



**HAL**  
open science

# Maladie d'Alzheimer et polyphénols : effet des tanins sur la phosphorylation de la protéine Tau

Charlotte Fleau

## ► To cite this version:

Charlotte Fleau. Maladie d'Alzheimer et polyphénols : effet des tanins sur la phosphorylation de la protéine Tau. Chimie organique. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0776 . tel-01941709

**HAL Id: tel-01941709**

**<https://theses.hal.science/tel-01941709>**

Submitted on 2 Dec 2018

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE**  
**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES  
SPÉCIALITÉ : CHIMIE ORGANIQUE

Par Charlotte FLEAU

**MALADIE D'ALZHEIMER ET POLYPHENOLS :**  
**Effet des tanins sur la phosphorylation de la protéine Tau.**

Sous la direction de : Magali SZLOSEK

Soutenue le 1<sup>er</sup> Décembre 2017

Membres du jury :

M. MERILLON, Jean-Michel  
Mme ENJALBAL, Christine  
Mme GRIMAUD, Laurence  
Mme LANDRIEU, Isabelle  
Mme SZLOSEK, Magali

Professeur, Université de Bordeaux  
Professeur, Université de Montpellier  
Directrice de Recherche, ENS (Paris)  
Directrice de Recherche, Université de Lille  
Maître de Conférences, Université de Bordeaux

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Directrice de thèse

## Remerciements

Je tiens d'abord à remercier Christine Enjalbal, Professeur à l'Université de Montpellier, et Laurence Grimaud, Directrice de recherches à l'École Normale Supérieure de Paris, d'évaluer mon manuscrit de thèse. Je remercie également Patrick Toullec, Professeur à l'Université de Bordeaux d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je souhaite également remercier Jean-Michel Merillon, Professeur à l'Université de Bordeaux, et Isabelle Landrieu, Directrice de Recherche à l'Université de Lille, d'avoir accepté de faire partie des membres de mon jury de thèse.

Je tiens particulièrement à remercier Magali Szlosek, ma directrice de Thèse, pour m'avoir accordé sa confiance sur ce beau projet, et ce depuis la Licence. Cela fait désormais 8 ans que je connais Magali puisque c'est elle qui m'a donné mes premiers cours de Chimie à l'Université de Bordeaux. Ses cours m'ont vraiment donné goût à la Chimie et aux Sciences du vivant et je l'en remercie car c'est avec des enseignants de cette qualité que l'envie d'apprendre nous envahit ! Pendant la thèse son enseignement m'a encore été profitable et ses qualités de directrice m'ont vraiment permis de m'épanouir pleinement pendant ces trois années ! Merci encore et mon souhait maintenant est qu'elle trouve quelqu'un pour faire continuer de vivre ce projet.

Je remercie également le Professeur Eric Fouquet, Directeur de l'ISM, pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe CSH ! Pendant ces trois ans il m'a fait part de ses connaissances et de ses conseils. Tout comme Magali je le connais depuis mes premiers pas à l'Université et c'était un vrai plaisir de suivre ses cours. Toujours très joyeux c'était vraiment agréable de travailler avec Eric.

Lors de ma thèse, j'ai passé une semaine à Lille dans le laboratoire d'Isabelle Landrieu et je l'en remercie. Elle m'a apporté de nouvelles connaissances en RMN et en synthèse de Protéines en prenant vraiment le temps de tout bien m'expliquer. Travailler pendant ces quelques jours avec Isabelle était vraiment une belle expérience et je la remercie grandement de m'avoir accueillie aussi chaleureusement. Merci aussi pour l'aide à la rédaction de notre publication, on y est presque !

En parlant de RMN, je remercie Isabelle Pianet qui a dirigé ma thèse la première année. Même si cela fût bref c'était une très bonne expérience qui m'a permis d'acquérir de nouvelles connaissances et compétences avec cet outil indispensable pour nous chimistes !

Je remercie Murielle Berlande, la maman du labo et technicienne en chef du groupe CSH de toujours être là pour nous les petits thésards ! Je tiens particulièrement à la remercier pour les synthèses peptidiques, cela n'a pas toujours été facile et il y en a un qui nous a résisté mais elle n'a jamais baissé les bras ! Elle est super notre Mumu !! Ils ont vraiment de la chance les prochains étudiants.

Je tiens également à remercier les différents permanents de l'équipe, Patrick Toullec, Philippe Hermange et Frédéric Cantagrel. Toujours plein d'idées et un partage immense de connaissances, on a beaucoup de chance de les avoir ! Là aussi la bonne humeur partagée permet de travailler dans de très bonnes conditions. Une équipe CSH en Or avec laquelle on a beaucoup partagé autour des barbecues annuels !

Je remercie Cybille et Yannick, responsables du plateau RMN de m'avoir laissé utiliser les spectros quand j'en avais besoin et ce de manière très arrangeante ! Mais aussi pour leurs conseils et connaissances en RMN. A Cybille, que j'ai rencontré pendant mon stage de Licence quand elle était doctorante dans l'équipe, gardes cette super bonne humeur que tu nous partages tous les jours ! Et merci de m'aider pour la suite, maintenant la RMN n'a plus de secrets pour toi !

Je remercie également le service masse du Cesamo, Claire et Patricia, pour m'avoir caractérisé mes produits et pour m'avoir laissé le MALDI pour mes nombreux tests ! C'était très agréable de travailler avec elles !

Bien entendu, le Cesamo c'est aussi sa directrice, Christelle. Je tiens particulièrement à la remercier car c'est grâce à elle que j'ai acquis de nouvelles compétences en masse. Très patiente, elle m'a partagé plein de connaissances et cela vaut un gros Merci ! Il en faut aussi un pour toute la mise au point du procédé de suivi car cela n'a pas été toujours simple, mais elle a toujours trouvé des solutions !

Je remercie également les artistes de notre laboratoire, les doctorants avec qui j'ai partagé un peu de temps, pour certains se sont devenus de vrais amis ! Tout d'abord Thomas, qui a été avec moi dès que je suis arrivée, sa bonne humeur a toujours été très plaisante au labo et je le remercie de m'avoir bien accueillie au début de ma thèse. Je te souhaite le meilleur avec ta

petite famille ! Ensuite, Marion arrivée au cours de ma deuxième année, un peu de girl power dans ce labo de garçons ! Et enfin Julien et Nicolas arrivés sur ma dernière année, bien trop tard je trouve ! On a bien rigolé ! Je remercie aussi les membres de l'équipe du Pr Yannick Landais, Jonathan, Vincent, Anthony, Chahinez et Lisa pour la bonne humeur au quotidien !

J'ai également une pensée pour mes stagiaires ! Les masters : Paloma, il lui en a fallu du courage pour la mise au point de la chloration, Alexia et Marine qui ont tout donné pour la click. Les licences : Hervé, Prisca et Maxime qui ont fait beaucoup de start mat, pas toujours facile, c'est ça être un chimiste !! Merci à eux.

Un grand merci à ma famille, mes parents et mes sœurs qui ont toujours été là pour moi et qui ont accepté mes choix. Merci pour votre soutien, je vous aime ! Un grand merci aussi à ma belle-famille adorée qui eux aussi font preuve d'un grand soutien dans cette épreuve.

Merci aussi à mes amis particulièrement à Morgane, toujours d'un grand soutien et avec qui je partage des grands moments de complicité depuis le collège. Je remercie aussi ma petite Pops avec qui j'ai partagé le Master ici à Bordeaux, ma miss potin en tout genre et son super mari, Bastien. Merci à ma Hélène que je ne vois pas souvent mais avec qui je suis toujours aussi proche. Je remercie aussi ma petite Mathilde avec qui on partage beaucoup depuis le collège ! Merci aussi à tous les autres !

Enfin, le dernier mot revient à mon Alexis, membre de notre groupe et avec qui je partage de merveilleux moments depuis plus d'un an. Merci d'être là pour moi pour cette dernière épreuve, merci d'être là à mes côtés tous les jours, merci d'embellir mes journées... Il y en a beaucoup d'autres dire mais tu sais l'essentiel. Ce n'est que le début d'une belle histoire !

# Table des matières

Abréviations .....	7
Introduction Générale .....	11
Bibliographie .....	15
I. La Maladie d'Alzheimer .....	16
1) Généralités .....	16
2) La protéine Tau .....	20
a) Structure et rôles .....	20
b) Les modifications post traductionnelles .....	23
II. Les polyphénols .....	39
1) Généralités .....	39
a) Classification des polyphénols .....	39
b) Structure des procyanidines .....	42
c) Les polyphénols et la santé .....	44
2) Les polyphénols et la MA : données initiales .....	47
a) Les Polyphénols et les plaques amyloïdes .....	48
b) Les Polyphénols et la Protéine Tau .....	50
3) Interactions polyphénols-Tau : Informations moléculaires .....	52
a) Origine de l'étude .....	52
b) Procyanidines et Protéine Tau .....	54
Résultats .....	59
I. Synthèses des Polyphénols .....	60
1) Synthèses de dimères de type C4-C8 .....	60
a) Stratégie de Synthèse .....	60
b) Synthèse des monomères fonctionnalisés .....	62
2) Synthèse d'un dimère de type C4-C6 .....	78
a) Tests de reproductibilité de la synthèse du B6 selon Suzuki .....	80
b) Mise au point de la synthèse du B6 .....	84
II. Etudes d'interactions peptides/polyphénols par RMN .....	105
1) Généralités .....	105
2) Interactions Polyphénols et P1P2 .....	109
a) Caractérisation de P1P2 .....	109
b) Interactions P1P2- EGCG .....	119

3) Interactions Polyphénols et Tau intégrale .....	124
a) Biosynthèse de la protéine Tau marquée à l'azote 15.....	125
b) Tests d'interactions .....	129
III. Etudes de la phosphorylation des peptides modèles par Spectrométrie de Masse ..	134
1) Choix des enzymes .....	135
2) Mise au point de la phosphorylation sur les peptides P1 et P2.....	138
3) Détermination du site de phosphorylation.....	152
4) Inhibition de la phosphorylation.....	156
5) Mise au point de la phosphorylation sur P1P2 .....	161
IV. Etudes du passage des polyphénols à travers la BHE .....	165
1) Généralités .....	165
2) Les modèles de BHE .....	166
3) Polyphénols et TEP .....	172
a) Chimie « click » et polyphénols.....	178
b) Silylation directe des polyphénols en position 8.....	187
Conclusions et Perspectives .....	193
Experimental Section .....	197
Annexes.....	243
Références Bibliographique .....	255

## Abréviations

A $\beta$  : Amyloïde  $\beta$

AB : Alcool Butargylique

ACN : ACétoNitrile

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADP : Adénosine DiPhosphate

AFM : Microscopie à Force Atomique

AP : Alcool Propargylique

APP : Amyloid Precursor Protein

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

ATP : Adénosine TriPhosphate

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

°C : degré Celsius

CDK5 : Cyclin-Dependent Kinase 5

CE : Cellules Endothéliales

CHIP : Carboxyterminus of Hsc 70 Interacting Protein

CK : Caséine Kinase

CMC : Concentration Micellaire Critique

COSY : COrrrelation SpectroscopY

d : day

DCC : DiCyclohexylCarbodiimide

DCM : DiChloroMéthane

DDQ : DichloroDicyanoQuinone

DIC : DIisopropylCarbodiimide

DIEA : DIethylAmine

DIPEA : DIsoPropylEthylAmine  
DMAP : DiMéthylAminoPyridine  
DMF : DiMéthylFormamide  
DNF : Dégénérescences NeuroFibrillaires  
DOSY : Diffusion Order SpectroscopY  
DYRK1A : Dual specificity tyrosine-phosphorylation-Regulated Kinase 1A  
ECG : EpiCatéchine Gallate  
EDCI : 1-Ethyl-3-(3-Diméthylaminopropyl)CarbodIimide  
EGCG : EpiGalloCatéchine Gallate  
EtOAc : Ethyl Aetate  
EtOH : Ethanol  
éq : équivalents  
ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène  
eV : électron-Volts  
FDA : Food and Drug Administration  
FDG : FluoroDésoxyGlucose  
g : grammes  
GlcNAc : N-ActétylGlucosamine  
GSK3 : Glycogène Synthase Kinase 3  
GTP : Guanosine TriPhosphate  
h : heures  
HBTU : (2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-TétraméthylUronium Hexafluorophosphate  
HHDP : acide Hexa-Hydroxy-DiPhénique  
HMBC : Heteronuclear Multible Bond Correlation  
HPLC : High Performance Liquid Chromatography  
HSP : Heat Shock Protein  
HSQC : Heteronuclear Single Quantum Correlation

Hz : Hertz

IC<sub>50</sub> : Concentration Inhibitrice médiane

j : jours

K : Kelvin

kDa : kiloDalton

L : Litres

LC : Liquid Chromatography

M : mol. L<sup>-1</sup>

MA : Maladie d'Alzheimer

MAP : Microtubule-Associated Proteins

MAP kinases : Mitogen-Activated Protein kinases

MARK : Microtubule Affinity-Regulating Kinases

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

mn : minutes

MS : Spectrométrie de Masse

MW : Micro-ondes

NBS : N-BromoSuccinimide

NCS : N-ChloroSuccinimide

NOE : Nuclear Overhauser Effect

NOESY : Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

OGA : O-GlcNAcase

OGT : O-GlcNAc transferase

p : page

PDPK : Proline-Directed Protein Kinases

PEG : PolyEthylèneGlycol

pH : potentiel Hydrogène

PHPB : Hydrobromure-PerBromure de Pyridinium

PHF : Paired of Helical Filaments  
pI : point Isoélectrique  
PK : Phosphorylase Kinase  
PP2A : Protéine Phosphatase 2A  
PRP : Protéine Riche en Prolines  
pTau : Tau phosphorylée  
PTC : PhénylisoThioCyanate  
PTH : PhénylThioHydantoïne  
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire  
rt : room temperature  
STD : Saturation Transfer Difference  
SF : Straight Filaments  
t : temps  
T : Température  
ta : température ambiante  
tR : temps de Rétention  
TEP : Tomographie par Emissions de Positons  
term : terminal  
TFA : acide TriFluoroAcétique  
THF : TétraHydroFurane  
TMS : TriMéthylSilyle  
TOCSY : TOtal Correlation SpectroscopY  
TPK : Tyrosine Protein Kinases  
TTBK: Tau-TuBulin Kinases  
UDP : Uridine DiPhosphate  
W : Watts

# **Introduction Générale**

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative caractérisée par une perte neuronale et par l'accumulation d'agrégats de protéines dans certaines régions du cerveau.<sup>[1]</sup> Ces physiopathologies entraînent une altération des capacités cognitives, comme la perte de la mémoire, du langage, du raisonnement ou encore de l'orientation dans le temps ou dans l'espace.<sup>[2]</sup> L'extension de la maladie provoque un déclin progressif de l'autonomie du patient. Les premiers neurones atteints dans la MA sont ceux situés dans l'hippocampe, zone responsable de la mémoire, c'est pour cela que cette maladie est la forme la plus connue de démence dont le premier facteur de risque est l'âge. En effet, 5% de la population est affectée à partir de 65 ans et 20% à partir de 80 ans. A l'heure actuelle, 30 millions de personnes souffrent de cette maladie et des études montrent que l'on devrait atteindre 100 millions d'ici 2050.<sup>[3]</sup> Malgré de nombreuses recherches visant à caractériser la MA et à développer d'éventuelles thérapies depuis plusieurs années, il n'existe à ce jour aucun traitement contre cette maladie qui est la 4<sup>ème</sup> cause de décès dans le monde. A ce jour, la MA ne peut être confirmée sans ambiguïté qu'après le décès du patient, alors que les premières lésions cérébrales apparaissent 10 à 15 ans avant l'apparition des symptômes ou manifestations cliniques.<sup>[4]</sup>

C'est pour ces différentes raisons qu'il est à ce jour essentiel de trouver des outils permettant la détection de la maladie d'Alzheimer de manière plus précoce ce qui devrait permettre à la fois de la prévenir de manière plus efficace ainsi que de trouver finalement une thérapie.

La pathogenèse de la maladie reste encore assez floue à ce jour. Toutefois, il a été montré que deux protéines, la  $\beta$  amyloïde et la protéine Tau, seraient à l'origine de la MA. Dans le cas de la protéine Tau, une hyper phosphorylation de celle-ci serait à l'origine de la désorganisation des neurones et d'une dégénérescence dite neuro-fibrillaire qui entrainerait, à terme, la mort des neurones. L'origine de l'hyper phosphorylation n'est pas clairement élucidée à ce jour, mais un déséquilibre entre l'activité des kinases, enzymes responsables de la phosphorylation, et des phosphatases, enzymes responsables de la déphosphorylation, en serait une des causes.<sup>[5]</sup>

Les polyphénols sont connus comme étant des substances à activités biologiques diverses telles que antibiotique, antivirale, anticancéreuse, antidiabétique et ils se sont de plus avérés être des neuroprotecteurs.<sup>[6]</sup> Certaines études montrent que les polyphénols pourraient être des inhibiteurs de l'agrégation de la protéine Tau, responsable de la formation de la dégénérescence neuro-fibrillaire.<sup>[7]</sup> Des travaux antérieurs, effectués au sein de l'équipe, ont

montré que les flavanols sont capables d'interagir avec des fragments de la protéine Tau et plus particulièrement avec des fragments issus de la région riche en proline qui est fortement impliquée dans l'hyper phosphorylation de Tau.<sup>[8]</sup>

Suite à ces résultats obtenus dans la littérature et au laboratoire, il a été envisagé de poursuivre ces travaux de manière à corréler les résultats initiaux d'affinités polyphénols/Tau et leurs capacités d'inhibitions de la phosphorylation *via* l'utilisation de peptides modèles issus de la région riche en proline. En parallèle de ces travaux, il a été initié une étude sur la possibilité de synthétiser des dérivés fluorés des flavanols ayant manifestés les meilleures affinités en vue d'accéder ultérieurement à des radiotraceurs pour l'imagerie TEP. Dans l'optique de diversifier les structures des polyphénols testés, il a été également mis au point une voie d'accès efficace pour l'obtention du dimère B6, à jonction C4-C6.

Dans une première partie bibliographie vont être décrites les généralités sur la MA ainsi que sur la protéine Tau, en décrivant de manière précise le processus de phosphorylation. La bibliographie permettra également d'introduire les polyphénols puis de voir comment ils sont d'ores et déjà utilisés dans le cas des différentes physiopathologies de la MA. Dans une seconde partie seront présentés les résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse en explicitant tout d'abord les synthèses des différents dimères et notamment du B6. Ensuite, les résultats des études RMN sur les peptides ainsi que sur la protéine Tau seront présentés. Un troisième point présentera les tests d'inhibition de la phosphorylation suivis par spectrométrie de masse et enfin l'étude sur le passage des polyphénols à travers la BHE sera explicitée.



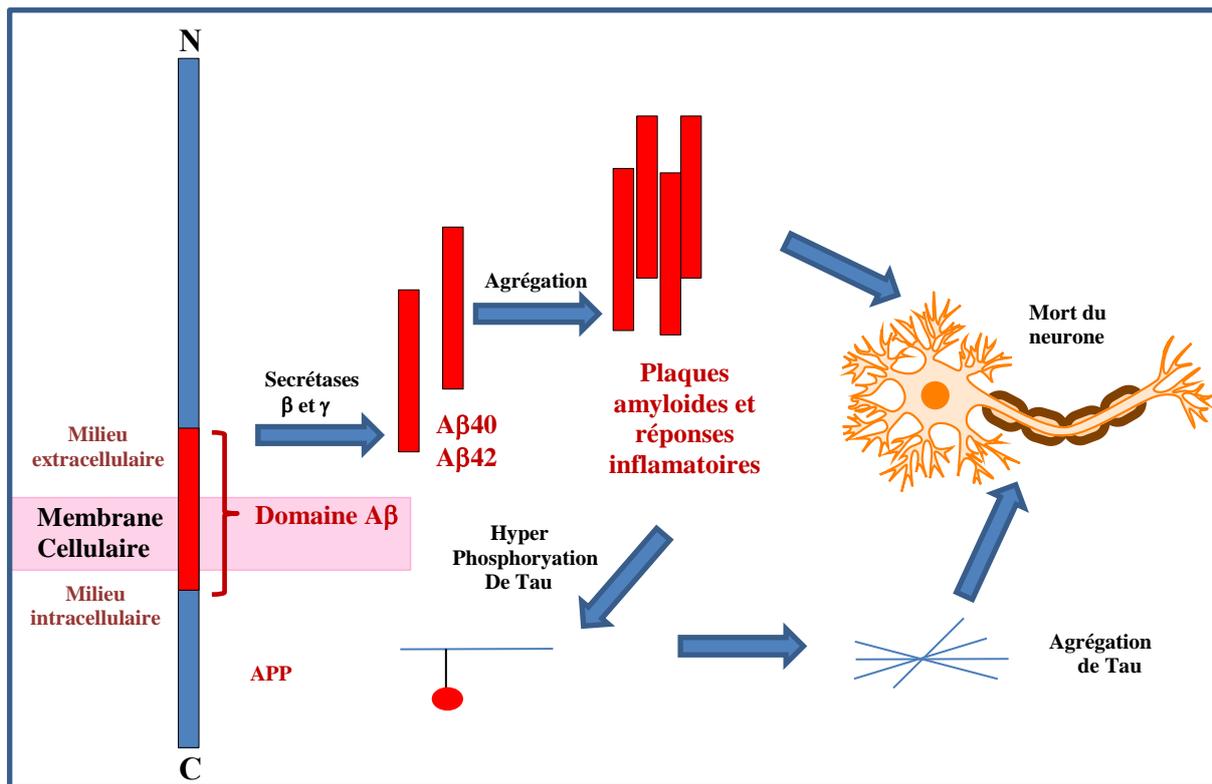
# **Bibliographie**

## I. La Maladie d'Alzheimer

### 1) Généralités

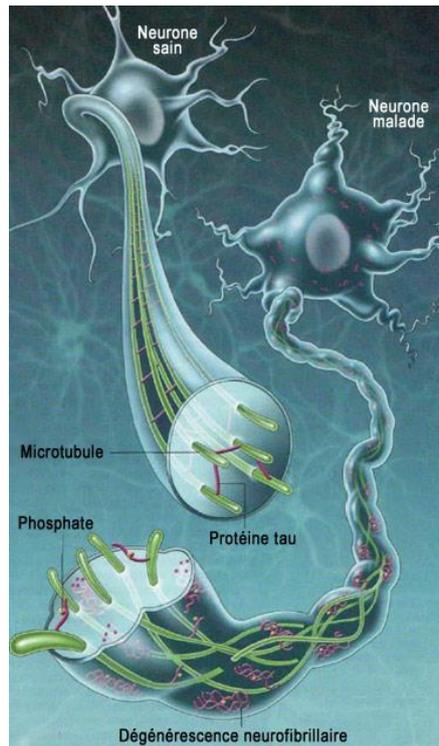
La maladie d'Alzheimer, décrite pour la première fois par Aloïs Alzheimer en 1906, est une dégénérescence des neurones qui débute au niveau de l'hippocampe et s'étend au reste du cerveau. Celle-ci implique une détérioration de la mémoire et est caractérisée par une neuro-dégénérescence progressive en raison d'importantes atrophies neuronales avec perte concomitante de synapses dans différentes régions du cerveau, conduisant à terme à une atrophie cérébrale généralisée.<sup>[4]</sup> La physiopathologie de la maladie est à ce jour encore au cœur de nombreuses études de par sa complexité et de par les nombreux facteurs impliqués. En effet, de nombreux dérèglements biologiques vont être à l'origine de la maladie dont le stress oxydatif lié à un dysfonctionnement mitochondrial<sup>[9]</sup>, la neuro inflammation engendrée par une activation de la réponse des cellules gliales<sup>[9]</sup> ou encore la diminution parfois massive de neurotransmetteurs. L'étude du cerveau de patients atteints de la MA, a montré deux types de lésions caractéristiques : les plaques amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires.

**Les plaques amyloïdes**, également appelées plaques séniles, sont composées d'un petit peptide de 4kDa, le  $\beta$  amyloïde ( $A\beta$ ).<sup>[10]</sup> Ce peptide est généré physiologiquement à partir d'une glycoprotéine membranaire, l'APP (amyloid precursor protein) localisée principalement autour des synapses et dont le rôle est crucial pour la plasticité neuronale et pour la formation des synapses.<sup>[11]</sup> Dans un neurone sain cette protéine va être clivée par deux enzymes, l' $\alpha$  et la  $\gamma$  sécrétases, conduisant à la forme soluble de l'APP (sAPP  $\alpha$ ) ayant un rôle important dans la neuroprotection.<sup>[12]</sup> Certaines mutations de l'APP, des facteurs environnementaux, le stress oxydatif ou encore un dysfonctionnement de l'appareil de Golgi vont être à l'origine de la formation de peptides toxiques.<sup>[13]</sup> En effet, un double clivage de la protéine est réalisé par la  $\beta$  sécrétase et par la  $\gamma$  sécrétase conduisant à la formation de deux peptides amyloïdogéniques  $A\beta$  de 40 et 42 acides aminés, le peptide  $A\beta_{42}$  se trouvant être la forme la plus toxique.<sup>[14],[15]</sup> Dans le cas de la MA, les peptides  $A\beta$  vont s'agréger dans le milieu extracellulaire et ce dépôt serait à l'origine de la « cascade amyloïde » décrite pour la première fois par Hardy et Higgins en 1992 (**Fig. 1**).<sup>[16]</sup> Selon certaines hypothèses, ce dépôt engendrerait l'activation de certaines enzymes, comme la GSK3 $\beta$  (kinases) à l'origine de l'hyper phosphorylation de Tau puis de son agrégation conduisant à la perte neuronale et à la démence.<sup>[17]</sup>



**Figure 1** : La cascade amyloïde.

**Les dégénérescences neurofibrillaires** sont localisées à l'intérieur de la cellule neuronale et sont composées de protéines Tau hyper phosphorylées. Tau est principalement localisée dans les neurones et appartient à la famille des protéines liées aux microtubules (MAP : Microtubule-Associated Proteins). Le rôle de la protéine est de permettre la polymérisation ainsi que la stabilisation des microtubules. La phosphorylation de Tau est un processus régulé du stade fœtal à l'adulte permettant d'accroître l'affinité de la protéine pour les microtubules et concerne notamment les résidus sérines et thréonines. L'hyper phosphorylation de Tau est un phénomène observé chez les patients atteints de la MA et la cause principale serait un déséquilibre entre l'activité des kinases et des phosphatases.<sup>[12]</sup> Ce dysfonctionnement enzymatique est à l'origine de la baisse d'affinité de Tau pour les microtubules et, une fois décrochée des microtubules, la protéine va s'agréger sous formes de filaments appelés PHF (Paired of Helical Filaments) formant les DNF (Dégénérescences NeuroFibrillaires).<sup>[18]</sup> Cette cascade d'évènements affecte les fonctions cellulaires normales des neurones comme le maintien de la morphologie cellulaire, la transmission synaptique et le transport axonal conduisant à terme à la mort du neurone (**Fig. 2**).



**Figure 2** : Représentation de la dégénérescence neurofibrillaire.

A ce jour, la cause exacte de l'apparition de la maladie reste encore inconnue. Il peut toutefois être noté que des facteurs environnementaux (stress oxydatif, commotion cérébrale, médicaments...) ou des facteurs biologiques (génétique, réponse inflammatoire anormale...) peuvent promouvoir la MA.<sup>[19],[20]</sup> En effet, malgré d'intenses recherches et de conséquents progrès dans la compréhension du mécanisme moléculaire exact de la maladie, on ne peut encore définir de manière complète son origine. A ce jour, d'importantes avancées ont été faites pour comprendre les processus moléculaires et biologiques régissant la formation de la cascade amyloïde et l'hyperphosphorylation de la protéine Tau. Toutefois, malgré des découvertes majeures sur ces physiopathologies caractéristiques, il n'existe à ce jour aucun traitement contre la maladie d'Alzheimer et 11 molécules testées sur ces dernières années ont échoué lors des tests pré-cliniques.<sup>[9]</sup> Pendant de nombreuses années la recherche s'est focalisée sur l'inhibition de la formation des plaques séniles afin de perturber la cascade amyloïde. En 2012 deux anticorps capables de cibler les peptides A $\beta$ , le Bapineuzumab et le Solanezumab, ont échoué en phase III des essais cliniques.<sup>[21],[22]</sup> La cause de cet échec serait liée à l'action dirigée vers une étape trop tardive dans le processus amyloïde ou dans le ciblage unique du peptide A $\beta$  qui ne suffirait pas à stopper le processus neurodégénératif.<sup>[4]</sup> En effet, des études ont montré qu'un lien existait entre la formation d'agrégats de peptides A $\beta$  et la toxicité de la protéine Tau et qu'il est donc crucial de cibler également l'agrégation

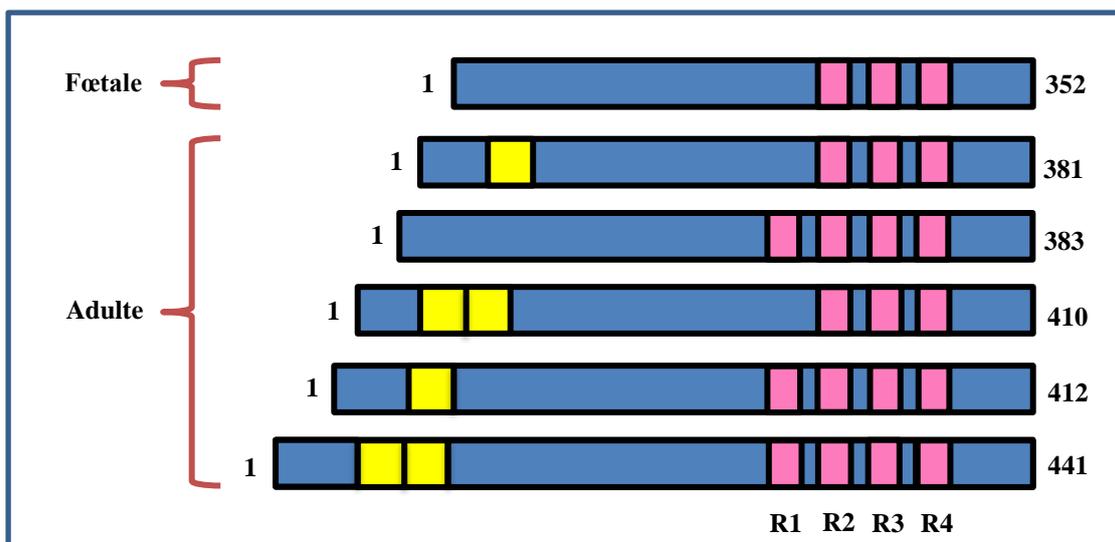
de la protéine Tau pour empêcher le déclin cognitif.<sup>[7]</sup> De plus, de nombreuses recherches démontrent que la formation des dégénérescences neurofibrillaires serait la cause principale de la MA, de par leur absence dans un cerveau sain, associée à leur localisation intracellulaire et de par le fait que leur densité seraient directement corrélée au stade de la démence.<sup>[23]</sup> C'est pour ces raisons que de nombreuses équipes essayent, depuis quelques années, de trouver des inhibiteurs d'agrégation de la Protéine Tau.

## 2) La protéine Tau

La protéine Tau a été découverte dans les années 70 dans le cadre de l'étude de la formation des microtubules.<sup>[24]</sup> Tau est une protéine hydrophile appartenant à la famille des protéines associées aux microtubules (MAPs). Elle est principalement retrouvée dans les neurones et plus particulièrement dans les axones et dans les dendrites.<sup>[25]</sup> Toutefois, Tau peut être trouvée à l'état de traces dans certaines cellules non neuronales.<sup>[1]</sup>

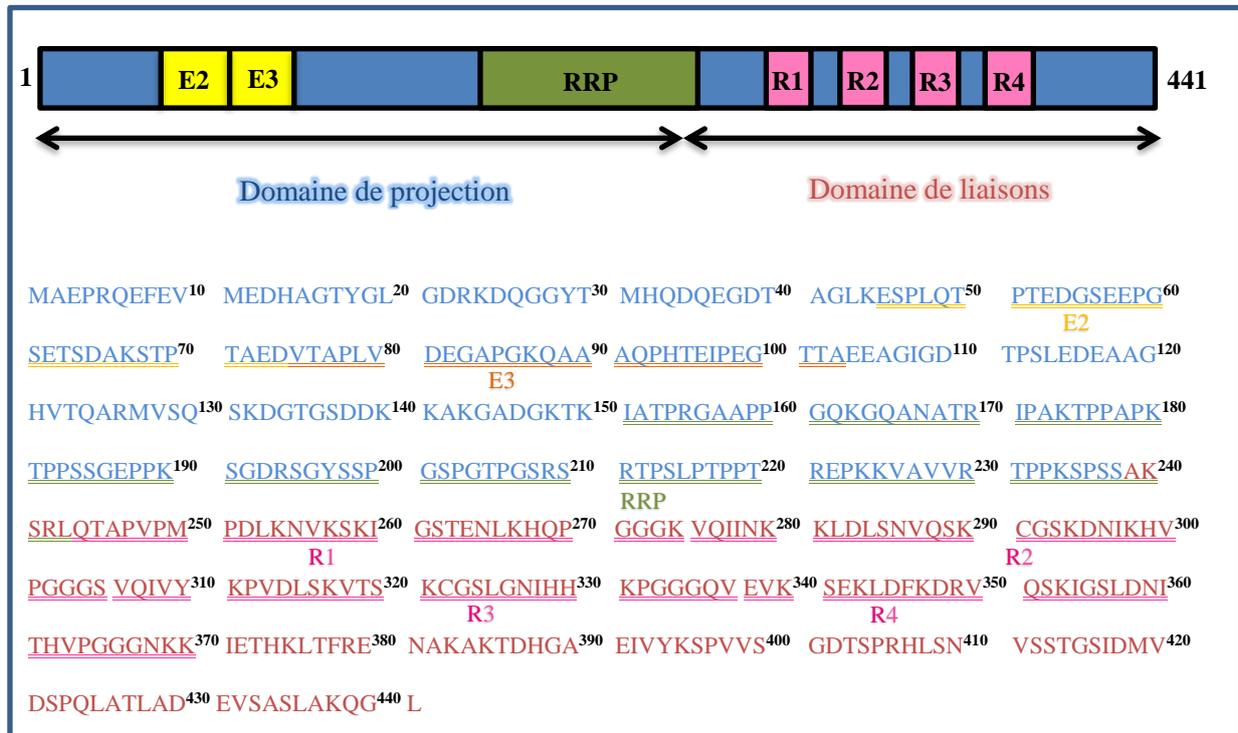
### a) Structure et rôles

Le gène codant pour la protéine Tau est situé sur le chromosome 17 en position 17q21 et, à l'issue de l'épissage alternatif, l'ARNm conduit à la formation de 6 isoformes dans le cerveau humain (**Fig. 3**).<sup>[26]</sup> Ils sont composés de 352 à 441 acides aminés et leurs poids moléculaires respectifs se situent entre 45 et 65kDa. Ces isoformes diffèrent par la présence de trois ou quatre séquences de répétitions (R1-R4 composés de 31 ou 32 résidus) dans la région C-terminale de la protéine et par l'absence ou par la présence de 1 ou 2 inserts (29 ou 58 acides aminés) dans la région N-terminale.<sup>[27]</sup> Par la présence ou l'absence de certaines régions, les isoformes de Tau vont avoir des rôles physiologiques différents. De plus, ces isoformes sont exprimés de manières différentes au cours du développement. Par exemple, l'isoforme composé de 3 séquences de répétitions et n'ayant pas d'inserts dans la région N-terminale est le seul existant au stade fœtal. Toutefois, les 6 isoformes sont exprimés à l'âge adulte.<sup>[28]</sup>



**Figure 3 :** Représentation des 6 isoformes de Tau.

Quel que soit l'isoforme, la protéine Tau peut être divisée en deux larges domaines : le domaine de liaison aux microtubules et le domaine de projection (**Fig. 4**).



**Figure 4** : Représentation de la Protéine Tau et séquence de l'isoforme 441.

Diverses études ont montré que cette protéine est complètement désorganisée ce qui va la rendre particulièrement flexible.<sup>[24]</sup> Tau est un dipôle composé de deux domaines dont les charges sont opposées comme le traduisent les points isoélectriques du domaine N-term : pI = 3.8, de la Région Riche en Prolines (RRP) pI = 11.4 et du domaine C-term 10.8.

### 1. Domaine de projection

Le domaine de projection se caractérise par l'absence ou la présence de deux inserts (E2 et E3). Ces inserts, composés de 29 acides aminés, ont la particularité d'être fortement acide et ils sont suivis par une région basique composée majoritairement de prolines (RRP). Le domaine de projection se situe à la surface du microtubule ce qui lui confère la propriété d'interagir avec des éléments du cytosquelette et avec la membrane plasmique. Ces interactions sont possibles car la protéine Tau est liée à des filaments d'actine et de spectrine (protéines composant le cytosquelette) ce qui permet une connexion entre les microtubules et des éléments du cytosquelette comme les neurofilaments (fibres permettant le soutien du neurone).<sup>[4]</sup> Cela a également un impact sur la flexibilité des microtubules. Il a aussi été

démontré que ce domaine permet de contrôler l'espacement entre les microtubules ce qui influe donc sur le diamètre des axones. Ces résultats montrent l'importance de cette région N-terminale dans la stabilisation et l'organisation des axones. Rappelons que l'axone a un rôle primordial dans le bon fonctionnement du neurone car celui-ci permet notamment le transport de certaines molécules, d'organelles, de neurofilaments ou encore de vésicules.<sup>[29]</sup> Des études montrent que la protéine Tau a également un rôle dans la transduction de signal neuronal. Dans ce cas c'est la région riche en proline qui serait impliquée. En effet, cette région interagirait avec certaines enzymes et plus particulièrement des kinases comme la Fyn (protéine ciblant des tyrosines) appartenant à la famille des Src-kinases.<sup>[1]</sup> Cette interaction entraîne une modification de la forme des neurones en agissant sur l'actine présente au niveau du cytosquelette.

## 2. Domaine de liaison.

La protéine Tau se lie aux microtubules par le biais des séquences de répétition situées dans la partie C-terminale. Les isoformes de Tau peuvent posséder 3 ou 4 séquences de répétition qui sont composées de 18 résidus hautement conservés et sont séparées par 13 ou 14 résidus. Par le biais de ces séquences de répétition, la protéine Tau est capable de se lier aux microtubules, ce qui a pour effet de les stabiliser. Cette stabilisation est cruciale car les microtubules permettent une conservation de la morphologie cellulaire, notamment au niveau des axones, ce qui a un effet direct sur le transport de molécules ou d'organelles entre les neurones. Il a été démontré que les isoformes possédant 4 séquences de répétition ont une affinité plus importante pour les microtubules. Il est important de notifier que cette affinité Tau/Microtubule est régulée *via* des modifications post-traductionnelles telle que, en particulier, la phosphorylation, ce qui sera détaillé dans la seconde partie de ce chapitre. Ce domaine permet aussi la polymérisation des microtubules *via* les régions entre les séquences de répétition et plus spécifiquement la région située entre R1 et R2. Il a également été démontré que le domaine C-terminal avait un rôle dans la régulation de la phosphorylation de Tau. En effet, les positions 224 à 236 sont capables d'interagir à la fois avec les microtubules et avec la protéine phosphatase 2A (PP2A), une protéine capable de déphosphoryler Tau.<sup>[30]</sup> De ce fait, il existe une compétition directe entre les microtubules et la phosphatase ce qui va avoir un impact direct sur l'état de phosphorylation de la protéine. Il est possible d'imaginer qu'un déséquilibre au niveau de cette compétition peut entraîner des tauopathies.

Pour résumer, la protéine Tau est essentielle au bon fonctionnement des neurones, de par sa faculté à se lier aux microtubules, influençant ainsi la stabilité de ces derniers et régulée par des modifications post-traductionnelles, et de par sa capacité à interagir avec le milieu extracellulaire.

## b) Les modifications post traductionnelles

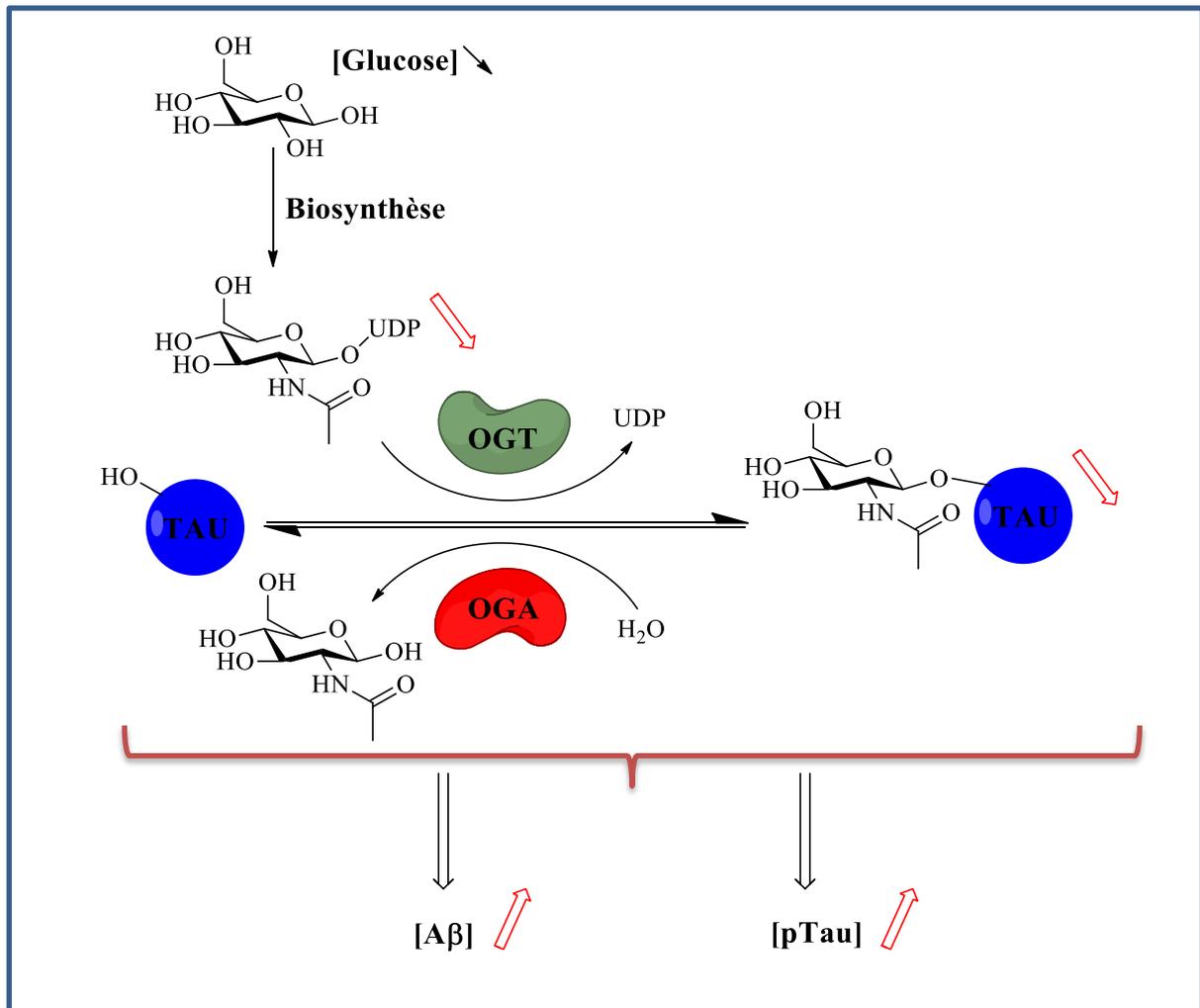
Après la traduction, permettant la transformation de l'ARNm en protéine, Tau va subir diverses modifications qui vont permettre de moduler les charges de la protéine ainsi que ses différents rôles. La phosphorylation, la glycosylation sont les phénomènes les plus décrits dans la littérature mais il a été mentionné à ce jour également l'ubiquitylation, l'oxydation, la nitration, la déamidation et la glycation.<sup>[26]</sup>

### 1. La glycosylation

La O-Glycosylation des protéines nucléocytoplasmiques fut découverte par l'équipe de Hart en 1984 et diffère de la O-Glycosylation des membranes ainsi que de celles des protéines extracellulaires.<sup>[31]</sup> La O-Glycosylation est une des modifications post traductionnelle la plus abondante et la plus dynamique de la protéine Tau. Celle-ci est caractérisée par l'addition d'un groupement N-actétylglucosamine sur les sérines et les thréonines (O-GlcNAc) à proximité de résidus prolines.<sup>[32],[33]</sup> Ce processus est régulé dans les cellules par deux enzymes : la O-GlcNAc transferase (OGT) permettant le transfert du groupement N-actétylglucosamine et par la O-GlcNAcase (OGA) qui catalyse le départ de ce groupement (**Fig. 5**). Cette modification post traductionnelle va avoir différents rôles au sein de la cellule comme la régulation de la transcription, l'activation cellulaire, la régulation du cycle cellulaire et va permettre l'assemblage de complexes multi-protéiques.<sup>[34]</sup> Depuis une dizaine d'années, des équipes de recherche travaillent sur un lien existant entre la O-GlcNAcylation et la phosphorylation car il s'avère que la phosphorylation de certains résidus spécifiques est régulée par l'ajout du groupement O-GlcNAc.<sup>[35]</sup> L'équipe de Lefebvre est la première à avoir démontré ce lien entre ces deux phénomènes en provoquant l'hyperphosphorylation de Tau qui a conduit une diminution de l'incorporation du groupement O-GlcNAc.<sup>[36]</sup>

Dans le cas de la MA, les facteurs étiologiques à l'origine de la maladie sont encore étudiés. Toutefois, il a été démontré que certains facteurs métaboliques sont fortement liés à certaines lésions de la maladie.<sup>[37]</sup> En effet, avec l'âge le métabolisme du cerveau va être perturbé et la

première conséquence va être une baisse importante du taux de Glucose dans le cerveau affectant directement la O-GlcNAcylation et se traduisant par une chute de sites O-GlcNAc et par une augmentation de la phosphorylation de ces sites.<sup>[38],[39]</sup> En effet, des études de spectrométrie de masse ont démontré que les sites O-GlcNAc sont également des sites hyperphosphorylés (T123, S208, S238, S400, S409, S412 et S413).<sup>[35]</sup> Cela implique donc que la O-GlcNAcylation inhiberait le processus de phosphorylation empêchant donc la formation des DNF.



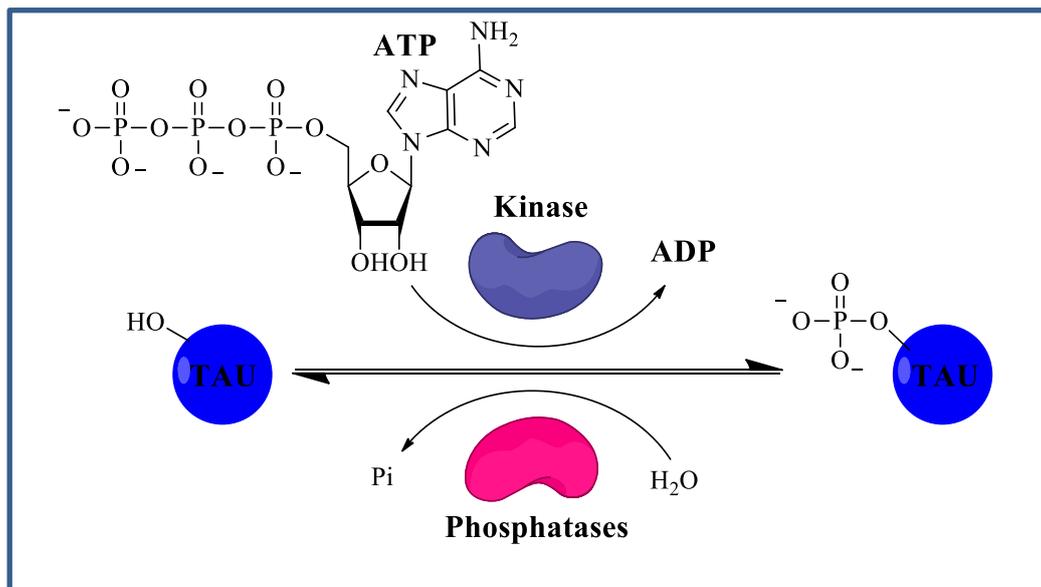
**Figure 5** : O-GlcNAcylation et maladie d'Alzheimer. Avec UDP : Uridine Diphosphate.

A ce jour, le lien entre la O-GlyNACylation et la maladie d'Alzheimer est toujours en cours d'étude. Afin de mieux comprendre le lien entre ce phénomène et la neurodégénérescence il est indispensable de connaître plus précisément la relation entre les sites de Tau impliqués dans le phénomène et les effets sur les neurones. Dans tous les cas, les enzymes responsables de cette modification post traductionnelle apparaissent comme des cibles prometteuses pour

prévenir la MA. En effet, inhiber l'OGA pourrait permettre une augmentation de la O-GlcNAcylation et ainsi réduirait la phosphorylation conduisant à terme à une neuroprotection.

## 2. La phosphorylation

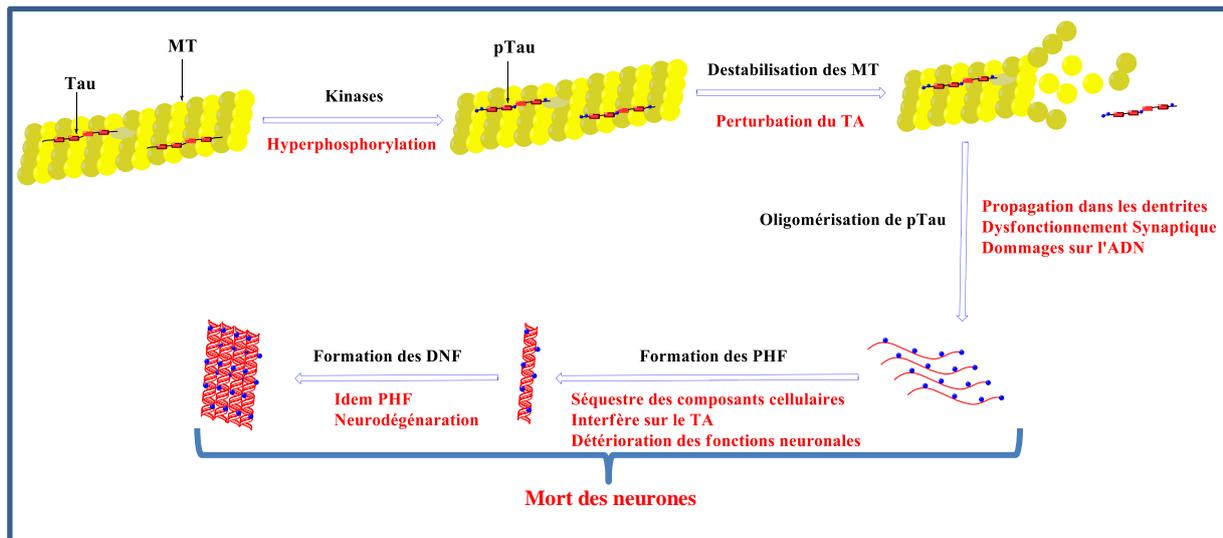
Depuis les années 80, Tau est définie comme une phosphoprotéine et la phosphorylation de cette dernière est au cœur de nombreuses recherches, notamment dans le cas des tauopathies. Cette modification post traductionnelle de Tau est la plus importante puisque 85 sites sont potentiellement phosphorylables dans le cas de l'isoforme le plus long. Parmi ces sites, 3 types de résidus peuvent être phosphorylés, dont 45 sérines, 35 thréonines et 5 Tyrosines.<sup>[40],[41]</sup> Afin de mieux comprendre le rôle de la phosphorylation physiologique et physiopathologique de nombreuses équipes ont cherché à identifier les différents sites de phosphorylation. L'équipe de Hanger *et coll.* a ainsi démontré que 9 sites sont phosphorylés dans le cas d'un neurone sain. Pour arriver à ce résultat, la protéine phosphorylée issue d'un cerveau sain a été étudiée par spectrométrie de masse (MS) en utilisant une technique de fragmentation de type MS/MS. Les résidus phosphorylés dans le cas d'un neurone sain sont les suivants : S46, S199, T181, S202, T231, S404 et deux parmi S412, S413 et T414.<sup>[40]</sup> La technique de masse n'a pas permis de détecter la thréonine 231 car ce résidu est localisé dans une séquence de 18 acides aminés dont l'analyse par MS/MS fut impossible. Toutefois l'étude de Morishima-Kawashima en 1995 avait permis de localiser ce site par le biais d'une autre technique utilisant le séquençage de peptides modifiés par l'éthanethiol.<sup>[42]</sup> Ce processus physiologique est régulé par un équilibre entre les activités de 2 enzymes, les kinases et les phosphatases. Les kinases vont permettre le transfert d'un groupement phosphate sur un alcool à partir d'une molécule d'ATP et les phosphatases vont déphosphoryler les protéines par élimination du groupement phosphate à partir d'une molécule d'eau (**Fig. 6**). La balance entre kinases et phosphatases est un processus qui va être régulé depuis le développement du stade fœtal jusqu'à l'adulte. En effet, au stade fœtal l'isoforme 352 va être davantage phosphorylé que dans le cas des isoformes plus long, cela va être essentiellement dû à l'activation des phosphatases au cours du développement. La phosphorylation est un processus important qui va moduler les propriétés de la protéine notamment l'affinité de Tau pour les microtubules grâce à une parfaite balance entre les activités enzymatiques décrites précédemment.



**Figure 6** : Phosphorylation de la protéine Tau.

Un déséquilibre entre l'activité des kinases et des phosphatases serait à l'origine de la maladie d'Alzheimer mais il n'a pas été tranché entre une suractivité des kinases ou une diminution de l'activité des phosphatases.<sup>[43]</sup> Or, il a été démontré dans de nombreuses études que l'état de phosphorylation de Tau influence la stabilité des microtubules par une diminution de l'affinité du domaine de liaisons de Tau envers ces derniers.<sup>[44]</sup> Dans le cas de la MA 45 résidus vont être phosphorylés conduisant à une protéine Tau dite hyperphosphorylée.<sup>[45]</sup> La conséquence directe de l'hyperphosphorylation va être la neutralisation de la protéine Tau dans les régions à proximité du domaine de liaisons aux microtubules. Ce changement d'état de charge de la protéine va ainsi influencer l'affinité de Tau pour les microtubules et également compenser le caractère répulsif de Tau ce qui va donc induire son agrégation sous forme de filaments neurotoxiques.<sup>[46]</sup> En effet, c'est en 1963 que les équipes de Kidd et Terry ont analysé les DNF à l'aide de la microscopie électronique ce qui leur a permis de découvrir que ceux-ci étaient composés de filaments.<sup>[47]</sup> Deux types de morphologies sont décrits pour ses filaments, les PHF et les SF (Straight Filaments). Dans le cas de la MA, Tau va principalement être présente sous la forme de PHF qui vont être constitués de 2 filaments de Tau enroulés l'un autour de l'autre formant ainsi une hélice. Les PHF ont une largeur variant entre 10-20nm et une demi-périodicité de 80 nm. Les SF sont des espèces minoritaires constituant les DNF et sont composés d'un seul filament de Tau. Le diamètre des SF est estimé à environ 10nm.<sup>[46]</sup> L'étude de la formation des DNF a été menée par diverses équipes dans le but de pouvoir inhiber cette agrégation de filaments à différentes étapes du processus de formation. Les DNF vont se former après 2 étapes clés, la première étant la phosphorylation de Tau provoquant

son détachement des microtubules ce qui a pour conséquence l'obtention de Tau « libre » dans le milieu intracellulaire. La seconde étape est l'association de protéines Tau au niveau de leurs domaines de répétitions conduisant à un assemblage protéique adoptant une conformation de type feuillet  $\beta$  qui est essentielle pour son agrégation. La dernière étape est l'assemblage des filaments en PHF conduisant à leurs agrégations formant ainsi les DNF (**Fig. 7**).<sup>[48]</sup>



**Figure 7 :** Les étapes de la formation des DNF et les conséquences sur les neurones. Avec TA : Transport Axonal et MT : Microtubules.

Les conséquences de la formation de ces DNF vont être multiples sur les neurones et vont apparaître à différents stades. Tout d'abord, l'hyper phosphorylation de Tau dans les domaines de répétitions vont causer le désassemblage des microtubules conduisant à un transport axonal réduit. En effet, la compétition entre Tau et les Kinésines n'existant plus, le transport d'organelles tout au long des microtubules est dérégulé. De plus, dans un neurone sain la protéine est également présente dans le noyau et son rôle est de maintenir l'intégrité de l'ADN génomique ainsi que de l'ARN cytoplasmique et de l'ARN nucléaire. La protéine Tau pathologique ne peut plus entrer dans le noyau ce qui conduit à des dommages sur l'ADN.<sup>[49]</sup> Enfin, les oligomères toxiques de Tau formés après la phosphorylation vont se propager dans les dendrites ce qui va avoir plusieurs conséquences comme la perte des épines dendritiques et des dysfonctionnements synaptiques conduisant notamment au blocage de la neurotransmission synaptique.<sup>[50]</sup> Cette cascade d'évènements conduit à terme à la neurodégénérescence et à la mort du neurone (**Fig. 7**).

A ce jour, différentes thérapies sont envisagées pour éviter la neurodégénération en ciblant différentes étapes conduisant à l'effet neurotoxique de la protéine Tau. La première stratégie serait de diminuer la production de Tau en limitant son expression. Pour cela, la synthèse d'inhibiteurs de la transcription semble être une piste thérapeutique intéressante. Supprimer l'hyperphosphorylation de Tau en inhibant des kinases ou en activant des phosphatases est au cœur de nombreuses recherches. Des molécules ciblant l'agrégation de Tau ont été testées lors d'essais précliniques dont un dérivé du bleu de méthylène, le LMTX. Ce composé a eu des effets bénéfiques sur des individus présentant de légers troubles pathologiques en phase II et les essais en phase III sont en cours. Enfin, la mort cellulaire pourrait également être évitée en synthétisant des stabilisateurs de microtubules. Un petit peptide (NAPVSIPQ), le NAP, a été testé en phase II et III mais n'a malheureusement pas montré d'effets bénéfiques.

L'inhibition des kinases est une des stratégies au cœur des études et semble être adaptée sachant qu'il a été montré que le dysfonctionnement synaptique et la perturbation du transport axonal précèdent la formation des DNF. De plus, l'équipe de Llinas a démontré dans une récente étude que les effets toxiques de Tau sur les fonctions synaptiques impliqueraient des enzymes telles que la GSK3 et la Cdk5.<sup>[50]</sup> Il semble donc nécessaire de s'intéresser aux différents sites de fixations et à ce qu'ils impliquent dans la maladie ainsi qu'aux différentes kinases.

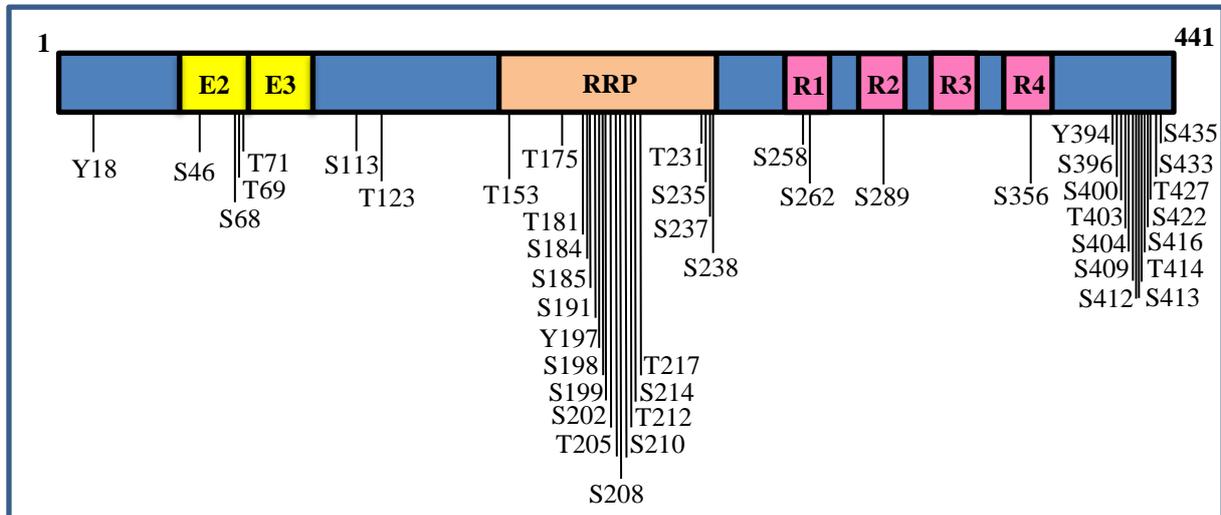
- [Les sites de phosphorylation](#)

Plusieurs techniques de séquençages protéiques ont permis de déterminer les sites de phosphorylation de la protéine Tau :

- La spectrométrie de masse par l'utilisation de technique de fragmentation de type MS/MS permet de recouvrir 90% des sites.
- La dégradation d'Edman qui consiste à cliver l'acide aminé terminal avec du phénylisothiocyanate (PITC) conduisant à un dérivé phénylthiohydantoïne (PTH)-acide aminé analysable par chromatographie ou par électrophorèse.
- L'utilisation d'anticorps phospho-spécifiques pouvant reconnaître des groupes de résidus spécifiques de la protéine appelés épitopes.

Dans le cas de la MA, 45 résidus sont phosphorylés ce qui correspond à plus de la moitié des sites potentiels de phosphorylation. La majorité de ces sites de phosphorylation sont localisés dans la région riche en proline et dans l'extrémité du domaine C-terminal. En effet, 27 sites sont recensés dans le domaine de projection dont 20 dans la RRP et 14 dans le domaine C-

terminal (**Fig. 8**).<sup>[3]</sup> Les 4 derniers sites sont localisés dans les domaines R1, R2 et R4 dont 2 sont phosphorylés dans des régions identiques (motif de type KXGS, avec X=I pour R1 et R4).<sup>[24]</sup>



**Figure 8** : Les sites de phosphorylation de Tau.

Le degré de phosphorylation de la protéine n'est pas le seul facteur déterminant de la gravité de la maladie. En effet, les phosphorylations spécifiques de certains résidus vont entraîner différents effets pathologiques. De nombreuses recherches utilisant la pseudo phosphorylation ont permis de démontrer les liens existants entre les effets de la phosphorylation de sites spécifiques et la MA. Le but de cette expérience est de mimer la phosphorylation en remplaçant un résidu potentiellement phosphorylable par un résidu négativement chargé.

Dans le domaine de liaisons aux microtubules et plus particulièrement dans les domaines de répétitions, est retrouvé un motif conservé de type KXGS. Des recherches ont démontré que remplacer les sérines de ces motifs (S262, S293, S324 et S356) par des acides aspartiques ou glutamiques induit des changements de configuration de Tau ayant un effet direct sur l'affinité de la protéine pour les microtubules et sur la stabilisation du cytosquelette.<sup>[43]</sup> Or, dans les tissus du cerveau de patients atteints de la MA la phosphorylation des motifs KXGS est présente sur 2 sites, la sérine 262 et la sérine 356.<sup>[51]</sup> De nombreuses recherches ont démontré que la phosphorylation de S262 a un rôle important dans la désassociation de Tau des microtubules et dans la perturbation du transport axonal. Toutefois, l'équipe de Grantham a récemment démontré que malgré ces effets sur les neurones, la seule phosphorylation de ce site n'est pas suffisante pour induire un déficit de la mémoire.<sup>[52]</sup> La phosphorylation des sérines 262 et 356 aurait également un effet inhibiteur sur certains complexes protéiques

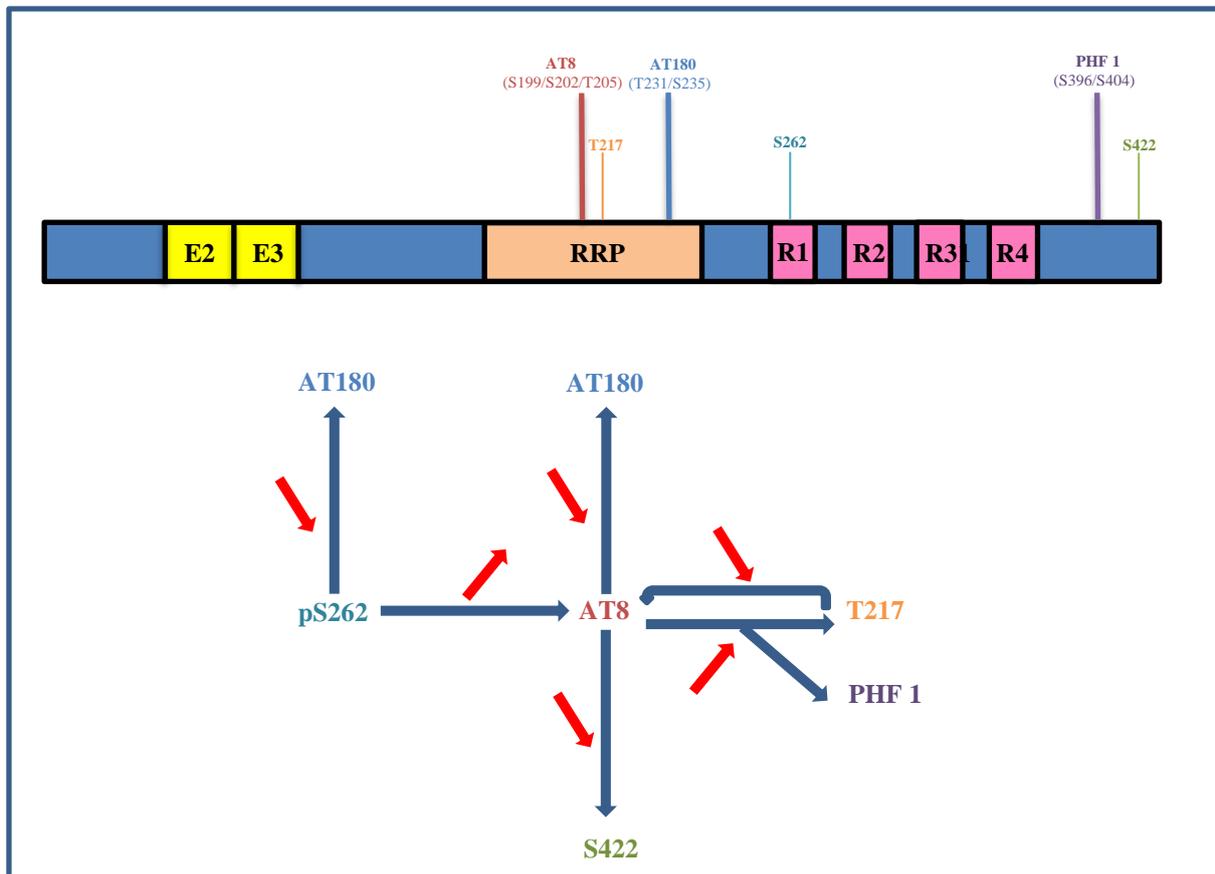
comme le complexe CHIP-HSP90 empêchant la dégradation de Tau. Les HSP (heat shock protein) permettent le repliement de protéines altérées suite à un stress, mais lorsque le repliement est trop complexe, les HSP forment un complexe avec les CHIP (Carboxyterminus of Hsc 70 Interacting Protein) qui permet de dégrader ces protéines.

A l'extrémité du domaine C-terminal, la phosphorylation de certains résidus va avoir pour effet d'accélérer la formation des PHF et des SF. L'équipe de Binder a montré qu'en remplaçant la S396 et la S404 par des acides Glutamiques la vitesse de formation des filaments était accélérée.<sup>[53]</sup> En 2004, l'équipe de Holzer a confirmé que la phosphorylation de ces sites induisait la formation de filaments et a également démontré que le seul remplacement de la sérine 422 avait le même effet. Contrairement aux S396 et S404, la Sérine 422 phosphorylée est très abondante dans les filaments extraits des tissus de cerveaux affectés par la MA.<sup>[54]</sup>

Dans la région riche en Proline, plusieurs sites ont été décrits comme étant des sites majeurs de phosphorylation de par leurs présences dans les cerveaux atteints de la MA et de par leurs rôles dans différents processus pathologiques. Dans les conditions physiologiques, la phosphorylation de la T231 est cruciale car elle permet la reconnaissance du résidu P232 par la peptidyl-prolyl cis/trans isomérase (Pin 1). La Pin 1 est une enzyme catalysant l'isomérisation des prolines de cis à trans dans un neurone sain ce qui permet de promouvoir l'assemblage des microtubules et ce qui permet également l'approche de la phosphatase PP2A qui va déphosphoryler ce site.<sup>[55]</sup> Cette cascade d'évènement est nécessaire pour la stabilisation des microtubules et dans le cas d'un neurone atteint de la MA la T231 n'est plus déphosphorylée, l'isomère cis de la proline étant alors majoritaire. Cette conformation de la protéine favorise la dissociation de Tau des microtubules et favorise également l'approche d'autres kinases qui vont phosphoryler d'autres sites.<sup>[24],[49]</sup> Comme dans le cas de la T231, la phosphorylation de la S202 et de la T205 induisent des changements conformationnels de la protéine atténuant l'affinité de Tau pour les Microtubules. De plus, la phosphorylation de ces 3 sites initie la phosphorylation d'autres sites comme la T212 par la kinase DYRK1A (Dual specificity tyrosine-phosphorylation-Regulated Kinase 1A).<sup>[43]</sup> Enfin, l'équipe de Mandelkow a montré que la S214 phosphorylée est présente dans les PHF et que sa phosphorylation *in vitro* entraîne un détachement de Tau des microtubules dont la conséquence est la déstabilisation du cytosquelette.<sup>[3],[56]</sup>

La phosphorylation des différents sites ne se fait pas en même temps et la formation de résidus phosphorylés va entraîner une cascade de phosphorylation. C'est ce que l'équipe de Leclerc a démontré en remplaçant les résidus phosphorylables par des résidus apolaires.

Prenons l'exemple de la sérine 262 remplacée par une alanine. La phosphorylation de la T217 passe de 47.5% (quand la S262 est phosphorylée) à 15.7% tandis que la phosphorylation de la T231 et de la S235 augmente. Cette expérience a été effectuée sur différents résidus et les résultats obtenus sont résumés sur la figure ci-dessous (**Fig. 9**).<sup>[45]</sup>



**Figure 9** : Représentation des épitopes de Tau et cascade de phosphorylations.

Cette étude démontre l'importance de la phosphorylation de l'épitope AT8 (Antibody Tau 8) dans la balance de la phosphorylation de Tau sur chaque domaine. Il serait donc intéressant de rétablir le niveau de phosphorylation dans ce domaine pour diminuer la progression de la maladie.

- Les Kinases

Les kinases sont des enzymes faisant partie de la famille des transférases catalysant des réactions de phosphorylation en transférant des phosphates à des substrats spécifiques à partir d'ATP ou de GTP (Guanosine TriPhosphate). Les Kinases font partie de la même superfamille protéique ce qui implique que leurs sites actifs et que leurs noyaux catalytiques sont constitués de résidus hautement conservés. De ce fait, le mécanisme catalytique sera le même pour les kinases où le site catalytique va permettre la fixation de l'ATP et du substrat. Une fois les 2 molécules positionnées correctement dans le site catalytique, le transfert du groupement phosphate sur un résidu de type sérine, thréonine ou tyrosine va avoir lieu pour donner la protéine phosphorylée et de l'ADP. Les kinases phosphorylant la protéine Tau se divisent en trois familles : les kinases dirigées par les prolines dites PDPK (Proline-Directed Protein Kinases), les kinases non dirigées par les prolines appelées non-PDPK et les kinases ciblant les tyrosines nommées TPK (Tyrosine Protein Kinases).

**Les PDPK** sont des kinases qui vont cibler des résidus sérine et thréonine situés devant une Proline (S/TP).

**La Glycogène Synthase Kinase 3 (GSK3)** existe sous deux isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  présentant 85% d'homologie de séquence. A ce jour, une centaine de substrats ont été répertoriés comme étant phosphorylés par cette enzyme, contre une dizaine pour les autres kinases, ce qui explique ses nombreuses actions dans différents processus cellulaires.<sup>[57]</sup> Son premier rôle est la métabolisation du glycogène mais il a également été démontré que cette enzyme est impliquée dans la prolifération cellulaire, dans les fonctions neuronales, dans l'oncogenèse, dans les voies de réponses immunitaires et dans l'apoptose.<sup>[43]</sup> Dans le cas de la MA, l'expression de la GSK3 va augmenter dans l'hippocampe et l'enzyme va être retrouvée de manière abondante dans les DNF ce qui montre son implication dans la formation de ces neurodégénérescences.<sup>[58]</sup> En 2000, l'équipe de Reynolds a identifié 9 sites phosphorylés par la GSK3 $\beta$  sur les 15 motifs S/TP phosphorylés dans le cas de la MA en utilisant la spectrométrie de masse avec une source de type Nanoelectrospray (T175, T181, S202, T212, T217, T231, S235, S396 et S404).<sup>[59]</sup> Or, de plus récentes études indiquent que 42 sites peuvent être phosphorylés par la GSK3 et 29 le sont dans le cas de la MA.<sup>[43]</sup> Or, nous pouvons dénombrer que 17 motifs S/TP ce qui s'explique, par le fait, que cette kinase non seulement phosphoryle les résidus S/TP mais également des sérines ou des thréonines dont le

motif est S/TX (avec X pouvant représenter n'importe quel résidu hormis une proline). En effet, la GSK3 peut phosphoryler quelques résidus sans amorçage (motif S/TP), c'est-à-dire sans que certains résidus du substrat ne soient phosphorylés en amont par d'autres kinases ce qui permet une meilleure affinité entre kinases et Tau. Dans le cas des motifs de types S/TX, la phosphorylation par la GSK3, et plus particulièrement de l'isoforme  $\beta$ , va être catalysée par d'autres kinases comme la PKA (Protein Kinase cAMP-dependent), la PKB (Protein Kinase B) ou la PKC (Protein Kinase C). Afin que la phosphorylation soit efficace il faut que le résidu qui va être phosphorylé par la GSK3 et celui qui a été phosphorylé par une autre kinase soient espacés de 3-4 résidus (motif de type S/T-X-X-X-XpS/pT). Plusieurs études démontrent que la GSK3, est impliquée dans la MA. En effet, la suractivité de cette kinase est non seulement impliquée dans le processus d'hyperphosphorylation mais aussi dans l'augmentation de la production des A $\beta$  ce qui va avoir des influences sur les réponses inflammatoires, sur la diminution de la synthèse d'acétylcholine et enfin sur l'apoptose.<sup>[43],[58]</sup>

**La kinase dépendante des cyclines 5 (CDK5)** est une enzyme inactive qui, de ce fait, s'associe avec des co-activateurs (p39/p35, étant des protéines virales exprimées respectivement au stade fœtal et adulte ou avec p29/p25 étant des fragments de p39 et p35). L'activité de CDK5 est spécifiquement exprimée dans les neurones où celle-ci va avoir pour rôles le développement du système nerveux central, la régulation de la dynamique du cytosquelette, la régulation du transport axonal et des fonctions synaptiques. Des essais *in vitro* ont montré que le complexe CDK5/p25 phosphoryle 11 sites qui sont tous retrouvés dans le cas de la MA. L'inhibition de de cette enzyme réduit, sur des souris, la formation des DNF ce qui montre que cette kinase est directement impliquée dans l'accumulation de ces DNF. De plus, la phosphorylation de Tau par la CDK5 favoriserait l'affinité entre Tau et la GSK3 $\beta$  ce qui implique une phosphorylation excessive. Enfin, cette kinase a également un effet sur la toxicité des peptides A $\beta$  et va également promouvoir l'apoptose neuronal.

**Les MAP kinases** (Mitogen-Activated Protein kinases), forment une famille de 6 kinases comprenant la p38, les Erk1/2 et les JNK1/2/3. Ces kinases sont impliquées dans différents stades du développement cellulaire comme la mitose, l'apoptose ou encore la différenciation cellulaire. La p38 est impliquée dans l'apoptose induite par un stress oxydatif ou chimique et est activée après la déstabilisation du cytosquelette. *In vitro*, la p38 phosphoryle 21 sites dont 15 sont présents dans le cas de la MA ce qui va être corrélé à des réponses inflammatoires responsables de la pathologie. De plus, cette kinase est retrouvée dans les DNF. Les Erk1/2 vont réguler la division cellulaire, la différenciation, la prolifération et l'apoptose. Ces kinases

phosphorylent 16 sites *in vitro* et 15 sont phosphorylés *in vivo*. Comme la p38, les JNK1/2/3 sont impliquées dans l'apoptose et vont être détectées dans les agrégats de Tau. Dans ce cas, 12 sites sont phosphorylés *in vitro* et *in vivo*. La sur-activation de ces enzymes va être associée à une hausse de l'activité des  $\gamma$  sécrétases conduisant à l'accumulation des A $\beta$ .

**Les non-PDPK** sont les kinases qui vont phosphoryler les motifs de type S/TX et cette famille est composée de 10 kinases comprenant les TTBK1/2 (Tau-Tubulin Kinases), les CK1 $\alpha$ /1 $\delta$ /1 $\epsilon$ /2 (Casein Kinases), les DYRK1A/2, les MARK (Microtubule Affinity-Regulating Kinases), la PK (Phosphorylase Kinase), la PKA, la PKB/Akt, la PKC, la PKN et la CaMKII (Ca<sup>2+</sup>/calModulin-dependant protein Kinase II). Nous traiterons dans cette partie les 2 enzymes qui sont le plus impliquées dans le processus de phosphorylation.

**Les Caséines Kinases** existent sous 10 isoformes (CK1 $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ 1/ $\gamma$ 2/ $\gamma$ 3/ $\delta$ / $\epsilon$  et CK2 $\alpha$ / $\alpha'$ / $\beta$ ) dont 4 sont impliquées dans le cas de la MA (CK1 $\alpha$ / $\delta$ / $\epsilon$ /2). Le rôle physiologique de ces kinases est la régulation des dynamiques des microtubules ainsi que de l'apoptose. *In vitro*, ces enzymes catalysent la phosphorylation de 46 sites dont 25 sont retrouvés dans les cerveaux de patients malades. Il a été démontré que la production de peptide A $\beta$  est liée à l'activité de la Caséine Kinase 1 et que les oligomères de A $\beta$  altèrent l'activité de la CK2. De plus, l'étude des tissus nerveux montrent que la CK1 est co-localisée avec les DNF.

**La Protéine Kinase A** est une enzyme dont l'activité dépend de la concentration en AMP (Adénosine Mono Phosphate) cyclique dans la cellule. Le rôle de cette enzyme est de réguler le métabolisme de différentes biomolécules comme le glycogène et les lipides. Dans le cas de la MA, cette protéine cible 17 résidus et 25 sont phosphorylés *in vitro*. Cette enzyme est une cible thérapeutique intéressante car elle permet l'amorçage de la phosphorylation par la GSK3 $\beta$ .

**Les TPK** sont les kinases phosphorylant les tyrosines. Dans le cas de la protéine Tau, 5 tyrosines peuvent être phosphorylées : Y18, Y29, Y197, Y310 et Y394. Dans le cas de la MA, 3 de ces 5 résidus sont phosphorylés par ces kinases qui se divisent en 2 familles : les SFK (famille des Src kinase) et la kinase c-Abl. Les SFK phosphorylent la Y18 ce qui est lié à des processus de neuro-inflammation et la c-Abl phosphoryle les Y18 et Y394 et il a été suggéré que ces phosphorylations facilitent l'approche d'autres kinases.

- Les inhibiteurs de Kinases

Depuis plusieurs années de nombreuses équipes s'intéressent à ces enzymes qui, dans le cas de la MA, vont entraîner l'agrégation de Tau sous formes de DNF neurotoxiques. Moduler la phosphorylation serait donc une voie prometteuse pour le développement d'une thérapie et pour cela le développement d'inhibiteurs de kinases est au cœur de nombreuses recherches. Toutefois, plusieurs paramètres vont devoir être pris en compte dans le développement de ces composés. En effet, il ne faut pas négliger le fait que les kinases font partie d'une des super familles les plus vastes du protéome et que ces enzymes sont impliquées dans diverses voies métaboliques et processus cellulaires.<sup>[60]</sup> De plus, le nombre de substrats par kinase est relativement élevé. Il faut donc avoir accès à des inhibiteurs sélectifs des kinases et des substrats directement impliqués dans la MA.

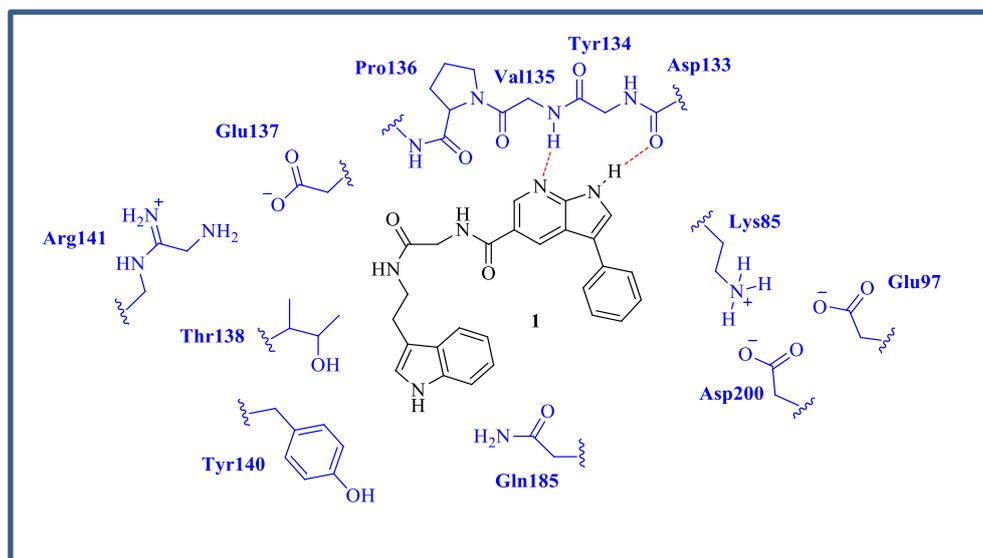
La GSK3 phosphoryle 70% de la protéine Tau dans le cas de la maladie et est retrouvée de manière importante dans les DNF, c'est pour cette raison que les inhibiteurs présentés vont être principalement axés sur cette kinase.

En 1996, l'équipe de Klein et Melton ont montré la capacité du Lithium ( $\text{Li}^+$ ) à inhiber la GSK3. Ce cation monovalent agit par compétition avec le Magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) nécessaire pour la réaction de phosphorylation.<sup>[43]</sup> Toutefois, ce composé présente une faible activité inhibitrice ( $\text{IC}_{50} = 2\text{mM}$ ) et aucun changement sur les performances cognitives des patients n'ont été observés. De plus, le Lithium n'est pas sélectif de la GSK3 et s'avère être neurotoxique puisqu'il altère la concentration en neurotransmetteurs.<sup>[61]</sup> La synthèse de petites molécules plus sélectives et ayant de plus fortes activités inhibitrices a été développée.

Il existe trois types d'inhibiteurs de kinases : les inhibiteurs compétitifs de l'ATP, les inhibiteurs non compétitifs de l'ATP et les inhibiteurs compétitifs du substrat.

Le développement d'inhibiteurs compétitifs de l'ATP consiste à synthétiser de petites molécules capables d'interagir avec le domaine de fixation de l'ATP de la kinase. Pour cela l'étude de cette région de l'enzyme est indispensable et pour mieux comprendre les interactions mises en jeu l'effet d'un dérivé du 7-azaindole va être explicité. En 2016, l'équipe de Hong à travers une étude de FBDD (Fragment-Based Drug Discovery) a mis en avant les interactions entre le domaine de fixation de l'ATP et **1**.<sup>[62]</sup> Il semble que les liaisons hydrogène pouvant se former entre le squelette des résidus Asp133 et Val135 et les inhibiteurs sont primordiales dans la fixation (**Fig. 10**).<sup>[43],[62]</sup> Ainsi, **1** présente pour GSK3 une  $\text{IC}_{50}$  de l'ordre du  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50} = 1.45\mu\text{M}$ ). De plus, perturber le pont salin entre la Lys85 et Asp200 joue également sur la sélectivité et sur la capacité de l'ATP à céder son groupement

phosphate. Des dérivés du composé **1** ont permis d'accroître l'activité inhibitrice ( $IC_{50}$  de l'ordre du nM) grâce à des études de relation structure-activité mais la sélectivité envers d'autres kinases et les effets que ces molécules peuvent avoir sur d'autres processus cellulaires n'ont pas encore été rapportés.<sup>[62]</sup>



**Figure 10** : Interaction entre le domaine de fixation de l'ATP et **1**.

La famille des Paullones regroupe plusieurs composés qui sont connus comme étant des inhibiteurs de kinases, en particulier l'Alsterpaullone **2** qui permet d'inhiber la phosphorylation de Tau *in vivo* par GSK3 $\beta$  ( $IC_{50}$  de l'ordre du nM). Les études *in silico* permettent de déterminer que les interactions préférentielles s'établissent par le biais de 2 liaisons hydrogène entre la Val135 et **2** puis une liaison H entre la Lys85 et le groupement nitro. L'intérêt de ce composé est double car il permettrait aussi l'inhibition de la CDK5/p25 (**Fig. 11**).

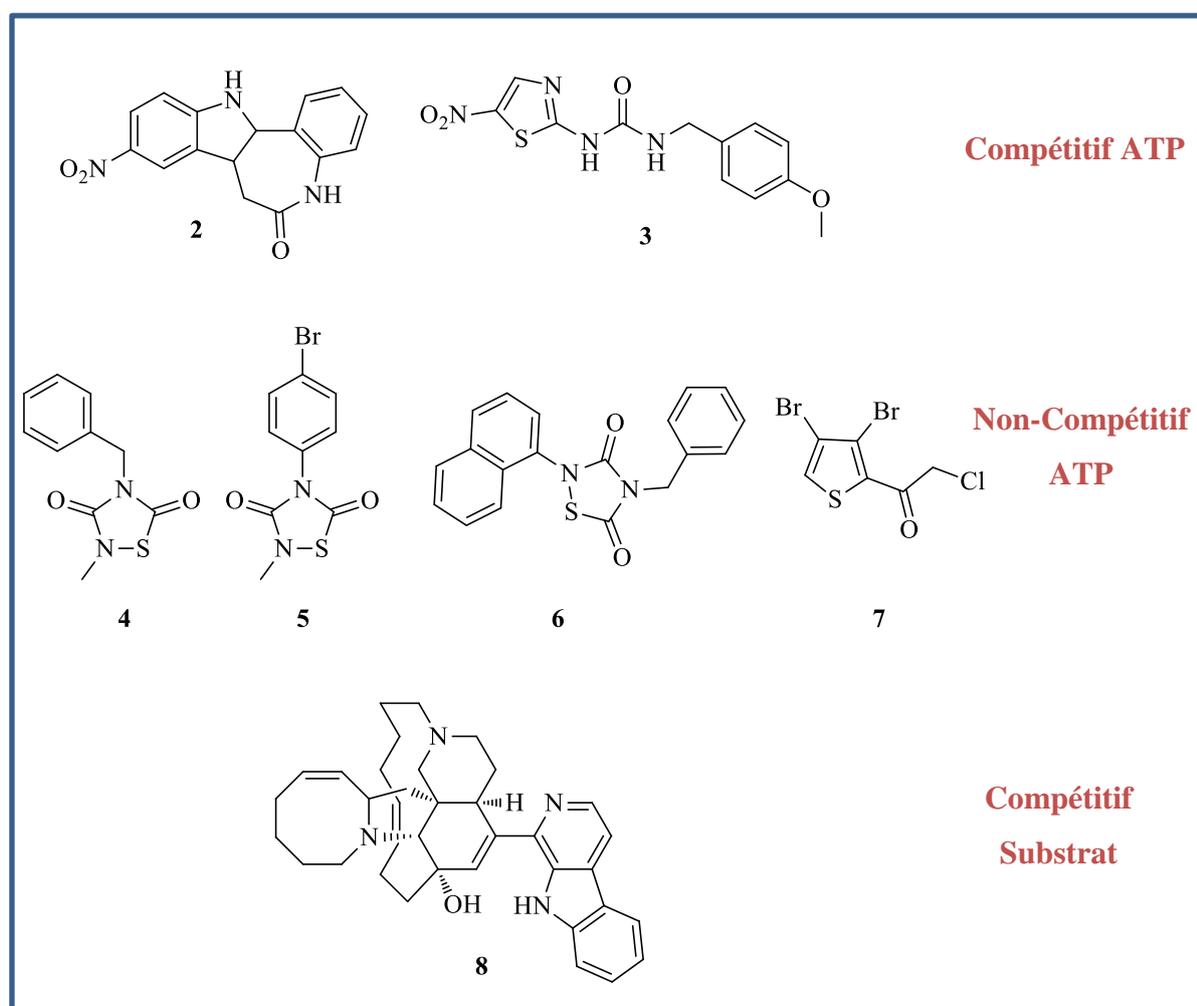
La famille des thiazoles est également au cœur des études depuis le développement par Astra Zeneca du composé **3** (AR-A014418). Cette urée permet non seulement l'inhibition de la phosphorylation de Tau de manière efficace ( $IC_{50} = 104 \pm 27 \text{ nM}$ ) mais elle est aussi spécifique à GSK3 $\beta$  puisque des essais sur 26 autres kinases n'ont rien donné (**Fig. 11**). Dans les cellules, ce composé inhibe la phosphorylation de la Ser396 et a un impact positif sur la neurotoxicité des A $\beta$ .<sup>[60],[61]</sup>

Les inhibiteurs non compétitifs de l'ATP permettent également des interactions Ligand-Domaine de fixation de l'ATP mais dans ce cas la fixation de l'inhibiteur peut se faire même

si le substrat (ATP) est lié à l'enzyme. En 2002 les Thiadiazolidinones (TDZD) **4** et **5** sont les premières molécules décrites comme des inhibiteurs non compétitif de l'ATP avec des  $IC_{50}$  de 2 à  $1.1\mu M$  respectivement. Ces molécules ont permis la diminution de la phosphorylation sur des cellules neuronales et sont sélectives de plusieurs kinases d'intérêt comme la PKA et la CK2. Un dérivé, le Tideglusib **6**, a atteint les phases II des essais cliniques (**Fig. 11**).

La cétone **7** est la première molécule qui permet une inhibition irréversible de la GSK3 (**Fig. 11**). L'inactivation de la kinase se fait par le biais de la création d'une liaison covalente carbone soufre entre **7** et la Cys199.

Enfin, il est possible d'inhiber l'activité enzymatique par compétition avec le substrat ce qui est le cas de la Manzamine A **8** (**Fig. 11**). Ce produit naturel retrouvé dans les éponges marines du Pacifique permet l'inhibition de GSK3 $\beta$  et de CDK5 ( $IC_{50}$  de 10 et  $15\mu M$ ) ce qui permet de réduire l'hyper phosphorylation de Tau dans certaines lignées cellulaires.



**Figure 11** : Les Inhibiteurs de GSK3 $\beta$ .

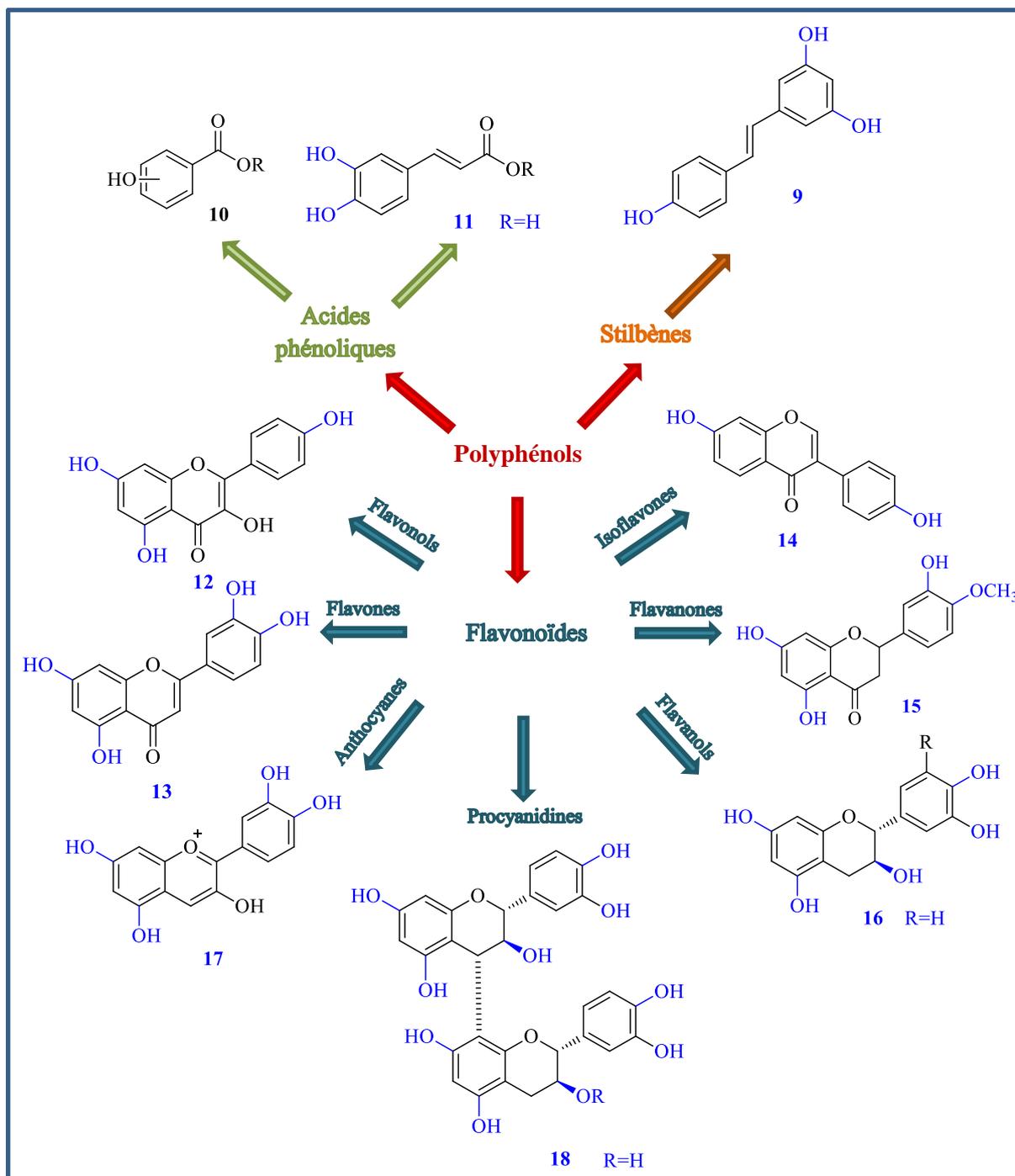
Comme nous pouvons le voir, plusieurs inhibiteurs de kinases ont été développés au cours des dernières années, la majorité d'entre eux étant encore en phase de découverte et une minorité étant en phase clinique. De plus des tests secondaires sur ces inhibiteurs sont encore faits afin d'étudier les effets indirects de ces molécules sur les kinases. Toutefois, il est à ce jour nécessaire de synthétiser des molécules ayant cette capacité d'inhiber les processus enzymatiques à l'origine des DNF mais ces composés doivent également inhiber l'activité amyloïdogénique à l'origine des plaques séniles. La seconde partie de cette étude bibliographique va porter sur les polyphénols qui semblent être des composés prometteurs pour inhiber ces deux processus conduisant à la MA.

## II. Les polyphénols

### 1) Généralités

#### a) Classification des polyphénols

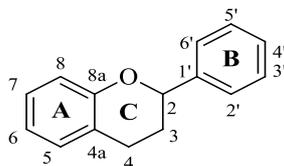
L'émergence des polyphénols dans le monde de la santé remonte à plusieurs dizaines d'années et est au cœur du développement de nombreuses thérapies envisageables par leurs effets bénéfiques sur la santé. Les polyphénols sont des composés phytochimiques présents de manière abondante dans la nature, notamment dans les fruits, les légumes et les plantes.<sup>[63]</sup> De ce fait, ces molécules font partie de notre alimentation quotidienne et des boissons dérivées de ces plantes riches en polyphénols sont commercialisées dans le monde comme le thé vert ou encore le vin rouge.<sup>[64]</sup> Cette classe de molécules représente plus de 8000 composés isolés et caractérisés dont les structures sont relativement variées. Les masses molaires de ces composés sont comprises entre plusieurs dizaines à 30kDa pour les polyphénols hautement polymérisés.<sup>[65]</sup> Les polyphénols vont se diviser en 3 sous-groupes dont les structures chimiques sont différentes : les stilbénoides, les acides phénoliques et les flavonoïdes (**Fig. 12**). Les Stilbénoides sont des stilbènes polyhydroxylés représentant la plus petite sous-catégorie des polyphénols. Le représentant majeur de cette catégorie est le Resveratrol **9** qui est présent dans le raisin, dans le vin et dans les arachides. Les acides phénoliques sont divisés en 2 groupes majeurs : les dérivés de l'acide benzoïque **10** et les dérivés de l'acide cinnamique. Les acides phénoliques les plus courants ne sont pas présents à l'état libre dans la nature mais ils vont avoir tendance à former des esters avec le glucose, l'acide tartrique ou encore l'acide quinique. Ces composés vont être majoritairement retrouvés dans le café, les myrtilles, le kiwi, les prunes et les pommes et le représentant majeur de cette sous-catégorie est l'acide caféique **11**. Les flavonoïdes représentent la sous-catégorie la plus abondante de la famille des polyphénols de par les 5000 molécules décrites et de par la diversité structurale qui y est retrouvée. Les flavonoïdes peuvent être répertoriés en 7 catégories de composés : les flavonols (ex. le kaempférol **12**), les flavones (ex. la lutéoline **13**), les isoflavones (ex. la daidzéine **14**), les flavanones (ex. l'hésperétine **15**), les flavanols (ex. catéchine **16**), les anthocyanes (ex. la Cyanidine **17**) et les proanthocyanidines (ex. procyanidine B3 **18**).



**Figure 12** : Classification des polyphénols.

Les flavonoïdes sont présents dans une grande variété de végétaux comme les agrumes, les oignons, le thé vert, le chocolat, le raisin... Ces polyphénols ont un squelette carboné commun de type phénylbenzopyrane composé de 15 atomes de carbone (C6-C3-C6). L'hétérocycle du benzopyrane est le cycle C selon la nomenclature et peut être soit un pyrane, soit un pyrilium ou une  $\gamma$ -pyrone. Le cycle fusionné à l'hétérocycle est le cycle aromatique A et il en existe 2 types : le phloroglucinol (cycle méta-tri hydroxylé) et le réSORCINOL (cycle

métab-dihydroxylé). Enfin le cycle B correspond à l'aromatique lié au C2 de l'hétérocycle et peut être soit mono hydroxylé, ortho-di hydroxylé ou vicinal-tri hydroxylé (**Fig. 13**).<sup>[66]</sup>

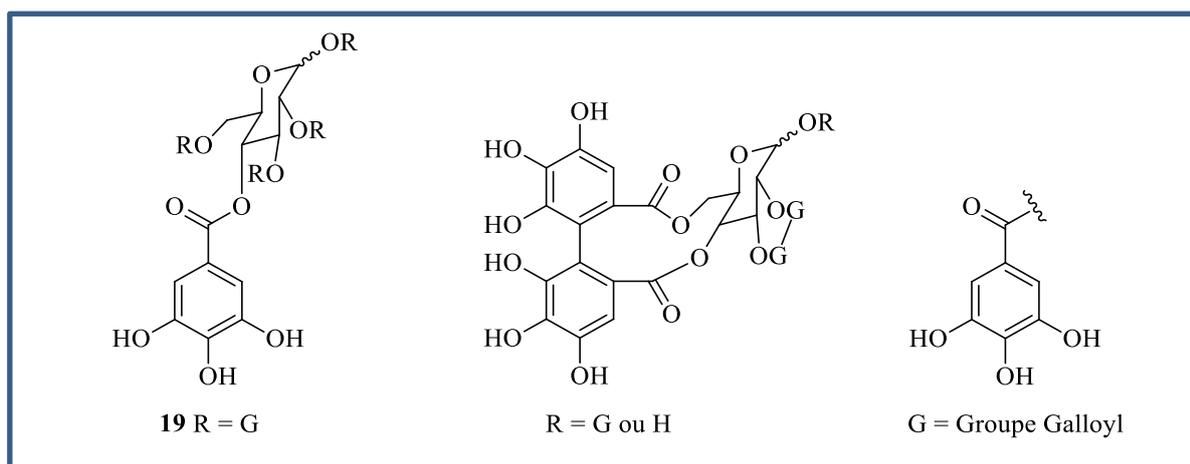


**Figure 13** : Nomenclature des flavonoïdes.

Procyanidines, proanthocyanidines ou encore tanins condensés sont les termes les plus couramment utilisés dans la littérature pour décrire les polymères de flavan-3-ol. Toutefois, il faut être vigilant avec le terme « tanins » puisque celui-ci fait référence à une nouvelle classe de polyphénols présents dans des plantes et des erreurs ou des abus de langage peuvent être faits. En effet, les tanins sont une famille de composés polyphénoliques qui ont la capacité de se complexer à des protéines, ce qui induit leur précipitation. Trois grandes classes de tanins sont présentes dans la nature : les tanins hydrolysables, les tanins condensés et les tanins complexes qui résulte d'une combinaison de ces deux classes de tanins.

Les tanins hydrolysables sont des phénols liés à des sucres (Glucose ou Polyol dérivant du D-Glucose) par des liaisons de types esters ce qui leur confère la propriété d'être hydrolysables par un simple traitement à l'eau chaude. Ces polyphénols hydrolysables sont divisés en deux sous-catégories : les gallotanins, tel que le 1,2,3,4,6 pentagalloyle glucose **19**, dont le phénol lié au sucre est un acide gallique et les ellagitanins dont le phénol est l'acide hexa-hydroxy-diphénique (HHDP) (**Fig. 14**).

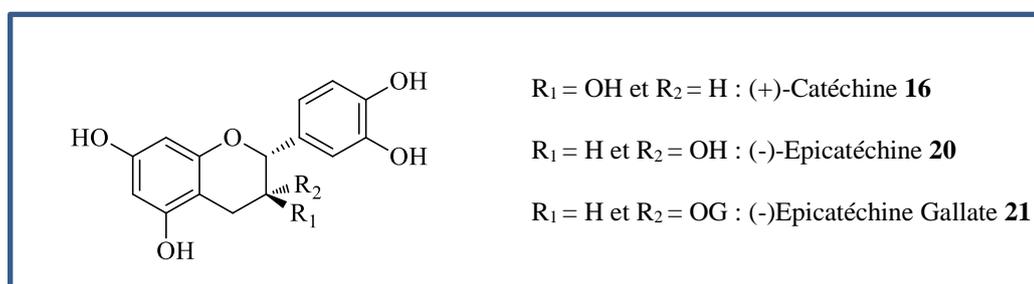
Les tanins condensés sont retrouvés sous forme de dimères, oligomères ou polymères de flavanols. Le degré d'oligomérisation est compris entre [3-10] pour les oligomères et leurs masses molaires varient entre 300 à 9000g.mol<sup>-1</sup>. Lorsque le degré d'oligomérisation est supérieur à 10 on parle de polymères et ces derniers peuvent avoir une structure de type linéaire ou branchée. Les tanins condensés sont une sous-catégorie de polyphénols très variés de par la nature des différents monomères mais également de par leurs degrés de polymérisation et la nature des liaisons interflavanols.



**Figure 14** : Structure des gallotanins (gauche) et des ellagitanins (droite).

### b) Structure des procyanidines

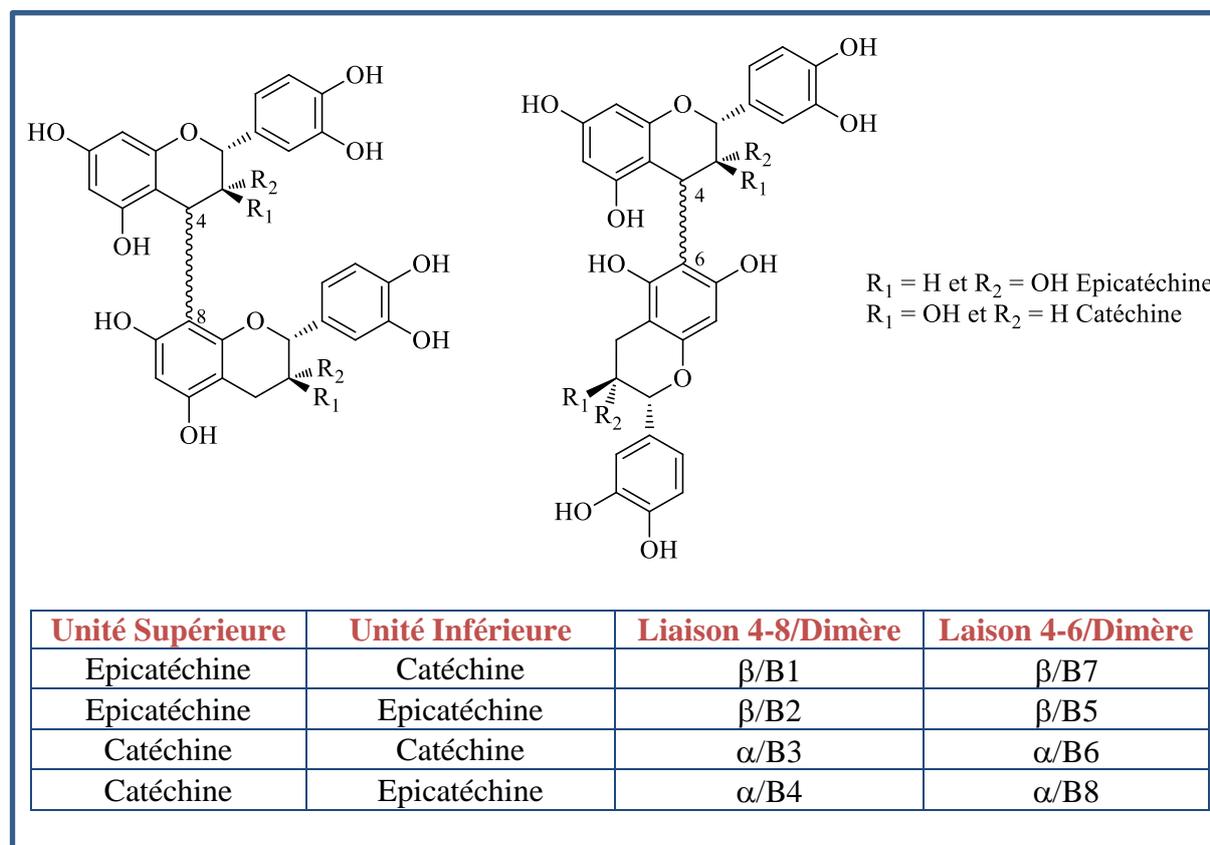
Les procyanidines sont composées de monomères de type flavanol comme l’Afzéléchol, l’Epiatzéléchol, la catéchine, l’épicatéchine, la gallocatéchine ou l’épigallocatéchine. Les tanins condensés vont être principalement retrouvés dans la nature avec des monomères de type catéchine **16**, épicatechine **20** et épicatechine gallate **21** (**Fig. 15**).<sup>[67]</sup>



**Figure 15** : Structure des monomères des Procyanidines.

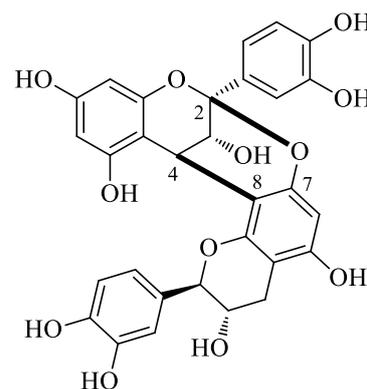
Les flavan-3-ols sont majoritairement retrouvés dans la nature avec la configuration *2R*, le stéréoisomères *S* étant moins fréquent. Une nomenclature pour les dimères a été mise en place en fonction des monomères, des types de liaison liant les monomères et de la stéréochimie de la liaison interflavane. Les dimères de type B, dont la liaison entre les monomères se fait entre le Carbone 4 de l’unité supérieure et le C8 ou C6 de l’unité inférieure, sont les plus communs (C4-C8 ou C4-C6). La liaison liant les dimères de type B est la liaison interflavane et sa stéréochimie va être dépendante de la stéréochimie du C3 de l’unité supérieure. En effet, lorsque l’unité supérieure est une catéchine, la liaison interflavane est située en arrière du plan (stéréochimie de type  $\alpha$ ) et lorsque l’unité supérieure est l’épicatéchine, la liaison interflavane est en avant du plan (stéréochimie de type  $\beta$ ). La stéréochimie ainsi que la nature des

monomères engagés dans la liaison permettent d'établir une nomenclature pour les dimères décrite ci-dessous (**Fig. 16**).



**Figure 16** : Nomenclature des Procyanidines de Type B.

Retrouvées de manière moins abondante dans la nature, les dimères de type A sont constitués de deux monomères doublement liés par des liaisons C4/C8 ou C4/C6 (interflavane) et par une liaison de type éther C2/O7 (**Fig. 17**). Ces dimères sont obtenus par une oxydation intramoléculaire des dimères de type B.



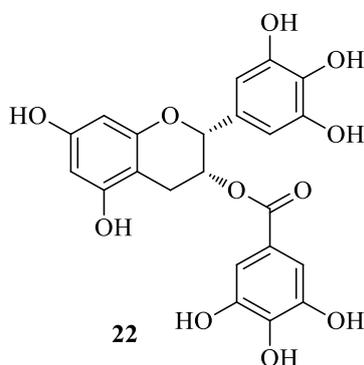
**Figure 17** : Procyanidines A1.

### c) Les polyphénols et la santé

Les données corrélant les polyphénols à la santé ont pris une très grande ampleur depuis les années 1950-1960 lors de diverses études épidémiologiques établissant en particulier le lien entre les maladies cardiovasculaires et les apports en graisses saturées. Or, il s'avérait que dans certains pays de l'Europe du Sud et notamment en France, le nombre de ces maladies était inférieur à ce qui était attendu par rapport à la consommation en graisses saturées. Dès lors il a été suggéré que la consommation régulière de végétaux (fruits, légumes et huile d'olive) et de boissons alcoolisées, particulièrement du vin rouge avait un effet protecteur sur la santé malgré des facteurs de risques élevés (cholestérol...). Les chercheurs ont rapidement associé la consommation de polyphénols, et en particulier de flavonoïdes, et la diminution de la survenue de maladies chroniques comme l'athérosclérose, l'asthme ou encore les maladies neurodégénératives.<sup>[68]</sup> De nombreux essais cliniques ont été faits pour valider que la consommation de produits riches en polyphénols était véritablement liée à un effet bénéfique sur la santé. En 2007, un de ces essais a révélé que la consommation aigüe ou chronique de chocolat faisait diminuer la pression artérielle.<sup>[69]</sup> Depuis ces résultats, de nombreuses équipes cherchent à expliquer le rôle des polyphénols dans la prévention de certaines maladies comme le diabète de type II, les maladies cardiovasculaires, certains cancers ou les maladies neurodégénératives.

Les polyphénols sont des puissants antioxydants et cela va être corrélé positivement à l'effet bénéfique de ces molécules sur la santé. Le dioxygène ( $O_2$ ) est un composant primordial pour l'organisme car sa réduction en eau dans la chaîne respiratoire des mitochondries est associée à la formation d'ATP. Toutefois, ce processus n'est pas parfait car 2-3% du dioxygène est transformé en radical libre anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) ce qui conduit à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) parmi lesquelles vont être retrouvés les radicaux hydroperoxydes ( $HOO^{\cdot}$ ) et hydroxyles ( $HO^{\cdot}$ ).<sup>[70]</sup> Ce processus est normalement régulé par des enzymes tel que les superoxydes dismutases ou par des molécules antioxydantes comme les vitamines C et E. Dans certains cas, le vieillissement ou la malnutrition, peut provoquer un stress oxydatif résultant d'un dysfonctionnement mitochondrial ou de la libération de  $Fe^{2+}$  à partir de protéines chélatrices (le  $Fe^{2+}$  permet la transformation du peroxyde d'hydrogène en radical hydroxyle par la réaction de Fenton). L'augmentation de ces radicaux libres entraîne des réactions parasites sur les biomolécules tel que l'ADN, les lipides ou encore les protéines.<sup>[71]</sup> A terme ces modifications sur ces biomolécules vont entraîner des cancers

(mutation de l'ADN...) et être impliquées dans des maladies chroniques comme la MA. Diverses études montrent que les polyphénols présents dans les plantes sont capables de piéger les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes ce qui permet, *in vitro*, d'inhiber la peroxydation des lipides responsables des dommages tissulaires.<sup>[72]</sup> Beaucoup de recherches se sont focalisées sur les polyphénols contenus dans le thé vert qui est principalement constitué de flavan-3-ols tel que la catéchine et l'épigallocatechine gallate **22** (EGCG). Ces polyphénols ont la capacité de chélater le Fe<sup>2+</sup> ce qui permet de prévenir la formation des radicaux hydroxyles et par conséquent empêcher l'oxydation des protéines et des lipides.<sup>[73]</sup> L'EGCG est un antioxydant très puissant puisqu'il est composé de 8 fonctions OH et ce grâce au groupement Galloyle en position 3 qui lui permet d'être un excellent piégeur de radicaux libres. Ce composé possède une plus forte capacité à piéger les radicaux que les vitamines C et E ce qui lui confère la propriété de protéger l'activité mitochondriale lors de stress oxydatif.<sup>[74]</sup> En effet, l'EGCG permet de réguler la fabrication des EROs et d'accroître la synthèse d'ATP de 50 à 85% dans l'hippocampe de souris transgéniques. Le test a été réalisé avec 25 autres molécules naturelles et c'est avec ce polyphénol que les meilleurs résultats ont été obtenus (**Fig. 18**).<sup>[73]</sup>



**Figure 18** : Epigallocatechine Gallate.

De nombreuses études épidémiologiques, cliniques et précliniques reportent que les fruits riches en polyphénols peuvent avoir un effet anticancérigène. En effet, en plus de l'activité antioxydante, les polyphénols et en particulier les flavonoïdes, ont la capacité de réguler des facteurs de transcription ou des voies de signalisation oncogéniques. En effet, une étude récente démontre que les polyphénols sont capables de cibler les micro ARN (miARN) qui, par leurs propriétés à réguler l'expression de certains gènes, sont impliqués dans la différenciation, la prolifération cellulaire et l'apoptose. Dans le cas de certains cancers les miARN n'assurent plus leurs activités, c'est notamment le cas du miARN let-7 qui est responsable de l'expression de gènes impliqués dans la suppression de tumeurs. Cette équipe

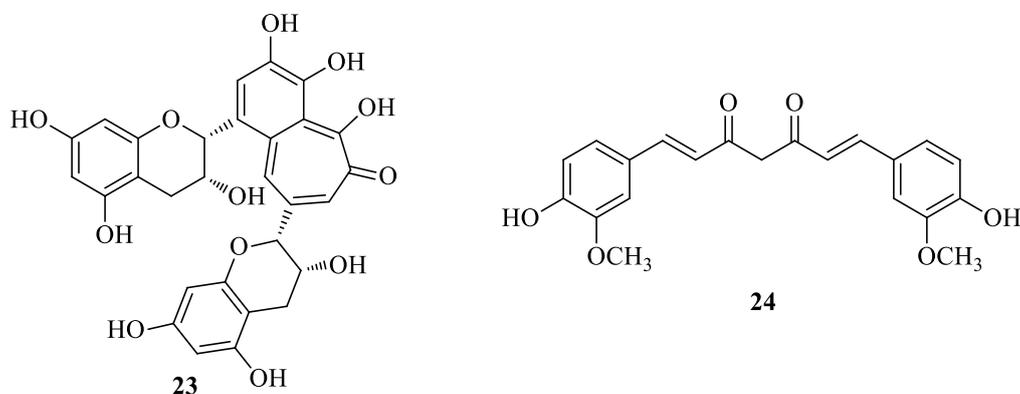
a démontré que l'EGCG est capable de restaurer l'activité de ce micro ARN.<sup>[75]</sup> En 2016, une revue rédigée par Awika, décrit que les dérivés de catéchine et de procyanidines (glycosylés en position 3 ou 7) présents dans le niébé, permettent l'inhibition de dommages liés à l'oxydation de l'ADN et l'antiprolifération de certaines lignées cellulaires cancéreuses.<sup>[76]</sup>

En 1995, l'équipe de Imai et Nakachi a montré que la consommation journalière de thé permettait la diminution du cholestérol dans le sang introduisant l'effet bénéfique des polyphénols sur le risque cardiovasculaire.<sup>[74]</sup> Plusieurs modes d'actions ont été suggérés comme la propriété que peuvent avoir certains polyphénols, en particulier l'EGCG, à interférer avec la solubilisation micellaire du cholestérol dans le tube digestif ce qui permet la diminution de l'absorption de ce composé. Les études portées sur les polyphénols contenus dans le niébé démontrent que la peroxydation des LDL (Low Density Lipoproteins) catalysée par le cuivre est inhibée *in vitro*. Des tests réalisés avec les molécules isolées du niébé montrent que les dérivés de la catéchine ont les plus fortes activités inhibitrices. L'inhibition de cette oxydation permet de prévenir le développement de l'athérosclérose et l'hypertension.<sup>[76]</sup>

Depuis quelques années, la recherche s'intéresse particulièrement aux polyphénols et à leurs effets bénéfiques sur la neuro-protection dans le cas de diverses maladies comme Parkinson, la MA ou encore le syndrome de Down.<sup>[77]</sup> Ces maladies vont être caractérisées par divers processus biologiques dans les neurones comme la neuroinflammation, qui se définit comme l'interaction entre le système immunitaire et les tissus abîmés. La neuroinflammation implique une augmentation de l'activité des cellules gliales qui peut se traduire par une hausse de la production de facteurs de signalisation cellulaire comme les cytokines. Il a été démontré, dans le cadre de la maladie de Parkinson, que certains polyphénols, comme la théaflavine **23**, sont capables de diminuer l'expression de certaines cytokines responsables de la neuro-inflammation (**Fig. 19**).<sup>[78]</sup> En 2017, l'équipe de Abdollahi, a montré que la curcumine **24** peut interagir avec le récepteur TLR4 (récepteurs de types Toll impliqués dans la production de facteurs de signalisation tel que la cytokine) permettant ainsi de prévenir contre la neuro-inflammation (**Fig. 19**).<sup>[79]</sup>

Ces maladies sont également caractérisées par des déficits cognitifs et mémoriels et des tests sur animaux ont permis de démontrer que les polyphénols avaient un effet bénéfique sur ces déficits. L'équipe de Zou, a réalisé des tests sur des rats ayant reçus des injections d'acide okadaïque, ce qui provoque des troubles mémoriels, spatiaux et sur l'apprentissage. Il s'est

avéré que les rats ayant reçu un prétraitement avec des polyphénols issus de thé verts subissent moins de dégâts sur la mémoire et sur les capacités cognitives que ceux qui ne l'ont pas eu.<sup>[80]</sup> Il semble donc que les polyphénols aient des effets bénéfiques sur les troubles pathologiques liés à la neurodégénérescence.



**Figure 19** : Structure de la Théaflavine (gauche) et de la Curcumin (droite).

Pour expliquer les observations, il semble donc désormais important de s'intéresser aux processus biologiques au niveau moléculaire mis en jeu entre polyphénols et biomolécules, dans le cas de la maladie d'Alzheimer.

## 2) Les polyphénols et la MA : données initiales

Dans le premier chapitre ont été abordés les neuropathologies responsables de la MA d'Alzheimer qui sont le stress oxydatif, le dysfonctionnement mitochondrial et l'accumulation d'A $\beta$  et de Protéine Tau sous forme d'agrégats. Pour cette maladie, dont les causes sur les patients sont multifactorielles, le développement de thérapies reste extrêmement difficile. En effet, entre 2002 et 2012, sur 413 essais cliniques concernant 244 composés testés, seul un composé a passé la phase 3 et a été approuvé par la FDA (Food and Drug Administration).<sup>[81]</sup> Cela représente un taux d'échec très élevé pour cette maladie de 99,6%. De récentes études montrent que les polyphénols pourraient agir sur chacun de ces dysfonctionnements biologiques par leurs propriétés d'antioxydants, par leurs capacités à chélater certains métaux, par leurs capacités à quencher les espèces radicalaires ou encore par l'inhibition de l'activité de certaines enzymes. Dans le cerveau, le risque des dommages causés par le stress oxydatif est fortement accru car les enzymes régulant la formation des EROs, comme le Glutathion, sont très peu présentes alors que le taux d'acide gras polyinsaturés est fortement élevé dans le cerveau. Comme nous l'avons déjà mentionné, les polyphénols présentent une activité antioxydante importante et cela est notamment le cas dans le cerveau d'après des tests *in vitro*

et *in vivo*. Cette propriété antioxydante des polyphénols permet également de préserver les mitochondries mais pour l'instant très peu d'études ont concerné le dysfonctionnement mitochondrial. Toutefois une équipe a montré que les flavonoïdes présents dans le thé noir protègent l'activité des mitochondries *in vitro* contre les dommages engendrés par la formation d'A $\beta$ .

A l'inverse, de nombreuses recherches se focalisent sur l'effet des polyphénols sur les deux lésions caractéristiques de la MA, la formation de plaques séniles et de DNF. Il s'avère que les polyphénols sont des candidats prometteurs contre l'apparition de ces lésions et peuvent intervenir à plusieurs stades du développement de ces deux neuropathologies majeures.<sup>[82]</sup>

#### a) Les Polyphénols et les plaques amyloïdes

Pour prévenir l'agrégation des peptides A $\beta$  et surtout leur toxicité plusieurs voies peuvent être envisagées : l'inhibition des sécrétases  $\beta$  et  $\gamma$ , la stabilisation des peptides amyloïdogéniques, l'inhibition de l'oligomérisation, de la formation des fibres et de l'agrégation de ces fibres conduisant aux plaques amyloïdes. Les composés visant à contrer la formation de plaques séniles dans les essais cliniques réalisés entre 2002 et 2012 ont été très nombreux, 70 sur 146 (incluant les petites molécules et l'immunothérapie) contre seulement 13 composés ciblant Tau.<sup>[81]</sup> Comme nous l'avons vu précédemment ces travaux n'ont pas abouti et beaucoup de composés, ciblant le processus amyloïdogénique, ont été testés sans comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu. Toutefois on peut organiser les composés en trois classes selon les phénomènes biologiques ciblés : les molécules de classe 1 inhibant l'oligomérisation d'A $\beta$ , celles de la classe 2 inhibant l'oligomérisation et la formation des fibres et celles de la classe 3 inhibant seulement la formation des fibres. De récentes études montrent que les polyphénols sont capables de préserver les neurones de l'effet amyloïde en intervenant à plusieurs stades de la formation des plaques séniles et ce, en suggérant des mécanismes moléculaires afin de pouvoir proposer des thérapies ciblées et efficaces.<sup>[83]</sup>

Certains flavanoïdes peuvent engendrer la diminution de la formation de peptides A $\beta$ 40 et A $\beta$ 42. En 2016, l'équipe de Tan a montré que la flavone **25** (la diosmétine) est capable d'inhiber l'activité des  $\gamma$  sécrétases *in vivo* (**Fig. 20**). Cette inhibition permet la diminution de la concentration en peptides A $\beta$ 42 et évite ainsi la formation d'agrégats neurotoxiques.<sup>[84]</sup> Des essais *in vitro* sur certaines lignées cellulaires, dérivées de cellules neuronales, montrent que l'EGCG diminue la formation de peptides amyloïdes par la régulation de l'activité des

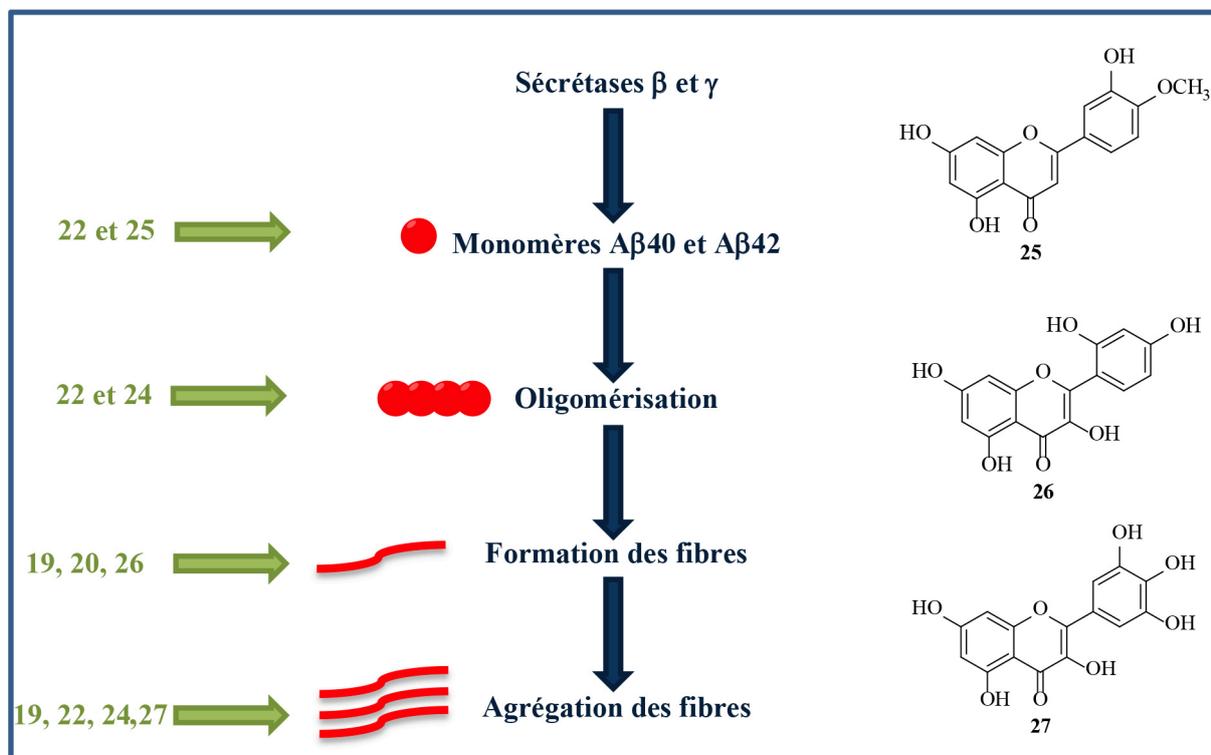
sécrétases  $\beta$  et  $\gamma$ . Les tests *in vivo* ont confirmé ces résultats et ont également montré que l'activité de la sécrétase  $\alpha$  est augmentée en présence de **22** ce qui permet de rétablir les fonctions cognitives chez les souris.<sup>[82]</sup>

Les polyphénols empêchent également l'oligomérisation des peptides amyloïdes en interagissant avec les monomères ou avec les oligomères. La formation de liaisons hydrogène entre certaines chaînes latérales des résidus du peptide A $\beta$ 42 et **22** permet de prévenir contre la formation d'oligomères et par conséquent empêche leur agrégation. Des résultats similaires ont été obtenus avec la curcumine mais les mécanismes moléculaires impliqués ne sont pas clairs et il a été suggéré que les fonctions polaires du composé **24** permettent sa liaison avec les oligomères.<sup>[83]</sup>

L'inhibition de la formation des fibres de peptides amyloïdes est également au cœur des recherches puisque ces fibres constituent les plaques amyloïdes. Il s'avère que les flavanols et les flavonols sont des candidats prometteurs pour éviter ce phénomène. En effet la catéchine et l'épicatéchine inhibent la formation des fibres *in vitro* et présentent des IC<sub>50</sub> de l'ordre du  $\mu$ M (IC<sub>50</sub> = 5,3 $\mu$ M pour A $\beta$ 42 et IC<sub>50</sub> = 2,9 $\mu$ M pour A $\beta$ 40). La morine **26** permet la réduction de la concentration en fibres *in vitro* (IC<sub>50</sub> = 0,67 $\mu$ M) *via* le désassemblage des oligomères induit par des interactions de type  $\pi$  et hydrophobes (**Fig. 20**).<sup>[83]</sup>

Enfin, l'inhibition de l'agrégation des fibres est la dernière stratégie envisagée par les chercheurs. La myricétine **27** est capable d'interagir avec l'agrégat de fibres, formant les plaques amyloïdes dans une conformation de type feuillet  $\beta$ , par le biais de liaisons hydrogène à la surface du feuillet ce qui a pour conséquence de déstabiliser cette structure (IC<sub>50</sub> = 1,5 $\mu$ M, **Fig. 20**). Ce résultat a été confirmé *in vivo* par l'injection de 10 $\mu$ M de **27** chez des souris ce qui a conduit à la diminution de la formation des feuillets. L'EGCG interagit également avec les agrégats amyloïdes *via* des liaisons non covalentes avec le squelette des peptides A $\beta$  ce qui permet la formation d'oligomères non toxiques pour les neurones. *In vivo*, la catéchine et l'épicatéchine permettent la réduction des plaques amyloïdes de 49% chez des souris transgéniques *via* la formation de complexes composés d'agrégats protéiques et de polyphénols non toxiques. L'injection (5 à 11 fois) de curcumine (500ppm) chez des souris a également montré une diminution des plaques amyloïdes après 4 mois de traitement.

Ces résultats sont très prometteurs mais des tests doivent également être réalisés, avec ces composés, sur la deuxième lésion caractéristique de la maladie qui est l'agrégation de la Protéine Tau.

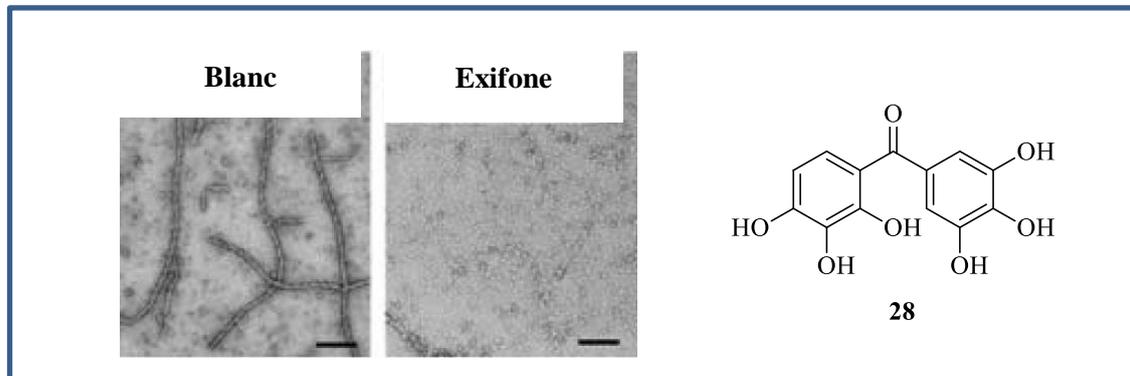


**Figure 20** : Formation des plaques Amyloïdes et son inhibition.

#### b) Les Polyphénols et la Protéine Tau

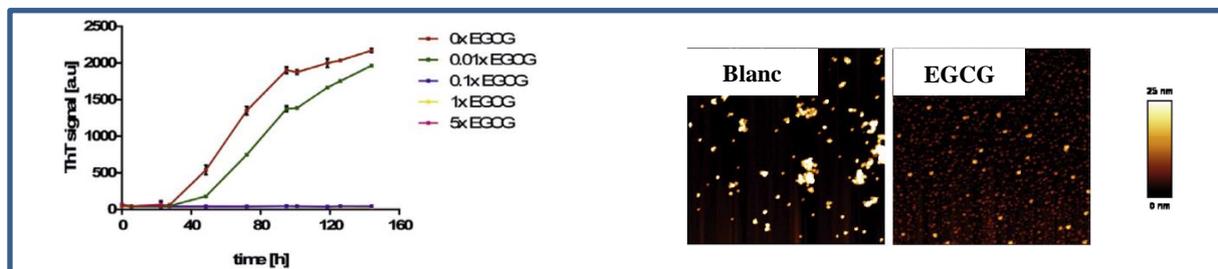
Le développement d'inhibiteurs de la formation de PHF est devenu depuis quelques années un axe majeur de recherche dans l'état de la prise en charge de la MA. Parmi ces inhibiteurs ont récemment été décrits les anthraquinones, les porphyrines, les phénothiazines et les polyphénols.<sup>[85]</sup> L'équipe de Goedert a ainsi évalué 42 composés, appartenant à ces classes de molécules, sur la formation de filaments de Tau induite par l'héparine *in vitro*. L'héparine est un polysaccharide anionique utilisé pour accélérer l'agrégation de Tau de manière à illustrer ce qu'il se passe quand la protéine est hyperphosphorylée. Cette étude réalisée à l'aide de microscopie électronique (**Fig. 21**) a montré que l'exifone **28** est un des candidats les plus prometteurs contre l'inhibition de la formation des filaments de Tau ( $IC_{50} = 3,3\mu M$ ). De plus, l'utilisation de ce composé permet également de prévenir l'agrégation de peptides amyloïdes ( $IC_{50} = 0,7\mu M$ ). Ces travaux démontrent également que l'EGCG est un candidat prometteur

puisqu'il permet également d'éviter la formation des fibres ( $IC_{50} = 1,8\mu M$ ) et des plaques amyloïdes ( $IC_{50} = 3\mu M$ ). Bien que ces résultats soient très encourageants, aucune donnée sur le mode d'interaction entre les polyphénols et la protéine Tau n'apparaissent dans ces travaux.



**Figure 21** : Formation de filaments de Tau (blanc) et inhibition par l'exifone.

En 2015, l'équipe de Wanker et de Bieschke a étudié l'effet de l'EGCG sur l'oligomérisation de Tau.<sup>[86]</sup> Pour cela les études ont été menées sur le fragment K18ΔK280 qui comprend les 4 domaines de liaison aux microtubules et une délétion de la Lysine 280 (ΔK280). Ce fragment de Tau peut s'agréger sous forme l'oligomères toxiques *in vitro*. Pour évaluer l'effet de **22** sur la formation d'agrégats, la Thioflavine T (ThT) qui émet de la fluorescence en se liant à des protéines qui sont sous la conformation de feuillets β a été utilisée. Sans EGCG, la fluorescence apparaît entre 24 à 30h (sans ajout d'héparine), avec 1% d'EGCG ce temps de latence est augmenté et avec des ajouts équimolaires d'EGCG la ThT n'émet pas de fluorescence ce qui traduit le blocage de la formation de feuillet β (**Fig. 22**). La détermination de la forme des agrégats après 120h d'incubation avec ou sans EGCG a été réalisée par microscopie à force atomique (AFM). Ces études traduisent la formation d'agrégats d'oligomères du fragment, alors qu'en présence d'EGCG seulement de petits agrégats sont observés (**Fig. 22**).



**Figure 22** : Fluorescence de la ThT en présence d'EGCG (gauche) et agrégation de K18ΔK280 sans et avec EGCG suivi par AFM au bout de 120h (droite).

Ces travaux montrent par ailleurs que l'EGCG semble prévenir la formation des agrégats de Tau sous forme de feuillet  $\beta$  par interaction avec les monomères puisque ce composé, d'après les résultats obtenus, apparaît comme intervenant relativement tôt dans le processus de formation des DNF. Cela est confirmé par des essais en présence d'héparine où l'EGCG ne prévient pas l'agrégation mais change la morphologie des oligomères. En effet, des petites structures sphériques sont obtenues tandis que sans EGCG il y a formation de fibres. De plus, il s'avère que l'EGCG prévient la formation d'oligomères toxiques dans des modèles de cellules neuronales.

Ces deux études montrent ainsi que l'utilisation des polyphénols pour lutter contre la formation des DNF est une piste envisageable. Toutefois très peu de détails sur les mécanismes moléculaires mis en jeu sont décrits et des recherches doivent encore être menées afin d'évaluer la capacité des polyphénols à interagir avec Tau à d'autres niveaux que dans la formation des DNF. Certaines études basées sur les relations de type structure-activité montrent que les hydroxyles des phénols sont très importants mais aucune étude ne montre quelles interactions sont mises en jeu entre ces fonctions et la protéine.<sup>[7]</sup> Devant ce manque crucial d'informations moléculaires régissant l'activité inhibitrice des polyphénols, notre équipe a initié des travaux devant permettre d'estimer l'affinité des polyphénols pour des fragments de protéine Tau ainsi que de déterminer les sites privilégiés et les types de liaisons mis en jeu dans ces interactions.

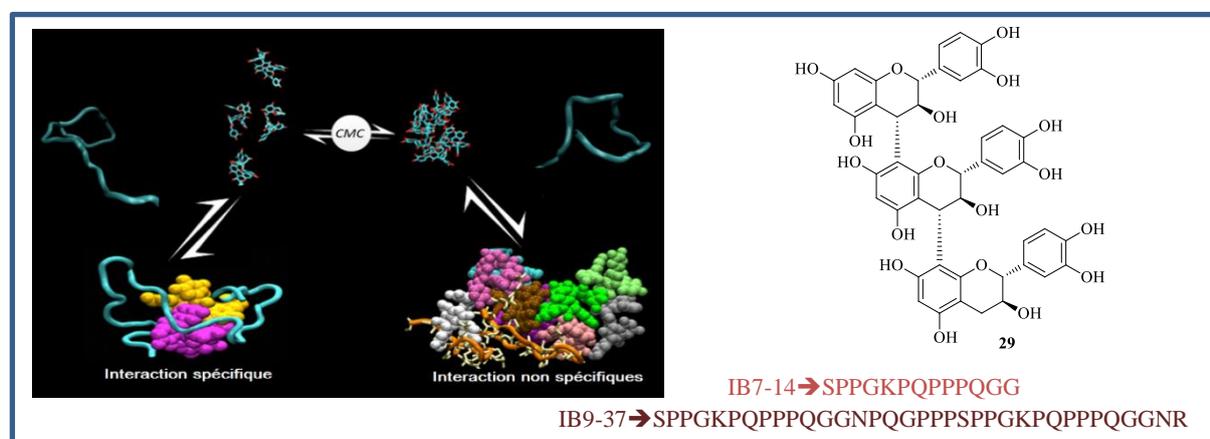
### 3) Interactions polyphénols-Tau : Informations moléculaires

#### a) Origine de l'étude

En 1973, Bate et Smith expliquent le phénomène d'astringence des tanins végétaux qui se traduirait par un phénomène de complexation entre les polyphénols et des protéines permettant aux plantes de se défendre contre des attaques microbiennes et animales. Les flavanols sont les plus consommés et sont particulièrement retrouvés dans les boissons tel que le vin ou le thé. Ce sont ces composés qui sont à l'origine du phénomène d'astringence dans le vin car ils ont la capacité d'interagir avec les protéines salivaires caractérisées par leur richesse en prolines (25 à 42% de prolines).<sup>[72]</sup> L'astringence se définit comme étant la sensation de rugosité en bouche et est bien souvent corrélé à la qualité du vin. Au niveau moléculaire il y a formation d'un complexe, entre les protéines salivaires et les polyphénols, qui précipite et qui est à l'origine de ce phénomène de sécheresse en bouche. Durant de

longues années, les chercheurs pensaient que les tanins se fixaient de manière non spécifique aux PRP (Protéines Riches en Prolines). Toutefois, plusieurs hypothèses ont émergé depuis les années 80, comme la création d'interactions hydrophobes entre les prolines et les aromatiques des polyphénols ou encore la formation de liaisons hydrogène entre les carbonyles du squelette protéique, notamment les carbonyles des prolines, avec les hydroxyles des phénols.<sup>[72],[87]</sup>

L'étude de la fixation et de l'affinité des polyphénols et en particulier des procyanidines, a été réalisée récemment par notre équipe afin d'expliquer le phénomène d'astringence et les mécanismes moléculaires mis en jeu. Pour cela, les interactions entre deux fragments de la protéine IB9, IB7-14 et IB9-37, avec 3 procyanidines (B1, B3 et un trimère C2 **29**) ont été étudiées par RMN et par dynamique moléculaire. Dans un premier temps, les études RMN ont permis de déterminer l'affinité des polyphénols pour les peptides *via* le calcul de constante de dissociation ( $K_D$ ) ainsi que le nombre de sites de fixation. Dans le cas du peptide le plus long (IB9-37) le  $K_D$  est de 1,4mM pour le B3, de 0.9mM pour le B1, de 0.4mM pour le C2 et le nombre de sites de fixation est de 2. De plus, il est également possible de déduire, par les variations maximales de déplacements chimiques, que les procyanidines interagissent au niveau de glycines et de prolines dans la région hydrophile de la molécule, ce qui est confirmé par les modélisations moléculaires. Enfin, les études de dynamique moléculaire ont démontré que le peptide IB39 est flexible dans son état natif et que les interactions avec les procyanidines induisent des changements de conformation de ce peptide. Toutefois, la précipitation du complexe serait induite par l'état colloïdal des polyphénols eux-mêmes. En effet, au-delà d'une certaine concentration, appelée concentration micellaire critique (CMC), les procyanidines précipitent sous formes de petites micelles, expliquant l'astringence (**Fig. 23**).<sup>[88],[89]</sup>

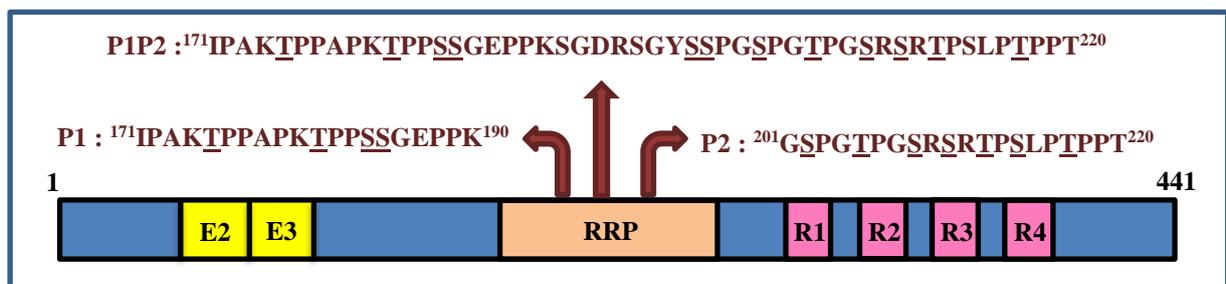


**Figure 23** : Interactions IB9-37/C2, Structure des peptides et de **29**.

Ces résultats montrent que les polyphénols, et en particulier les procyanidines sont capables d'interagir avec une affinité de l'ordre du mM avec des protéines riches en prolines et de manière spécifique sur certaines régions du peptide. Au vu de ces résultats, l'équipe s'est ensuite intéressée aux interactions possibles entre les procyanidines et la protéine Tau ayant pour point commun de posséder également des régions riches en prolines.

### b) Procyanidines et Protéine Tau

Dans le cadre de ces travaux antérieurs trois peptides modèles de la région riche en prolines ont été choisis, le P1 (<sup>171</sup>I-K<sup>190</sup>), le P2 (<sup>201</sup>G-T<sup>220</sup>) et le P1P2 (<sup>171</sup>I-T<sup>220</sup>). Le choix des différents fragments a été fondé par le fait que ces régions sont riches en prolines et par le fait qu'ils présentent de nombreux sites de phosphorylation caractéristiques dans le cas de MA (Fig. 24).



**Figure 24** : Peptides modèles de Tau et les sites de phosphorylation (soulignés).

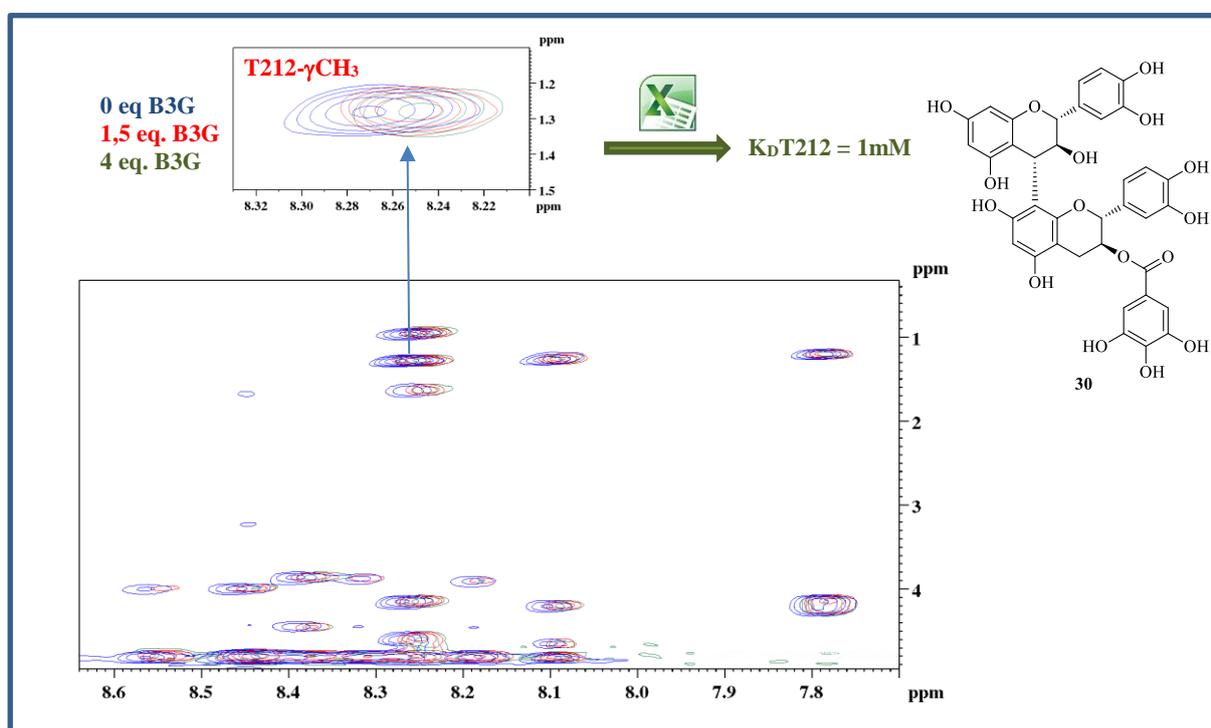
Dans un premier temps, les affinités ont été mesurées par le calcul des constantes de dissociation de plusieurs polyphénols avec les différents peptides. Pour cela, les peptides P1 et P2 ont été totalement caractérisés par RMN en utilisant la stratégie de Wüthrich, tandis que le P1P2 a été partiellement caractérisé par superposition de P1 et de P2. Afin de déterminer le  $K_D$  et les nombres de sites de fixation, des expériences de titrations avec les différents polyphénols en présence des peptides ont été réalisées. Ainsi l'ajout progressif de concentrations croissantes de polyphénols induit une variation des déplacements chimiques ainsi qu'une variation d'intensités des pics de certains résidus du peptide de plus en plus importante ce qui permet, après résolution de l'équation ci-dessous et à l'aide du solveur d'Excel, de déterminer l'affinité polyphénols/peptides (**Eq. 1**).

$$\text{Equation 1 : } A_{\text{obs}} = 1/2A_{\text{max}}[(1+K_D/n.P_0 + T_i/n.P_0)-((1+ K_D /n.P_0+T_i/n.P_0)^2-4T_i/n.P_0)^{1/2}]$$

Avec :

- $A_{\text{obs}}$  la variation de déplacement chimique observé.
- $A_{\text{max}}$  la variation de déplacement chimique maximal.
- $n$  le nombre de sites de fixation.
- $P_0$  la concentration en peptide.
- $T_i$  la concentration totale en polyphénols.

Les variations de déplacements chimiques sont suivies soit par une expérience RMN 1D de type  $^1\text{H}$  ou par une expérience 2D de type TOCSY dès lors que les recouvrements des signaux sont trop importants avec une simple RMN du proton (**Fig. 25**).



**Figure 25** : Exemple de titration avec le B3G **30** et le P2.

Les constantes de dissociation ont été calculées pour plusieurs résidus afin d'obtenir une moyenne pour chaque peptide. Les résultats de ces calculs sont détaillés dans le tableau ci-dessous pour le peptide P2 (**Tab. 1**).<sup>[90]</sup>

Procyanidines	K <sub>D</sub> (mM)	n
B3	4,0 ± 0,2	2,9 ± 0,2
B2	4,0 ± 0,1	2,9 ± 0,2
B1	3,3 ± 0,5	3,0 ± 0,3
B4	3,4 ± 0,5	2,8 ± 0,2
B6	1,8 ± 0,3	4,5 ± 0,3
B3G	1,2 ± 0,3	2,6 ± 0,2
C2	1,0 ± 0,1	2,8 ± 0,1
EGCG	0,9 ± 0,2	3,1 ± 0,2

**Tableau 1** : Constantes de dissociations et nombre de sites de fixation obtenus pour le P2.

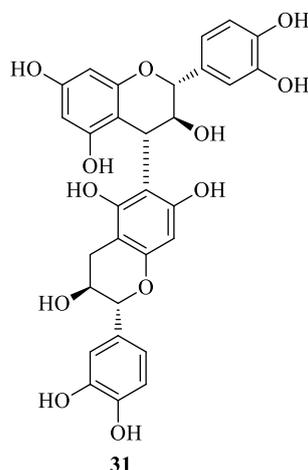
Les expériences réalisées avec les peptides P1 et P1P2 ont montré des résultats proches de ceux obtenus avec le P2 où les constantes de dissociation sont de l'ordre du mM. Ces données sont très intéressantes puisque même si l'affinité entre les procyanidines et les peptides n'est pas forte, elle est du même ordre de grandeur que celle classiquement décrite entre les kinases et les protéines riches en prolines.<sup>[91]</sup>

Ainsi, les sites de fixation des polyphénols ont été déterminés par RMN (variation de déplacements chimiques maximales) et par dynamique moléculaire. Dans le cas du P2 les procyanidines se fixent autour de la T205 et de la T212, pour le P1 autour de la T181 et dans le cas du P1P2 la fixation se ferait préférentiellement autour des T181, T205 et T212. Ces résultats ont mis en évidence une affinité des polyphénols au niveau des sites de phosphorylation, poussant l'équipe à poursuivre l'étude. De plus, les données de dynamique moléculaire montrent que des liaisons hydrogène s'établissent entre les polyphénols et les résidus localisés dans les régions hydrophiles des peptides. Ces liaisons hydrogène s'établissent entre les hydroxyles des phénols et les carbonyles ou chaînes latérales des résidus dans le cas de composés non galloylés. Toutefois, nous verrons avec l'étude RMN sur le P1P2 que les polyphénols peuvent jouer le rôle d'accepteur de liaison hydrogène lorsque la fonction galloyle est présente (Partie Résultats II. 2).

Ces résultats ont conduit l'équipe à suggérer qu'il pourrait exister une éventuelle compétition entre les kinases responsables des Tauopathies, telle que la MA, et les polyphénols pouvant être à l'origine d'une inhibition ou d'une minimisation de l'hyperphosphorylation et donc de l'agrégation de Tau.

## Objectifs

Les travaux antérieurs réalisés au sein du laboratoire ont permis de mettre en évidence les interactions entre les PRP et les procyanidines, notamment dans le cas de la RRP de la protéine Tau. L'objectif principal de la thèse s'inscrivant dans la continuité, est de montrer que les procyanidines sont capables d'inhiber l'activité des kinases par le biais de ces interactions Tau-Polyphénols. Pour cela, la synthèse de plusieurs polyphénols d'intérêt sera réalisée. La synthèse du dimère B6 **31** a fait l'objet d'une grande partie de ces travaux, de par son affinité intéressante avec les peptides modèles de Tau précédemment cités et de par le fait que la création de la liaison interflavane C4-C6 restait un vrai défi chimique puisque jusque-là une seule synthèse a été décrite (Partie Résultats I. 2., **Fig. 26**).



**Figure 26** : Structure du dimère B6 (**31**).

Par ailleurs, afin de pouvoir poursuivre notre étude sur les peptides P1, P2 et P1P2 il est important de valider ces modèles en réalisant des expériences d'interaction sur la protéine Tau intégrale. Pour cela, la biosynthèse de la protéine Tau enrichie en  $^{15}\text{N}$  et des tests d'interactions avec certains polyphénols ont été envisagés. Une fois nos modèles validés, ils pourront être utilisés pour mettre au point des réactions de phosphorylation ainsi que leur suivi cinétique. Ceci devant finalement permettre de déterminer l'effet des polyphénols sur la réaction de phosphorylation.

Le dernier objectif sera d'estimer le passage des procyanidines à travers la barrière hémato-encéphalique. Pour cela, il a été envisagé de synthétiser des polyphénols, soit conjugués avec une molécule fluorescente, soit marqué avec un radioélément tel que le Fluor 18 ( $^{18}\text{F}$ ), chimie développée par ailleurs dans le groupe.



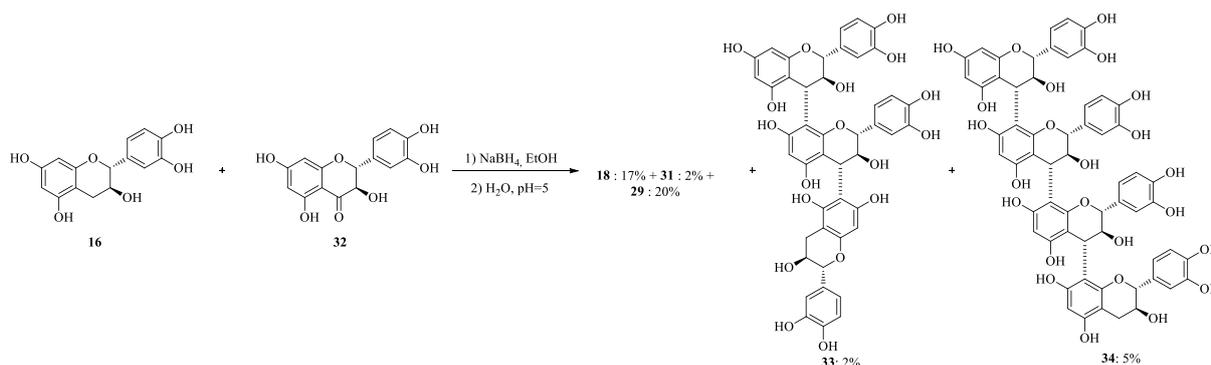
# Résultats

## I. Synthèses des Polyphénols

### 1) Synthèses de dimères de type C4-C8

#### a) Stratégie de Synthèse

Depuis la première synthèse de procyanidines réalisée par l'équipe de Geissman en 1966, de nombreux travaux ont été effectués afin d'optimiser l'obtention de ces composés.<sup>[92]</sup> Les principales difficultés rencontrées, lors de ces synthèses, sont liées à un contrôle de la régio et de la stéréosélectivité de la liaison interflavane ainsi que de celui du degré d'oligomérisation. Les premières réactions menant à la formation de procyanidines étaient faites à partir d'unités monomériques, non protégées de type catéchine et flavan-3,4-diols en milieu acide.<sup>[92],[93]</sup> La synthèse de Roux en 1983, basée sur les conditions de Geissman, a conduit à l'obtention d'un mélange complexe de procyanidines qui a été purifié par colonne Sephadex LH20 (**Fig. 27**).

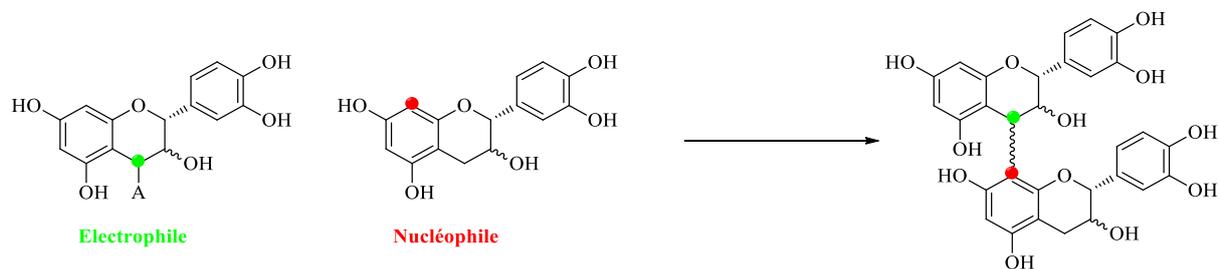


**Figure 27** : Synthèse de procyanidines par l'équipe de Roux.

L'obtention de deux dimères, à partir de la catéchine et du flava-3,4,diols méthylié avec un rendement de 67% par Geissman a permis de confirmer que la dimérisation se faisait *via* une réaction de condensation. Toutefois les composés ne peuvent pas être purifiés et une épimérisation au niveau du C4 révèle un manque de stéréosélectivité.

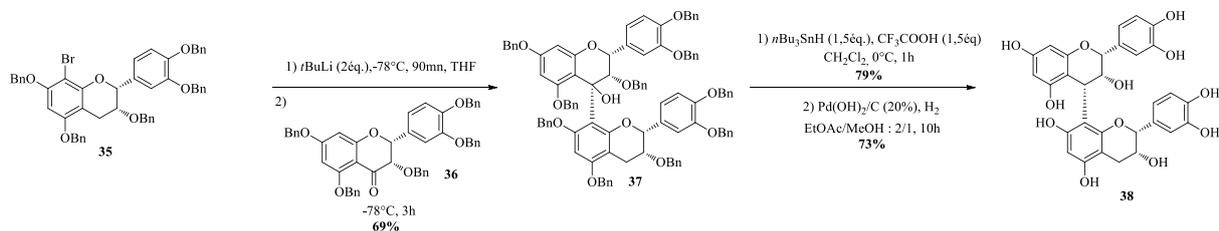
Ces synthèses s'illustrent par un manque de régiosélectivité, de stéréosélectivité et de contrôle du degré d'oligomérisation menant ainsi les chercheurs à travailler sur des monomères protégés. Pour réaliser des condensations de flavanols protégés deux types de couplage sont décrits dans la littérature : les couplages organométalliques et les couplages cationiques. Le couplage cationique est le plus utilisé et une étude réalisée au cours de la thèse de Karine Barathieu a révélé que le couplage organométallique est beaucoup moins efficace pour la synthèse de tanins condensés.<sup>[94]</sup>

La stratégie du couplage cationique repose sur la condensation de 2 unités flavanols, une électrophile activée en position C4 et une nucléophile en position C8 (**Fig. 28**).



**Figure 28** : Couplage cationique. Avec A = Activateur.

Le couplage cationique peut être réalisé par une addition nucléophile ou par une substitution nucléophile. En 2001 l'équipe de Tückmantel a réalisé une addition nucléophile *via* une condensation entre un flavanol protégé et bromé en position 8 **35**, mis en présence de *t*BuLi, et un flavonoïde présentant une cétone en position 4 **36** pour donner le produit de couplage **37** avec un rendement de 69%. Le composé **37** ensuite été engagé dans une réaction de désoxygénation suivie d'une débenzylation pour conduire à **38** avec un rendement global de 40% (**Fig. 29**).<sup>[95]</sup>

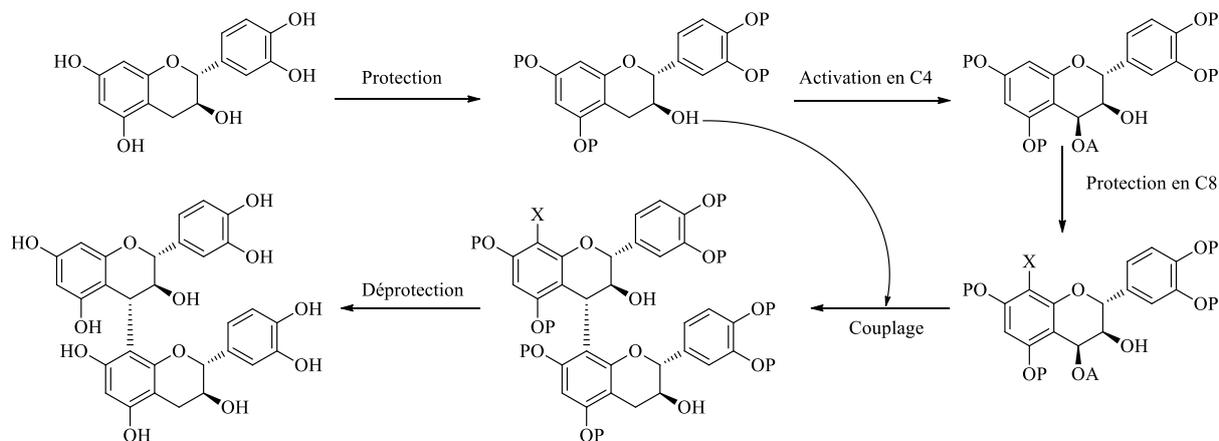


**Figure 29** : Couplage de Tückmantel.

Cette stratégie permet un bon contrôle de la régiochimie en C4-C8 et du degré d'oligomérisation, seul un dimère se forme. Toutefois le contrôle de la stéréochimie pose des problèmes puisque dans le cas de cette synthèse de Tückmantel un dimère non naturel **38** est obtenu. Cette réaction confirme les résultats obtenus par l'équipe de Weinges en 1967, rendant nécessaire le développement d'une autre stratégie tel que le couplage cationique par substitution nucléophile.<sup>[96]</sup>

Depuis plusieurs années, notre équipe s'intéresse à la synthèse de procyanidines et c'est notamment grâce aux travaux d'Isabelle Tarascou que la stratégie de formation de dimères de manière régio- et stéréosélective par substitution nucléophile a été établie.<sup>[97]</sup> Cette synthèse repose sur un couplage entre deux flavanols protégés introduits en quantité stœchiométrique,

un monomère électrophile activé en C4 et protégé en position 8 et un monomère nucléophile (Fig. 30).

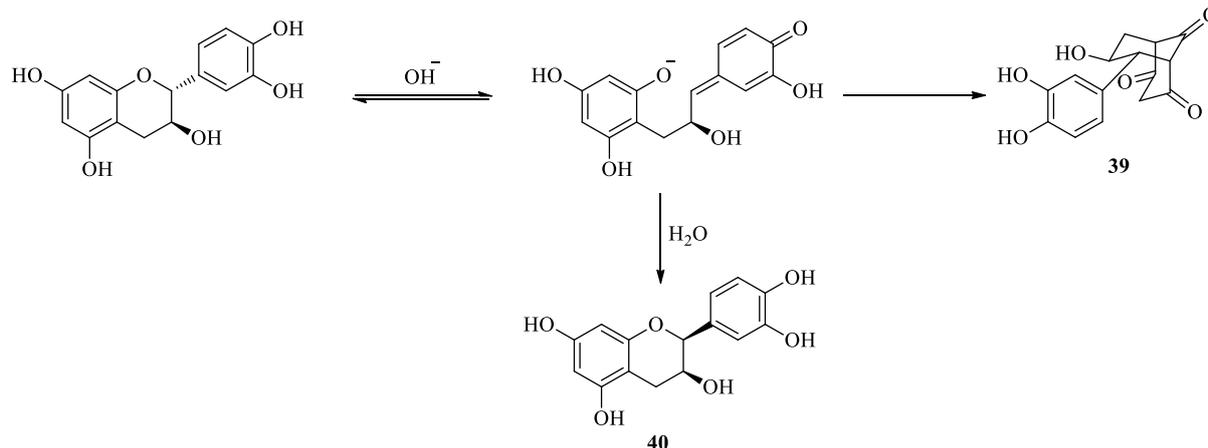


**Figure 30** : Stratégie de synthèse de procyanidines.

### b) Synthèse des monomères fonctionnalisés

- Protection des monomères

Les flavan-3-ols sont des composés relativement sensibles à la température, à l'oxygène et au pH.<sup>[98]</sup> En effet, comme nous l'avons vu dans la partie bibliographie, les polyphénols sont de puissants anti-oxydants, ils sont donc sensibles à la présence d'oxydants tel que l'oxygène qui peut induire la transformation des phénols en quinones. Il a également été démontré que les catéchines sont instables en dehors de la zone de pH 5-8. Un milieu acide peut conduire à la polymérisation de ces monomères tandis qu'en milieu basique la catéchine peut se réarranger. En effet, l'équipe de Sears a montré qu'un traitement de la catéchine par NaOH à reflux conduit à un réarrangement de la catéchine en acide catéchinique **39**.<sup>[99]</sup> Ce réarrangement serait initié par une ouverture du cycle pyrane en C2 ce qui peut également conduire à une épimérisation de cette position pour donner l'énantiomère de l'épicatéchine **40** (Fig. **31**).<sup>[100]</sup> Ces deux réarrangements sont accélérés à haute température (T = 100°C) et l'épimérisation peut même être observé à des pH faibles (pH = 5).



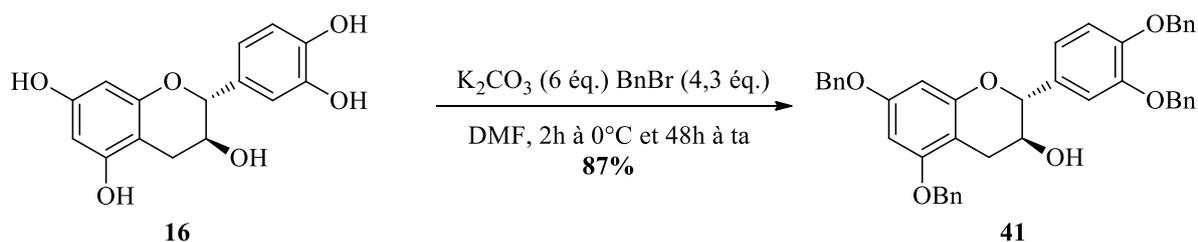
**Figure 31** : Epimérisation et réarrangement de la catéchine en milieu basique.

Les dimères non protégés peuvent aussi se dégrader en milieu acide ou basique par rupture de la liaison interflavane. En effet, le traitement de polymères de flavanols par un acide conduit à la cassure de la liaison interflavane induisant la formation de polymères plus petits et à des unités catéchiniques possédant un carbocation en position C4.<sup>[101]</sup> Ces carbocations peuvent réagir avec les procyanidines présentes dans le milieu pour ainsi former d'autres oligomères ou polymères avec une liaison interflavane pouvant se faire entre le C4 et le C8 ou entre le C4 et le C6.

Enfin, précédemment il a été discuté de la synthèse des procyanidines sans groupement protecteur conduisant à la formation de liaisons interflavanes de manière non régiosélective. Or, il a été démontré que protéger les fonctions phénoliques est essentiel pour le contrôle de la régiosélectivité de cette liaison.<sup>[102]</sup>

Plusieurs groupements protecteurs ont été testés dans la littérature : les méthyles,<sup>[103]</sup> les acétates,<sup>[104]</sup> et les benzyles.<sup>[102]</sup> Toutefois, les stratégies proposées dans la littérature pour déprotéger les méthyles et les acétates des procyanidines ne semblent pas compatibles avec la fragilité des produits déprotégés (voir IV). Ces groupements protecteurs ne s'éliminent pas de façon douce (excès de  $\text{BBr}_3$  pour les méthyles) et peuvent conduire à une dégradation des composés.<sup>[105]</sup> A l'inverse, les groupements benzyliques peuvent s'éliminer dans des conditions douces et, selon les conditions choisies, une élimination du groupement protecteur en position C8 de manière simultanée est envisageable. De plus, les benzyles sont stables dans des conditions acides et basiques ce qui fait de ces groupements protecteurs de bons candidats pour la synthèse de procyanidines.

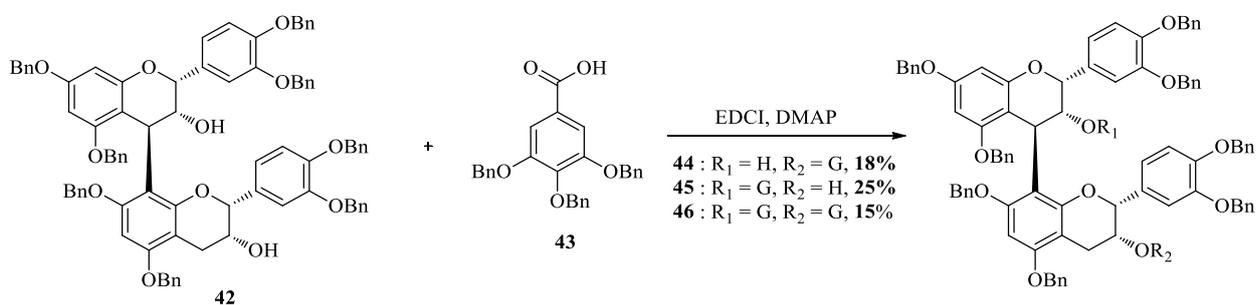
La protection des alcools peut se faire de manière sélective en choisissant une base appropriée puisque l'hydroxyle en position 3 est moins acide que les phénols. Pour réaliser cette réaction, les conditions décrites par Buffnoir ont été reprises en utilisant comme base du  $K_2CO_3$  en excès, comme agent de benzylation du bromure de benzyle et comme solvant le DMF.<sup>[106]</sup> La réaction est réalisée pendant 2h à 0°C de manière à éviter des réactions parasites de C-alkylation en position 8 et 6 puis l'agitation est maintenue pendant 48h. Après purification sur gel de silice la catéchine tétrabenzylée **41** est obtenue avec un bon rendement de 87% (**Fig. 32, p199**).



**Figure 32** : Benzylation de la Catéchine.

- Galloylation des monomères nucléophiles

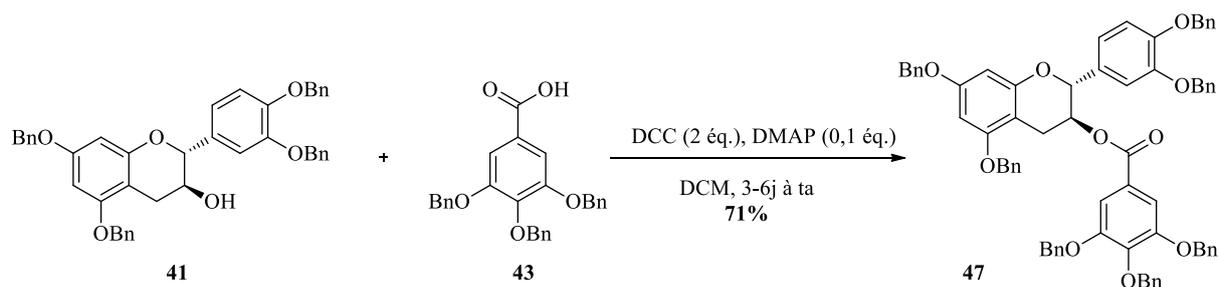
Dans le cadre de ces travaux, la synthèse du dimère B3G **30** a été envisagée, puisque comme nous l'avons vu précédemment, ce composé fait partie des dimères présentant les meilleures affinités avec les peptides modèles de Tau. Pour cela, deux stratégies sont envisageables : la galloylation des dimères ou la galloylation des monomères. En 2013, l'équipe de Fujii et Makabe a réalisé la galloylation du dimère B2 **42** en position C3 du cycle F *via* une estérification par de l'acide gallique **43** en présence d'EDCI et de DMAP (**Fig. 33**).<sup>[107]</sup>



**Figure 33** : Galloylation du B2 selon Fujii et Makabe.

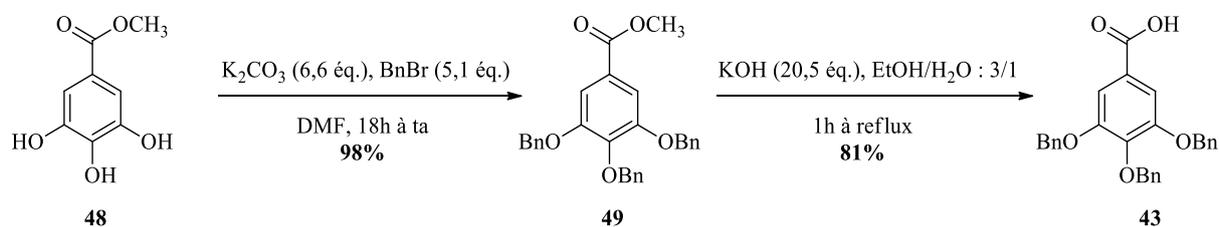
Cette réaction a conduit à **44** avec un faible rendement de 18%, car ces conditions ne sont pas régiosélectives. En effet, le groupement galloyle se fixe également en position C3 du cycle C et conduit ainsi à un mélange de 3 composés (mono galloylés sur le cycle C **44** ou sur le cycle F **45** ou doublement galloylés **46**).<sup>[107]</sup> Malgré de bons rendements obtenus pour le B3G à

partir du B3 (65% en utilisant du DCC), il a été privilégié la galloylation du monomère qui conduit à de meilleurs rendements avec une régiosélectivité totale. En 2004, Saito a décrit la galloylation de la catéchine tétrabenzylée par une estérification de Steglich en utilisant du DCC (2 éq.) et de la DMAP (0,05 éq.).<sup>[108]</sup> Cette réaction est décrite comme étant quantitative au bout de 12h mais il s'est avéré, qu'après une mise au point réalisée par Marie Guéroux cette réaction n'était pas reproductible et nécessite jusqu'à 6 jours d'agitation. Dans le meilleur des cas, **47** est obtenu avec rendement de 71% après purification (**Fig. 34**).



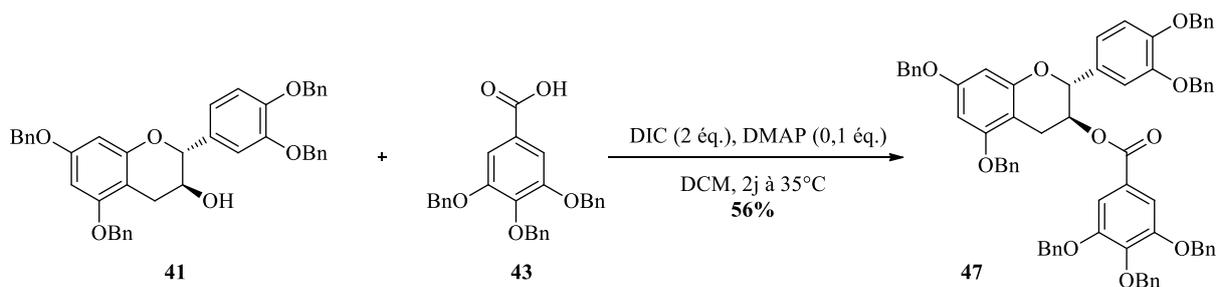
**Figure 34** : Galloylation de la catéchine **41**.

Le composé **43** est un produit commercial, mais son coût excessif (environ 20€ le gramme) nous a conduit à réaliser la synthèse à partir de l'ester méthylique de l'acide gallique **48** bien moins coûteux (moins de 1€ le gramme). Ainsi, le composé **43** a été obtenu en deux étapes, la première étant la protection des fonctions phénoliques et la deuxième étant une étape de saponification. La protection est réalisée en mettant **48** en présence d'un excès de  $K_2CO_3$ , (6,6 éq.) et de  $BnBr$  (5,1 éq.) dans du DMF anhydre conduisant à **49** avec un rendement de 98%. La saponification de **49** est réalisée avec un excès de  $KOH$  (20,5 éq.) dans un mélange éthanol/ $H_2O$  : 3/1 et après recristallisation dans l'éthanol **43** est obtenu avec un rendement de 81% (**Fig. 35**, p200).



**Figure 35** : Synthèse de l'acide gallique tri-benzylé **43**.

Les conditions de galloylation présentées sur la **Figure 34** n'étant pas reproductibles, de nouvelles conditions ont été mises au point en utilisant le couple DIC/DMAP à 35°C conduisant à la catéchine galloylée **47** avec un rendement de 56% après purification sur gel de silice (**Fig. 36**, p201).

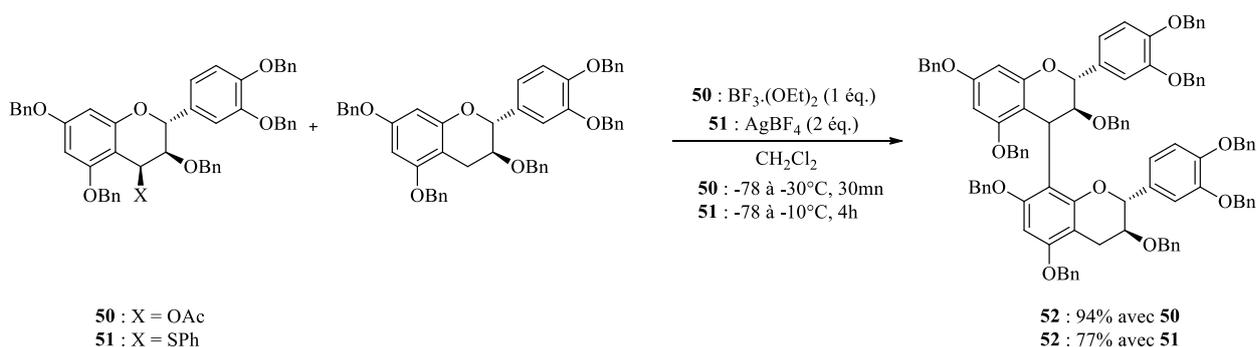


**Figure 36** : Synthèse de la catéchine galloylée **47**.

Malgré l'obtention de rendements moyens, ces conditions sont reproductibles et ont donc été conservées pour la suite des synthèses.

- Activation du Carbone C4 de l'unité électrophile

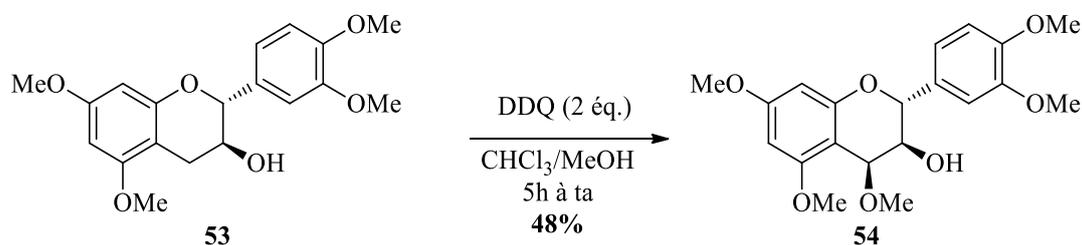
Le couplage cationique par substitution nucléophile nécessite l'activation de la position 4 avec un bon groupement partant, permettant ainsi l'augmentation du caractère électrophile de cette position. Dans la littérature, la fonctionnalisation de la position benzylique des flavanols a été décrite avec différents hétéroatomes tel que le Brome,<sup>[109]</sup> le Soufre<sup>[110]</sup> ou encore l'Oxygène.<sup>[111]</sup> Les couplages cationiques sont majoritairement réalisés avec des groupements oxygénés, de par la stabilité de l'unité électrophile et de par la réactivité que va avoir l'oxygène avec des acides de Lewis (voir **Fig. 45**). De plus, dans le cas du B3, l'étude de Suzuki réalisée en 2004, montre que les rendements obtenus lors du couplage avec un groupement partant oxygéné sont meilleurs qu'avec un groupement partant soufré (**Fig. 37**).<sup>[112]</sup>



**Figure 37** : Couplage de Suzuki *et coll.*

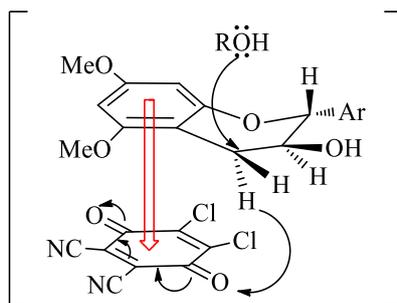
De plus, notons que la formation de la liaison du composé **52** n'est pas totalement stéréosélective et malgré l'utilisation de deux groupements activant différents la stéréochimie de **52** est la même ( $\alpha/\beta$  : 9/1). Ce résultat sera discuté ultérieurement. Pour la suite de ce travail nous avons donc choisi de travailler avec des groupements activants oxygénés par

oxydation de la position C4 réalisée en présence d'un excès de DDQ. En effet, dans ces conditions en 1985 l'équipe de Roux met au point une l'activation du C4 de la catéchine méthylée par le méthanol conduisant au composé **54** avec un rendement de 48% (**Fig. 38**).<sup>[113]</sup>



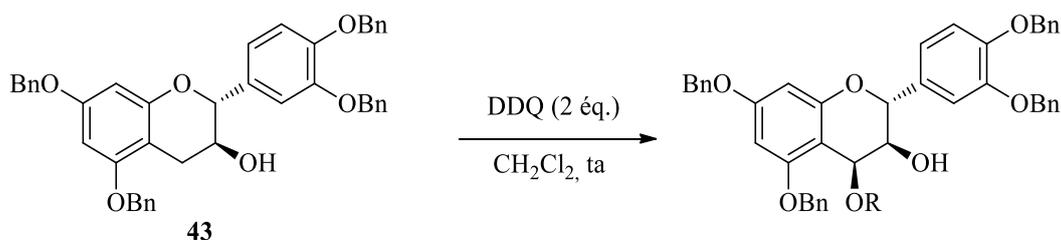
**Figure 38** : Activation de la position C4 par le méthanol.

Cette réaction a également été effectuée avec l'épicatéchine et des rendements similaires ont été obtenus par l'équipe de Roux montrant l'efficacité de l'activation de la position benzylique par le DDQ. Ajouté en excès, le DDQ permet également de réaliser cette réaction de manière efficace puisque l'abstraction de l'hydrure se fait plus rapidement qu'avec une quantité stœchiométrique. Il est également intéressant de noter que la diastéréosélectivité du C4 est totale conduisant à une stéréochimie du type S sur ce centre asymétrique qui peut s'expliquer par le mécanisme réactionnel mis en jeu. En effet, le DDQ est utilisé pour sa capacité à faire des complexes par transfert de charges avec les molécules aromatiques, et le noyau aromatique du DDQ étant pauvre en électrons va avoir tendance à faire le complexe avec un noyau aromatique riche en électrons. Or, dans le cas de la catéchine, 2 noyaux aromatiques peuvent être concernés, le cycle A et le Cycle B. Toutefois le cycle A possède une densité électronique plus riche que le cycle B expliquant dans un premier temps que le complexe par transfert de charges se forme entre le cycle A et le DDQ. L'approche du DDQ pourrait se faire en dessous du cycle A ou bien au-dessus mais ici un seul diastéréoisomère est obtenu pouvant traduire d'une approche préférentielle. En effet, en 1991 l'équipe de Roux montre qu'un effet répulsif entre l'hydrogène du C2, située en position axiale et le DDQ empêche l'approche de ce dernier par la face supérieure l'obligeant ainsi à se placer en dessous du cycle A. L'abstraction de l'hydrure sur le C4 se fait donc en Pro-R simultanément avec l'attaque du méthanol sur la face supérieure expliquant ainsi la stéréochimie S du C4 (**Fig. 39**).<sup>[103]</sup>



**Figure 39** : Mécanisme de l'activation par le DDQ selon Roux *et coll.*

Par la suite, de nombreux autres groupements activant cette position C4 de la catéchine ont été décrits dans la littérature tel que l'hydroxyle,<sup>[114]</sup> le méthoxyle, l'éthoxyle,<sup>[115]</sup> l'acétate,<sup>[116]</sup> l'alcool benzylique, l'éthylène glycol et le 2-éthoxyéthanol.<sup>[117]</sup> En particulier, en 2002 l'équipe de Saito a réalisé cette activation avec différents électrophiles en utilisant les conditions établies par Roux *et coll.* sur la catéchine benzylée (**Fig. 40**).

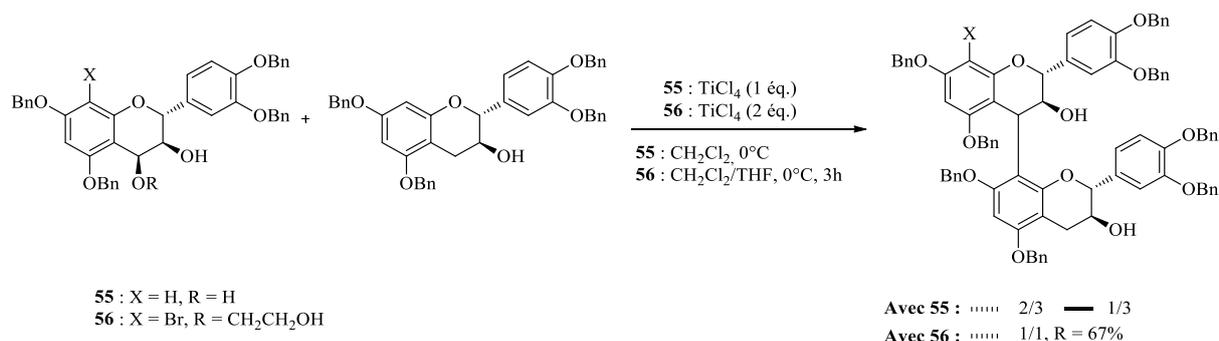


R	Temps (h)	Rendement (%)
CH <sub>3</sub>	4	52
CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	8	58
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	6	74
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2	98
CH <sub>2</sub> Ph	12	86

**Figure 40** : Activation de la catéchine benzylée.

D'après les rendements obtenus l'activation de la catéchine benzylée semble être plus efficace avec le 2 éthoxyéthanol et l'éthylène glycol. Toutefois, cela ne suffit pas à justifier le choix de ces groupements pour la suite de la synthèse. Il faut rajouter, qu'il a été observé que le choix du groupement activant à une grande influence sur la réaction de couplage cationique elle-même ainsi que sur le contrôle de la stéréochimie de la liaison interflavane. Comme nous l'avons vu dans le cas du couplage de Suzuki (**Fig. 37**), la stéréochimie de la liaison interflavane est de 9/1 ( $\alpha/\beta$ ) avec un groupement activant de type acétate. Avec un

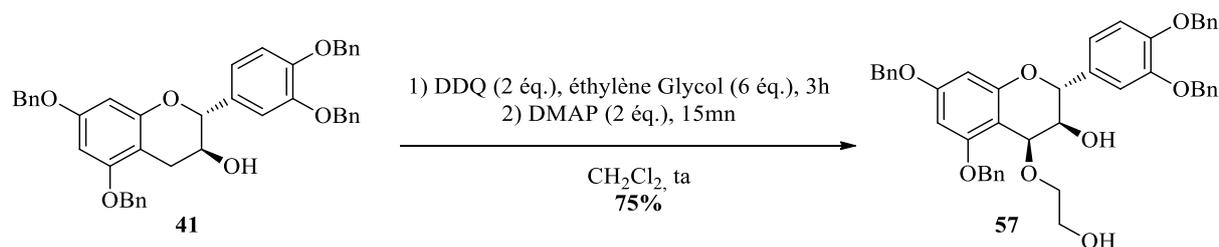
groupement hydroxyle et en utilisant le  $\text{TiCl}_4$  comme acide de Lewis en excès, l'équipe de Vercauteren a obtenu les mêmes dimères avec un ratio de 3/1.<sup>[114]</sup> Or, Isabelle Tarascou a montré que l'utilisation de l'éthylène glycol comme groupement activant conduit au dimère naturel B3 avec un contrôle total de la stéréochimie en utilisant également du  $\text{TiCl}_4$  (**Fig. 41**). Le rendement de couplage obtenu par Vercauteren n'est pas indiqué puisque le couplage a été réalisé avec un mélange racémique sur la position C2 du composé **55**.



**Figure 41** : Stéréosélectivité du couplage cationique en fonction du groupement activant.

Le mécanisme de cette réaction sera discuté par la suite pour justifier la différence de stéréosélectivité observée.

Compte tenu de cela, nous avons choisi d'activer la catéchine avec de l'éthylène glycol dans les conditions décrites par Roux *et coll.* Pour cela, le composé **41** a été mis en présence de DDQ et d'éthylène glycol en excès dans du DCM pendant 3h et la réaction a été stoppée avec de la DMAP. Le composé **57** a ainsi été obtenu avec un rendement de 75% après purification sur gel de silice (**Fig. 42, p202**).

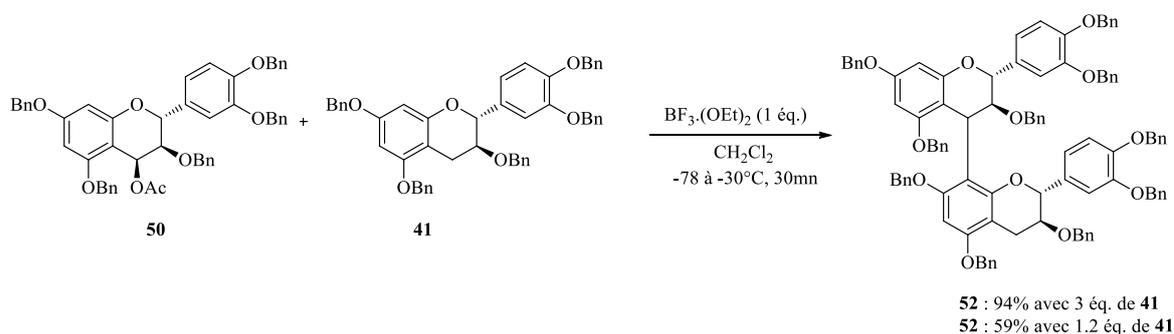


**Figure 42** : Activation de la catéchine benzylée par l'éthylène Glycol.

Une autre voie d'activation par l'alcool propargylique a été utilisée et sera discutée dans la partie IV.

- Protection du C8 de l'unité électrophile.

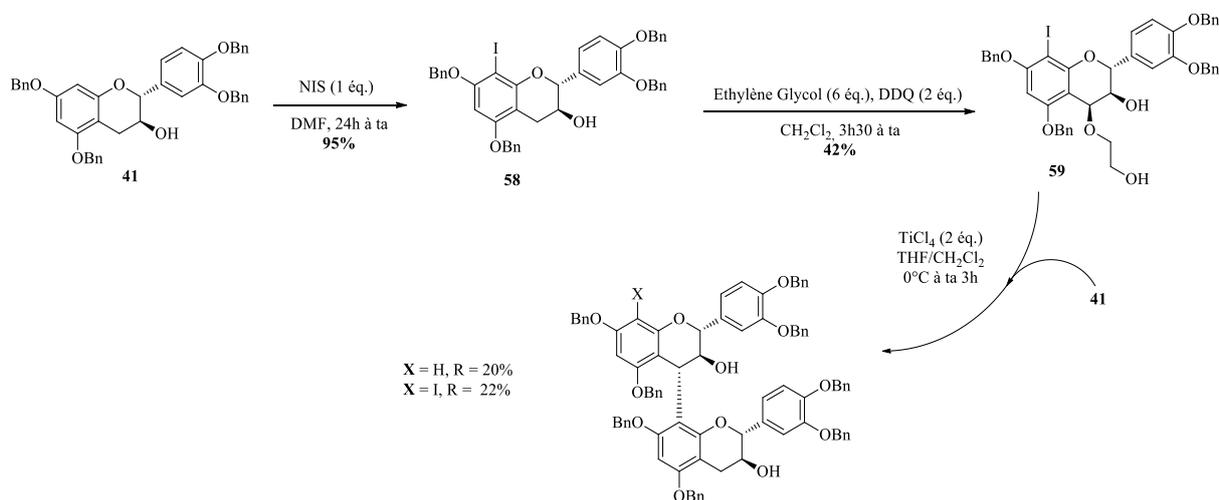
La protection de la position C8 de l'unité électrophile est cruciale pour contrôler le degré d'oligomérisation des procyanidines lors de l'étape de couplage. En effet, lorsque le couplage est réalisé avec l'électrophile non protégé en C8 et le nucléophile en quantité stœchiométrique, les rendements sont nettement moins bons que lorsque l'unité nucléophile est mise en excès. L'équipe de Saito a montré cet impact en réalisant la réaction de couplage avec ou sans excès de nucléophile dans les mêmes conditions expérimentales (**Fig. 43**).<sup>[112]</sup>



**Figure 43** : Couplage sans protection en C8.

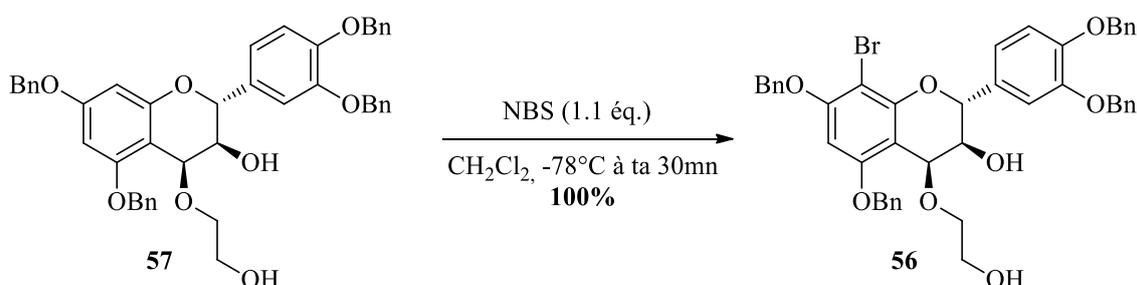
La différence de rendement observée est expliquée par la formation importante et non contrôlée d'oligomères d'ordre supérieurs. En effet, dans le cas où un seul équivalent de **41** est présent dans le milieu, 31% de trimère est isolé ainsi que 7% d'oligomères de plus hauts poids moléculaires. Les différents couplages décrits dans ces conditions dans la littérature, sans protection du monomère électrophile C8, et utilisant un excès de nucléophile donnent les mêmes résultats avec de très bons rendements.<sup>[118]</sup> Toutefois, l'utilisation d'un excès d'unité nucléophile n'est pas une solution viable pour des synthèses à grande échelle, la protection du C8 semble donc être indispensable. Dans la littérature, la protection des unités catéchiques est principalement décrite avec des halogènes tel que le brome et l'iode et récemment l'équipe de Smith a utilisé un acide boronique permettant de réaliser des couplages avec de très bons rendements (90-95%).<sup>[119]</sup> Dans notre cas, l'utilisation des halogènes a été privilégiée, car largement décrite avec d'excellents rendements et nécessitant moins d'étapes de synthèse qu'avec l'acide boronique. L'utilisation de l'iode et du brome se justifie par le fait que cette halogénéation doit être régiosélective et utiliser le chlore ou le fluor peut conduire à des mélanges de régio-isomères (voir Synthèse de Dimère C4-C6, Chloration). Isabelle Tarascou a décrit l'iodation de **41** avec le NIS conduisant à **58** avec un rendement 95% et a réalisé l'activation en C4 par l'éthylène glycol par la suite conduisant à **59** avec un rendement de

42%. Le composé **59** a ensuite été engagé dans une réaction de couplage en conditions stoechiométriques mais il s'est avéré que la liaison carbone-iodo est trop fragile conduisant à une déprotection du Carbone C8 en cours de couplage. La perte de l'iode, au cours de la réaction, conduit à la formation d'oligomères et a donc un impact direct sur le rendement en dimère désiré qui n'est que de 42% (**Fig. 44**).



**Figure 44** : Couplage avec l'unité électrophile protégé en C8 par de l'iode.

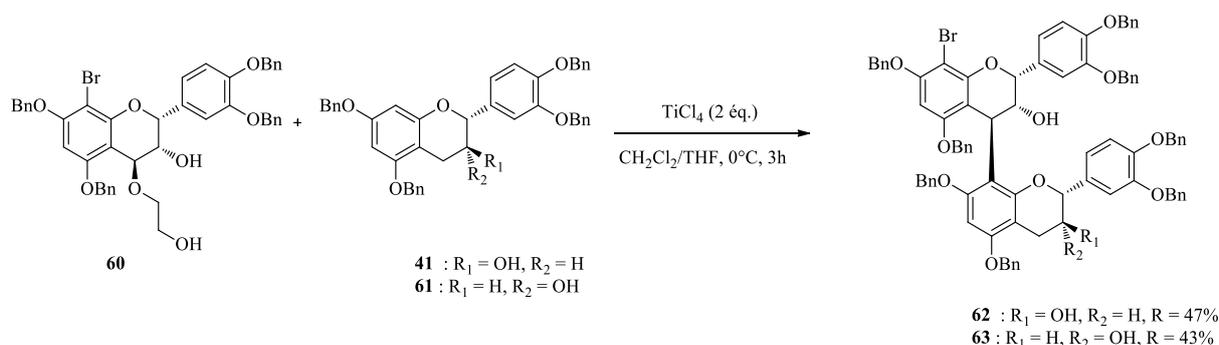
Au vu de ces résultats, le brome a donc été utilisé pour la suite car la réalisation du couplage avec l'unité électrophile protégée par le brome dans les mêmes conditions que précédemment ne conduit pas à une cassure de la liaison C-Br.<sup>[102]</sup> Pour réaliser la bromation, nous avons utilisé le NBS, mais d'autres agents de bromation ont été décrits dans la littérature pour bromer des catéchine tel que le PHPB (l'hydrobromure-perbromure de pyridinium).<sup>[120]</sup> Contrairement à l'iodation présentée précédemment, la bromation se fait après l'étape d'activation de manière à avoir un rendement global sur les deux étapes plus élevé. L'obtention du composé **56** se fait donc par l'ajout de NBS à  $-78^{\circ}\text{C}$  sur le composé **57** avec un rendement quantitatif ne nécessitant pas d'étape de purification (**Fig. 45, p203**).



**Figure 45** : Bromation de la catéchine activée par l'éthylène glycol.

- Couplage par formation de la liaison interflavane

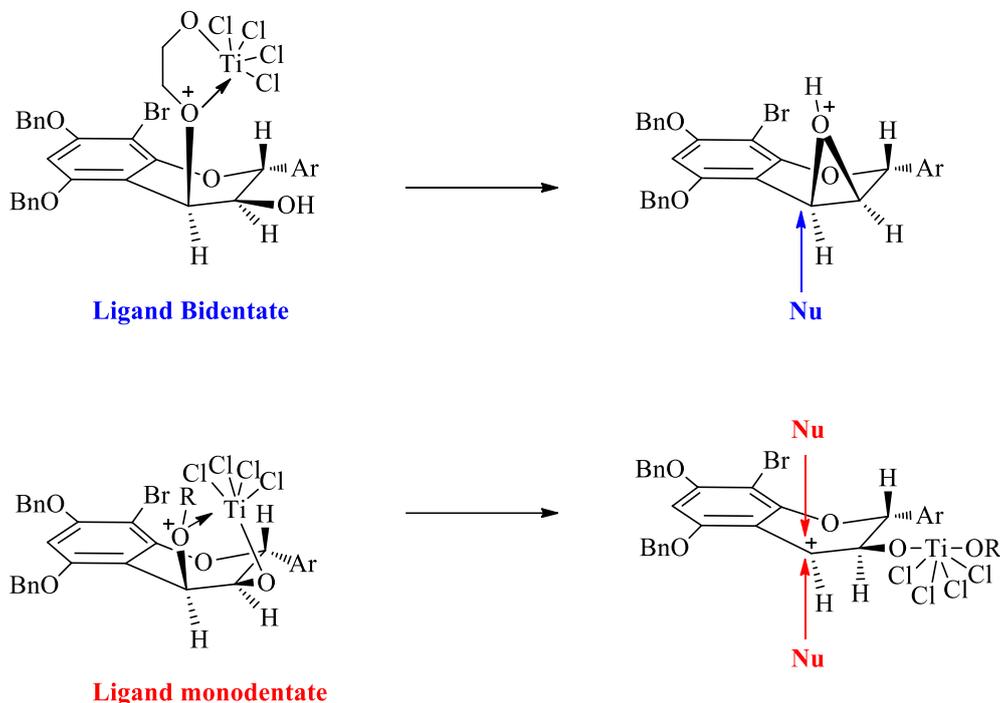
La première synthèse de tanins condensés entre des unités catéchiniques utilisant un acide de Lewis a été décrite en 1990 par l'équipe de Kawamoto permettant d'obtenir un tétramère avec un rendement de 99%.<sup>[121]</sup> Les conditions développées dans ces travaux, utilisant le  $\text{TiCl}_4$  comme acide de Lewis, ont été largement reprises dans la littérature, notamment par Vercauteren (**Fig. 41**). Les principales difficultés de ce couplage sont le contrôle de l'oligomérisation, la régiosélectivité et la stéréosélectivité de la liaison interflavane. Or, comme nous l'avons vu précédemment, les conditions mises au point par Isabelle Tarascou en 2006, ont permis d'obtenir le dimère B3 avec un bon rendement (67%) et surtout de manière stéréosélective (**Fig. 41**). Pour pouvoir expliquer la stéréochimie de la liaison interflavane, les synthèses du dimère B1 **62** et B2 **63** ont également été réalisées par l'équipe dans les mêmes conditions que pour le B3 (**Fig. 46**).<sup>[102]</sup>



**Figure 46** : Synthèse des dimères B1 et B2.

Dans le cas du dimère B3 une inversion de la configuration du carbone C4 est observée alors que dans le cas des dimères B1 et B2 une rétention de la configuration de ce carbone a lieu. Notons que dans le cas de la synthèse du dimère B4 (catéchine-épicatéchine) une inversion de configuration est également observée. Il apparaît donc que la stéréochimie du carbone C3 de l'unité supérieure gouverne la stéréochimie de la liaison interflavane. Or, comme nous l'avons vu dans le cas de la synthèse de Vercauteren, des mélanges de stéréoisomères peuvent être obtenus dans ces mêmes conditions réactionnelles. Donc la seule configuration du carbone C3 ne suffit pas à expliquer la stéréochimie de la liaison interflavane. Dans le cas de ces deux synthèses la seule différence vient de la nature du groupement activant. Le titane, pendant sa complexation avec l'unité électrophile, va adopter un état bis-chélaté de manière préférentielle. Le groupement éthylène glycol est un bon ligand bidentate et sa complexation avec le  $\text{TiCl}_4$  permet la formation d'un carbocation stabilisé par l'hydroxyle en C3 par le biais d'un pont oxonium. L'attaque du nucléophile en position C4 se fait donc sur la face opposée

au pont oxonium induisant ainsi la formation de la liaison interflavane de manière stéréosélective (**Fig. 47**).

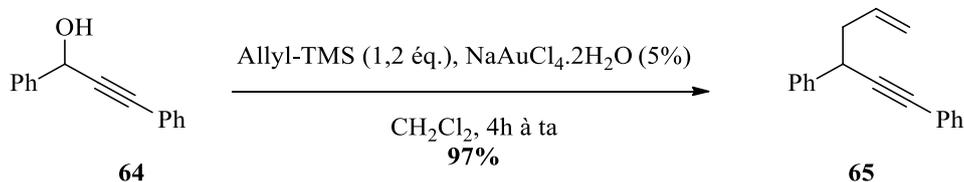


**Figure 47** : Complexation du titane avec un ligand bidentate ou monodentate.

Dans le cas du ligand monodentate, l'hydroxyle en C3 est engagé dans la sphère de coordination du titane et ne peut plus stabiliser le carbocation benzylique ce qui a un impact direct sur la formation non sélective de la liaison interflavane. Cependant l'utilisation du titane dans ces synthèses implique l'utilisation de conditions dures pouvant être à l'origine des rendements de couplage limités. Divers acides de Lewis sont décrits dans la littérature comme promoteurs de cette réaction de couplage tel que  $\text{BF}_3 \cdot \text{O}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ ,  $\text{Et}_2\text{AlCl}$ , ou encore des terres rares tel que  $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ .<sup>[115]</sup> Malgré des bons rendements obtenus lors de certains couplages avec ces composés, leur utilisation se fait en quantités substoechiométriques voire stoechiométriques ce qui peut poser des problèmes pour les industries pharmaceutiques où les traces de métaux dans les médicaments ne sont pas tolérées. Afin de travailler dans des conditions plus douces, l'équipe a développé en 2015, une version catalytique du couplage par des sels d'or.<sup>[122]</sup>

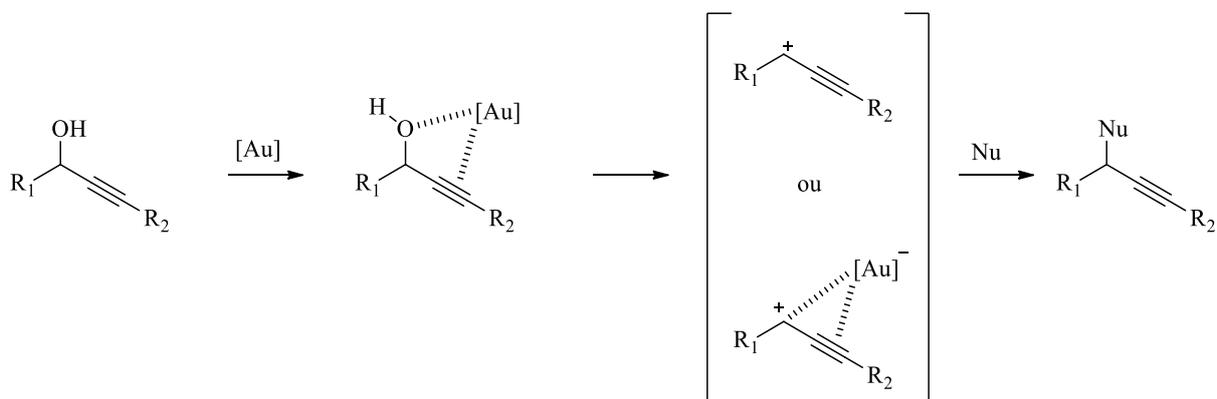
Considéré pendant longtemps comme inactif en catalyse organométallique, l'or a fait l'objet de nombreuses études comme catalyseur depuis l'hydrogénation d'oléfines réalisée par l'équipe de Bond en 1973 (catalyseur :  $\text{Au}/\text{SiO}_2$ ).<sup>[123]</sup> Ainsi, les catalyseurs à l'or ont été utilisés pour réaliser des réactions d'oxydation, pour de l'activation C-H ou encore pour des

additions nucléophiles.<sup>[123]</sup> En 2009, l'équipe de Campagne a réalisé des substitutions nucléophiles d'alcool propargyliques à l'aide de sel d'or (III) et a obtenu d'excellents rendements (**Fig. 48**).<sup>[124]</sup>



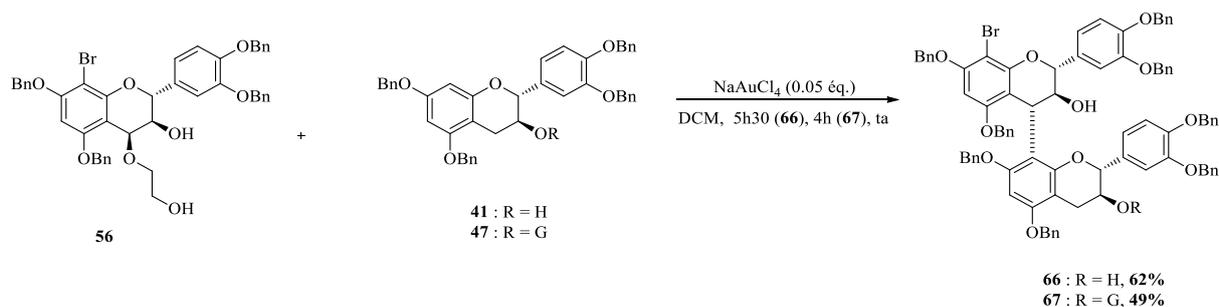
**Figure 48** : Substitution d'alcool propargylique catalysé à l'Or.

Ces réactions ont été réalisées avec divers alcools propargyliques et ces essais ont notamment permis de définir le mécanisme réactionnel mis en jeu. En effet, lorsque l'alcyne porte des groupements attracteurs la réaction ne se fait pas laissant supposer un passage par un intermédiaire de type carbocation qui se forme si et seulement s'il peut être stabilisé. Ce carbocation se forme par double complexation de l'or par l'alcyne et l'alcool, puis peut être attaqué par le nucléophile (Nu) (**Fig. 49**).



**Figure 49** : Mécanisme de la substitution d'alcool propargylique.

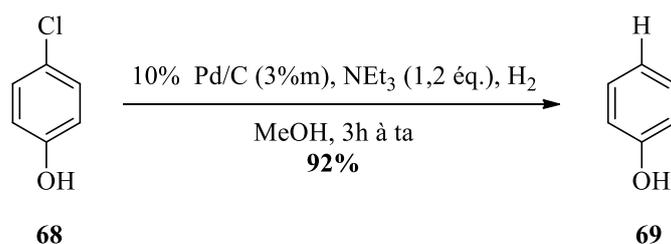
Cette stratégie a donc été appliquée à la synthèse du B3 et du B3G avec des quantités stoechiométriques d'unité électrophile et d'unité nucléophile en présence de 5% de NaAuCl<sub>4</sub> dans du DCM. Après purification le dimère **66** a été obtenu avec un rendement de 62% et le dimère **67** avec un rendement de 49% (**Fig. 50, p204-205**). Les essais avaient également été réalisés par Marie Guéroux pendant sa thèse sur d'autres unités monomériques et dans le cas de l'obtention du B1, un rendement de 61% a été décrit.<sup>[122]</sup> Ces réactions ont également été catalysées par l'or (I) (AuCl) et par le FeCl<sub>3</sub> donnant ainsi le dimère B3, cependant avec de moins bons rendements que ceux décrits avec NaAuCl<sub>4</sub>.



**Figure 50** : Synthèse du B3 et du B3G.

- Déprotection

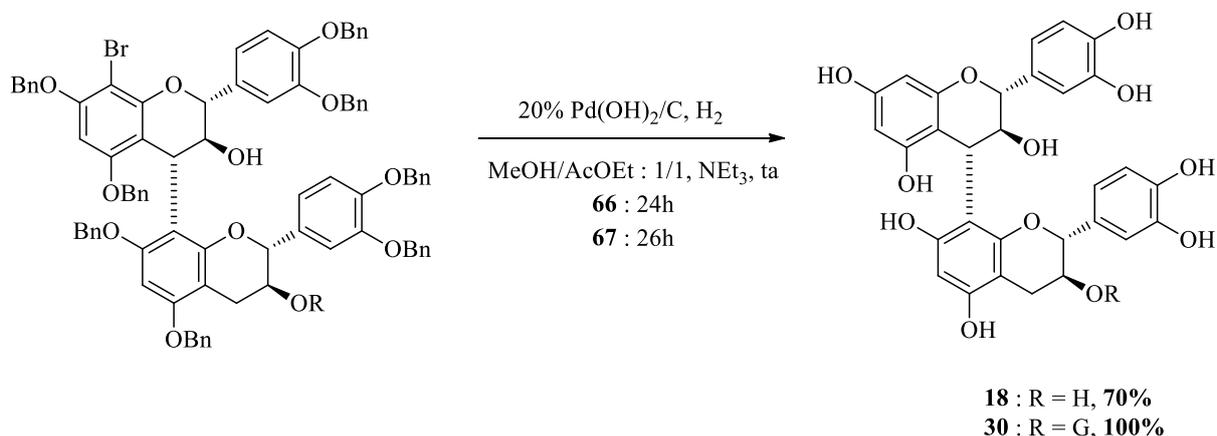
Afin d'obtenir les dimères naturels, la dernière étape de la synthèse consiste à déprotéger les composés en enlevant les éthers benzyliques et l'halogène. Il est important de rappeler que les conditions de déprotection doivent être relativement douces à cause de la faible stabilité des unités catéchiques et de la liaison interflavane. La débromation de la catéchine méthylée a été décrite par l'équipe de Roux en utilisant du *n*BuLi en présence d'une source de protons.<sup>[120]</sup> Cette technique a été utilisée pour la synthèse de trimères mais, dans le cas de la simple déprotection, ces conditions ne sont pas appliquées car elles impliquent une étape supplémentaire. En effet, il faudrait par la suite enlever les éthers benzyliques, ce qui se fait classiquement par hydrogénolyse. Or, en 2002 l'équipe de Sajiki a décrit la déchloration de composés aromatiques tel que les PCB ou les chlorophénols en utilisant du Pd/C et de la NEt<sub>3</sub> sous atmosphère d'hydrogène conduisant à des conversions quantitatives (**Fig. 51**).<sup>[125],[126]</sup>



**Figure 51** : Déchloration dans les conditions de Sajiki.

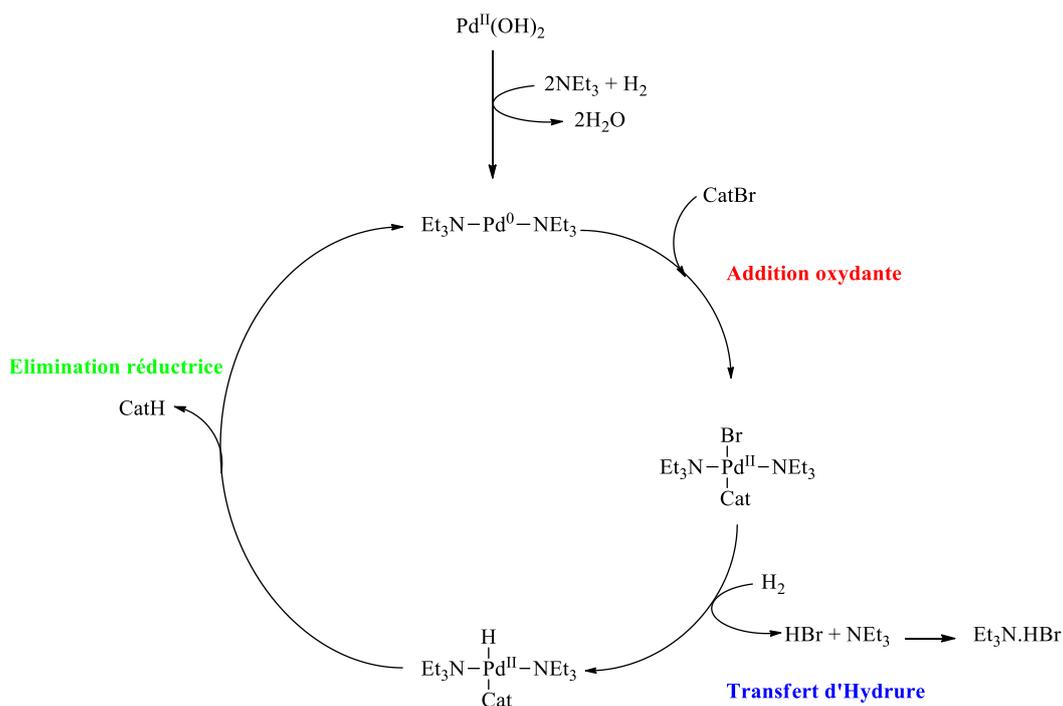
Plusieurs bases ont été testées par l'équipe de Sajiki mais la triéthylamine donne les meilleurs résultats et permet d'accélérer considérablement le temps de la réaction.<sup>[127]</sup> Ces conditions sont intéressantes puisqu'il s'agit également des conditions classiquement utilisées pour déprotéger des éthers benzyliques (dans ce cas la base n'est pas nécessaire). Toutefois, les conditions décrites dans la littérature utilisant le Pd/C pour débenzyler les procyanidines ne donnent pas de bons résultats. En effet, les temps de réactions sont très longs et les

déprotections ne sont que partielles.<sup>[121],[128]</sup> En 1999, l'équipe de Tückmantel a utilisé le catalyseur de Pearlman ( $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ ) pour réaliser la débenzylation d'un dimère galloylé et a obtenu un rendement de 90%.<sup>[129]</sup> Notons ici que la source d'hydrogène est le  $\text{H}_2$  mais d'autres sources pourraient être utilisées telle que le 1-4-cyclohexadiène mais nous conserverons le dihydrogène pour nos travaux.<sup>[130]</sup> En se basant sur les conditions décrites par Sajiki et par Tückmantel une déprotection efficace et totale des procyanidines en mettant en présence les dimères protégés de  $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$  (50% de la masse du dimère) et de quelques gouttes de triéthylamine sous une atmosphère d'hydrogène a été mise au point. Divers solvants ont été testés pour cette réaction incluant des alcools, l'acétate d'éthyle et le THF mais il s'est avéré que le mélange MeOH/AcOEt conduit aux meilleurs rendements.<sup>[102]</sup> Ainsi le dimère B3 **18** été obtenu avec un rendement de 70% et le dimère B3G **30** avec un rendement de 100% après purification (**Fig. 52, p206-207**).



**Figure 52** : Déprotection des dimères B3 et B3G.

Il a été supposé que le rôle de la triéthylamine était, dans un premier temps, de réduire *in Situ* le Palladium (II) en palladium (0) par formation du complexe  $\text{Pd}(\text{NEt}_3)_2$ . Etant plus réactif que le  $\text{Pd}(\text{OH})_2$ , le complexe formé peut être engagé dans l'étape d'addition oxydante de manière efficace. La triéthylamine permet également de piéger l'acide HBr se formant lors de l'étape du transfert d'hydrure (**Fig. 53**). Ce piégeage permet d'éviter d'éventuelles dégradations des dimères déprotégés et ainsi d'avoir de bons rendements.

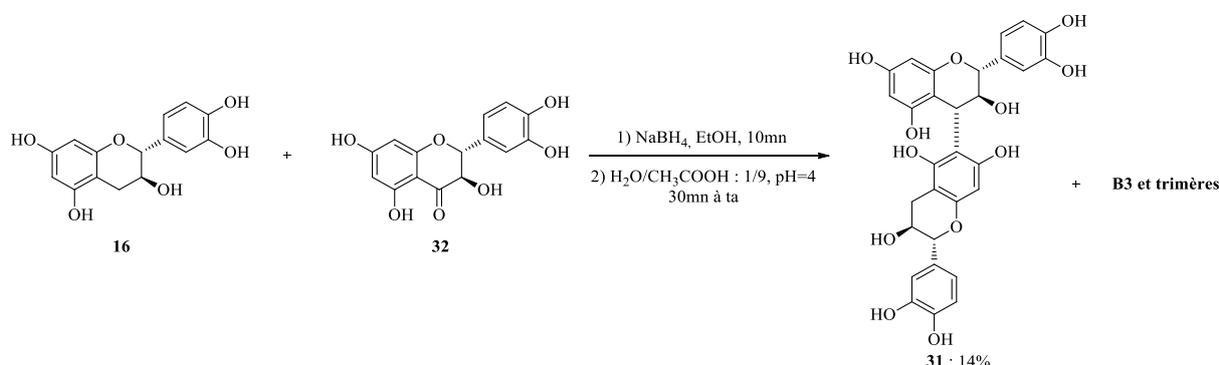


**Figure 53** : Mécanisme de la débromation de la catéchine.

La formation du bromhydrate de triéthylamine lors de la réaction nécessite une étape de purification sur micro-colonne C18. Des essais d'extraction pour éliminer ce sel avait été testés mais la solubilité de la catéchine dans l'eau ne permet pas de s'affranchir d'une étape de purification. Cette synthèse s'est avérée efficace pour l'obtention de divers dimères tel que le B1, le B2 et le B4. [8],[102]

## 2) Synthèse d'un dimère de type C4-C6

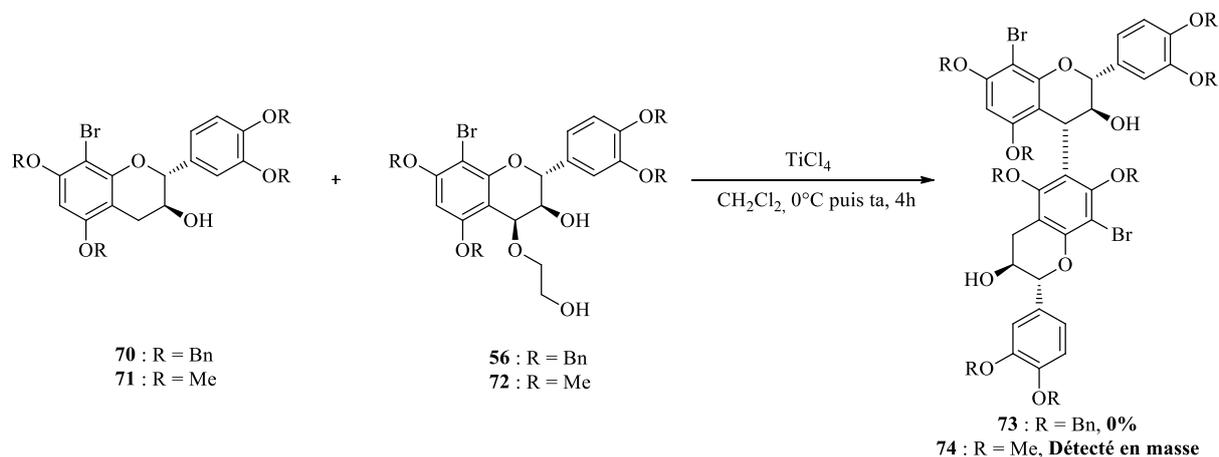
Les dimères de type C4-C6 sont des composés moins présents dans la nature que les dimères C4-C8, c'est notamment le cas dans les raisins de cépage du carbenet Sauvignon. En effet, l'étude de l'équipe de Vivas montre que les dimères B5 à B8 ont des teneurs de 0,04 à 0,36g.L<sup>-1</sup> tandis que la teneur des dimères B1 à B4 varient de 2,19 à 3,42g.L<sup>-1</sup>.<sup>[131]</sup> Cette disparité pourrait traduire une biosynthèse plus délicate des dimères de type C4-C6. Cette hypothèse a pu être vérifiée à travers des préparations semi-synthétique de différentes procyanidines à partir d'oligomères naturels. Lors de ces synthèses, des mélanges entre dimères, trimères et oligomères sont obtenus et l'isolation de ces structures passe par des purifications assez lourdes. Cette voie de préparation permet d'obtenir les dimères C4-C6 et C4-C8 avec un ratio d'environ 1/4 traduisant ainsi un manque de réactivité de la position 6 par rapport à la position 8.<sup>[132],[133]</sup> Lors de sa thèse, Marie Guéroux a effectué la synthèse du dimère B6 dans le cadre d'une collaboration avec Victor De Freitas en s'inspirant des conditions décrites par l'équipe de Roux.<sup>[93]</sup> Cette condensation consiste à mettre la taxifoline **32** et la catéchine **16** en présence de NaBH<sub>4</sub> pendant 10min puis d'ajuster le pH à 4 à l'aide d'acide acétique (**Fig. 54**).



**Figure 54** : Synthèse du B6 selon De Freitas *et coll.*

Cette synthèse conduit à un mélange de B3, B6 et de trimères nécessitant une étape de purification par HPLC. Comme nous pouvons le constater ces synthèses font appel à des étapes de couplage non régio-sélectives ce qui a un impact direct sur le rendement. La synthèse régio-contrôlée de ce composé constitue donc un véritable défi de synthèse pour les chimistes organiciens. De plus, ce composé possède une affinité intéressante avec le peptide P2 et présente donc un intérêt biologique dans le cadre de l'étude de l'inhibition du phénomène d'hyperphosphorylation de la protéine Tau. C'est pour ces deux raisons que le

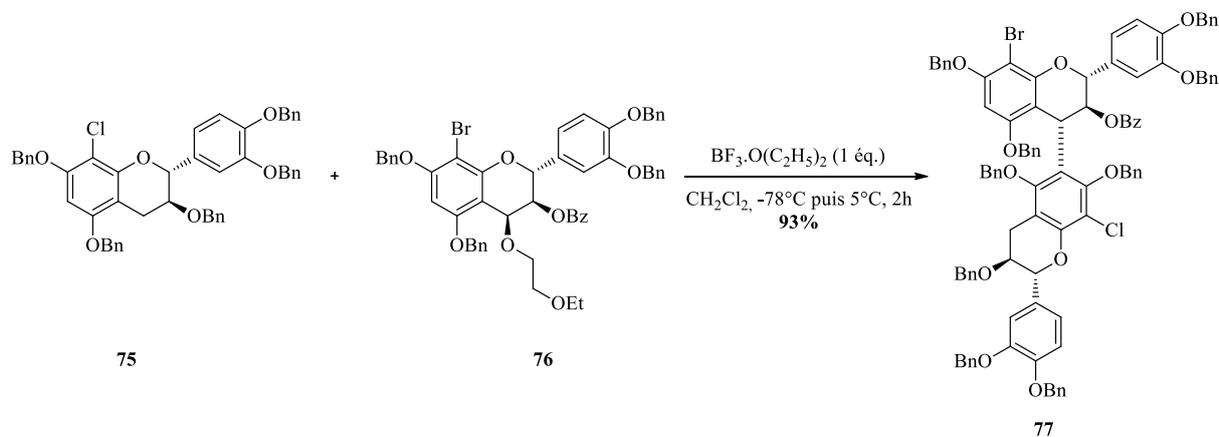
laboratoire s'est intéressé depuis plusieurs années à la synthèse du B6. Sandy Fabre, dans le cadre de sa thèse, a essayé de développer 3 voies de synthèses régiosélectives en s'inspirant des conditions de couplage conduisant au dimère B3.<sup>[134]</sup> La première stratégie reposait sur le couplage entre l'unité électrophile **56** et l'unité nucléophile benzylée bromée en position 8 **70** en présence de TiCl<sub>4</sub>. Malheureusement le B6 n'a pas été obtenu avec cette voie de synthèse et il a été supposé que les groupements benzyles rendent l'approche du nucléophile difficile (**Fig. 55**). Par conséquent, il a été envisagé de changer les groupements protecteurs par des méthyles. Les étapes d'activation de la position C4 et la bromation de la position C8 des deux unités ont été réalisées en suivant les mêmes stratégies qu'avec la catéchine tétrabenzylée. Après le couplage **74** n'a pas pu être isolé mais sa détection en masse était encourageante pour la suite des études car elle montre qu'une diminution de l'encombrement stérique autorise la réaction (**Fig. 55**).



**Figure 55** : Essais de synthèse du B6 avec différents groupements protecteurs.

Il a ensuite été envisagé de travailler avec une unité nucléophile déprotégée pour le couplage afin de s'affranchir des problèmes d'encombrements stériques et d'accroître la nucléophilie de la position 6. Pour cela, l'idée était de faire réagir l'électrophile **56** avec la catéchine bromée en position 8. Cela n'a pas pu aboutir car la déprotection de **70** conduit à la débromation partielle du composé formant ainsi la catéchine. Pour pallier à ce problème le brome a été remplacé par un thiophényle, malheureusement l'étape d'hydrogénolyse conduit également à la formation partielle de catéchine. En 2013, l'équipe de Suzuki décrit la première synthèse régiosélective du B6 mettant en jeu une catéchine benzylée activée et bromée **76** et une catéchine benzylée chlorée en C8 **75**.<sup>[135]</sup> Le couplage se fait *via* une substitution nucléophile catalysée par BF<sub>3</sub>.O(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub> avec un rendement de 93% (**Fig. 56**). Au vu de cet excellent rendement obtenu lors de ce couplage et des résultats obtenus par Sandy Fabre lors de ces

différents essais, des tests de reproductibilité de cette synthèse ont été conduits au sein du laboratoire.

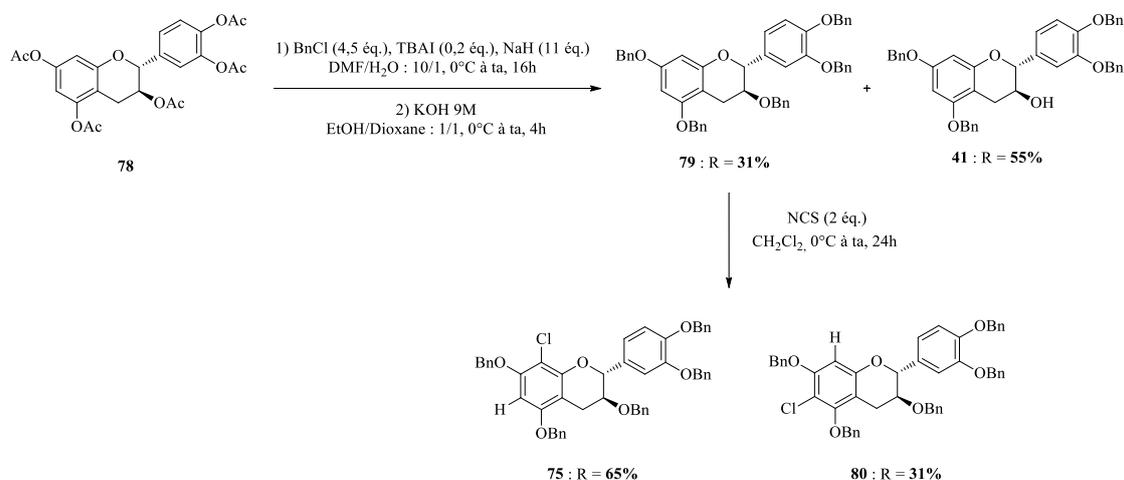


**Figure 56** : Synthèse du B6 selon Suzuki *et coll.*

a) Tests de reproductibilité de la synthèse du B6 selon Suzuki

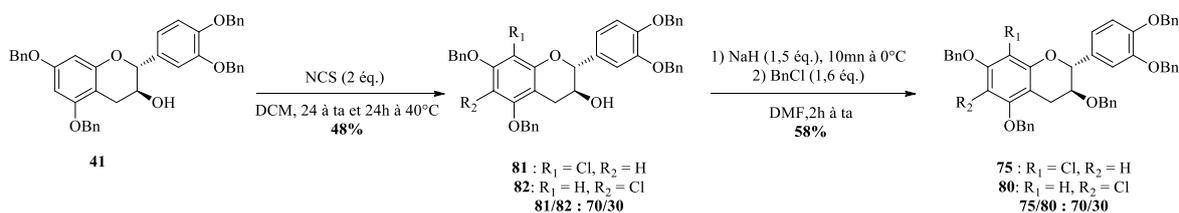
- Synthèse de l'unité nucléophile chlorée

Dans la synthèse de Suzuki, la première étape permettant la synthèse du synthon **75** est la protection des fonctions hydroxyles par benzilylation à partir de la catéchine pentaacétylée **78** placée en présence de chlorure de benzyle, de TBAI et de NaH dans un mélange H<sub>2</sub>O/DMF. Puis un traitement par KOH conduit à la catéchine **41** avec un rendement de 55% et la catéchine pentabenzylée **79** avec un rendement de 31% (**Fig. 57**). Le produit **79** est ensuite engagé dans la réaction de chloration par addition de NCS à 0°C dans le DCM conduisant ainsi, après 24h de réaction, au mélange des deux régioisomères **75** et **80** avec un rendement global de 96% (ratio C6/C8 : 30/70) (**Fig. 57**).



**Figure 57** : Conditions de protection et de Chloration selon Suzuki *et coll.*

Nous avons repris les conditions de chloration décrites par Suzuki pour les appliquer à **41**, celui-ci étant un synthon commun de nos synthèses. Ainsi, après 24h d'agitation à température ambiante, un suivi CCM a permis de constater que la réaction n'était pas finie et cela a été validé en RMN où une conversion de 70% a été calculée. La purification semblant délicate entre les produits **81** et **82** et le réactif **41**, l'agitation a été maintenue à reflux pendant 24h, mais malgré cela il restait encore un peu de composé de départ. Malgré diverses tentatives, les régioisomères **81** et **82** n'ont pas pu être séparés. De plus, la séparation avec **41** est également délicate et des fractions mélanges composées des 3 produits ont été récupérées. Ainsi, les deux régioisomères ont été isolés avec un rendement de 48% et avec un ratio de chloration en C6 et en C8 de 30/70 (**Fig. 58**). Ces conditions de chloration ont été améliorées par la suite au laboratoire, mais nous avons choisi de travailler sur ce mélange dans le cadre de la vérification de la faisabilité du couplage. De manière à nous mettre dans les mêmes conditions que Suzuki pour le couplage, les hydroxyles en C3 des composés **81** et **82** ont été protégés en utilisant du chlorure de Benzyle et NaH. Après 2h d'agitation dans le DMF, le produit brut a été purifié sur gel de silice pour conduire au mélange **75** et **80** avec un rendement de 58% (**Fig. 58, p208**).

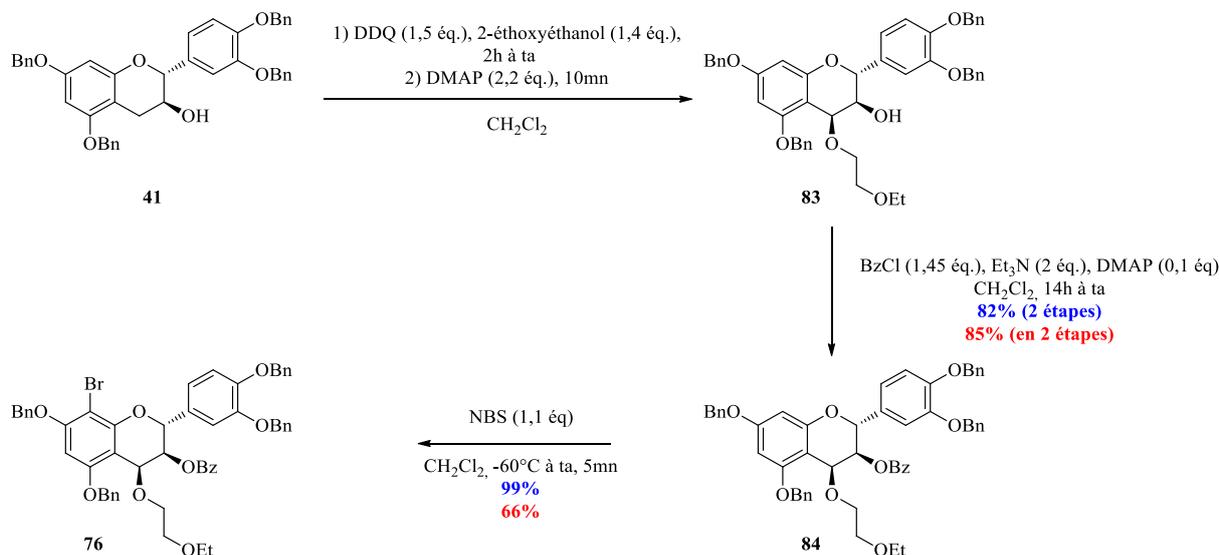


**Figure 58** : Chloration et benzylation de la Catéchine.

- Synthèse de l'unité électrophile

La synthèse de l'unité **76** est décrite en trois étapes à partir de **41** : l'activation de la position C4, la benzylation de l'hydroxyle en C3 et la bromation de la position 8. La synthèse du monomère **76** a été reproduite au sein du laboratoire dans les mêmes conditions que celles établies par Suzuki. L'activation de la position C4 est réalisée avec le 2-éthoxyéthanol dans les conditions décrites par Roux.<sup>[113]</sup> Ainsi, le composé **41** a été mis en présence d'un léger excès de DDQ et de 2-éthoxyéthanol dans du DCM à 0°C. Après purification sur célite le produit **83** a été directement engagé dans la réaction de benzylation en mettant **83** en présence de chlorure de benzoyle, de triéthylamine et de DMAP dans le DCM à 0°C. Le composé **84** a été obtenu avec un rendement de 85% sur les 2 étapes après purification. Enfin, la protection de l'unité C8 a été réalisée dans les conditions classiques de bromation

précédemment décrite avec du NBS dans le DCM conduisant à **76** avec un rendement de 66% en 5min (**Fig. 59, p209-211**).

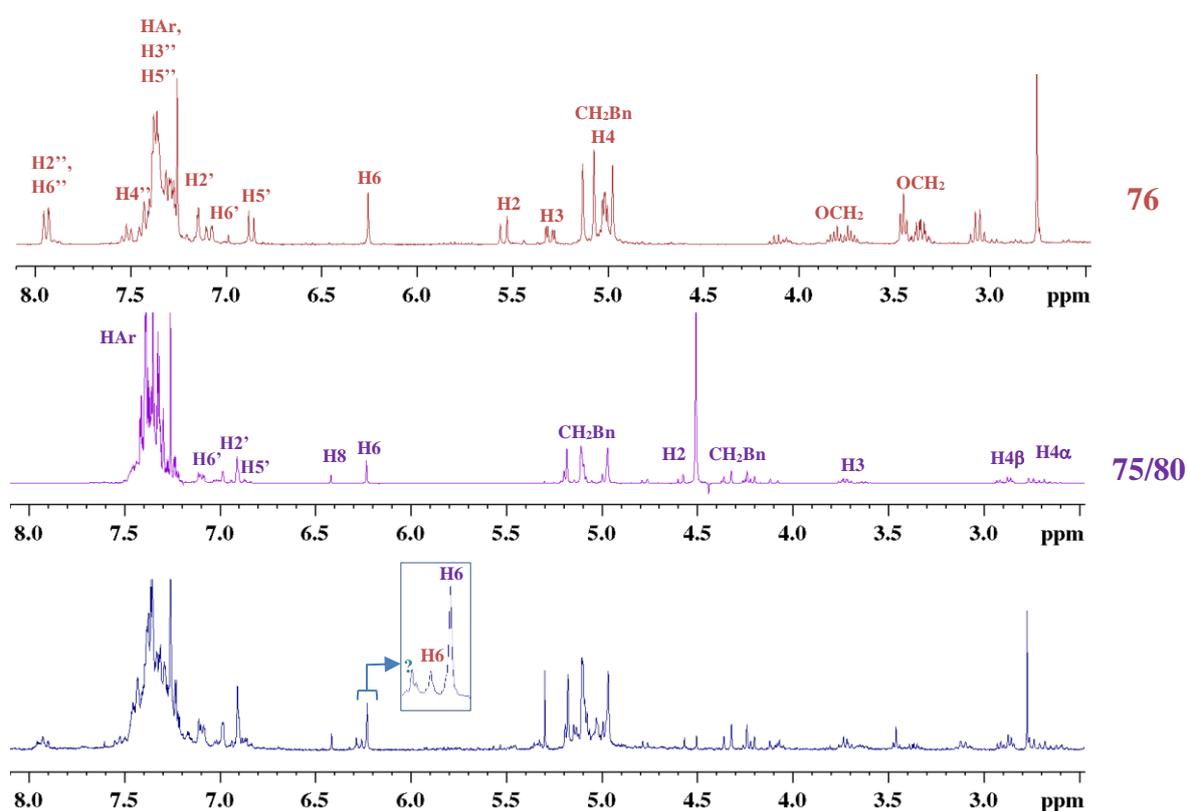


**Figure 59** : Synthèse de l'électrophile. En bleu : rendements obtenus par Suzuki *et coll.* et en rouge : rendements obtenus au laboratoire.

La dernière étape n'a pas nécessité une purification sur gel de silice. L'équipe de Suzuki a démontré que la protection de l'hydroxyle en C3 est indispensable lors de l'étape de couplage à travers une comparaison de réalisation de ce couplage avec un acétate. En effet, lorsque l'unité électrophile est protégée en C3 par un acétate, une importante chute de rendement est observée, on passe de 93% (avec le benzoyle) à 49%. Il a été postulé que l'unité électrophile est trop réactive par rapport à l'unité nucléophile et que la balance entre nucléophilie et électrophile est la clé d'un couplage réussi. Cette différence de réactivité s'explique par le fait que le chlore, plus attracteur que le brome ou l'iode, a un effet désactivant sur la nucléophilie de la position 6 trop important. La chute de rendement avec l'acétate s'expliquerait par le fait que ce groupement ne stabiliserait pas suffisamment le carbocation formé lors du couplage ce qui entraînerait le déséquilibre de réactivité entre le nucléophile et cet intermédiaire électrophile. Le benzoyle permettrait quant à lui de faire un intermédiaire plus stable et ainsi d'avoir un composé moins réactif permettant de rééquilibrer les réactivités entre les 2 monomères.

- Couplage et déprotection

Une fois les deux monomères préparés, les conditions de couplages ont été reproduites comme précédemment décrites par Suzuki, et après 2h de réaction seul les composés de départ sont récupérés comme le montre la superposition des RMN  $^1\text{H}$  des produits de départ et du brut réactionnel. Cependant on remarque qu'un nouveau produit se forme en quantité relativement faible. Le mélange a été analysé par spectrométrie MALDI mais aucun pic correspondant à la masse du composé attendu **77** n'a été observé (**Fig. 60**).



**Figure 60** : Superposition des RMN  $^1\text{H}$  de **75**, **76** et du brut de couplage.

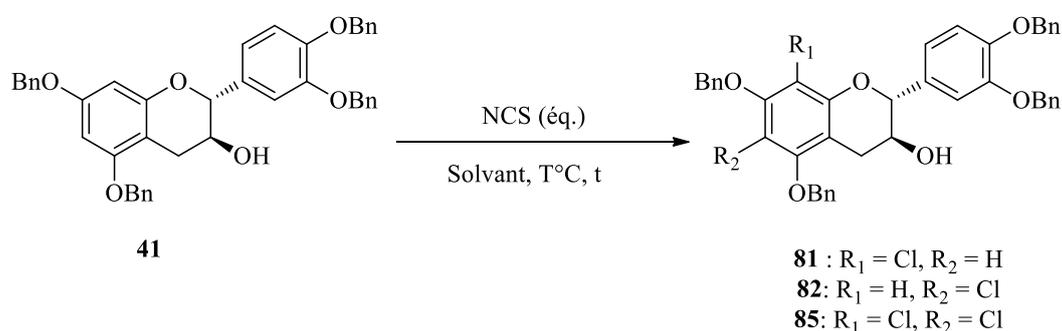
Comme nous pouvons le constater sur la RMN du brut réactionnel, très peu de composé **76** est retrouvé, on peut supposer qu'il se soit dégradé lors de la réaction. Ces conditions de couplage n'étant pas reproductibles nous avons alors envisagé de développer une voie alternative qui nous a ainsi permis de travailler sur l'optimisation de l'étape de chloration.

b) Mise au point de la synthèse du B6

Nous avons choisi de travailler avec l'unité électrophile **56** précédemment utilisée pour la synthèse du B3 et du B3G. Dans un premier temps, l'optimisation de la chloration de l'unité nucléophile a été effectuée afin de réduire le temps de la réaction, d'augmenter le rendement ainsi que la régiosélectivité.

- Optimisation de la chloration de l'unité nucléophile

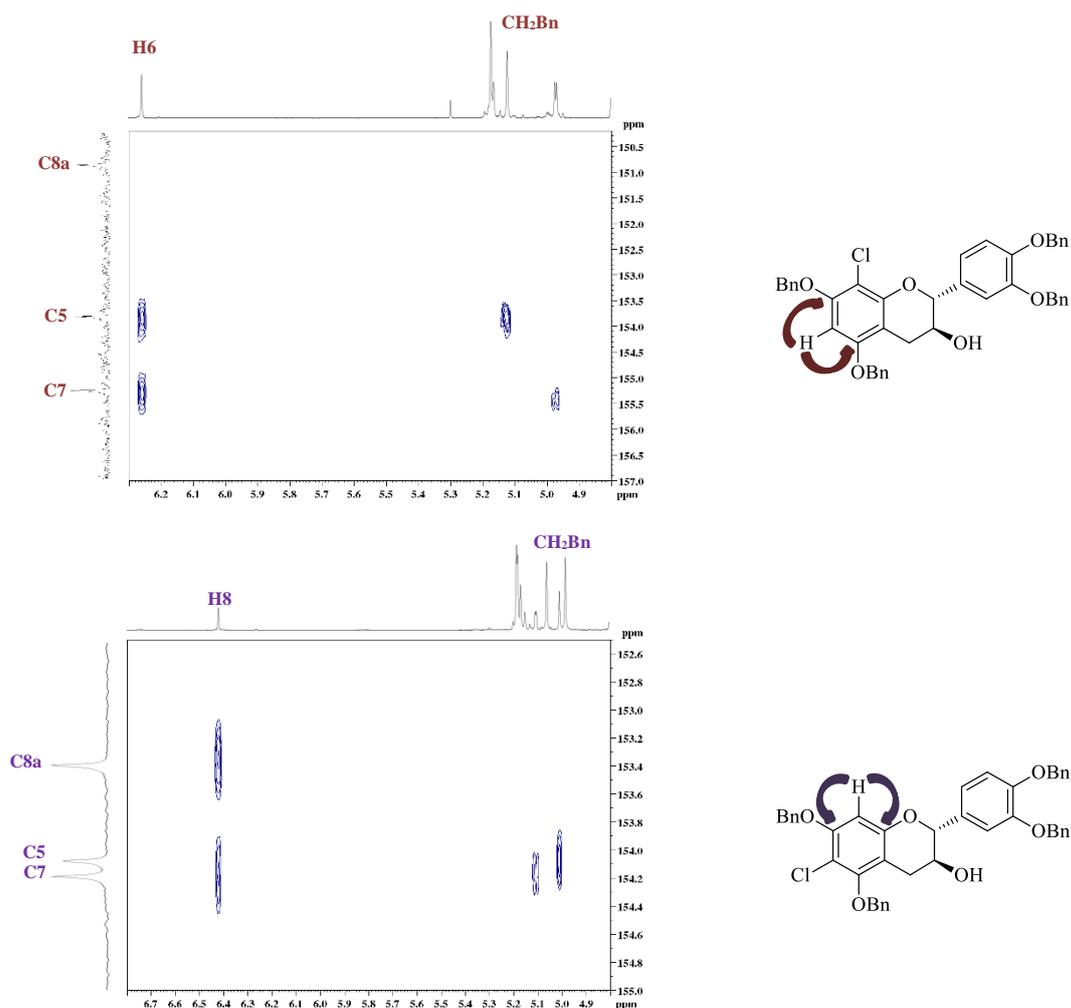
Comme nous l'avons vu précédemment, la chloration à température ambiante dans le DCM n'aboutit pas à une conversion totale et la régiosélectivité est seulement de 70/30 en faveur de **81**. Afin d'améliorer ces conditions, il a été envisagé dans un premier temps de faire des essais dans différents solvants, à différentes températures et avec 1 ou 2 équivalents de NCS. Ainsi, la réaction a été conduite dans le DMF, dans l'acétonitrile, dans le chloroforme, dans l'acétone et dans un mélange DCM/DMF (70/30) à ta, 0°C et 30°C. Pour ces différents tests, la conversion ainsi que le ratio de chloré en C6 et en C8 ont été calculés à partir de la RMN <sup>1</sup>H et les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau ci-dessous (**Fig. 61**).



Entrée	Solvant	Température (°C)	Equivalents NCS	Temps (h)	Conversion (%)	Ratio 81/82/85
1	DMF	30°C	2	24h	90%	0/50/50
2	DMF	30°C	1	24h	70%	70/30/traces
3	DMF	0°C	1	24h	100%	60/40
4	ACN	TA	1	20h	10%	90/10
5	ACN	0°C	1	58h	45%	80/20
6	CHCl <sub>3</sub>	TA	1	20h	50%	70/30
7	Acétone	TA	1	24h	90%	70/30
8	DMF/DCM	-10°C	1	22h	30%	85/15

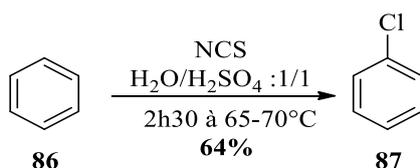
**Figure 61** : Optimisation de la chloration.

Dans le DMF, avec 2 équivalents de NCS, la formation du composé dichloré **85** a été détectée et le composé souhaité **81** n'est pas obtenu (**Entrée 1**), nous avons donc choisi de ne plus travailler en excès de NCS pour la suite des essais. Malgré les bonnes conversions obtenues dans le DMF, les ratios **81/82** ne sont pas satisfaisants et la baisse de température n'y change rien (**Entrées 2 et 3**). Le composé **41** n'étant pas totalement soluble dans l'acétonitrile la conversion n'est pas totale, de plus le ratio **81/82** n'est pas amélioré (**Entrées 4 et 5**). Toutefois, on peut noter que, dans ce cas-ci, la baisse de la température a eu un effet bénéfique sur la régiosélectivité. Le chloroforme et le mélange DMF/DCM ne permettent pas une conversion satisfaisante et n'ont donc pas été retenus dans le cadre de l'optimisation (**Entrées 6 et 8**). Enfin, bien que l'acétone conduise à une bonne conversion, ce solvant ne permet pas d'améliorer la régiosélectivité obtenue par l'équipe de Suzuki (**Entrée 7**). Ces différents tests nous conduisent à conclure que le changement de solvant ne permet pas un gain de temps sur la réaction (avec le DCM, 24h à ta pour une conversion de 70%) et que dans certains cas la conversion est bien moins efficace. De plus, la régiosélectivité n'est pas améliorée et celle-ci semble être dépendante de la température et du temps de la réaction. En effet, des suivis RMN ont permis de montrer que, dans le cas du mélange DMF/DCM, après 7h de réaction le ratio **81/82** est de 100/0 et après 22h de réaction 15% du composé **82** se forme. Il faut donc mettre au point des conditions permettant une chloration rapide et efficace afin d'optimiser la conversion et la régiosélectivité. Enfin, des essais de purification ont été conduits sur les différents bruts obtenus. Avec des purifications sur gel de silice, des mélanges sont obtenus à chaque fois et des essais sur puriflash, permettant des séparations sous haute pression, n'aboutissent également plus à des séparations satisfaisantes. Pour se rendre compte de la difficulté de la purification, le chromatogramme obtenu après purification sur puriflash a été mis en Annexe (**Annexe 1**). La séparation des composés étant trop délicate, il est impératif d'améliorer les conditions afin d'obtenir le composé **81** avec le meilleur ratio possible. Notons que les ratios et conversions sont calculés par RMN en utilisant les intégrations sur les protons H6 et H8. La purification des composés nous a tout de même permis de récupérer suffisamment de produits pour caractériser les composés **81** et **82** afin de calculer leurs ratios donnés dans le tableau précédent. Une analyse HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  permet de savoir si le composé est chloré en 8 ou 6. Dans le cas du composé **81**, l'hydrogène en C6 corrèle avec les carbones C7 et C5 tandis que dans le cas de **82** l'hydrogène H8 corrèle avec C7 et C8a (**Fig. 62**). Il est facile de distinguer les C5/C7 du C8a car ce dernier ne corrèle pas avec des CH<sub>2</sub> benzyliques contrairement au C5 et au C7.



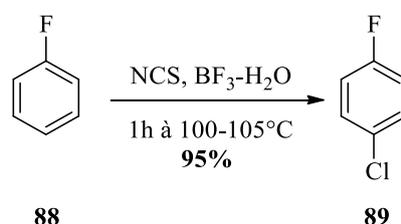
**Figure 62** : Détermination de la position du Chlore par HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ .

Une étude bibliographique montre que l'agent d'halogénéation de type NCS, connu pour être un très bon réactif halogénant, est le plus couramment utilisé car il est facile à manipuler. Toutefois, dans le cas d'aromatiques non activés tel que le benzène ou le toluène l'hydrogénation avec du NCS conduit à de faibles rendements et à des composés poly substitués.<sup>[136]</sup> Pour palier à ce problème, Lambert *et coll.* ont développé des conditions de chloration du benzène en présence d'acide sulfurique (**Fig. 63**). La réaction est effectuée entre 65-70°C et donne le produit monochloré **87** avec un rendement de 64% en 2h30.



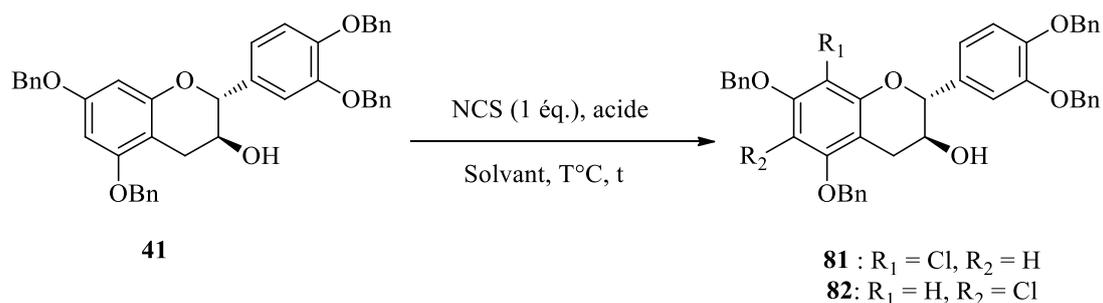
**Figure 63** : Chloration dans les conditions de Lambert *et coll.*

Depuis ces résultats, des essais d'halogénations sur différents composés avec différents acides ont été développés.<sup>[137],[138]</sup> En 2004, l'équipe de Olah décrit l'halogénéation de divers aromatiques possédant des groupements désactivant en présence de NCS et de BF<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O. Cet acide a notamment permis la mise au point efficace de la chloration du fluorobenzène avec un rendement de 95% après 1h de réaction (**Fig. 64**).<sup>[137]</sup>



**Figure 64** : Chloration du fluorobenzène dans les conditions de Olah *et coll.*

Bien que ces conditions permettent l'obtention de composés halogénés de manière rapide et efficace, les températures utilisées sont bien trop élevées pour être appliquées à nos composés. Toutefois, l'ajout d'acide dans les réactions de chloration des unités catéchiques n'a pas été exclue puisque dans ce cas l'aromatique est riche en électrons et la catalyse permettrait seulement d'accroître la régiosélectivité de la réaction. Des essais ont donc été réalisés dans des conditions plus douces en présence de TFA et d'acide acétique (**Fig. 65**). Nous avons pu constater une différence notable sur le pourcentage de conversion de **41** en utilisant du TFA par rapport à l'acide acétique. En effet, après 24h de réaction en présence d'acide acétique seul, environ 50% du NCS (**Entrées 5 et 6**) est consommé tandis qu'en présence de TFA l'obtention de **81** et **82** est quantitative (**Entrée 4**). Un gain de temps de 20h par rapport aux réactions engagées sans ajout d'acide a été observé, ce qui est une première donnée intéressante. Le travail à basse température permet d'obtenir de meilleurs ratios **81/82** mais nécessite d'avoir des quantités importantes de TFA afin d'avoir une bonne conversion (**Entrée 1**). Lorsque le milieu réactionnel est placé à TA avec une quantité catalytique de TFA, les conversions sont rapides et efficaces mais nous obtenons toujours un ratio **81/82** de 70/30, ce qui était le cas sans l'ajout de catalyseur (**Entrée 4**).

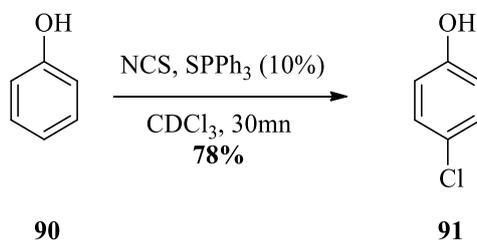


Entrée	Solvant	Température (°C)	Acide	Temps (h)	Conversion (%)	Ratio 81/82
1	DCM	-78°C à -10°C	TFA (8,5 éq.)	1h30	85%	75/25
2	DCM	78°C à -10°C	TFA (0,1 éq.)	3h	20%	100/0
3	DCM	0°C à ta	TFA (0,1 éq.)	3h30	80%	70/30
4	ACN	TA	TFA (0,1 éq.)	4h	100%	70/30
5	DCM	TA	CH <sub>3</sub> COOH (1 éq)	24h	57%	80/20
6	ACN	TA	CH <sub>3</sub> COOH (1 éq)	24h	44%	85/15

**Figure 65** : Optimisation de la chloration en présence d'acide de Brønsted.

Ces différentes conditions en présence d'acide de Brønsted ne permettant pas d'amélioration notable du ratio **81/82**, nous avons alors choisi de poursuivre l'étude en nous orientant vers utilisant des acides et bases de Lewis.

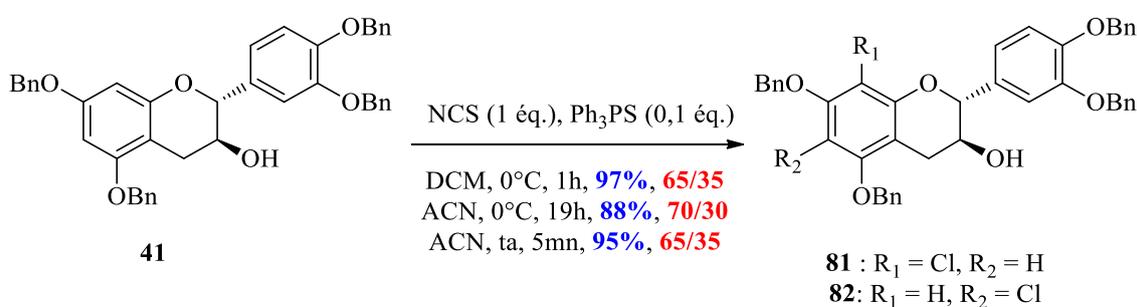
En effet, en 2015, l'équipe de Gustafson a mis au point la catalyse de la chloration de différents arènes et hétérocycles en présence de NCS et de sulfure de phosphine.<sup>[139]</sup> Le sulfure de phosphine est une base de Lewis qui, dans la réaction de chloration, joue le rôle de catalyseur. L'équipe a réalisé divers tests avec plusieurs phosphines et de très bons résultats ont été obtenus avec le sulfure de triphénylphosphine sur le phénol **90** (**Fig. 66**).



**Figure 66** : Chloration du phénol selon les conditions de Gustafson *et coll.*

Cette technique permet des chlurations dans des conditions relativement douces en présence de seulement 10% de catalyseur à température ambiante et en un temps relativement court.

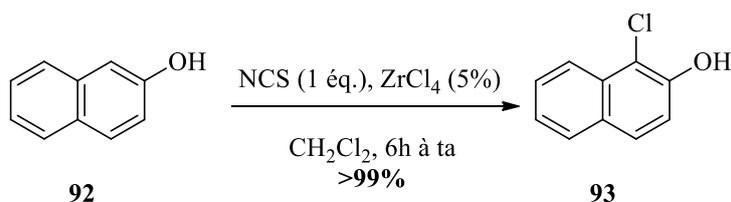
Dans le cas du phénol **90**, une conversion de 78% est obtenue après 30mn dans le chloroforme deutéré alors que sans le sulfure de triphénylphosphine le composé **91** n'est toujours pas détecté en RMN après 3h de réaction (**Fig. 66**). Nous avons appliqué ces conditions à **41** dans le DCM à 0°C et les produits **81** et **82** ont été obtenus avec une conversion de 97% en 1h et avec un ratio **81/82** de 65/35. Bien que la réaction soit rapide, le composé **81** ne représente que 65% du mélange ce qui n'est pas satisfaisant pour la suite de l'étude. Les mêmes conditions ont donc été appliquées dans l'acétonitrile mais, dans ce cas, la réaction est relativement lente et donne une conversion de 88% en 19h pour un ratio **81/82** de 70/30. Enfin, un essai dans l'acétonitrile à température ambiante a été réalisé et, dans ce cas, une conversion totale a été observé après 5mn mais 35% de **82** est présent dans le mélange ce qui n'est pas satisfaisant (**Fig. 67**).



**Figure 67** : Chloration de la catéchine benzylée en présence d'une base de Lewis. En bleu : Conversion RMN ; en rouge : Ratio 81/82.

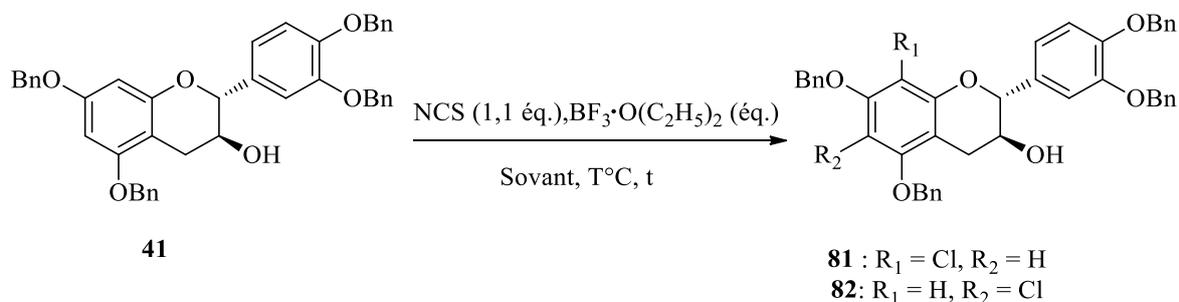
Bien que ces conditions permettent une chloration rapide, elles ne permettent pas toujours un bon contrôle de la régiosélectivité, c'est pourquoi l'optimisation a dû être poursuivie.

En 2005, l'équipe de Yamamoto a décrit des réactions d'halogénéation catalysées par des acides de Lewis tel que  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{AlCl}_3$  et  $\text{ZrCl}_4$ .<sup>[140]</sup> Ces conditions permettent notamment d'effectuer des chlorations d'aromatiques dans des conditions douces, avec de très bons rendements ainsi que de très hautes régiosélectivités (75/25 à 100/0) (**Fig. 68**).



**Figure 68** : Chloration du naphthol catalysée par un acide de Lewis.

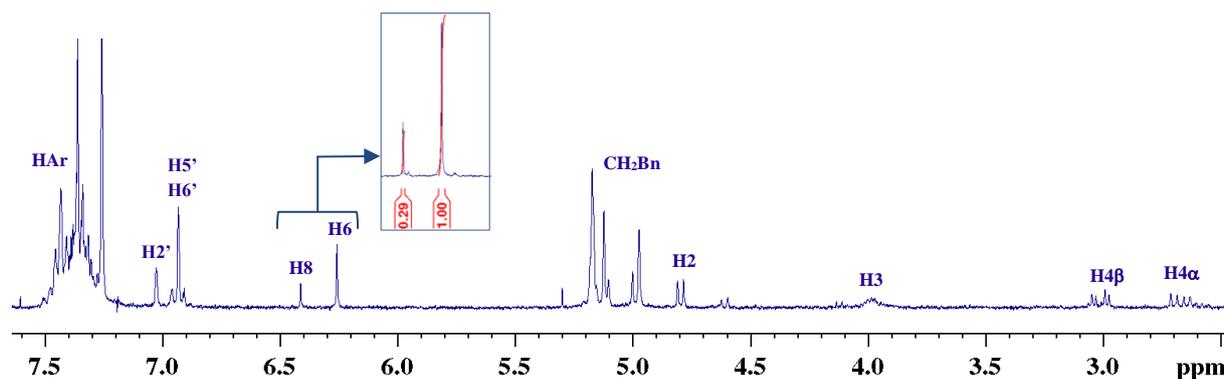
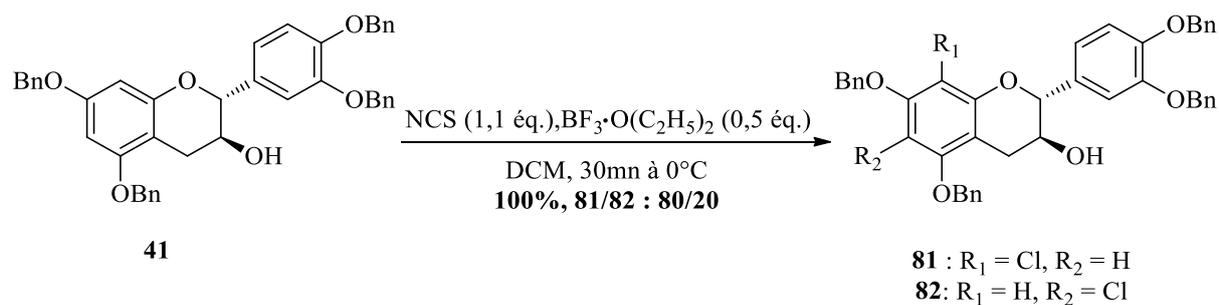
La chloration catalysée par un acide de Lewis semble être une bonne alternative pour pallier aux problèmes de régiosélectivité observés précédemment. Pour des questions de coût et de disponibilité nous avons choisi de réaliser les essais avec le  $\text{BF}_3 \cdot \text{O}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ . Différents essais en changeant la température et le solvant ont été réalisés et sont résumés dans le tableau ci-dessous (**Fig. 69**).



Entr\u00e9e	Solvant	Temp\u00e9rature ( $^\circ\text{C}$ )	Equivalents $\text{BF}_3 \cdot \text{O}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Temps (h)	Conversion (%)	Ratio <b>81/82</b>
<b>1</b>	ACN	$0^\circ\text{C}$ \u00e0 ta	0,1	22h	100%	75/25
<b>2</b>	ACN	$-20^\circ\text{C}$	1	5mn	90%	70/30
<b>3</b>	DCM	$-20^\circ\text{C}$	0,1	3h	20%	90/10
<b>4</b>	DCM	$0^\circ\text{C}$	0,1	3h30	100%	80/20
<b>5</b>	<b>DCM</b>	<b><math>0^\circ\text{C}</math></b>	<b>0,5</b>	<b>30mn</b>	<b>100%</b>	<b>80/20</b>

**Figure 69** : Mise au point de la chloration catalys\u00e9e par un acide de Lewis.

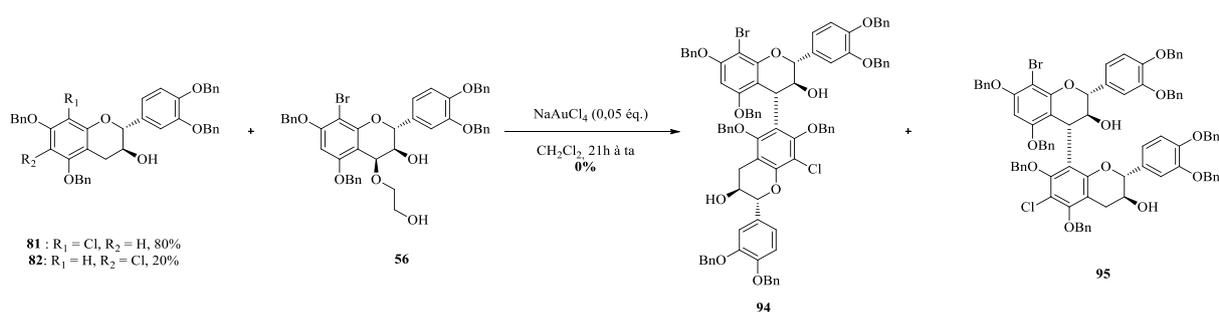
Dans l'ac\u00e9tonitrile (**Entr\u00e9e 1 et 2**) la r\u00e9action est relativement lente lorsque l'on utilise une quantit\u00e9 catalytique de  $\text{BF}_3 \cdot \text{O}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$  obligeant \u00e0 travailler avec des quantit\u00e9s stoechiom\u00e9triques. Or, l'utilisation d'une grande quantit\u00e9 d'acide ne permet pas d'am\u00e9liorer la r\u00e9gios\u00e9lectivit\u00e9 de la r\u00e9action. Lorsque la r\u00e9action est r\u00e9alis\u00e9e \u00e0  $-20^\circ\text{C}$  dans le DCM (**Entr\u00e9e 3**) la conversion est tr\u00e8s lente et atteint 20% en 3h mais une augmentation de la temp\u00e9rature \u00e0  $0^\circ\text{C}$  (**Entr\u00e9e 4**), pour la m\u00eame quantit\u00e9 de catalyseur, permet une conversion totale en 3h avec un ratio satisfaisant en **81**. Enfin, la r\u00e9action a \u00e9t\u00e9 faite \u00e0  $0^\circ\text{C}$  avec 0,5 \u00e9quivalent de catalyseur, permettant une conversion totale en 30mn avec 80% de **81** dans le m\u00e9lange (**Entr\u00e9e 5**). Une purification sur gel de silice conduit au m\u00e9lange **81** et **82** avec un rendement quantitatif (**Fig. 70, p212**). Ainsi, ces conditions optimis\u00e9es nous permettent d'obtenir le compos\u00e9 souhait\u00e9 avec un tr\u00e8s bon rendement et compte tenu de la difficult\u00e9 de s\u00e9parer le m\u00e9lange de r\u00e9gioisom\u00e8res, celui-ci a \u00e9t\u00e9 utilis\u00e9 tel quel pour tester les conditions de couplage sachant que les dim\u00e8res obtenus, apr\u00e8s les \u00e9tapes de couplage et de d\u00e9protection, pourront \u00eatre s\u00e9parables par HPLC.



**Figure 70** : Conditions de chloration optimisées et RMN du mélange **81/82** obtenu.

- Couplage entre unités protégées.

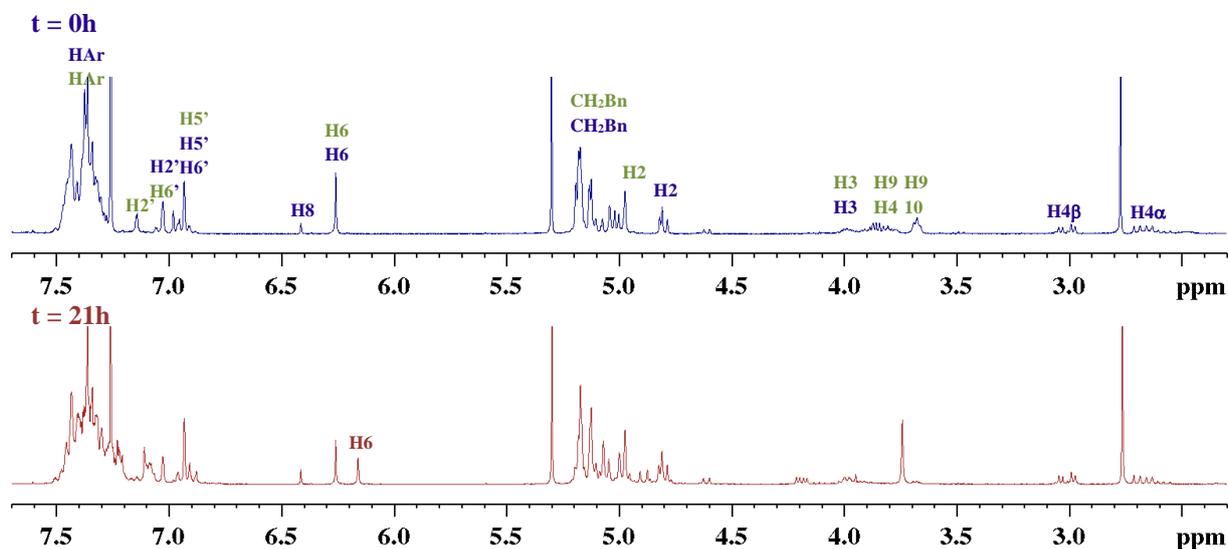
Des essais de couplage entre **56** et le mélange **81/82** précédemment obtenu ont été réalisés sous plusieurs conditions. Dans un premier temps nous avons appliqué les conditions de couplage utilisées pour la synthèse des dimères B3 et B3G. **81/82** et **56** ont ainsi été mis en solution dans du DCM en quantité stoechiométrique en présence de 0.05 équivalents de  $\text{NaAuCl}_4$  à température ambiante (**Fig. 71**).



**Figure 71** : Couplage en vue de la formation du B6 protégé.

La réaction a été suivie par RMN  $^1\text{H}$  et après 3h un nouveau produit s'est formé mais il reste encore beaucoup de réactifs chlorés. Aucune évolution n'a été observée après 21h de réaction, la réaction a donc été stoppée, puis purifiée sur plaque chromatographique semi préparative. Les analyses RMN et de spectrométrie de masse (MALDI) montrent que les réactifs **81** et **82**

n'ont pas réagi et que le nouveau produit est issu de la dégradation du composé **56**. En effet, on observe une perte de la chaîne éthylène glycol et seulement 1mg de **56** est récupéré sur les 46mg engagés (**Fig. 72**).

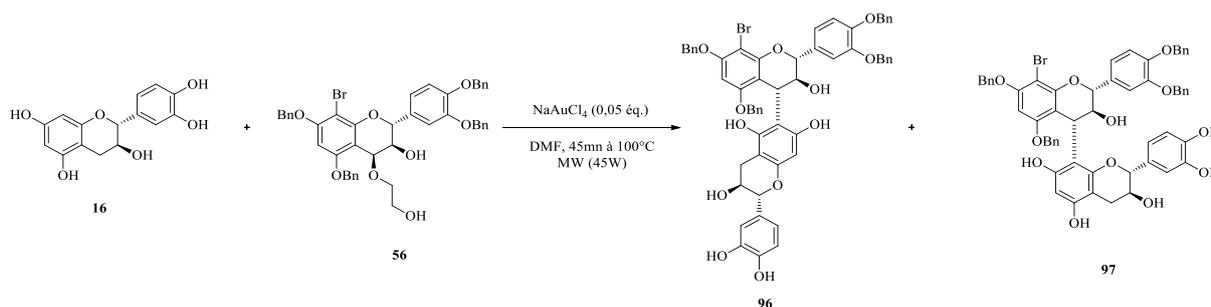


**Figure 72** : RMN  $^1\text{H}$  du brut réactionnel du couplage à  $t = 0$  et à  $t = 21\text{h}$ . En bleu : Attribution de **81/82** ; en vert : Attribution de **56**.

Compte tenu du manque de réactivité nous avons envisagé de chauffer le milieu réactionnel soit par un chauffage classique soit par un chauffage par activation microondes. Ainsi, après un chauffage pendant 2h30 à 60°C, un mélange complexe de produits est obtenu mais seul des traces du composé attendu sont observées dans le brut au MALDI :  $[\text{M}+\text{H}^+] = 1412,37$ . Le couplage a donc été réalisé à 60°C sous activation microondes (90W) et après 5mn de réaction un profil RMN similaire à celui obtenu **Figure 72** a été observé et seul des traces du produit de couplage ont été détectées en masse. Ces résultats n'étant pas concluants nous avons essayé de changer de catalyseur. Le premier essai a été conduit avec du  $\text{BF}_3 \cdot \text{O}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$  de manière à reprendre les conditions de Suzuki. Une nouvelle fois les réactifs chlorés n'ont pas réagi et le seul produit qui se forme est celui issu de la dégradation de **56**. Nous avons ensuite essayé avec un excès de  $\text{TiCl}_4$  (2 équivalents) et le constat est le même que dans les cas précédents. Ces différents essais confirment une nouvelle fois que le couplage entre deux unités protégées n'est pas réalisable, il a donc été envisagé de faire cette condensation avec une unité nucléophile déprotégée. De plus, il semble important de préciser que le couplage, dans ce cas-ci, ne peut pas être totalement régiosélectif et les traces de produits obtenues peuvent ne pas être le composé **94** attendu mais le B3 protégé **95**.

- Couplage avec une unité déprotégée

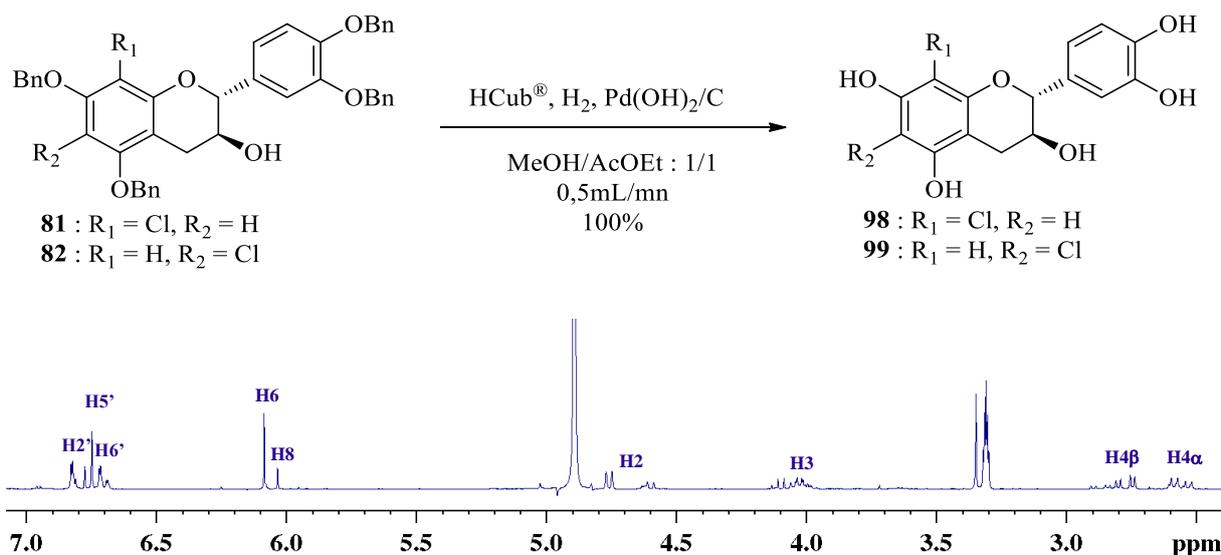
Afin de pallier aux problèmes de réactivité, il a été envisagé de travailler avec une unité nucléophile déprotégé, ce qui permet non seulement de s'affranchir des problèmes liés à l'encombrement stérique et également d'accroître le caractère nucléophile de la molécule. Les précédents essais ont révélé que l'activation microondes permet l'obtention de traces des produits de couplages protégés **94** et **95** de manière rapide, c'est pour cette raison que le développement de la synthèse du B6 a été optimisée par cette technique de chauffage. Une étude préliminaire a été réalisée en utilisant de la catéchine commerciale afin de s'assurer que les composés déprotégés ne risquent pas de se dégrader dans les conditions de couplage. Ainsi, la catéchine **16** et l'électrophile **56** ont été mis en présence de NaAuCl<sub>4</sub> dans du DMF (**Fig. 73**). Après 15 minutes d'agitation à 60°C (90W) aucun nouveau produit n'est détecté sur CCM, la température est donc augmentée à 100°C (45W) et après 15 minutes des produits se forment. L'agitation est maintenue 30mn à 100°C puis le brut réactionnel a été analysé au MALDI.



**Figure 73** : Couplage sous activation microondes.

D'après les analyses MALDI, les produits de couplage se sont bien formés puisque le pic correspondant à la masse du produit attendu est détectée [M+Na<sup>+</sup>] : 1041.58. De plus, ce pic est relativement intense ce qui est très encourageant (**Annexe 2**). Le spectre RMN <sup>1</sup>H révèle, tout de même, que la catéchine n'a pas totalement réagi, cette information est intéressante puisqu'au-delà de l'aspect conversion nous pouvons constater que cette unité ne se dégrade pas dans les conditions de couplage. En parallèle, le couplage a été réalisé dans les conditions classiques à température ambiante et après 3 jours seules des traces des produits **96** et/ou **97** ont été détectées par MALDI (**Annexe 3**). Ce résultat nous a donc conforté dans le choix d'optimiser cette réaction à l'aide des microondes. Les produits obtenus lors de ces couplages n'ont pas été isolés puisque la réaction n'est pas régiosélective mais leur obtention nous a poussé à étudier la réactivité de la catéchine chlorée non protégée **98** dans ces conditions. La

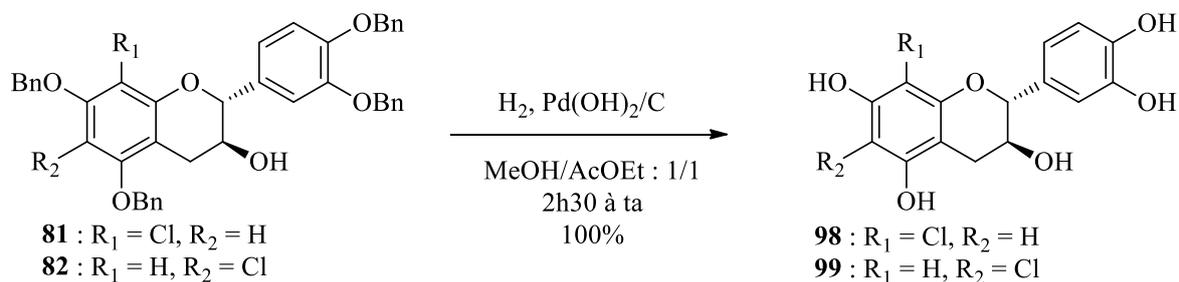
première étape, avant de réaliser le couplage entre **98** et **56**, consiste donc à débenzyler les composés **81** et **82**. Afin de réaliser la déprotection des composés **81** et **82** nous nous sommes inspirés des conditions d'hydrogénation décrites pour le B3 et le B3G utilisant le catalyseur de Pearlman (**Fig. 52**). Afin d'obtenir les composés **98** et **99** de manière efficace, des conditions classiques d'hydrogénation (ballon de baudruche) et des conditions en flux continue (HCub<sup>®</sup>) ont été testées. L'intérêt du HCub<sup>®</sup> outre la rapidité des réactions est qu'il permet de travailler sous haute pression d'hydrogène même si dans notre cas, pour des raisons techniques, les essais ont été faits à pression atmosphérique profitant tout de même de l'aspect chimie en continu. Ainsi un mélange 80/20 de **81/82** a été injecté en solution dans un mélange MeOH/AcOEt : 1/1 dans le HCub<sup>®</sup> à 40°C. Après 2 passages sur la cartouche, avec un débit de 1mL/min, l'analyse RMN <sup>1</sup>H montre que la débenzylation n'est pas totale. Un nouveau test a donc été fait, cette fois ci avec un débit de 0,5mL/min, conduisant au mélange correspondant à **98/99** avec un rendement quantitatif sans purification (**Fig. 74**).



**Figure 74** : Déprotection de la catéchine chlorée au HCub<sup>®</sup> et RMN <sup>1</sup>H du mélange obtenu.

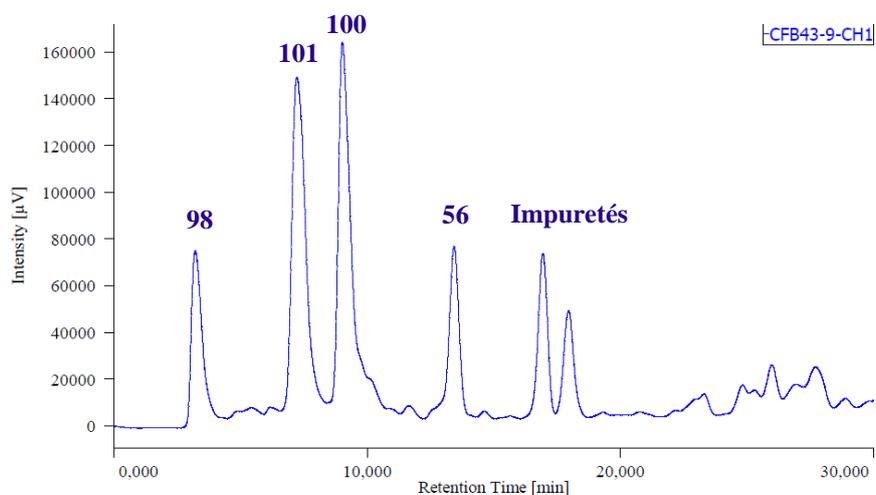
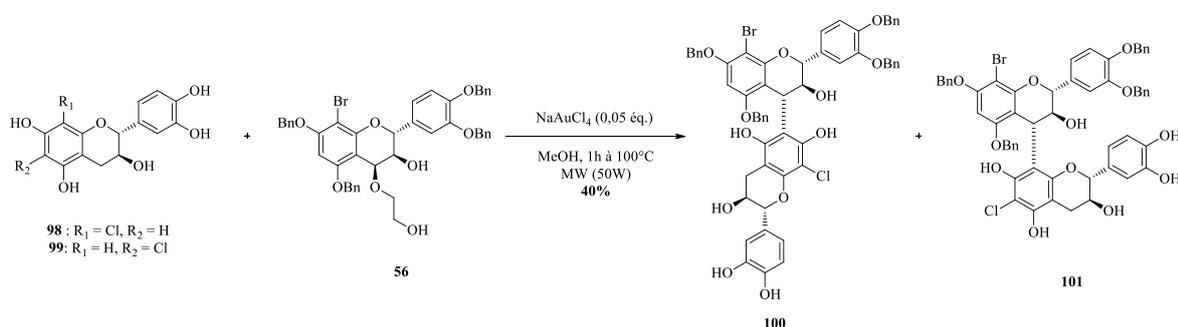
Cependant, ayant des problèmes avec la pression d'hydrogène de notre appareil, nous avons également choisi de mettre au point l'hydrogénation dans des conditions classiques pour des questions de reproductibilité. Ainsi le même mélange **81/82** ont été mis en présence du catalyseur de Pearlman sous une pression atmosphérique d'hydrogène à température ambiante. Après 2h30 d'agitation, la réaction est finie et il a été remarqué que, si les composés restent trop longtemps dans le milieu réactionnel, il y a une perte partielle du chlore. Ces conditions nécessitent une étape de filtration sur milipore afin d'enlever le

palladium ce qui conduit à l'obtention du mélange **98/99** avec un rendement quantitatif (**Fig. 75, p213**).



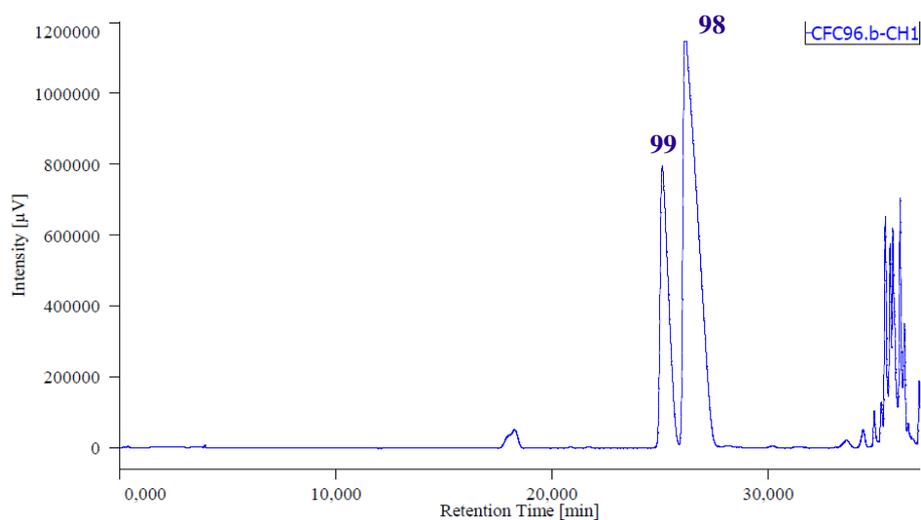
**Figure 75** : Déprotection de la catéchine chlorée dans des conditions classiques d'hydrogénation.

Un essai de couplage a par la suite été réalisé sur ce mélange **98/99**, mis en présence de **56** et de  $\text{NaAuCl}_4$  (0,05éq.) dans du méthanol. Après 1h d'agitation, sous microondes à  $100^\circ\text{C}$  (50W) un mélange complexe de produits est obtenu et afin de caractériser les différents composés une purification par HPLC semi préparative a été réalisée pour conduire à **100** et à **101** avec des rendements respectifs de 15 et 25% (**Fig. 76**).



**Figure 76** : Couplage avec avec le mélange **98/99** et chromatogramme. Elution : 30/70 ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  à 85/15 en 25mn et à 5/95 en 28mn.

Lors de la purification 4 produits ont été récupérés, le premier avec un temps de rétention  $t_R = 3\text{mn } 24\text{s}$  étant un reste de catéchine chlorée **98** n'ayant pas réagi. Les deux produits majoritaires correspondant aux composés **100** ( $t_R = 9\text{mn}$ ) et **101** ( $t_R = 7\text{mn } 22\text{s}$ ) ont été isolés avec des rendements respectifs de 15% et 25%. La catéchine activée et bromée **56** a été récupérée à hauteur de 15% ( $t_R = 13\text{mn } 43\text{s}$ ) et les autres pics correspondent à des impuretés ( $t_R = 16\text{mn } 93\text{s}$  et  $17\text{mn } 94\text{s}$ ). Comme nous le montrent ces résultats, le couplage fonctionne bien dans ces conditions toutefois une complète conversion du composé **101** est observée, ce qui n'est pas le cas de **100**. Il a donc fallu optimiser la réaction de manière à obtenir majoritairement le couplage en 4-6. Pour cela, il a été envisagé de purifier en amont le mélange **98/99** par HPLC de manière à avoir une régiosélectivité totale et afin d'augmenter le rendement. La mise au point de la purification de ces 2 produits s'est révélée être fastidieuse mais **98** et **99** ont pu être séparés avec succès malgré des temps de rétention très proches (**Fig. 77**).

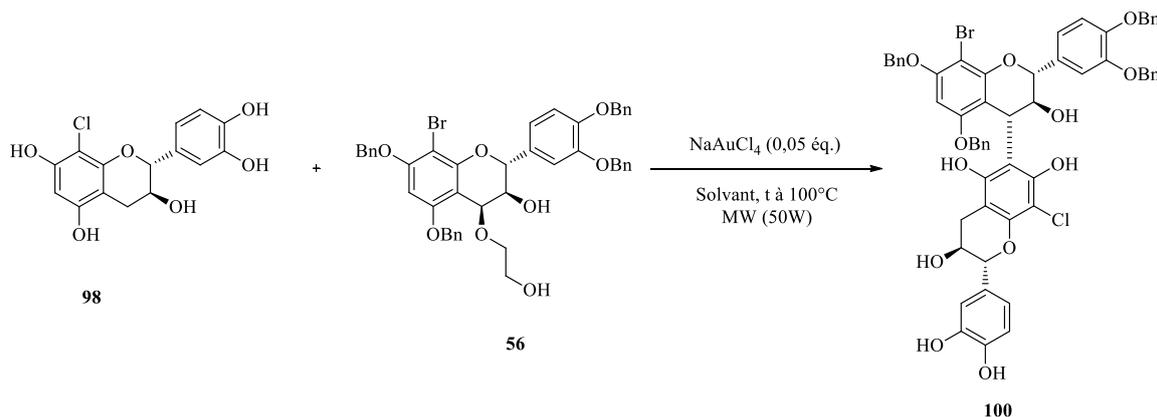


**Figure 77** : Chromatogramme du mélange **98** et **99**. Elution : 95/5 ACN/H<sub>2</sub>O à 80/20 en 30mn et à 15/85 en 35mn.

Ainsi les composés **98** et **99** ont été isolés avec des rendements respectifs de 49% et 27% nous offrant ainsi la possibilité de réaliser des couplages régiosélectifs.

- Couplage avec la catéchine chlorée en 8 et débenzylée

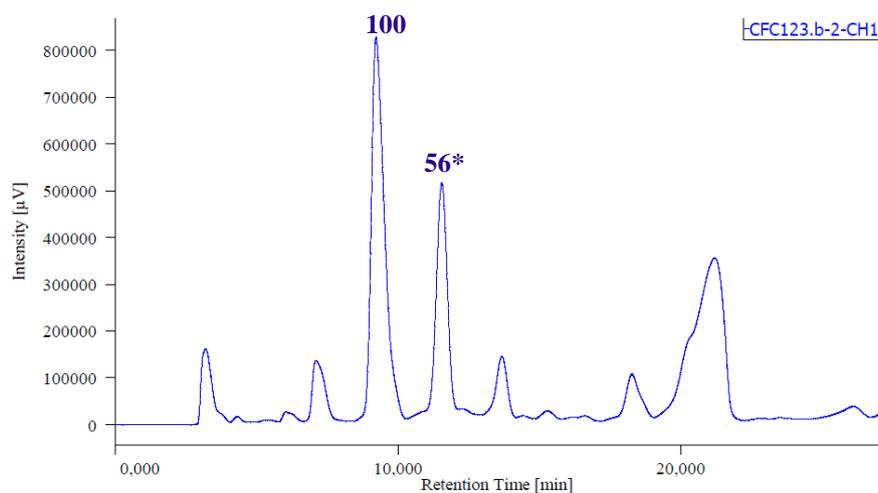
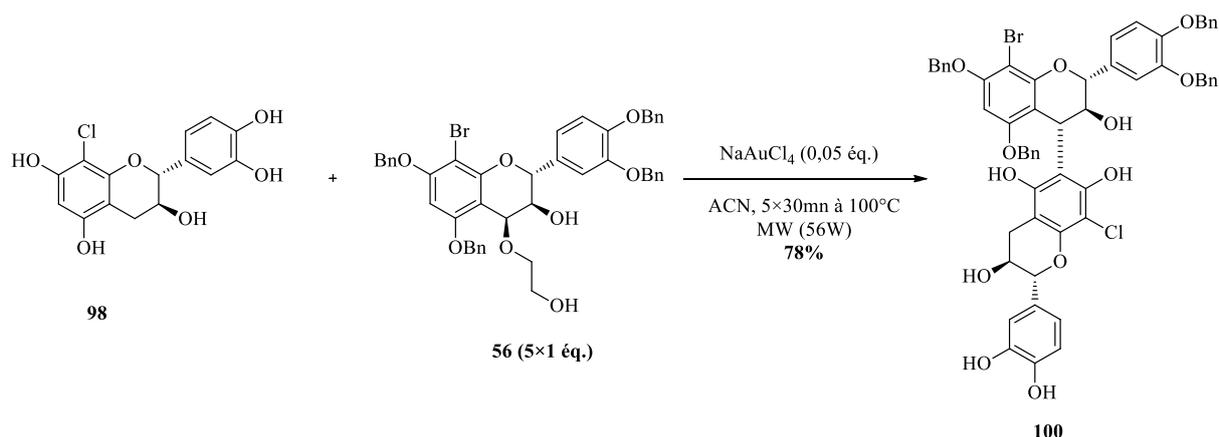
Dans un premier temps une reproduction des conditions établies précédemment avec le mélange **98** et **99** (**Fig. 76**) a été effectuée conduisant au produit désiré avec un rendement de 30% après 2h de chauffage (**Entrée 1, Fig. 78**). Afin d'optimiser la réaction, nous avons fait des essais avec différents solvants et les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-dessous (**Fig. 78**).



Entrée	Solvant	Temps (h)	Rendements (%)
1	MeOH	2×1h	30%
2	DMF	1h	0%
3	ACN	2×1h	40%

**Figure 78** : Conditions de couplage et rendements obtenus avec différents solvants.

Notons que les rendements donnés ici sont calculés après purification par HPLC. D'après les résultats obtenus, l'acétonitrile semble être le meilleur solvant pour effectuer le couplage. De plus, des suivis RMN <sup>1</sup>H ont permis de montrer qu'une dégradation complète du composé **56** avait lieu en 30mn, pouvant être à l'origine du rendement moyen obtenu. Ainsi, le composé **98** ne se dégradant pas, nous avons décidé de réaliser la réaction en rajoutant toutes les 30mn un équivalent de **56** jusqu'à la complète conversion de **98**. Et, avec un ajout de 5 équivalents de **56**, et après 2h30 de réaction le produit **100** a finalement été obtenu avec un rendement de 78% après purification sur C18 (**Fig.79, p214**).

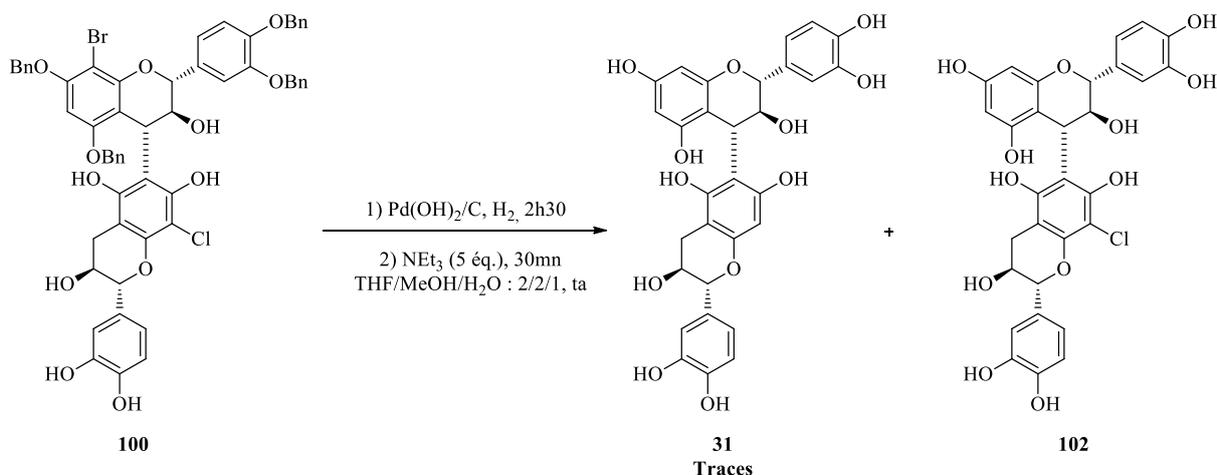


**Figure 79 :** Conditions de couplage optimisées et chromatogramme de la purification par HPLC. Elution : 30/70 ACN/H<sub>2</sub>O à 85/15 en 25mn et à 5/95 en 28mn.

Deux produits majoritaires sont isolés après purification par HPLC, le composé souhaité **100** (tR = 9mn 02s) et le composé issu de la dégradation de **56** (tR = 11mn 63s). L'optimisation de cette étape clé de la synthèse du B6 permet d'accéder à de très bons résultats en termes de rendement et régiosélectivité. De plus, cette étape est parfaitement reproductible contrairement au couplage réalisé avec des unités protégés. La dernière étape *via* la déprotection intégrale de la molécule **100** (débenzylation, débromation et déchloration) avant l'obtention du composé natif **31** reste à développer.

- Déprotection du B6 100.

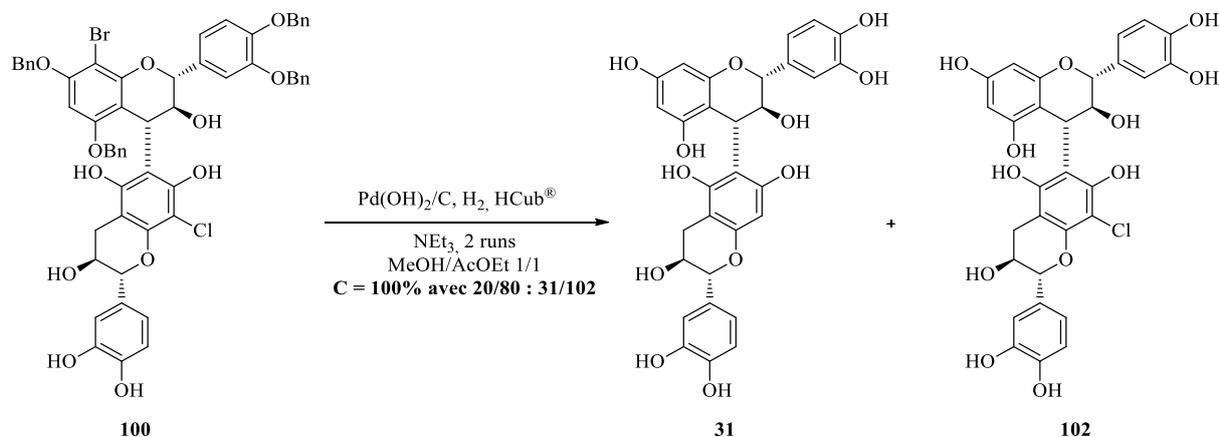
Afin de déprotéger le composé **100**, nous avons voulu tester les conditions données dans la publication de l'équipe de Suzuki utilisant une hydrogénéolyse basée sur les conditions de Sajiki. Pour cela **100** a tout d'abord été engagé dans une réaction de débenzylation avec le catalyseur de Pearlman puis, après 2h30 d'agitation, 5 équivalents de triéthylamine ont été rajoutés afin d'enlever le chlore et le brome des positions C8. Cependant, après 1h d'agitation seules des traces de B6 ont été détectées par spectrométrie de masse de type ESI alors que l'équipe de Suzuki a obtenu **31** de manière quantitative après 30mn (**Fig. 80**).



**Figure 80** : Conditions de déprotection selon Suzuki *et coll.*

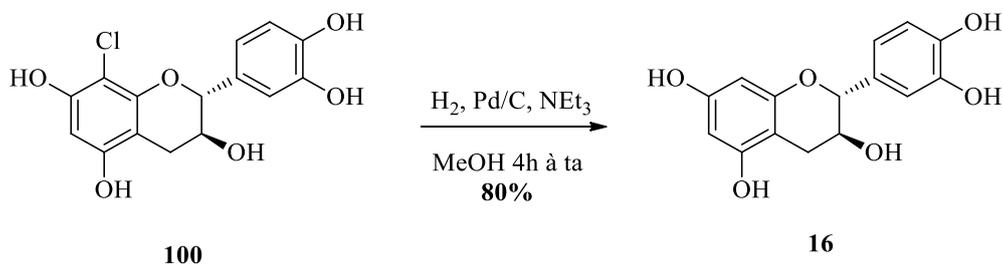
En utilisant les conditions de déchloration, mises au point par Suzuki *et coll.*, nous n'arrivons donc pas dans notre cas à déchloration le composé. Notons toutefois que le produit **102**, obtenu en fin de réaction est totalement débenzylé et débromé. Ces conditions n'étant pas adaptées pour déprotéger intégralement **100**, une mise au point a dû être réalisée. Nous avons tout d'abord travaillé dans des conditions classiques d'hydrogénation en reprenant les conditions de Suzuki *et coll.* mais en ajoutant la triéthylamine dès le départ dans le milieu réactionnel. Après 2h de réaction le milieu a été analysé en ESI et **31** est bien présent malgré une présence majoritaire de **102**. En supposant que l'ionisation de **31** et **102** soit là même, la conversion serait à 30%. Cette valeur est à prendre à titre informatif pour pouvoir la comparer avec les résultats obtenus par la suite dans le cadre de l'optimisation. Travaillant sur de petites quantités et de par la complexité des molécules le suivi n'a pu être réalisé par RMN <sup>1</sup>H. Malgré ce résultat encourageant, une augmentation du temps de réaction n'améliore pas la conversion de **100**. La réaction a donc été réalisée dans le méthanol avec de la triéthylamine, en utilisant une nouvelle fois le catalyseur de Pearlman, et comme dans le cas des conditions de Suzuki, seulement des traces de B6 sont observées. Il a donc été envisagé de travailler avec

le HCub<sup>®</sup> et après plusieurs tests un résultat s'est avéré être encourageant avec une conversion de 20% après 2 runs dans un mélange MeOH/AcOEt : 1/1 en présence de NEt<sub>3</sub> (**Fig. 81**).



**Figure 81** : Conditions de déprotection au HCub<sup>®</sup>.

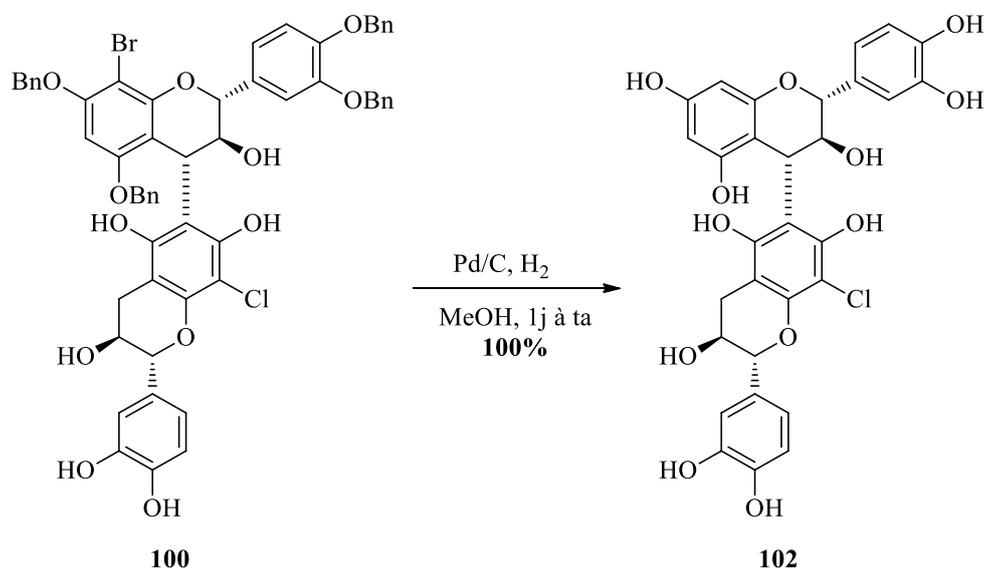
Malgré ces résultats, plusieurs passages sur la cartouche de palladium n'ont pas amélioré la déchloration de **102**. Ayant des cartouches de Nickel de Raney à disposition, nous avons essayé une déprotection avec cet autre catalyseur, mais cela n'a pas été concluant et a conduit seulement au composé **102**. Afin de ne pas engager le composé **100** qui nécessite plusieurs étapes de synthèse dont 2 purifications par HPLC, des essais sur la catéchine chlorée **98** ont été réalisés. Cette fois-ci le palladium sur charbon a été utilisé comme catalyseur dans les conditions classiques en présence de NEt<sub>3</sub> et après 4h d'agitation une déchloration à hauteur de 80% a été observée (**Fig. 82**). Ces conditions ont donc été directement appliquées sur le composé **100** mais après 1 jour dans le milieu réactionnel le composé souhaité n'est pas observé en masse. Notons tout de même que ce catalyseur est efficace pour la débenzylation ainsi que pour la débromation car le composé **102** est obtenu de manière quantitative avec et sans triéthylamine (aucune dégradation de **102** est observée dans ce cas).



**Figure 82** : Mise au point de la déchloration sur la catéchine.

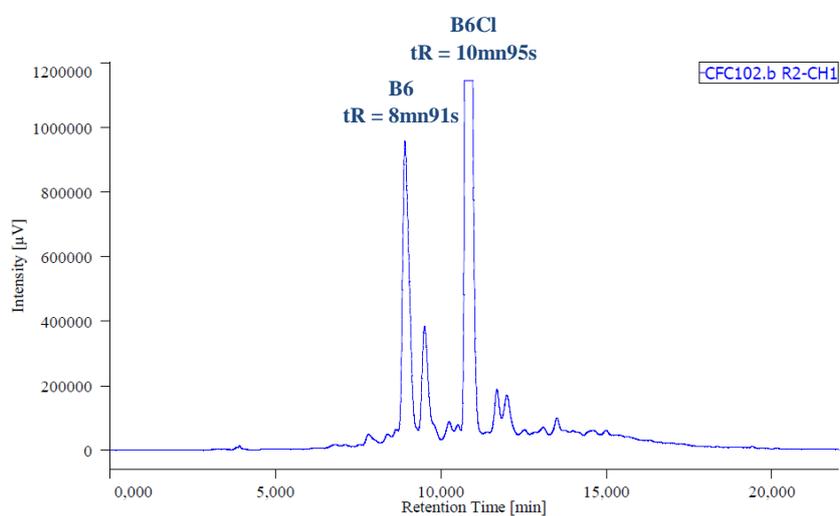
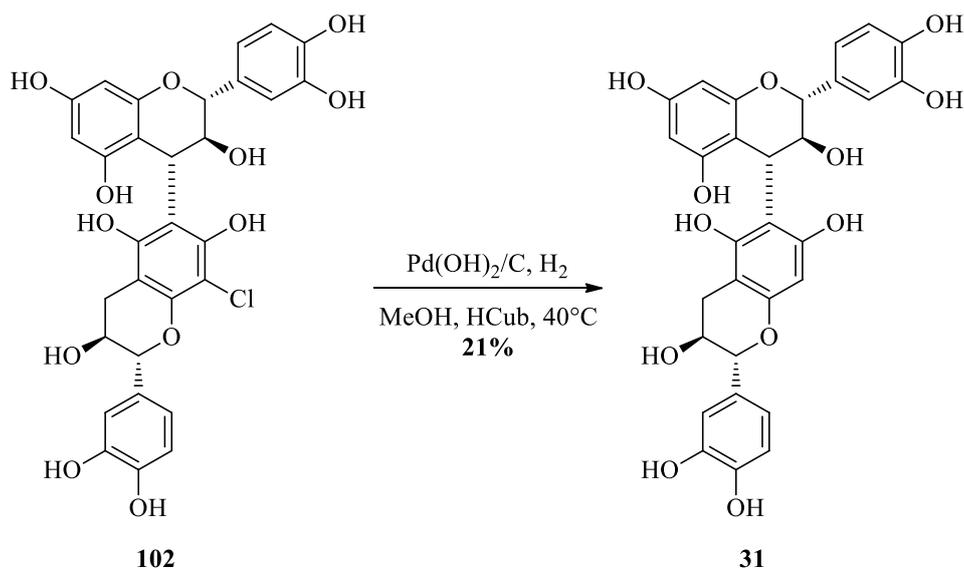
Au vu de ces résultats, nous avons envisagé de revenir sur une déprotection en 2 étapes faisant intervenir une débenzylation/débromation par une hydrogénation catalysée par du Pd/C en

conditions classiques suivie par une déchloration au HCub<sup>®</sup>. Le Pd/C a été choisi pour réaliser la première étape car il permet d'isoler **102** de manière quantitative (**Fig. 83, p215**). Le composé a ensuite été analysé par HPLC analytique afin de mettre au point un suivi cinétique de la réaction suivante (déchloration).



**Figure 83** : Débenzylation et débromation du produit B6.

Ainsi, le composé **102** a ensuite été engagé dans une réaction de déchloration au HCub<sup>®</sup> puisque, comme nous l'avons vu précédemment, l'utilisation de cet appareil a conduit à des résultats encourageants avec **100**. Les essais sans triéthylamine n'étant pas concluants, 5 équivalents de triéthylamine ont été ajoutés dans la solution à injecter de manière à reprendre les conditions de Sajiki (**Fig. 50**). Toutefois, une précipitation de **102**, traduisant une déprotonation du composé, n'a pas permis de réaliser ce test. Pour pallier à ce problème une diminution de la quantité de triéthylamine a été envisagée pour passer de 5 à 0,5 équivalents ce qui permet d'éviter la précipitation du réactif. Ainsi, **102** a été injecté dans le HCub<sup>®</sup> avec 0,5 équivalents de NEt<sub>3</sub> et après 2 runs le composé a été analysé par HPLC analytique et le B6 semble se former de manière propre. Ceci nous a conduit à purifier le mélange par HPLC semi-préparative de manière à quantifier précisément le rendement de la réaction après 2 passages de **102** sur la cartouche de Palladium (**Fig. 84, p215**). Ainsi, après purification le B6 **31** a été isolé avec un rendement de 21%, le reste étant le produit de départ **102** (**Annexe 4**).

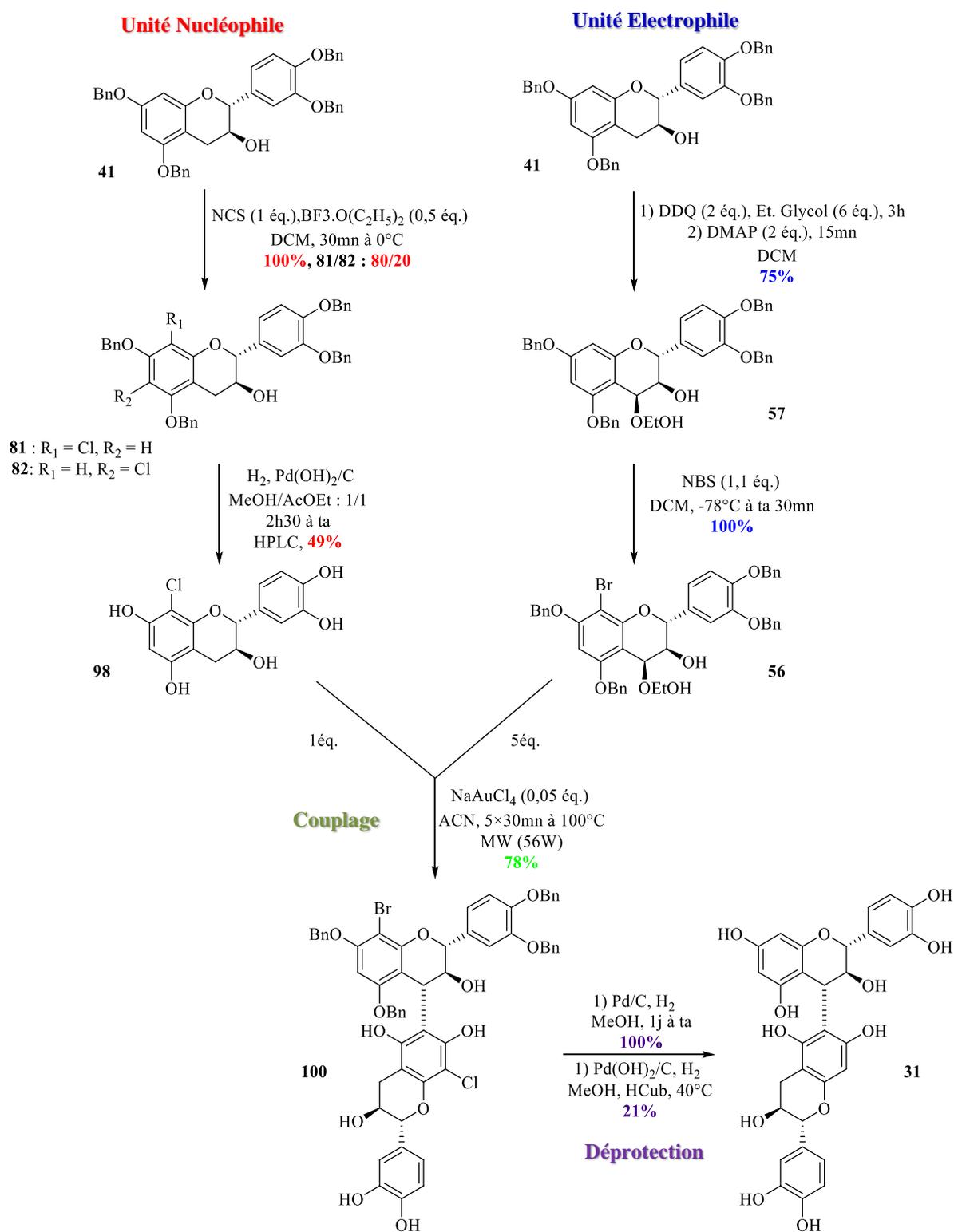


**Figure 84** : Conditions de déprotection du B6Cl et chromatogramme de la purification par HPLC.

Malgré de nombreux essais, le rendement de la réaction n'a pu être augmenté, même après plusieurs runs. La cause de ce rendement limité serait liée à l'état du HCub<sup>®</sup> qui n'assure pas une pression d'hydrogène constante. De plus, le fait de ne pas pouvoir utiliser cet appareil sous haute pression limite également la faisabilité de la réaction. Il est donc envisagé de réaliser cette déprotection sur un HCub<sup>®</sup> fonctionnel dans un autre laboratoire, ce qui permettrait éventuellement de faire la réaction en une seule étape à partir de **100**.

Pour résumer, cette optimisation de la synthèse nous a permis d'accéder au B6 *via* une réaction un couplage régiosélective et avec de très bons rendements entre une unité nucléophile chlorée déprotégée **98** et l'électrophile **56**. Bien que la déchloration pose des

problèmes, cette réaction reste tout à fait optimisable et nous a tout de même permis d'isoler le B6 (**Fig. 85**) nous permettant ainsi de faire des tests d'inhibition de la phosphorylation de Tau.



**Figure 85** : Synthèse du B6.

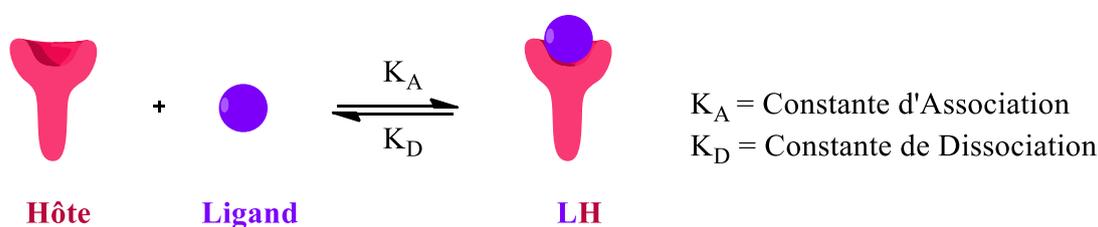
Précisons, qu'en parallèle une alternative utilisant l'équivalent bromé déprotégé a été envisagée.

En conclusion de cette partie nous pouvons dire que ces travaux ont permis la synthèse de plusieurs dimères tels que le B3, le B3G et surtout pour la première fois le B6. Les travaux précédents réalisés au laboratoire et les conditions de couplage décrites par l'équipe de Suzuki ont permis l'optimisation du couplage en position 4-6 avec une synthèse totalement régiosélective, reproductible et conduisant à de très bons rendements. L'obtention de ces différentes molécules nous ouvre la voie pour des essais *in vitro* de tests d'inhibition de la phosphorylation de la protéine Tau.

## II. Etudes d'interactions peptides/polyphénols par RMN

### 1) Généralités

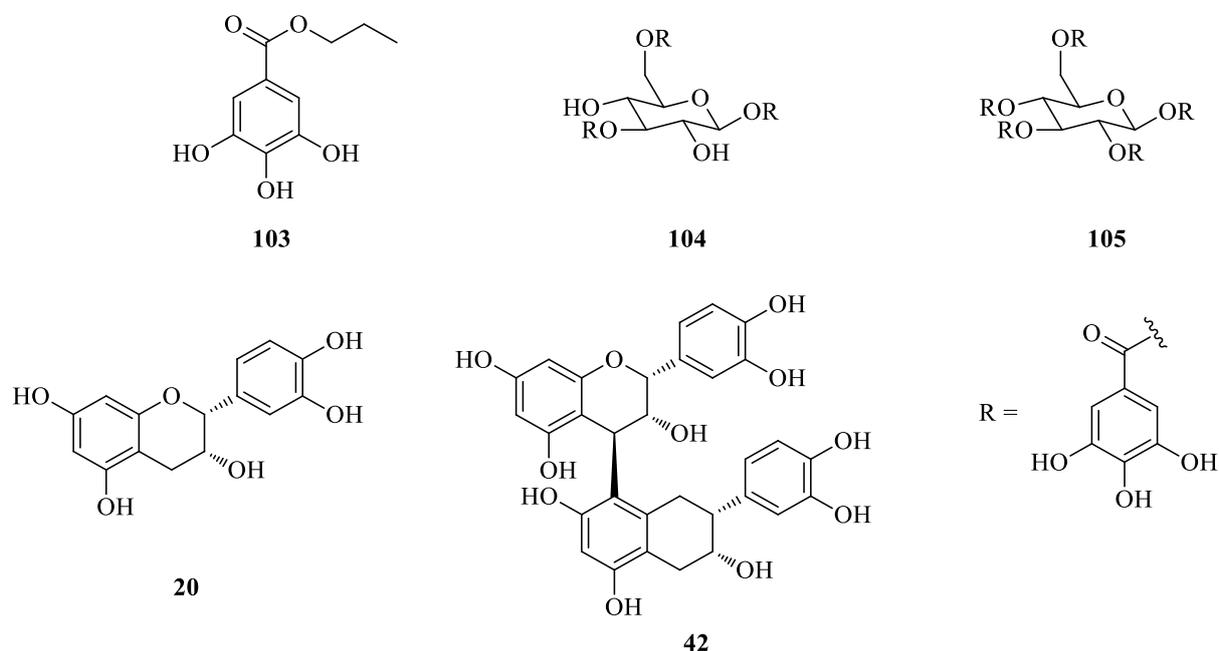
Les phénomènes biologiques liés à la signalisation cellulaire par l'activité activatrice/inhibitrice de molécules pharmacologiquement actives sont régis par des interactions à l'échelle moléculaire entre des petites molécules, nommées ligands, et des macromolécules, généralement des protéines, nommées hôtes. Ce processus se caractérise par un équilibre thermodynamique traduisant une association et une dissociation du complexe LH (Ligand-Hôte). Cet équilibre nécessite une affinité entre le ligand et son hôte qui est quantifiable par l'utilisation d'équations mathématiques donnant accès à la détermination de la constante de dissociation  $K_D$  du complexe LH (**Fig. 86**).



**Figure 86 :** Equilibre traduisant l'affinité entre un hôte et son ligand.

La constante de dissociation est classiquement calculée à l'aide d'étude pharmacologiques de liaison du ligand à son hôte (Binding) mais depuis quelques années les méthodes physico-chimiques sont également utilisées.<sup>[141]</sup> La RMN est utilisée couramment pour calculer les  $K_D$  entre des protéines et de petites molécules *via* plusieurs modalités privilégiées telles que la RMN homonucléaire, hétéronucléaire ou encore la DOSY. Ces calculs sont réalisables à partir d'expériences RMN effectuées sur le ligand, sur le récepteur ou sur les deux, ce qui est plus rare. L'utilisation de cette technique nécessite un échange rapide entre formes non liées et liées des composés, un échange lent conduisant à un spectre très complexe. Dans le cas de l'échange rapide, une moyenne entre les signaux du composé étudié libre et lié est observée ce qui peut être plus facilement interprétable sur le spectre final. Afin de déterminer les constantes de dissociation de complexes, il est nécessaire de faire des expériences de titration. Généralement, les études RMN sont réalisées sur l'hôte et un ajout de concentrations croissantes du ligand permet d'observer soit des variations de déplacements chimiques de certains noyaux de l'hôte, soit des élargissements ou soit des disparitions de certains pics.<sup>[141]</sup> L'ajout du ligand est fait jusqu'à saturation afin d'avoir une constante la plus précise possible. En 1997, l'équipe de Williamson utilise cette technique afin d'apporter des explications, au

niveau moléculaire, du phénomène d'astringence causé par l'interaction entre les protéines salivaires et les polyphénols. Ces études ont été réalisées avec un peptide issu d'une protéine salivaire riche en prolines et avec différents polyphénols (**Fig. 87**).



**Figure 87** : Structures du peptide et des polyphénols utilisés par Williamson *et coll.* pour la titration.

Les variations de déplacements chimiques ont été suivies par TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) et un traitement de l'équation suivante a été réalisé de manière à obtenir une corrélation maximale entre variations de déplacements chimiques théoriques  $A_{\text{obs}}$  et expérimentales (**Eq. 1**) conduisant ainsi aux  $K_D$ .

$$\text{Equation 1} : A_{\text{obs}} = 1/2 A_{\text{max}} [(1 + K_D/n.P_0 + T_i/n.P_0) - ((1 + K_D/n.P_0 + T_i/n.P_0)^2 - 4T_i/n.P_0)^{1/2}]$$

Ainsi, il a été montré que plus les polyphénols ont un haut poids moléculaire et une haute complexité, plus l'affinité avec le peptide est grande ( $K_D \mathbf{42} > K_D \mathbf{105} > K_D \mathbf{104} \gg K_D \mathbf{20} \approx K_D \mathbf{103}$ ).<sup>[142]</sup> Notons que dans ce cas les affinités varient de 50  $\mu\text{M}$  à 5mM. Ce travail montre également que l'affinité entre le peptide et le polyphénol est régie par une interaction hydrophobe entre les cycles pyrrolidines de certaines prolines avec les aromatiques des polyphénols. Cette étude a été complétée en 2002 par la même équipe pour décrire les différents états de complexation liant l'agrégation des protéines salivaires et des polyphénols

expliquant ainsi l'astringence.<sup>[143]</sup> Ces travaux et ceux réalisés par l'équipe du Pr Fouquet sur l'IB9 ont servi de base pour initier l'étude des interactions entre les polyphénols et des fragments de la protéine Tau dont les résultats ont été brièvement discutés dans la partie bibliographie. Ainsi, afin de décrire l'affinité et les mécanismes moléculaires régissant ces interactions, Marie Guéroux a mis au point une stratégie combinant la RMN à des études de dynamique moléculaire. Concernant la RMN, la titration des polyphénols a été suivie à l'aide de 3 expériences complémentaires, en prenant soin de ne pas dépasser la CMC des polyphénols, de manière à éviter les interactions non spécifiques causées par la présence de micelles. Les premières expériences basées sur de la RMN 1D (<sup>1</sup>H) et 2D (TOCSY) consistent à suivre les variations de déplacements chimiques induites par les interactions polyphénols-peptides. Ainsi, dans la région des NH du peptide (7,5 à 8,6ppm), des variations significatives sont observées, traduisant un changement d'environnement autour des hydrogènes. La compilation de ces données permettant d'obtenir des informations quantitatives à travers le calcul des  $K_D$  et qualitatives à travers la détermination des sites de fixation sur les peptides. Ces résultats initiaux ont ensuite été comparés à ceux obtenus avec une expérience de type DOSY permettant de déterminer les coefficients de diffusion des complexes peptide-tanins. La variation de ce coefficient traduit un changement de taille de l'assemblage moléculaire qui peut être directement relié à l'affinité existant entre les composés engagés. Enfin, des expériences de types STD (Saturation Transfer-Difference) ont été réalisées afin d'obtenir des informations sur les interactions mises en jeu lors du processus d'assemblage. Cette dernière technique a été notamment utilisée pour confirmer les données issues de la dynamique moléculaire. Dans la partie bibliographie a été mis en évidence, à travers les calculs de  $K_D$  sur le P2 (<sup>201</sup>G-T<sup>220</sup>), que l'affinité entre les peptides modèles de Tau et les polyphénols dépendait de la structure de ces derniers et notamment du degré d'oligomérisation ainsi que de la présence du groupement galloyle. Cette information, confirmée par les calculs à partir des coefficients de diffusion, est relativement importante pour la suite de l'étude et permettra d'expliquer au niveau moléculaire les différences pouvant être observées lors de l'étude de l'inhibition du processus de phosphorylation. Les données RMN complétées par les données de dynamique moléculaire ont permis de mettre en évidence que les interactions entre les polyphénols et le peptide P2 se faisaient *via* des liaisons hydrogène impliquant notamment des sérines et des thréonines. En effet, dans le cas de composés galloylés, le peptide a un rôle de donneur de liaisons hydrogène et l'interaction s'établit entre les NH du squelette peptidique et ou les hydroxyles des sérines/thréonines et l'ester du galloyle. Dans le cas de polyphénols non galloylés, la liaison se fait entre les OH des polyphénols et différentes parties du squelette

peptidique (fonctions carboxyliques des sérines, leucine ou prolines) traduisant ici le rôle de donneur des composés non galloylés (**Tab. 2**). Cette différence de réactivité entre les polyphénols galloylés et non galloylés peut expliquer la différence d'affinité révélant des liaisons hydrogène plus labiles dans le cas où le polyphénol est un donneur.

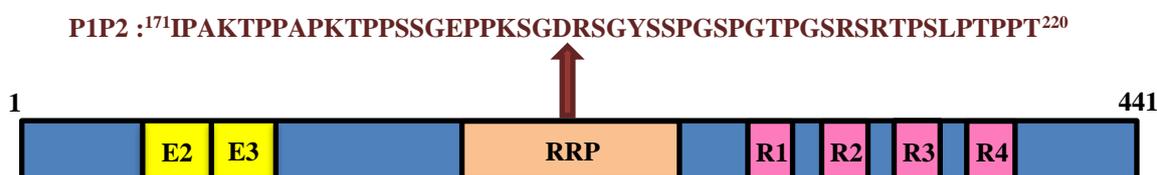
<b>Tanins</b>	<b>Donneur (%)</b>	<b>Accepteur (%)</b>	<b>n</b>	<b>aa impliqués</b>
<b>EGCG</b>	17	83	2	G207/T212/S214
<b>ECG</b>	18	82	2	S210/S214
<b>B2</b>	90	10	1	P218/T220
<b>B3</b>	65	35	2	T205/G207/P218
<b>B6</b>	34	66	2	L215/P218
<b>C2</b>	35	65	2	G207/R209/P213

**Tableau 2 :** Données issues de la dynamique moléculaire pour le P2. Avec n le nombre de sites de fixations.

Des études complémentaires ont également été réalisées sur le peptide P1 ( $^{171}\text{I-K}^{190}$ ) avec deux polyphénols : le B3 et l'EGCG. Des affinités de l'ordre du mM ont également été obtenues ( $K_D\text{B3} = 2,0 \pm 0,3\text{mM}$  et  $K_D\text{EGCG} = 1,1 \pm 0,1\text{mM}$ ) et deux sites de fixations (n) ont été dénombrés. Les études de dynamique moléculaire ont permis de montrer que des liaisons hydrogène étaient une nouvelle fois impliquées dans le processus de complexation. Ces liaisons s'établiraient avec le OH de la thréonine 181 et avec le  $\text{NH}_3^+$  de la lysine 180 dans le cas de l'EGCG. Il est important de noter que les interactions, dans le cas du P1 et du P2, se font autour de thréonines et de sérines qui sont hyperphosphorylées dans le cas de la MA et ces interactions pourraient permettre de bloquer l'approche des kinases. Dans le cas du peptide P1P2 l'attribution réalisée initialement par Marie Guéroux était partielle ce qui ne permet pas d'établir de façon précise les zones d'interactions. Dans un premier temps, les données ont donc été retraitées au cours de ces travaux afin de déterminer l'intensité de l'affinité entre les polyphénols et ce peptide ainsi que d'identifier les résidus impliqués.

## 2) Interactions Polyphénols et P1P2

Le peptide P1P2 est composé de 50 résidus recouvrant ainsi 57% de la région riche en prolines de Tau (**Fig. 88**).



**Figure 88** : Structures du peptide P1P2.

L'intérêt de travailler sur ce peptide est de voir si l'augmentation de la taille du peptide peut être corrélée à une amélioration de l'affinité, puisque l'on peut imaginer que de nouveaux sites d'interactions vont être mis en jeu mais aussi bénéficier de certains repliements de la chaîne. De plus, cela nous donne une information sur un fragment plus gros de la région riche en prolines permettant d'anticiper de manière plus globale le comportement des polyphénols, avec la RRP. Afin d'avoir les informations moléculaires souhaitées le premier travail consiste à caractériser le peptide P1P2.

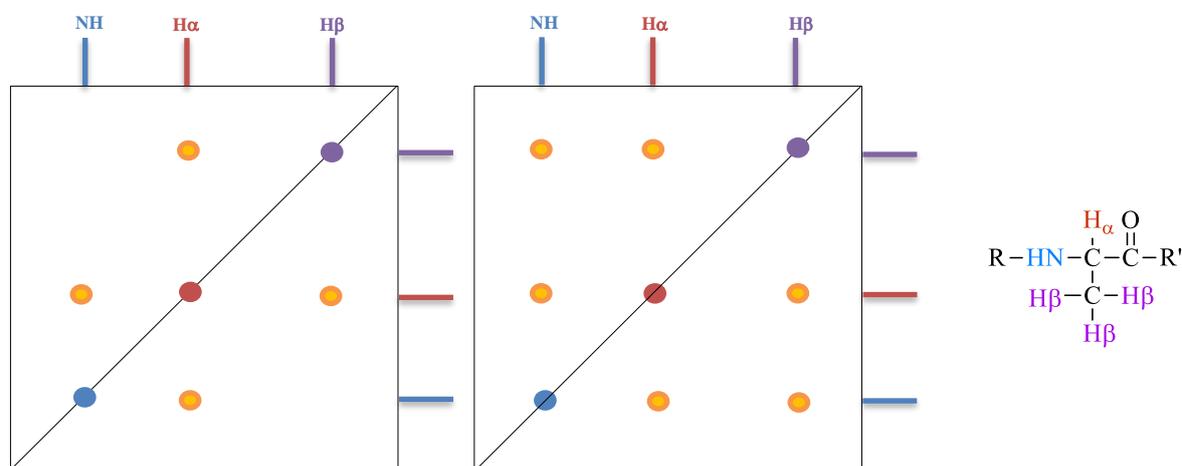
### a) Caractérisation de P1P2

En 1998 Kurt Wüthrich se voit décerné le prix de Kyoto pour ses travaux sur le développement d'une stratégie conduisant à la détermination structurale des protéines. Depuis 1960, son équipe a caractérisé 60 structures de protéines en solution à l'aide de la RMN et d'outils informatiques.<sup>[144]</sup> Cette technique se divise en trois parties qui sont l'identification des résidus, la détermination de la structure primaire du peptide et enfin de sa structure tridimensionnelle.

- Attribution des résidus.

Afin d'identifier les résonances des protons de chaque résidu, des expériences 2D vont être privilégiées du fait du recouvrement des signaux rendant le spectre  $^1\text{H}$  très vite illisible. De plus, seuls 2 signaux caractéristiques peuvent être identifiés en RMN du proton dans le cas de petits peptides : le NH des glycines qui forme un triplet et les  $\text{NH}_2$  des lysines qui se situent vers 7ppm. Afin de caractériser les résidus des expériences 2D homonucléaires, telles que la COSY et la TOCSY, sont couramment utilisées. La COSY permet de mettre en évidence les

corrélations en J3 tandis qu'une TOCSY permet de voir l'ensemble des protons corrélés de façons scalaires (**Fig. 89**).

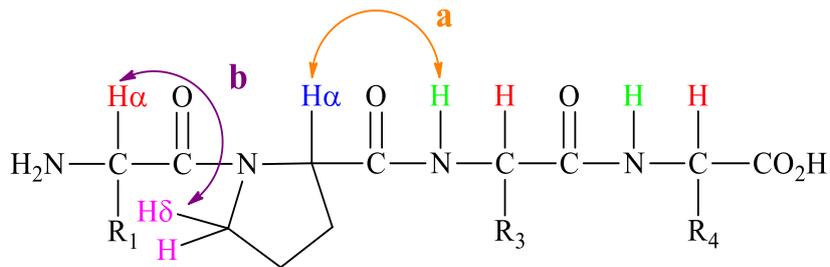


**Figure 89** : Représentation d'une COSY (gauche) et d'une TOCSY (droite) de l'alanine.

La TOCSY est la technique que nous avons choisi d'utiliser puisqu'elle permet d'avoir une vue d'ensemble de chaque proton de chacun des résidus qui vont être différenciables par leur système de spins propre.<sup>[145]</sup> Ainsi, cette technique permet dans un premier temps l'identification de la nature de chaque résidu peptidique.

- Caractérisation de la structure primaire du peptide.

Une fois la nature des résidus identifiée, il faut déterminer la position de ces différents résidus dans la structure primaire. Pour cela une nouvelle expérience de type 2D est utilisée mais contrairement à la précédente elle repose sur des interactions dipolaires, il s'agit de la NOESY. Cette technique permet de d'obtenir des corrélations entre les protons étant proches spatialement (2-5Å) résultant de l'effet NOE. Ainsi, l'identification est réalisée *via* des corrélations (a) entre l'hydrogène H $\alpha$  d'un résidu i et l'hydrogène NH d'un résidu i+1 (**Fig. 90**). Toutefois, dans le cas des prolines les corrélations étudiées doivent être différentes puisque l'azote engagé dans la liaison peptidique est tertiaire. Ainsi dans le cas d'un motif XP (avec X un résidu quelconque et P une proline) les corrélations (b) observées seront entre l'hydrogène H $\alpha$ <sub>1-p</sub> de X et l'Hydrogène H $\delta$ <sub>p</sub> de la proline (**Fig. 90**).



**Figure 90** : Corrélations observées par NOESY.

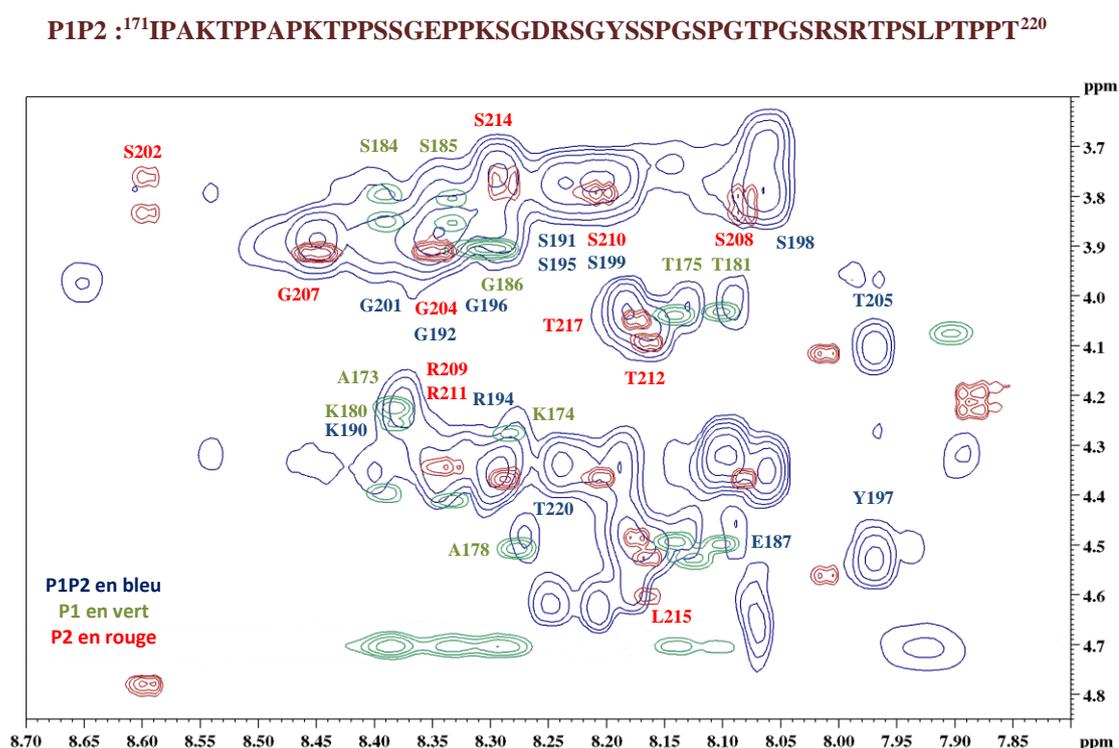
La détermination de la position des résidus dans la séquence primaire permet par la suite la caractérisation RMN complète du peptide par le biais d'expériences 2D hétéronucléaires de type HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation)  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  et  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ .

- Détermination de la structure tridimensionnelle.

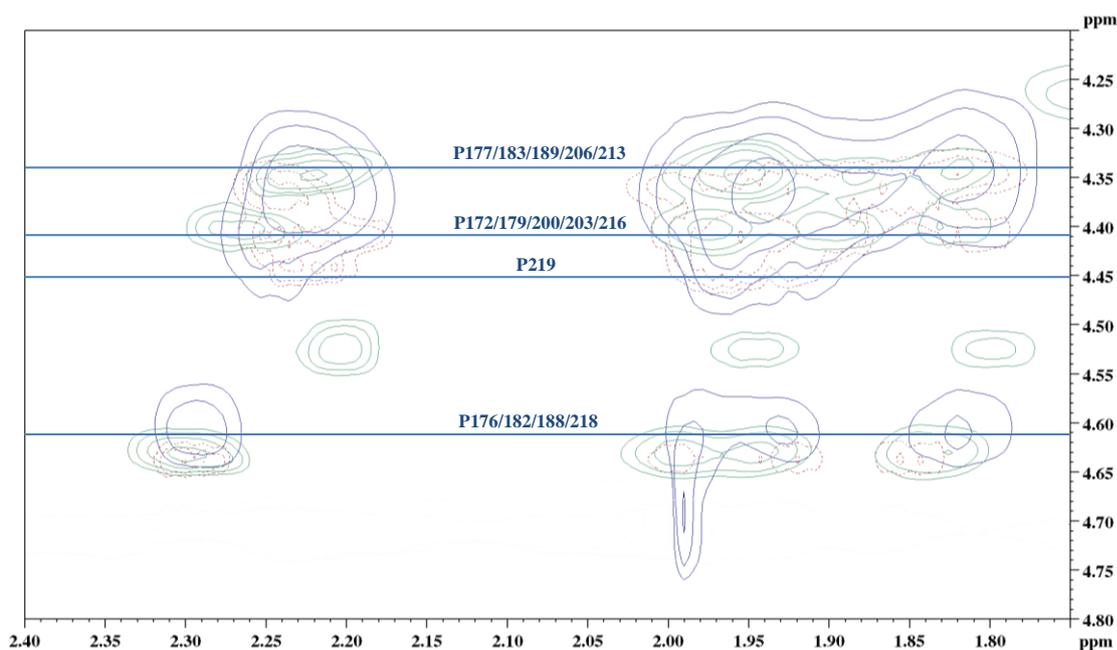
La dernière étape de cette stratégie consiste à établir la structure 3D du peptide. Pour cela les constantes de couplages en J3 sont extraites des spectres  $^1\text{H}$  lorsque cela est possible et les effets NOE sont classés par leurs intensités. Ces données sont collectées dans un fichier de contraintes de manière à modéliser les structures 3D à l'aide d'expériences de dynamique moléculaire. Si seules des corrélations entre les résidus  $i$  et  $i+1$  sont observées cela traduit un état non structuré du peptide.



résidu. Cela permet de déterminer la nature de certains résidus en regardant en premier dans la zone en dehors des corrélations NH-H $\alpha$  et NH-H $\beta$ . Après avoir étudié la zone la plus blindée il est possible d'en déduire à quels types de résidus appartiennent les corrélations dans la zone entre 3,5-4,6ppm. Toutefois, le recouvrement important des signaux dans cette zone ne permet pas l'identification de résidus tel que les glycines. Afin de déterminer la structure primaire du peptide, les TOCSY des peptides P1 et P2 ont été superposés à la TOCSY de P1P2 (**Fig. 92**).



Comme nous pouvons le constater, il y a un haut degré de superposition entre les « petits » et le « grand » peptide. Les variations importantes observées pour K190 et T220 sont dues à la position C-terminale de ces résidus au sein des peptides P1 et P2. Pour les 10 résidus n'appartenant pas à P1 ou P2 la stratégie de Wüthrich a été appliquée afin d'obtenir une caractérisation complète des protons de chacun des résidus à l'exception des prolines qui ne peuvent être étudiées dans la région des NH. Les prolines peuvent être caractérisées dans la zone H $\gamma$ P-H $\delta$ P mais l'attribution ne sera pas aussi précise que pour les autres résidus du fait du recouvrement important dans cette zone (**Fig. 93**).



**Figure 93** : TOCSY du P1P2 (bleu) superposé avec la TOCSY de P1 (vert) et de P1 (rouge) dans la zone des prolines.

Deux massifs sont distinguables au niveau des prolines par leurs blindages. En effet, les prolines précédant une autre proline sont décrites comme étant plus déblindées que les prolines précédant un autre résidu.<sup>[146]</sup> Grâce aux superpositions et à l'étude des effets NOE la caractérisation peut tout de même être affinée.

Une fois tous les protons caractérisés, les carbones et les azotes ont également pu être attribués à l'aide des HSQC  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  et  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  et les attributions sont résumées dans les tableaux suivants (**Tab. 3 et 4**).

	NH	H $\alpha$	H $\beta$	H $\gamma$	H $\delta$	H $\epsilon$ et autres
<b>P172</b>		4.37	1.81/2.23	1.88/1.96	3.65/3.74	
<b>A173</b>	8.37	4.22	1.33			
<b>K174</b>	8.27	4.24	1.65	1.35	1.59	$\epsilon_{CH2}$ : 2.88 $\epsilon_{NH2}$ : 7.46
<b>T175</b>	8.13	4.49	4.03	1.18		
<b>P176</b>		4.62	1.82/2.29	2.01/1.93	3.59/3.62	
<b>P177</b>		4.35	1.82/2.23	1.89/1.96	3.78/3.82	
<b>A178</b>	8.26	4.57	1.28			
<b>P179</b>		4.37	1.81/2.23	1.88/1.96	3.65/3.74	
<b>K180</b>	8.37	4.25	1.67	1.36	1.59	$\epsilon_{CH2}$ : 2.91 $\epsilon_{NH2}$ : 7.46
<b>T181</b>	8.09	4.43	4.03	1.16		
<b>P182</b>		4.62	1.82/2.29	2.01/1.93	3.59/3.62	
<b>P183</b>		4.35	1.82/2.23	2.01/1.93	3.78/3.82	
<b>S184</b>	8.34	4.34	3.87			
<b>S185</b>	8.29	4.38	3.78			
<b>G186</b>	8.29	3.78				
<b>E187</b>	8.07	4.66	2.40	2.04	1.79	
<b>P188</b>		4.62	1.82/2.29	2.01/1.93	3.59/3.62	
<b>P189</b>		4.35	1.82/2.23	2.01/1.93	3.59/3.62	
<b>K190</b>	8.37	4.25	1.67	1.36	1.59	$\epsilon_{CH2}$ : 2.91 $\epsilon_{NH2}$ : 7.46
<b>S191</b>	8.23	4.34	3.778			
<b>G192</b>	8.34	3.87				
<b>D193</b>	8.25	4.64	2.80			
<b>R194</b>	8.31	4.32	1.67/1.79	1.55	3.11	NH : 7.07 ; 7.11
<b>S195</b>	8.23	4.34	3.78			
<b>G196</b>	8.31	3.85				
<b>Y197</b>	7.97	4.54	2.91			3 et 5 : 6.73 2 et 6 : 7.02
<b>S198</b>	8.05	4.35	3.66			
<b>S199</b>	8.20	4.64	3.78			
<b>P200</b>		4.37	1.81/2.23	1.88/1.96	3.65/3.74	
<b>G201</b>	8.36	3.90				

<b>S202</b>	8.34	4.34	3.87			
<b>P203</b>		4.37	1.81/2.23	1.88/1.96	3.65/3.74	
<b>G204</b>	8.35	3.87				
<b>T205</b>	7.96	4.54	4.10	1.14		
<b>P206</b>		4.35	1.81/2.23	2.01/1.93	3.78/3.82	
<b>G207</b>	8.45	3.90				
<b>S208</b>	8.06	4.36	3.75			
<b>R209</b>	8.34	4.31	1.67/1.79	1.55	3.11	NH : 7.07
<b>S210</b>	8.20	4.37	3.78			
<b>R211</b>	8.34	4.31	1.67/1.79	1.55	3.11	NH : 7.07
<b>T212</b>	8.15	4.51	4.07	1.17		
<b>P213</b>		4.35	1.82/2.23	2.01/1.93	3.78/3.82	
<b>S214</b>	8.29	4.36	3.78			
<b>L215</b>	8.17	4.58	1.52	1.52	0.85	
<b>P216</b>		4.37	1.81/2.23	1.88/1.96	3.65/3.74	
<b>T217</b>	8.17	4.47	4.04	1.18		
<b>P218</b>		4.62	1.82/2.29	2.01/1.93	3.59/3.62	
<b>P219</b>		4.39	1.81/2.20	1.90/1.96	3.79/3.84	
<b>T220</b>	7.96	4.54	4.10	1.14		

**Tableau 3** : Déplacements chimiques (ppm) des protons du P1P2.

	N	C $\alpha$	C $\beta$	C $\gamma$	C $\delta$	C $\epsilon$
<b>P172</b>		61.1	29.4	24.7	47.8	
<b>A173</b>	124.9	53.6	22.0			
<b>K174</b>	121.0	57.0	28.0	22.1	26.3	39.4
<b>T175</b>	118.5	57.1	67.0	18.9		
<b>P176</b>		60.5	29.4	24.7	61.3	
<b>P177</b>		61.1	29.4	24.7	47.8	
<b>A178</b>	125.6	57.0	22.0			
<b>P179</b>		61.2	29.4	24.7	44.8	
<b>K180</b>	121.6	53.4	28.0	22.1	26.3	39.4
<b>T181</b>	113.7	60.3	67.0	18.9		
<b>P182</b>		60.5	29.4	24.7	61.3	
<b>P183</b>		61.1	29.4	24.7	47.8	
<b>S184</b>	115.9	58.2	42.4			
<b>S185</b>	116.4	55.6	48.4			
<b>G186</b>	110.4	42.4				
<b>E187</b>	118.2	57.0	29.7	24.7	28.1	
<b>P188</b>		60.5	29.4	24.7	61.3	
<b>P189</b>		61.1	29.4	24.7	47.8	
<b>K190</b>	121.6	53.4	28.0	22.1	26.3	39.4
<b>S191</b>	116.7	55.7	48.4			
<b>G192</b>	109.2	42.4				
<b>D193</b>	118.8	57.0	35.6			
<b>R194</b>	122.7 (N $\alpha$ ) 124.5; 124.6NH $\epsilon$	55.6	27.9	24.4	40.6	
<b>S195</b>	116.8	55.7	48.4			
<b>G196</b>	110.7	42.4				
<b>Y197</b>	120.1	57.0	39.4			3, 5 :115.1 2, 6 :130.4
<b>S198</b>	115.5	55.6	48.4			
<b>S199</b>	118.9	57.1	48.4			
<b>P200</b>		61.2	29.4	24.7	47.8	
<b>G201</b>	110.5	42.4				

<b>S202</b>	115.9	55.7	42.4			
<b>P203</b>		61.2	29.4	24.7	47.8	
<b>G204</b>	108.9	42.4				
<b>T205</b>	115.5	57.1	67	18.9		
<b>P206</b>		61.2	29.4	24.7	47.8	
<b>G207</b>	109.3	42.4				
<b>S208</b>	116.7	55.6	48.4			
<b>R209</b>	122.9 (N $\alpha$ ) 124.5; 124.6	56.4	27.9	24.4	40.6	
<b>S210</b>	116.6	55.7	48.4			
<b>R211</b>	122.9 (N $\alpha$ ) 124.5; 124.6	56.4	27.9	24.4	40.6	
<b>T212</b>	118.0	57.0	67.0	18.9		
<b>P213</b>		61.1	29.4	24.7	47.8	
<b>S214</b>	117.6	55.6	48.4			
<b>L215</b>	125.4	56.9	39.3	39.3	20.7	
<b>P216</b>		61.2	29.4	24.7	47.8	
<b>T217</b>	117.5	60.2	67.0	18.9		
<b>P218</b>		60.5	29.4	24.7	61.3	
<b>P219</b>		61.2	29.4	24.7	47.8	
<b>T220</b>	115.5	57.1	67.0	18.9		

**Tableau 4 :** Déplacements chimiques (ppm) des carbones et des azotes du P1P2.

Lors des travaux sur P1 et P2, des caractérisations de la structure 3D avaient été réalisées par dynamique moléculaire en utilisant des fichiers de contraintes dans lesquels étaient collectés les effets NOE entre les résidus ainsi que les constantes de couplages en J3. Ainsi il a été montré que les peptides adoptent préférentiellement une structure flexible et étendue. Les NOE ont également été collectés pour le peptide P1P2 (**Tab. 5**) et les corrélations relevées correspondent exclusivement aux couplages dipolaires entre les résidus  $i$  et  $i+1$ . Ainsi, le faible nombre d'effets NOE et le haut degré de superposition des signaux entre les peptides P1, P2 et P1P2 traduisent l'état non structuré de P1P2. Or, dans la littérature il est décrit que la protéine Tau ne possède pas une structure secondaire régulière et que ce polymère existe sous forme de pelotte statistique en solution, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus sur le peptide.<sup>[147],[148]</sup>

Acide Aminé i	Acide Aminé i+n	Intensité
P172-H $\alpha$	A173-NH	xx
A173-H $\alpha$	K174-NH	x
K174- H $\alpha$	T175-NH	xxx
P176- H $\alpha$	P177- H $\delta$	x
P177-H $\alpha$	A178-NH	xx
A178- H $\alpha$	P179- H $\delta$	x
P179-H $\alpha$	K180-NH	xxx
K180- H $\alpha$	T181-NH	xxx
T181- H $\alpha$	P182- H $\delta$	xx
P183-H $\alpha$	S184-NH	xxx
S184- H $\alpha$	S185-NH	xxx
S185- H $\alpha$	G186-NH	xxx
G186- H $\alpha$	E187-NH	xxx
K190- NH	P189- H $\delta$	xx
K190- H $\alpha$	S191-NH	xxx
S191- H $\alpha$	G192- NH	xxx
G192- H $\alpha$	D193- NH	xx
R194- H $\alpha$	S195- NH	xxx
S195- H $\alpha$	G196- NH	xxx
G196- H $\alpha$	Y197- NH	x
Y197- H $\alpha$	S198- NH	xx
S198- H $\alpha$	S199- NH	xxx
P200- H $\alpha$	G201- NH	xxx
G201- H $\alpha$	S202- NH	xxx
P203- H $\alpha$	G204- NH	xxx
G204- H $\alpha$	T205- NH	x
G207- H $\alpha$	S208- NH	xxx
S208- H $\alpha$	R209- NH	xxx
R209- H $\alpha$	S210- NH	xxx
S210- H $\alpha$	R211- NH	xxx
R211- H $\alpha$	T212- NH	xxx
P213- H $\alpha$	S214- NH	xxx
S214- H $\alpha$	L215- NH	xxx
T217- H $\alpha$	P218- NH	x

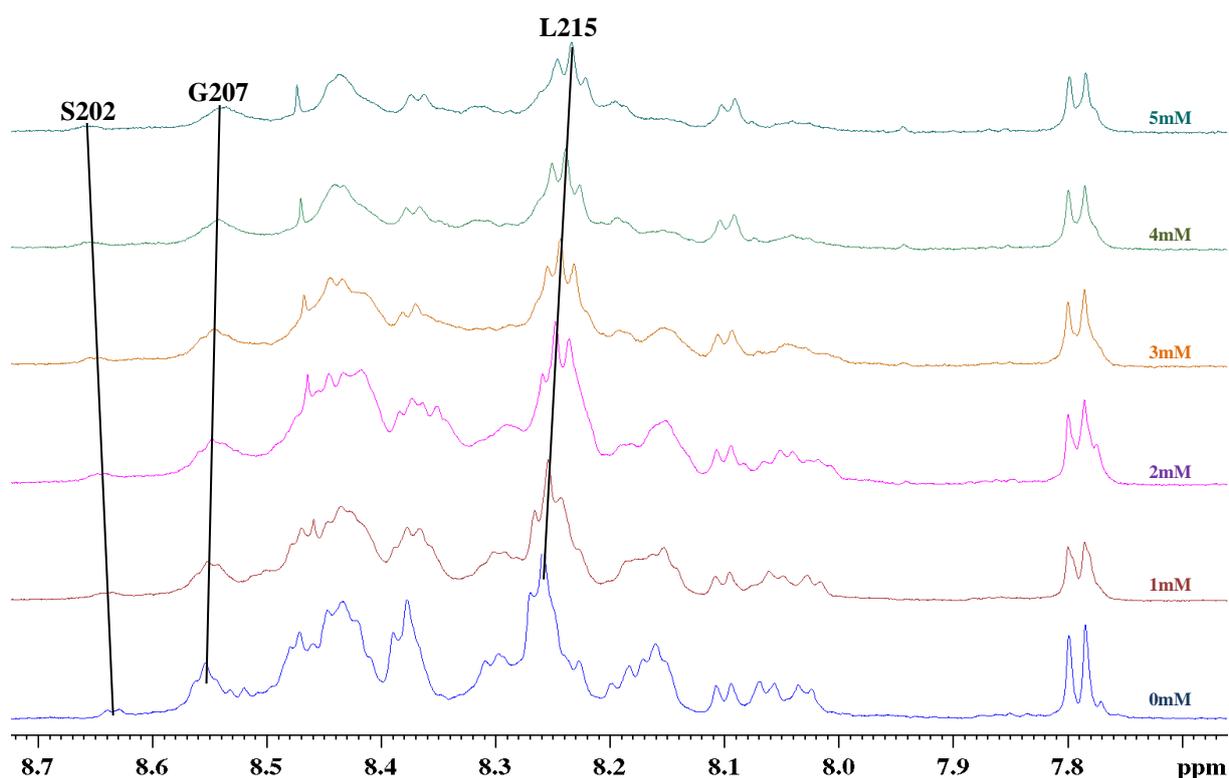
**Tableau 5** : Effets NOE classés selon leurs intensités : x = faible, xx = moyen et xxx = fort.

Une fois la caractérisation du peptide P1P2 complètement achevée, les essais d'interactions ont été conduits mais, par manque de temps, seul l'EGCG a été étudiée.

#### b) Interactions P1P2- EGCG

La titration de l'EGCG dans une solution contenant P1P2 a été suivie par RMN 1D et 2D. Pour cela, des spectres  $^1\text{H}$  et TOCSY d'une solution contenant le peptide, à une concentration de 10mM dans un mélange  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  à pH 6,2, ont été enregistrés sur un spectromètre

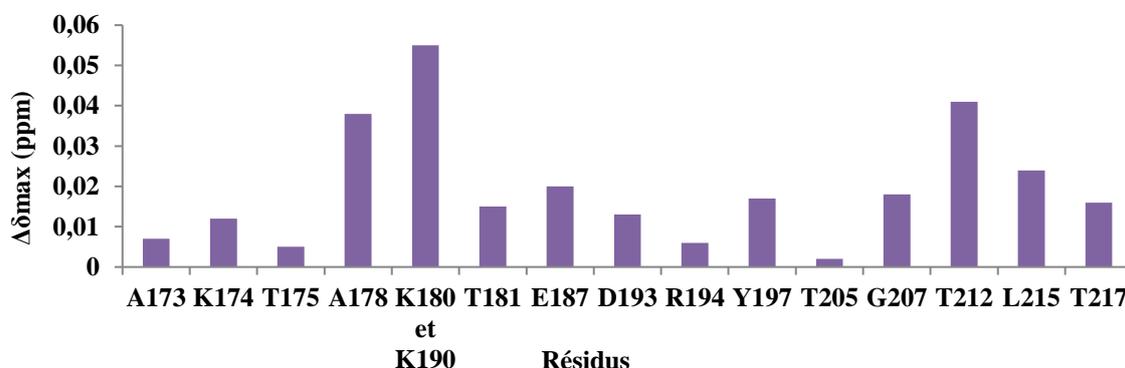
600MHz. L'ajout de l'EGCG a été fait de manière progressive (0,5mM) jusqu'à une concentration finale de 5mM de manière à ne pas dépasser la CMC de ce composé ( $CMC_{EGCG} = 6mM$ ). Le premier travail a consisté à relever toutes les variations de déplacements chimiques des résidus de manière à pouvoir définir des zones de fixation et calculer le  $K_D$ . Pour le P1 et le P2, les variations de déplacements chimiques avaient été principalement mesurées sur les spectres  $^1H$  mais dans notre cas les recouvrements entre les signaux sont bien trop importants et seules les variations de S202, G207 et L215 peuvent être définies (**Fig. 94**).



**Figure 94** : Variations de déplacements chimiques sur le spectre  $^1H$  de P1P2.

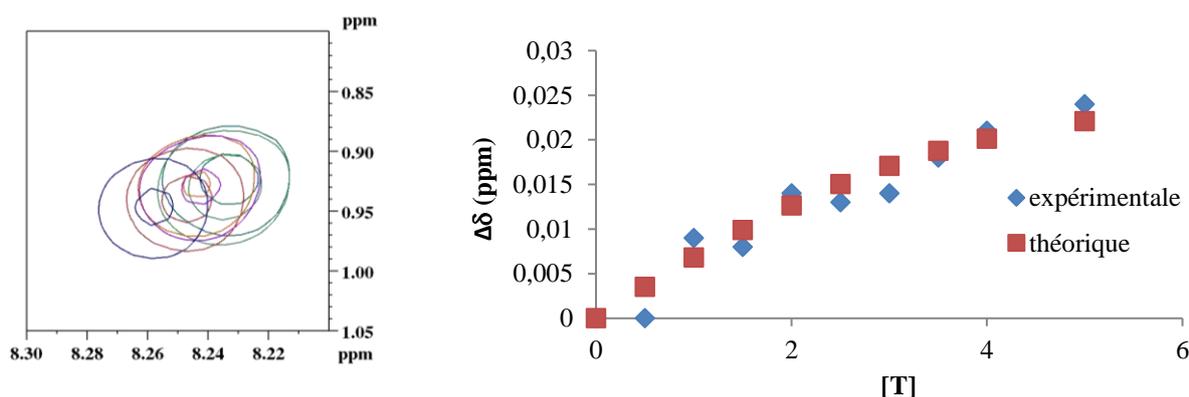
Les variations de déplacements chimiques  $\Delta\delta$  ont donc été suivies sur les TOCSY afin de s'affranchir au maximum des problèmes de recouvrements. Ces variations n'ont pas pu être établies pour l'intégralité des résidus, c'est notamment les cas des sérines et des glycines dont les  $H\alpha$  et  $H\beta$  sont superposés avec les signaux des autres résidus. Malgré cela, des zones d'interactions préférentielles ont pu être établies comme étant autour de T181 et T212 à l'aide des  $\Delta\delta_{max}$  pour l'Alanine 178 et la Thréonine 212 (**Fig. 95**). Ces résultats confirment ceux obtenus avec les peptides P1 et P2, excepté dans le cas de T205, où les variations de déplacements chimiques de la G204 ne peuvent être données à cause des recouvrements des

signaux. Il est important de noter que certains signaux disparaissent pour une certaine concentration d'EGCG ajoutée ce qui peut également traduire un phénomène d'interaction.



**Figure 95** : Variations maximales de déplacement chimiques de P1P2 en présence d'EGCG (5mM).

Après avoir relevé toutes les variations de déplacements chimiques, le  $K_D$  a été calculé afin de quantifier l'affinité entre Tau et l'EGCG. Pour cela, l'équation 1 a été traitée en utilisant le solveur d'Excel et les variations  $\Delta\delta$  de plusieurs résidus. Le but est ainsi d'obtenir une correspondance maximale entre les variations  $\Delta\delta$  expérimentales et les théoriques obtenues à partir de l'Equation 1. Dans le cas de la Leucine 215, les variations de déplacements chimiques expérimentales ont été mesurées à partir de la corrélation entre le NH et les H $\delta$  ainsi les meilleures superpositions entre résultats expérimentaux et théoriques ont été obtenus avec un  $K_D$  de 0,6mM (**Fig. 96**).



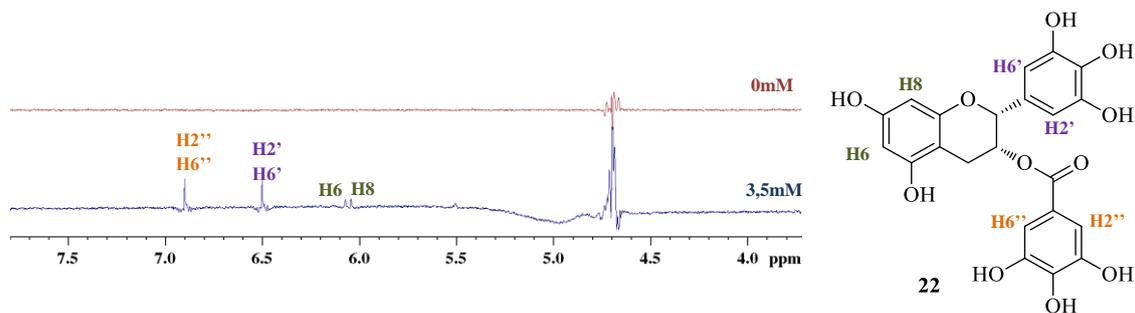
**Figure 96** : Variations maximales de déplacement chimiques (NH-H $\delta$ ) de L215 (Droite) avec 0mM EGCG (bleu), 1mM (rouge), 2mM (violet), 3mM (orange), 4mM (vert) et 5mM (bleu-vert). Variations de déplacements chimiques expérimentaux et théoriques avec  $n = 6$  et  $\Delta\delta_{\max} = 0,029$ .

De la même manière, les  $K_D$  d'autres résidus ont été calculés afin d'estimer une constante globale pour le peptide. Ainsi, avec la moyenne des résultats obtenus à partir des calculs sur A173, K174, A178, T181, E187, G207, T212, L215 et T217 un  $K_D$  pour P1P2 de 0,6mM a pu être confirmé. De plus, le peptide est capable de fixer 5 molécules d'EGCG ce qui est cohérent avec les résultats obtenus avec P1 (n = 2) et P2 (n = 3). Les valeurs calculées sont cohérentes avec celles trouvées à partir des spectres DOSY ( $K_D = 0,54mM$ ) ce qui permet de valider la quantification de l'affinité P1P2-EGCG autour de 0,5mM.<sup>[190]</sup> Ces données ont ensuite été comparées avec celles calculées pour les peptides P1 et P2 laissant paraître une augmentation de l'affinité pour P1P2 ainsi qu'une augmentation du nombre de sites de fixation (**Tab. 6**).

	$K_D$ (mM)	n
P1	1,1±0,1	2,1±0,3
P2	0,9±0,2	3,1±0,2
P1P2	0,6±0,4	5,3±0,7

**Tableau 6** : Constantes de dissociation et nombre de sites de fixation entre l'EGCG et les différents peptides.

Un lien entre augmentation de la longueur du peptide et diminution de la constante de dissociation est constaté. Cette hausse d'affinité peut s'expliquer par l'augmentation du nombre de sites de liaisons favorisant les interactions et peut nous laisser imaginer qu'en travaillant sur la protéine intégrale cette valeur peut encore être améliorée. De plus, il est intéressant de noter que les sites préférentiels d'interaction sont localisés autour des thréonines 181 et 212 qui sont des sites phosphorylés caractéristiques de la MA. Enfin, pour la nature des interactions mises en jeu entre l'EGCG et P1P2 des RMN-STD ont été enregistrées (**Fig. 97**). Cette technique est utilisée depuis plusieurs années pour caractériser les liaisons intramoléculaires d'un complexe et permet de mettre en évidence les zones où se lie la protéine au ligand.<sup>[149]</sup> Afin de s'assurer de la spécificité des sites de liaison des tests avaient été réalisés avec le peptide et l'EGCG seuls et après irradiation la disparition des signaux des molécules est constatée. Après cette vérification, les spectres ont été enregistrés sur le mélange P1P2-EGCG et seuls les signaux correspondant au H2'', H6'', H6', H2', H6 et H8 sont observables. De plus, il semble intéressant de spécifier que les pics des protons H6 et H8 sont moins intenses que les autres traduisant une saturation plus faible et donc un engagement dans la liaison moins important du cycle A.



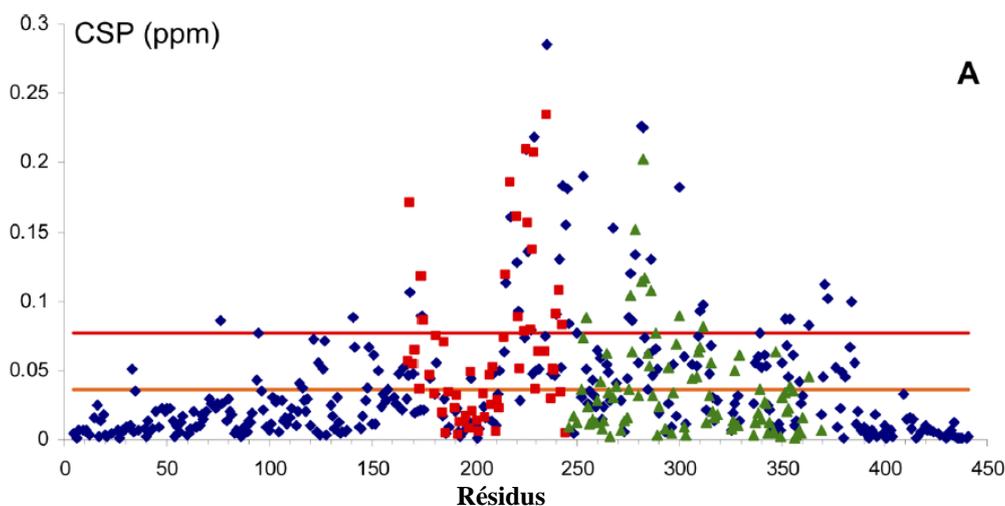
**Figure 97** : Spectres obtenus par RMN-STD d'un mélange P1P2 (0,5mM)-EGCG (3,5mM) dans H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O à pH = 6,2 et sites de liaison.

Afin de confirmer la spécificité de l'interaction entre l'EGCG et le peptide, une expérience STD avait également été réalisée en présence de 1mM de glucose conduisant à une disparition des signaux de ce composé. Ainsi, ces données permettent de conclure que ces interactions sont localisées au niveau des hydroxyles phénoliques traduisant la formation de liaisons hydrogène. L'EGCG serait non seulement un donneur de liaison hydrogène mais également un accepteur puisque les signaux les plus intenses sont ceux correspondant aux protons du groupement gallate. Ces données confirment ainsi les résultats issus de la dynamique moléculaire obtenus avec P1 et P2. Enfin avec les études de variations de déplacements chimiques réalisées sur le peptide on peut supposer que ces liaisons s'établissent avec les hydroxyles des sérines et des thréonines ou/et avec l'amine primaire de la lysine 180.

Ces résultats permettent ainsi d'obtenir des données au niveau moléculaire sur l'interaction entre les polyphénols et la RRP de Tau donnant des arguments en faveur d'une activité de type inhibiteur potentiel de l'hyperphosphorylation de Tau. La meilleure affinité obtenue sur le fragment plus long de RRP est prometteuse et nous conforte dans l'idée de faire ces tests d'interactions avec la protéine Tau entière. Ces données permettront non seulement de vérifier que les valeurs de  $K_D$  sont améliorées mais également de valider l'utilisation de nos modèles pour la suite de l'étude.

### 3) Interactions Polyphénols et Tau intégrale

L'information quantitative montrant l'affinité entre un composé et une protéine entière est plus complexe mais la RMN s'avère être l'outil le plus puissant à utiliser pour calculer des constantes de dissociation pour des interactions faibles.<sup>[150]</sup> Depuis quelques années, l'équipe d'Isabelle Landrieu s'est spécialisée dans l'étude des interactions de différents composés tel que l'héparine ou encore l'ADN avec la protéine Tau.<sup>[151],[152]</sup> Ces travaux ont permis de mettre en évidence des sites d'interactions préférentiels pour ces composés dans le domaine de liaisons aux microtubules, comme dans le domaine de répétition R2, mais également dans la RRP. De plus, des valeurs de constantes de dissociations de l'ordre du  $\mu\text{M}$  ont été calculées pour ces zones d'interactions. Les études réalisées dans le cas de l'ADN nous ont particulièrement intéressé puisque des essais ont été faits sur la protéine entière et sur des fragments de manière à confirmer les résidus mises en jeu. Pour cela, des titrations avec des concentrations croissantes en oligonucléotide (22 paires de bases) ont été ajoutés à une solution de Tau et, en étudiant les variations de déplacements chimiques de chaque résidu, une carte des sites d'interactions a été établie (**Fig. 98**).



**Figure 98** : Carte des sites d'interactions de l'oligonucléotide (2 équivalents) avec Tau (bleu) et avec les fragments [165-245] (rouge) et [344-372] vert. Le trait orange correspond à la moyenne des  $\Delta\delta_{\text{max}}$  et le rouge à cette moyenne plus une déviation standard.

Dans ce cas, les variations de déplacements chimiques sont mesurées sur des spectres HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  en prenant en compte les variations de déplacements chimiques des protons et de l'azote. Pour cela les CSP (chemical shift perturbations) sont calculées à partir de l'équation suivante :

$$\text{Equation 2 : } \text{CSP} = [(\delta^1\text{H}_{\text{lié}} - \delta^1\text{H}_{\text{libre}})^2 + 0,2(\delta^1\text{N}_{\text{lié}} - \delta^1\text{N}_{\text{libre}})^2]^{1/2}$$

Ainsi, il a été confirmé que les fragments et la protéine interagissent de la même manière avec l'oligonucléotide. Des  $K_D$  ont ensuite été calculés en utilisant les variations de CSP au cours d'une expérience de titration sur plusieurs résidus afin de faire une moyenne sur la RRP et le domaine de liaison. Comme dans le cas de P1P2 les calculs sont réalisés de manière à avoir une corrélation maximale entre valeurs théoriques et expérimentales en utilisant une équation ne prenant pas en compte le nombre de sites de fixations (**Eq. 3**).

$$\text{Equation 3 : } (\text{CSP})_{\text{max}} \times [\text{Ligand}] / (K_D + [\text{Ligand}])$$

Dans le cas de la RRP de Tau un  $K_D$  de  $10,5 \pm 2,4 \mu\text{M}$  a été obtenu pour une valeur de  $19,2 \pm 0,8 \mu\text{M}$  dans le cas du fragment [165-245].<sup>[152]</sup> Ce résultat montre qu'au niveau quantitatif l'interaction entre l'oligonucléotide avec Tau et le fragment est assez similaire.

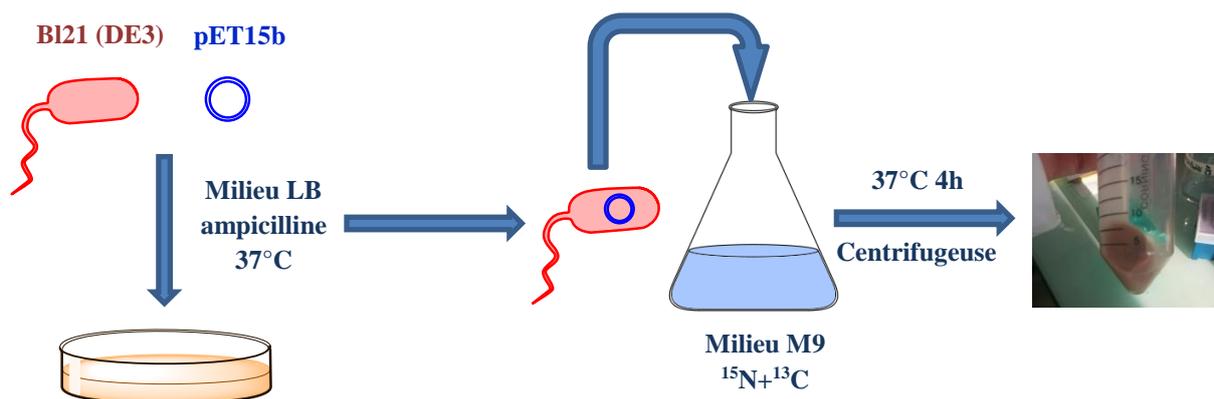
Intéressés par le savoir-faire du laboratoire de RMN dirigé par Isabelle Landrieu, nous avons souhaité collaborer avec le Dr Landrieu afin de pouvoir étudier l'affinité de Tau pour les polyphénols de la même manière que pour l'oligonucléotide.

La stratégie de l'équipe d'Isabelle Landrieu repose sur l'étude des variations de déplacement chimiques mesurées sur des TOCSY  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ . L'azote 15 possède un spin nucléaire I de  $\frac{1}{2}$  alors, que dans le cas de l'azote 14, I est supérieur à  $\frac{1}{2}$  et possède de ce fait un moment quadripolaire nécessitant des conditions plus spécifiques d'analyses. De plus, l'étude des noyaux par RQN (Résonance Quadripolaire Nucléaire) ne se fait qu'en solide ce qui implique le choix d'étudier l'azote 15 avec la RMN du liquide. Or, l'isotope 14 est bien plus abondant que l'isotope 15 (99,6% contre 0,364%) ce qui a un impact direct sur l'analyse, notamment sur la durée de l'acquisition mais aussi sur la qualité spectrale. Pour faciliter le travail il a donc été nécessaire de préparer la protéine Tau marquée au  $^{15}\text{N}$  dans un premier temps.

#### a) Biosynthèse de la protéine Tau marquée à l'azote 15

Depuis 20 ans les connaissances et les techniques nécessaires à la production de protéines recombinantes ont été largement développées.<sup>[153]</sup> Dans un premier temps, il faut choisir une cellule hôte qui peut être soit une bactérie, une levure, soit des cellules d'insectes, de plantes ou de mammifères.<sup>[154]</sup> Dans le cas de la biosynthèse de Tau le choix s'est porté sur une bactérie, *Escherichia coli*, présentant de nombreux avantages tels que : un faible coût, une

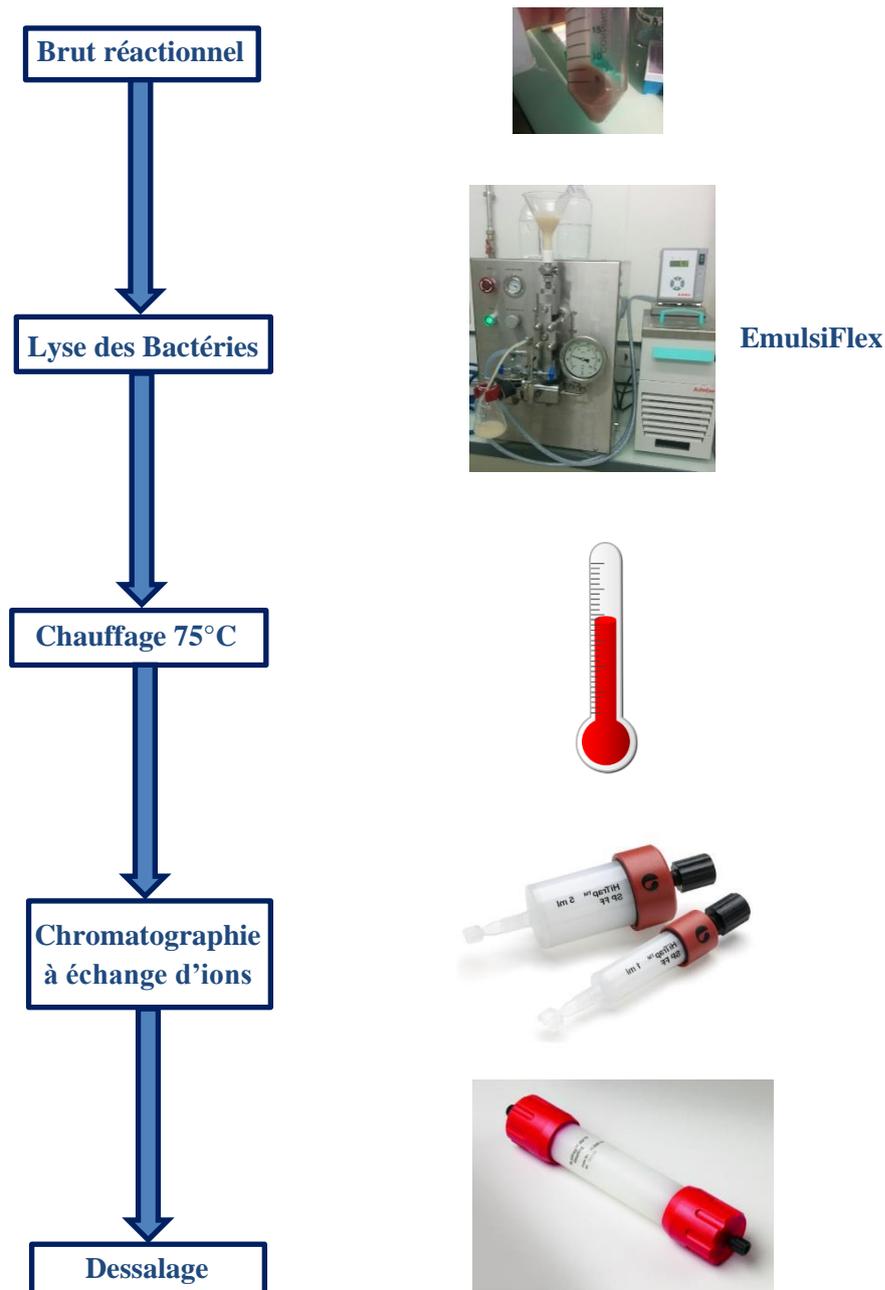
manipulation facile et permettant une biosynthèse rapide. Dans le cas de l'expression protéique, *E. Coli* doit être compétente afin de pouvoir incorporer l'ADN c'est pour cela que c'est une souche spécifique qui est utilisée, la B121 (DE3). La première étape consiste en l'incorporation d'un vecteur plasmidique contenant le gène codant pour Tau qui est ici le vecteur pET15b. Ce vecteur contient également un marqueur antibiotique résistant à l'ampicilline ce qui permet une sélection des bactéries portant le plasmide recombinant. Ainsi, les bactéries ont été transformées à 37°C, dans un milieu de culture LB, contenant de l'ampicilline. Une fois la transfection réalisée, les bactéries ont été placées dans 1L d'un milieu M9 enrichi en  $^{15}\text{N}$  (1g de  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  et  $^{15}\text{N}$ ]ISOGRO) et en  $^{13}\text{C}$  (2g de  $^{13}\text{C}$ glucose). Un cocktail de vitamine MEM était également présent dans le milieu réactionnel afin de préserver la viabilité des bactéries. L'expression de la protéine a ensuite été amorcée par l'ajout d'IPTG (IsoPropyl  $\beta$ -D-1-ThioGalactopyranoside) et le milieu a été placé à 37°C pendant 4h puis centrifugé (**Fig. 99**).



**Figure 99** : Préparation de Tau enrichie en  $^{15}\text{N}$  et  $^{13}\text{C}$ .

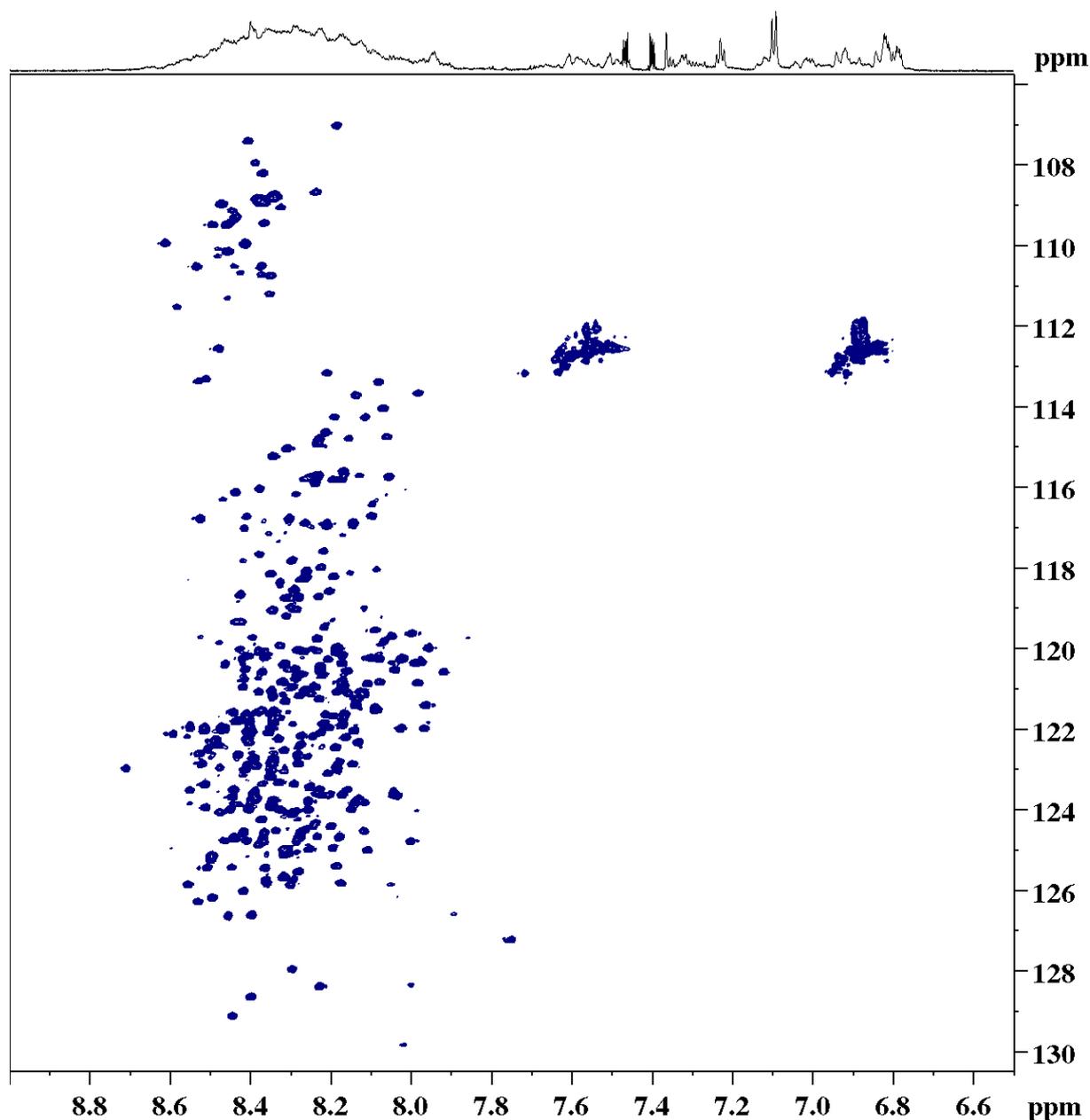
Afin d'obtenir la protéine analysable en RMN, des étapes de purification ont dû être effectuées. Tout d'abord, les protéines présentes dans *E. Coli* doivent être extraites et pour cela une lyse des bactéries a été réalisée en utilisant un « EmulsiFlex » dont le principe est basé sur la presse de French. Pour cela, le milieu bactérien a été replit dans 30mL de tampon phosphate 50mM (pH = 6,6) contenant de l'EDTA ainsi qu'un cocktail d'inhibiteurs de protéases ce qui permet d'éviter une dégradation de Tau. Le mélange a ensuite été passé dans « l'EmulsiFlex », à une pression entre 10000 et 15000pSi, et à une température de 4°C, pour ensuite être centrifugé 20mn à 10°C. Afin de séparer les différentes protéines présentes dans le milieu, une première purification par chauffage du surnageant à 75°C a été effectuée, la protéine Tau étant thermostable et non structurée elle ne précipite pas et se retrouve donc en

phase liquide. Le mélange a ensuite été centrifugé et le surnageant a été récupéré. Afin de séparer Tau des protéines résiduelles une purification sur colonne échangeuse de cations a été faite sur une colonne HiTrap SP FF conduisant à l'obtention de Tau pure (vérification par électrophorèse). Enfin, une étape de dessalage a été effectuée sur colonne d'exclusion stérique HiPrep 26/10 avec comme éluant un tampon de bicarbonate d'ammonium  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . La solution a par la suite été congelée puis lyophilisée afin d'obtenir Tau marquée à  $^{15}\text{N}$  et  $^{13}\text{C}$  (Fig. 100).



**Figure 100** : Purification de Tau.

Après l'étape de lyophilisation, le composé a été analysée en RMN afin de s'assurer que la biosynthèse et la purification conduisent bien à la protéine Tau pure. Ainsi, la protéine a été dissoute dans un tampon phosphate 50mM à pH = 6,6 contenant 30mM de NaCl, 2,5mM d'EDTA et 1mM de DTT dans de l'eau et une référence interne, le TMSP-d4, ainsi que 20% de D<sub>2</sub>O ont été ajoutés. Ainsi, une expérience HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N de la solution a été enregistrée sur un spectromètre 900MHz Avance III à 293K (**Fig. 101**).



**Figure 101** : HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N de la protéine Tau.

D'après la RMN 2D nous avons pu constater que la biosynthèse et la purification ont bien conduit à la protéine Tau souhaitée. La caractérisation partielle de Tau a été réalisée par

l'équipe d'Isabelle Landrieu et par l'équipe de Markus Zwecksetter.<sup>[147],[155],[156]</sup> Comme nous pouvons le voir sur la **Figure 101**, la dispersion des protons est très faible (<1ppm) ce qui traduit la nature non structurée de la protéine mais également une difficulté dans l'attribution des résonnances. En effet, les stratégies classiques utilisant la RMN triple résonance conduisant à l'attribution des protéines n'ayant pas fonctionné, d'autres stratégies ont dû être développées afin de couvrir le maximum de la séquence. A ce jour, plus de 98% de l'assignement a été effectué sur le squelette protéique en ne comptant pas les prolines.<sup>[156]</sup> Avec ces caractérisations décrites dans la littérature, il a été possible de réaliser des tests d'interactions sur la protéine Tau intégrale.

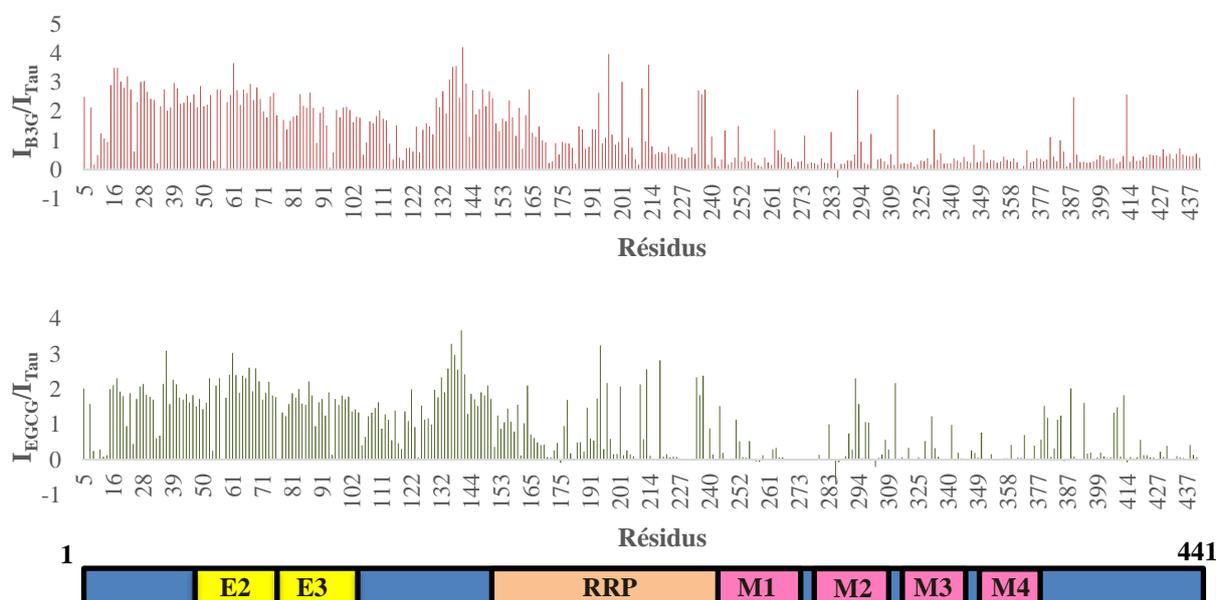
#### b) Tests d'interactions

Les tests d'interactions avec la protéine Tau intégrale ont été effectués en présence d'EGCG et de B3G. Le choix de ces composés s'est fait par rapport aux affinités obtenus précédemment avec les peptides modèles. En effet, comme nous l'avons vu dans la partie interactions avec P1P2 et dans la partie bibliographie, la présence d'un groupement galloyle et le degré d'oligomérisation sont les facteurs influençant l'affinité peptide/polyphénols. Comme dans le cas des peptides, une titration suivie par RMN a été effectuée en ajoutant une concentration croissante de polyphénols dans une solution contenant Tau (tampon similaire que celui utilisé pour la caractérisation). Ainsi, 5 acquisitions ont été réalisées avec 1 à 10 équivalents d'EGCG et avec 2 à 10 équivalents de B3G. Afin de définir l'affinité de manière qualitative il a été nécessaire d'étudier chaque spectres HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N superposé avec celui de la protéine Tau seule, ce qui permet dans un premier temps de définir les zones d'interactions.

- Zones d'interactions.

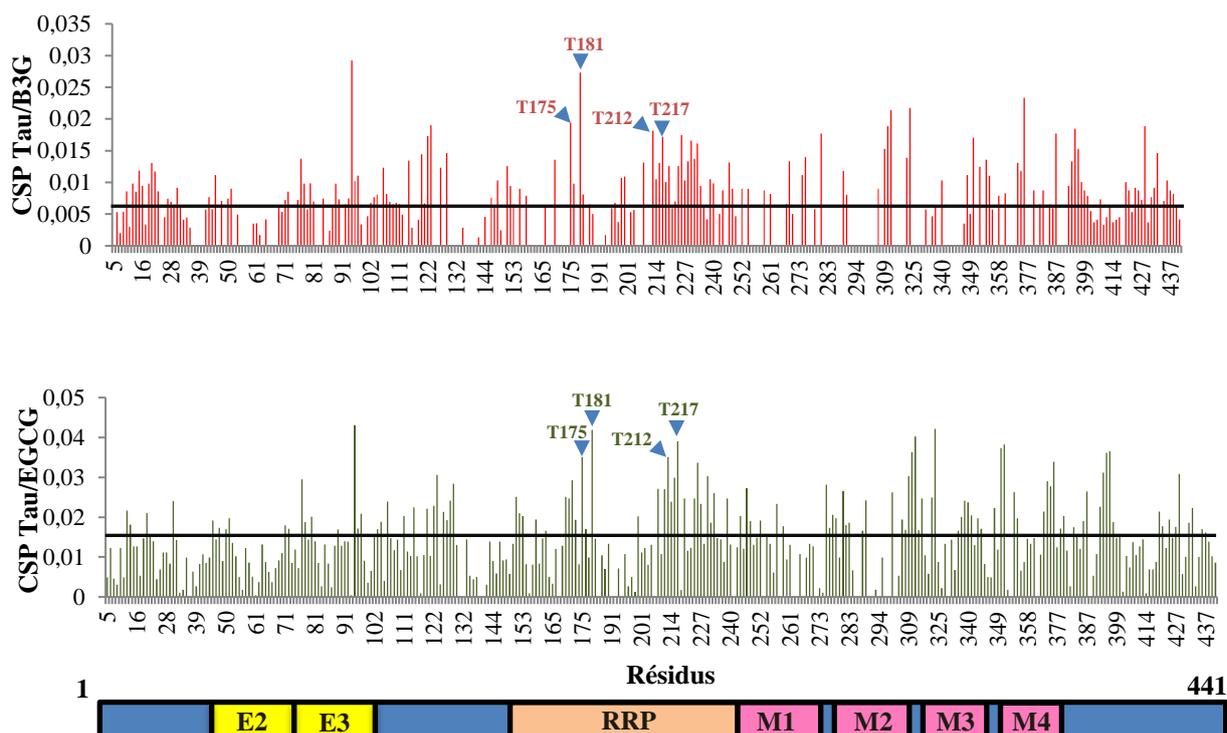
Dans un premier temps, il a été constaté que l'ajout de polyphénols sur Tau n'induisait pas de variations de déplacements chimiques très importantes permettant de montrer que cet ajout n'induit pas de changement conformationnel de la protéine (**Annexe 5**). En général, l'interaction entre un ligand et une protéine se traduit en RMN par une perturbation de l'intensité et/ou une variation des déplacements chimiques, induits par un changement d'environnement des noyaux observés.<sup>[152]</sup> Dans le cas de la protéine Tau et des polyphénols d'importantes variations d'intensités sont observées alors que les variations de déplacements chimiques sont relativement faibles. En effet, l'intensité de certains résidus est très faible dès lors que 3 équivalents d'EGCG et 7,5 équivalents de B3G sont ajoutés dans la solution. Afin

de traiter ces données, les intensités de chaque résidu ont été répertoriées dans un fichier Excel pour chaque équivalent de polyphénols ajoutés. Ces valeurs ont été comparées avec celles des résidus de Tau sans polyphénol en faisant un rapport d'intensités ( $I_{\text{Tau+Polyphénols}}/I_{\text{Tau}}$ ) et les résultats obtenus ont été répertoriés sous forme d'histogrammes (**Fig. 102**).



**Figure 102** : Profils de variations d'intensités des résidus de Tau en présence de B3G (rouge, 7,5  $\mu\text{M}$ ) et d'EGCG (vert, 3  $\mu\text{M}$ ).

De fortes diminutions d'intensités des résonances ont été observés dans la région riche en prolines et dans le domaine de liaison aux microtubules tandis que dans le domaine N-terminal les pics de corrélations restent très intenses. Ce profil traduit des interactions préférentielles de l'EGCG et du B3G pour la RRP et pour le domaine de liaison. Toutefois il est important de noter que ces interactions ne sont pas d'une grande spécificité puisqu'un nombre important de résidus est affecté traduisant ainsi des sites de liaisons multiples. Afin d'avoir une idée plus précise des résidus affectés, le même type d'histogramme a été réalisé en prenant en compte les CSP de la protéine (**Fig. 103**). Les CSP ont été calculées à l'aide de l'équation 2 de manière à prendre en compte les variations de déplacement chimique de l'azote et de l'hydrogène de la liaison peptidique. De plus, ces CSP ont été évaluées pour un rapport d'intensité de signal entre Tau avec et sans polyphénols d'environ égale à 1 de manière à pouvoir faire une estimation sur le maximum de résidus ( $I_{\text{Tau+Polyphénols}}/I_{\text{Tau}} \approx 1$ ) et de manière à être sûr que les signaux très faibles ne correspondent pas à du bruit de fond.



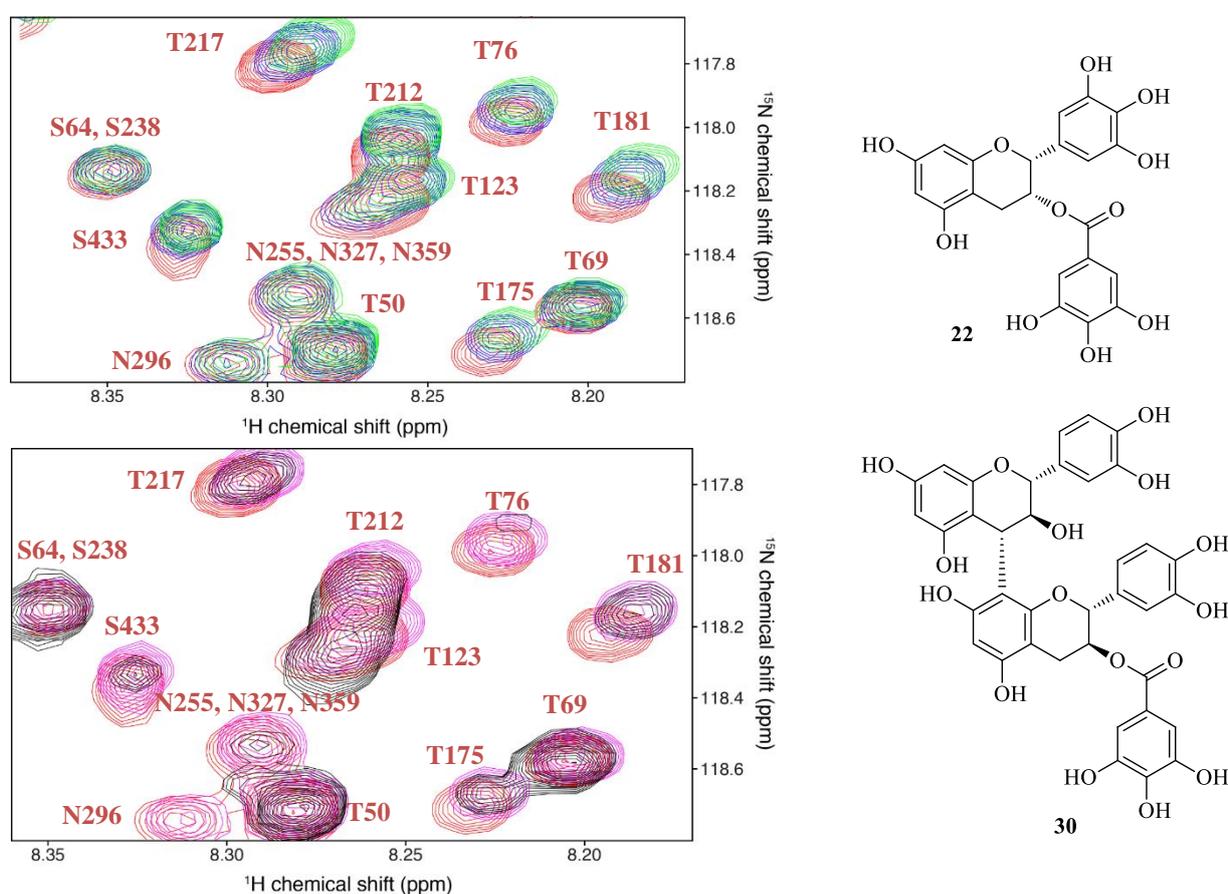
**Figure 103** : Profils des CSP des résidus de Tau en présence de 5éq. De B3G (rouge) et de 2,5 éq. d'EGCG (vert). Le trait noir correspond à la moyenne des CSP.

L'étude des variations des CSP montre également que les sites d'interactions sont préférentiellement localisés dans la RRP et dans le domaine de liaison, confirmant ainsi les résultats obtenus avec l'étude des variations d'intensités. Dans le cadre de notre projet, nous nous sommes intéressés aux résidus de la RRP de manière à corréliser les résultats obtenus avec les peptides. Tout d'abord, il semblerait que les polyphénols se fixent préférentiellement au niveau des fragments correspondants aux peptides P1 ( $^{171}\text{I-K}^{190}$ ) et P2 ( $^{201}\text{G-T}^{220}$ ). De plus les résidus principalement affectés dans ces zones correspondent aux Thréonines 175, 181, 212 et 217 ce qui est cohérent avec les résultats précédemment obtenus sur les peptides modèles. A ce stade il est important de rappeler que ces sites sont hyperphosphorylés dans le cas de MA et donc qu'une interaction entre ces résidus et les polyphénols pourrait empêcher l'approche des kinases.<sup>[3]</sup> Afin d'avoir une idée quantitative de l'affinité Tau-Polyphénols des calculs de constante de dissociation ont été effectués.

- Constantes de dissociation

Afin de valider l'utilisation de nos peptides modèles et de vérifier si travailler avec la protéine entière a un impact sur l'affinité entre Tau/polyphénols il a été nécessaire de tirer une information quantitative des spectres HSQC  $^1\text{H-}^{15}\text{N}$ . Dans le cadre de l'étude, seule une

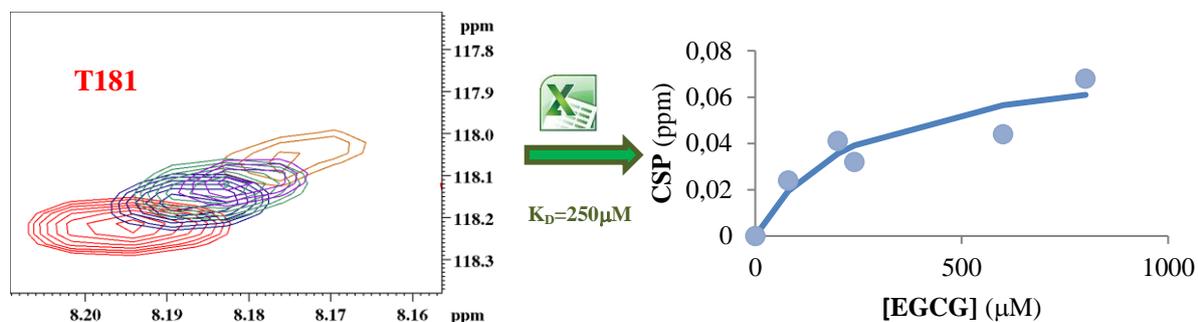
estimation pour la RRP a été effectuée. Dans un premier temps, le comportement de certaines thréonines, qui semblent avoir des variations de déplacement chimiques plus importantes que les autres résidus, ont été étudiées en fonction de l'ajout croissant en EGCG ou en B3G dans la solution contenant Tau. Dans le cas de l'EGCG, l'ajout semble avoir un effet plus important sur les CSP entre 1 et 2,5 équivalents alors qu'avec le B3G les effets commencent à être notables à partir de 5 équivalents. (**Fig. 104**). Cette information pourrait révéler une affinité légèrement meilleure avec l'EGCG ce qui serait cohérent avec les données obtenues pour le peptide P2, toutefois cette information est à prendre avec précaution.



**Figure 104** : HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  représentant les CSP de certaines thréonines en présence d'EGCG **22** (haut) avec en bleu 1,2 éq. et en vert 2,5 éq. puis de B3G **30** (bas) avec en violet 5 éq. puis en noir 10éq. Le spectre HSQC de Tau sans polyphénol est représenté en rouge.

A partir de ces variations de déplacements chimiques et de l'équation 3 il a été envisagé de calculer les  $K_D$ . Toutefois, les variations de déplacements chimiques sont relativement faibles et la saturation n'est pas optimale, ce qui peut venir des importantes chutes des intensités dans le cas de certains résidus. Dans le cas de l'EGCG, deux résidus permettent une titration

correcte, la thréonine 181 et la glycine 201. En effet, lorsque l'on trace la courbe obtenue avec l'équation 3, la saturation est obtenue pour des  $K_D$  respectifs de 205 et 400  $\mu\text{M}$  pour la T181 et la G201 (**Fig. 105**). Dans le cas du B3G, les courbes de lissage obtenues sont moins saturées, mais un  $K_D$  du même ordre de grandeur que celui obtenu avec l'EGCG a été estimé à partir des variations de déplacements chimiques de la T217 et de la G201.

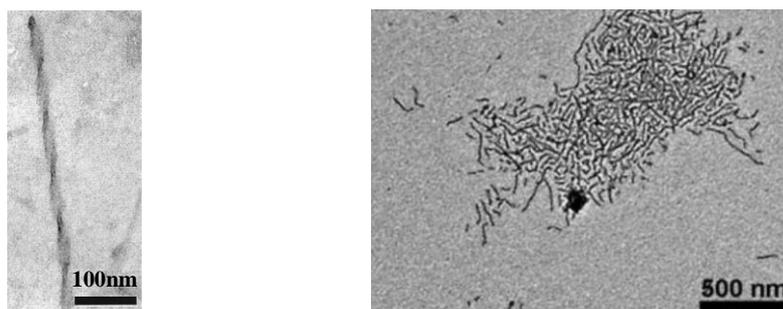


**Figure 105** : Détermination de  $K_D$  de la T181 avec à gauche les variations de déplacements chimiques lors de l'ajout d'EGCG de la T181 (rouge 0 éq., bleu 1,2 éq., vert 2,5 éq., violet 7,5 éq. et orange 10éq.) et à droite la courbe de lissage obtenue avec l'équation 3.

Bien que ces données ne nous permettent pas d'obtenir des valeurs précises des constantes de dissociation entre la RRP de Tau et les polyphénols elles permettent toutefois d'estimer son ordre de grandeur autour d'un mM. Cette information est très intéressante dans la mesure où elle est en parfaite adéquation avec les résultats obtenus avec nos peptides dont les  $K_D$  pour l'EGCG et le B3G se situent entre 0,6 et 1,2mM. De plus, les sites de fixation des polyphénols sur Tau semblent être les mêmes que pour les peptides, notamment au niveau de la T181 et de la T217, positions connues pour être des sites de phosphorylations caractéristiques de la MA. Cet ensemble de données RMN a permis d'observer que le passage du peptide à la protéine n'améliore par l'affinité, contrairement à ce que l'on aurait pu imaginer, mais il permet de valider l'utilisation de nos modèles pour le reste de l'étude. Sachant que les kinases ont une affinité pour les protéines riches en prolines du même ordre de grandeur on peut être amené à se demander si une compétition entre ces kinases et les polyphénols ne pourrait pas conduire à une diminution voir à une complète inhibition du processus d'hyperphosphorylation. C'est dans cette optique que l'équipe a décidé de s'intéresser au processus de phosphorylation des peptides modèles ainsi qu'à sa potentielle inhibition par les polyphénols.

### III. Etudes de la phosphorylation des peptides modèles par Spectrométrie de Masse

Une des lésions majeures de la MA est la formation de Dégénérescences NeuroFibrillaires (DNF) au sein des neurones. Ces DNF sont principalement composées de filaments de protéine Tau phosphorylée et causent des troubles neuronaux majeurs menant à terme à la démence (**Fig. 106**).<sup>[157],[158]</sup>



**Figure 106** : Microscopie de Tau sous forme de PHF (gauche) et sous forme de DNF (droite) obtenue par microscopie électronique à transmission.

Dans la partie bibliographique les différentes conséquences de la phosphorylation de certains sites ont été discutées notamment sur la déstabilisation des microtubules. De plus, il a été montré que les biomolécules à l'origine de cette modification structurale sont les kinases et les phosphatases. En effet, un déséquilibre entre l'activité des kinases et des phosphatases conduit à l'hyperphosphorylation de la protéine Tau et donc à la baisse d'affinité Tau/microtubules. Malgré de nombreuses études, il est à ce jour compliqué de confirmer si l'hyperphosphorylation est régie par une augmentation de l'activité des kinases ou par une diminution d'activité des phosphatases. Toutefois, des études montrent que certaines enzymes, telle que la GSK3, sont retrouvées de manière abondante dans le cerveau et qu'elles peuvent induire, *in vitro*, la formation de filaments.<sup>[58],[158]</sup> Ce sont pour ces raisons que l'équipe a décidé de travailler uniquement, dans un premier temps, avec les kinases pour les tests d'inhibition de la phosphorylation. Enfin, il a été montré que les phosphorylations de certains sites de la RRP induisent des changements conformationnels majeurs de Tau (S202, T205, S214 et T231) favorisant le détachement des microtubules ainsi que l'apparition de nouveaux sites phosphorylés dans différentes régions de la protéine. Or ces sites, à l'exception de la T231, sont présents dans les peptides modèles ayant été utilisés pour les tests d'interactions précédemment décrits et ont été identifiés comme formant des liaisons

hydrogène avec les polyphénols. Forts de ces données issues des expériences RMN et de la bibliographie il a été envisagé de mettre au point la phosphorylation des peptides modèles et de voir si l'interaction polyphénol/peptide permet de l'inhiber. La première étape de ce travail a été le choix de l'enzyme car, comme nous l'avons vu dans la partie bibliographie, plusieurs kinases phosphorylent Tau et il est important de choisir les enzymes les plus adaptées dans le cas des modèles.

### 1) Choix de l'enzyme

Afin de choisir les enzymes pour ces essais plusieurs critères ont été pris en compte tel que le nombre et l'emplacement des sites phosphorylés dans la séquence par ces kinases dans le cas de la protéine Tau entière. Dans la partie bibliographie il a été discuté du nombre de sites phosphorylés par les différentes kinases dont les résultats sont répertoriés dans le tableau suivant (**Tab. 7**).

<b>Kinases</b>	GSK3	P38	CDK5	CK	PKA
<b>Sites</b>	29	15	11	25	17

**Tableau 7** : Nombre de sites phosphorylés dans le cas de la MA par les différentes kinases.

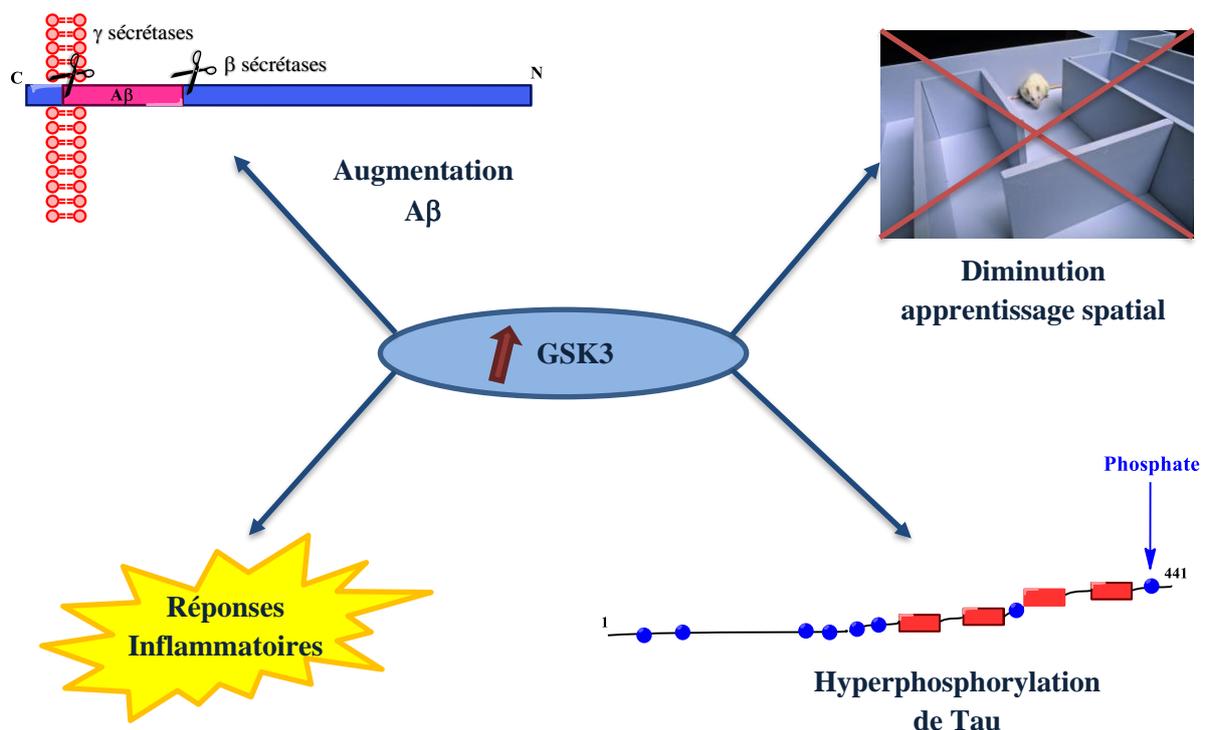
D'après ces données, la Glycogène Synthase Kinase 3 (GSK3) et la Caséine Kinase (CK) sont des cibles intéressantes puisqu'elles semblent être relativement impliquées dans l'état de phosphorylation de Tau. Toutefois, ce critère n'est pas suffisant pour la sélection de l'enzyme car les essais ont été effectués sur des régions spécifiques de la protéine impliquant de prendre en compte les sites phosphorylés par les différentes enzymes. Ainsi, à l'aide d'une recherche bibliographique, les sites phosphorylés par les différentes kinases dans la région dont est issu le peptide P1P2 ont été localisés (**Fig. 107**).<sup>[159]</sup>



**Figure 107** : Sites de phosphorylation des différentes kinases dans le domaine P1P2.

Comme on peut le constater, la kinase phosphorylant le plus de sites appartenant à ce fragment de Tau est la GSK3. De plus, cette enzyme, ainsi que la p38, phosphorylent plusieurs sites du fragment P1 (I<sup>171</sup>-K<sup>190</sup>) ce qui n'est pas le cas des autres kinases annonçant donc des résultats peu probants sur les essais de phosphorylation de ce peptide avec CDK5, CK et PKA. Il est également important de rappeler que la GSK3 et la p38 sont des enzymes dirigées par les prolines. Or, les fragments P1, P2 et P1P2 sont riches en prolines il a donc semblé judicieux de privilégier la GSK3 ou la p38 pour la mise au point de la réaction de phosphorylation.

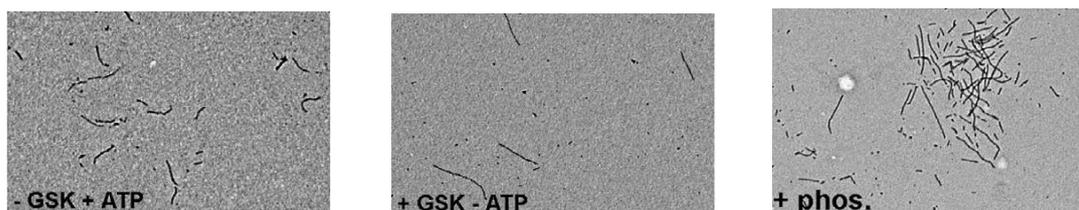
De nombreuses études dans la littérature lient la GSK3 et la MA. En effet, cette kinase est non seulement impliquée dans l'hyperphosphorylation de Tau mais également dans l'augmentation de la production de peptides A $\beta$ , dans des réponses inflammatoires et dans la démence. Il a été montré qu'une surexpression de cette enzyme induit également une diminution de l'apprentissage spatial chez les souris (**Fig. 108**).<sup>[58]</sup>



**Figure 108** : Conséquences de la suractivité de GSK3.

A ce jour, l'inhibition de la GSK3 est au cœur de multiples recherches mais il ne faut pas oublier que cette kinase existe sous 2 isoformes et il est donc important de savoir lequel de ces isoformes doit être ciblé. Les GSK3 $\alpha$  et  $\beta$  possèdent des sites actifs très proches au niveau

structural et il n'existerait pas encore d'inhibiteurs capable de bloquer sélectivement une forme.<sup>[57]</sup> Toutefois quelques différences existent entre les isoformes, en particulier leurs localisations dans le cerveau. En effet, la GSK3 $\alpha$  est principalement exprimée dans l'hippocampe, dans le cortex cérébral et le striatum alors que l'expression de l'isoforme  $\beta$  est observée dans toutes les zones du cerveau.<sup>[160]</sup> Toutefois, de récentes études montrent que ces 2 kinases ont des rôles distincts dans la MA et que l'isoforme  $\alpha$ , peu étudié auparavant, peut également être une cible intéressante. En effet, l'étude de Phiel en 2003 a révélé qu'une diminution de l'activité de la GSK3 $\alpha$  entraîne une chute d'environ 40% de la production en peptides amyloïdes alors que lorsque l'on agit sur la GSK3 $\beta$  une légère hausse est observée. Ce phénomène montre qu'une suractivité de l'isoforme  $\alpha$  peut accroître la production en peptides A $\beta$  et ainsi favoriser leur agrégation sous forme de plaques amyloïdes.<sup>[161]</sup> Dans le cas des lésions pathologiques liées à la protéine Tau c'est l'isoforme  $\beta$  qui est majoritairement étudié depuis plusieurs années. Non seulement la GSK3 $\beta$  est fortement exprimée dans les tissus neuronaux mais elle est également décrite comme étant la meilleure enzyme pour générer, *in vitro*, la protéine Tau hyperphosphorylée caractéristique des PHF.<sup>[162],[163]</sup> En 2007, Hanger *et coll.* ont répertorié, *via* la spectrométrie de masse, 28 sites de phosphorylation *in vitro* et 27 de ces sites phosphorylés *in vivo*.<sup>[40]</sup> Des essais *in vitro* révèlent également que l'utilisation de cette kinase suffit à induire des changements de conformation de Tau conduisant à la formation de filaments après phosphorylation ainsi qu'à la déstabilisation des microtubules (**Fig. 109**).<sup>[158]</sup>



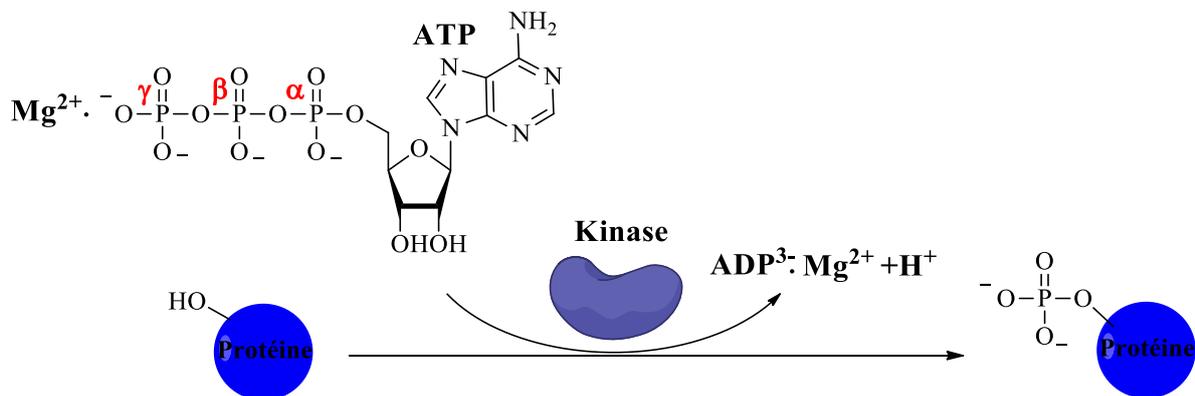
**Figure 109** : Microscopies de Tau : en présence d'ATP (droite), en présence de GSK3 (milieu) et en présence d'ATP et de GSK3 $\beta$  (gauche). Ces images ont été faites 20h après ajout d'un agent de polymérisation, l'acide arachidonique.

Des tests ont également été réalisés sur petit animal de manière à collecter des données *in vivo*. La surexpression de la GSK3 $\beta$  chez des souris induit une hyperphosphorylation de Tau, principalement dans l'hippocampe, accompagnée par la formation d'agrégats de Tau (DNF) après 18 mois.<sup>[164]</sup> De plus, il a été montré que cette kinase s'accumule dans le cytoplasme des neurones pré-dégénérés et que sa distribution dans le cerveau coïncide avec le stade du

développement de la maladie. Ainsi, cette recherche bibliographique nous a donc conduit à sélectionner l'isoforme  $\beta$  de la GSK3 pour réaliser la mise au point de la phosphorylation. Toutefois la p38 a également été étudiée de manière à voir s'il existait une affinité entre cette kinase et les peptides modèles.

## 2) Mise au point de la phosphorylation sur les peptides P1 et P2

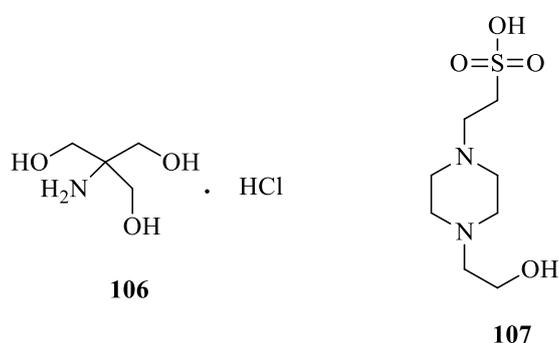
La phosphorylation est une modification post-traductionnelle indispensable dans les cellules eucaryotes permettant notamment la régulation de certains processus cellulaires. C'est pour cette raison que, depuis plusieurs années, l'activité des kinases est étudiée de manière importante. Le rôle des kinases est de catalyser le transfert du groupement phosphoryle ( $\text{PO}_3^{2-}$ ) provenant du  $\gamma$  phosphate de l'ATP sur un hydroxyle d'un résidu de type sérine, thréonine et tyrosine en présence de  $\text{Mg}^{2+}$  (**Fig. 110**).



**Figure 110** : Equation Bilan de la réaction de phosphorylation.

Cette réaction est dépendante de la bonne orientation des deux substrats, l'ATP et la protéine, c'est pourquoi l'implication de la kinase est primordiale. En effet, si aucun catalyseur n'est présent dans le milieu la réaction est trop lente et ne peut pas être correctement réalisée alors qu'avec l'enzyme la vitesse de réaction est augmentée d'un facteur  $10^{14}$ .<sup>[165]</sup> Cette orientation, qui est l'étape clé de la réaction, est également assurée par le magnésium dont la présence est indispensable pour le bon positionnement de l'ATP dans le site actif de la kinase. Depuis les études corrélant Tau et Alzheimer, de nombreux chercheurs ont développé des conditions de phosphorylation *in vitro* permettant notamment la caractérisation des sites phosphorylés. Pour réaliser ces réactions plusieurs paramètres doivent être pris en considération tels que le pH, la température et la possible dégradation de l'enzyme et/ou de la protéine dans le milieu réactionnel. En effet, l'activité enzymatique est directement dépendante de ces paramètres et

beaucoup d'enzymes, en particulier celles retrouvées chez les mammifères, vont avoir une activité optimale dans les conditions physiologiques (pH = 7,5 et T = 37°C).<sup>[166]</sup> Dans le cas de la GSK3β et de Tau, les données bibliographiques ainsi que les fournisseurs de cette enzyme, définissent la zone de pH optimale entre 7,5 et 8 pour une température de travail de 30°C.<sup>[59],[167]</sup> Afin d'obtenir un pH stable tout au long de la réaction, il est nécessaire de préparer un tampon composé d'un acide faible et d'ajuster le pH avec une base telle que NaOH. Dans la littérature, les composés couramment décrits pour la réalisation des solutions tampons dans le cas de la phosphorylation de Tau *in vitro* sont le TrisHCl **106** et l'HEPES (acide 4-(2-HydroxyEthyl)-1-Pipérazine Ethane Sulfonique) **107** (**Fig. 111**).

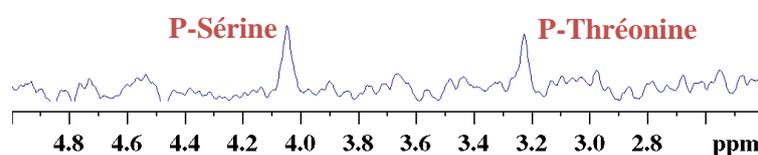


**Figure 111** : Structure du Tris HCl **106** et de l'HEPES **107**.

Enfin, le dernier paramètre à prendre en compte lors de ce type de réaction est l'éventuelle dégradation de l'enzyme ou des protéines pouvant se traduire par une perte de la structure 3D ou encore par des ruptures des liaisons peptidiques. Ainsi, dans les tampons sont également ajoutées des molécules de type DTT ou mercaptoéthanol permettant de maintenir la protéine sous forme réduite, prévenant notamment la formation de ponts disulfures. Notons que la GSK3β est composé de 9 cystéines et que la formation de ponts disulfure non désirés pourrait être à l'origine d'une perte d'activité (**Annexe 6**).<sup>[168],[169]</sup> Dans la littérature, de nombreuses réactions sont également réalisées en présence d'un cocktail composé d'inhibiteurs de protéases tels que la leupéptine et le PMSF (Fluorure de PhénylMéthylSulfonyle).<sup>[59]</sup> On peut également retrouver dans ces solutions tampons des inhibiteurs de phosphatases tels que le glycérophosphate ou le Sodium ortho vanadate.<sup>[169]</sup> Toutefois, le composé le plus utilisé lors de ces réactions est l'EDTA (Ethylène Diamine TétraActéique) qui permet d'inhiber l'activité des métalloprotéases. L'EDTA est également retrouvé dans les solutions de stockage des enzymes.<sup>[167]</sup>

Différentes conditions issues de ces données bibliographiques sont applicables sur les

peptides mais, avant ces essais, il a été nécessaire de réfléchir à la méthode analytique appropriée permettant de suivre cette réaction et d'en déterminer sa cinétique. Ainsi, dans un premier temps il a été envisagé d'effectuer un suivi de la phosphorylation des peptides par RMN en s'inspirant des travaux réalisés par l'équipe de Zweckstetter.<sup>[170]</sup> Pour cela, il a été décidé de travailler avec la RMN du phosphore  $^{31}\text{P}$ , les intégrations des pics correspondant aux groupements phosphorylés transférés sur les peptides permettant de suivre la réaction en fonction du temps. Pour cela des tests préliminaires ont été faits sur la phosphosérine et la phosphothréonine de manière à avoir une idée de la quantité de peptide, et donc d'enzyme, à engager dans la réaction. Ainsi avec des expériences réalisées sur un spectromètre 600MHz il a été possible de détecter 0,1mM de ces acides aminés phosphorylés (**Fig. 112**).

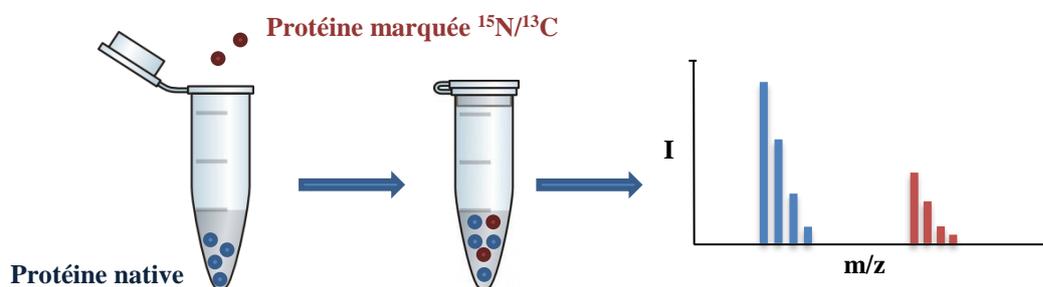


**Figure 112** : Spectre phosphore  $^{31}\text{P}$  de la phosphosérine et de la phosphothréonine (600MHz).

Toutefois, la résolution spectrale est insuffisante pour une quantification. De plus, utiliser cette technique est relativement coûteuse en enzyme puisqu'elle nécessite d'en engager 10 $\mu\text{g}$  (500€). Il a donc été nécessaire de trouver une alternative à la RMN pour aller vers un mode de caractérisation plus sensible, nécessitant des quantités très faibles de composés à analyser tel que la spectrométrie de masse.

La spectrométrie de masse (MS) est couramment utilisée pour l'analyse qualitative de phosphoprotéines notamment pour identifier ces composés phosphorylés dans des mélanges de protéines natives ainsi que pour la détermination des sites de phosphorylation.<sup>[171]</sup> Toutefois, quantifier la phosphorylation par la MS est relativement complexe car il est souvent décrit que cette technique ne permet pas une quantification absolue.<sup>[172]</sup> Plusieurs techniques ont tout de même été développées en utilisant deux sources d'ionisation : l'ESI (ElectroSpray Ionization) et le MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization). La quantification par ESI se fait principalement à l'aide d'un couplage avec la chromatographie liquide (LC/MS). Ainsi, les pics du chromatogramme sont identifiés par MS et *via* leur intégration respective et une courbe de calibration externe, les composés correspondant à ces pics peuvent être quantifiés dans le mélange. Cette technique présente toutefois des inconvénients tels que la nécessité d'une séparation efficace, une solubilisation optimale du

produit dans la phase mobile malgré un gradient d'élution et une ionisation des peptides qui ne doit pas être perturbée par la composition de cette phase (notamment dans le cas où des tampons sont nécessaires). Des quantifications utilisant le MALDI ont également été décrits car, contrairement à l'ESI, la préparation de l'échantillon est relativement simple et ne nécessite pas forcément une étape de purification. De plus, les pics de ces peptides ne sont pas multichargés, comme dans le cas d'une source electrospray, ce qui simplifie considérablement les spectres. Toutefois, l'utilisation du MALDI, pour réaliser de la quantification, est très controversée puisque de nombreux facteurs peuvent introduire des erreurs de calculs tels que l'homogénéité de la taille des cristaux et la distribution du composé à analyser dans la matrice ainsi que sur le spot. Ces facteurs vont notamment avoir une influence sur l'intensité du signal. Il a tout de même été montré que l'erreur introduite par ces différents facteurs peut être corrigée en analysant plusieurs spots du composé, en réalisant un grand nombre d'impulsion du laser (>500) et en déplaçant le laser sur plusieurs parties du spot de manière à prendre en compte la distribution de l'analyte. Bien que ces différents facteurs soient maîtrisés, un autre paramètre important est à prendre en compte pour réaliser la quantification à savoir l'ionisation du peptide phosphorylé et du peptide natif. En effet, on ne peut pas simplement comparer l'intensité relative des deux pics pour déterminer le degré de phosphorylation de manière absolue mais il faut prendre en compte la différence d'ionisation des deux composés. La première technique mise au point pour palier à ce problème est l'introduction d'une quantité connue d'une référence interne. En général, l'analogue marqué en  $^{15}\text{N}$  et  $^{13}\text{C}$  de la protéine étudiée est introduite comme référence interne et permet une quantification efficace permettant de s'affranchir du problème d'ionisation et traduisant ainsi un rapport d'abondance entre les 2 composés (**Fig. 113**).



**Figure 113 :** Quantification de protéines par MS à l'aide du marquage protéique.

Cette méthode, bien qu'efficace, présente des inconvénients tels que le temps de préparation des protéines marquées qui peut être long, ainsi que le coût du marquage. Des alternatives ont donc été développées par plusieurs équipes afin de pouvoir s'affranchir de l'utilisation de la

chromatographie et de références internes tout en tenant compte de la différence d'ionisation des espèces.

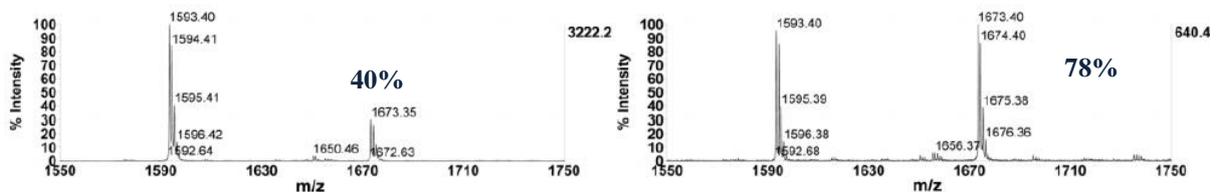
En 2008 l'équipe de *Parker et coll.* a proposé de quantifier les conversions de phosphorylation en réalisant des courbes de calibration prenant en compte l'intensité des signaux, la proportion de peptides phosphorylés dans le mélange et l'ionisation des peptides selon l'équation suivante (**Eq. 4**) :

$$\text{Equation 4 : } A/(A+B) = xSP_A/[xSP_A+(1-x)SP_B]$$

Avec :

- A = Aire observée sous le pic du peptide non phosphorylé
- B = Aire observée sous le pic du peptide phosphorylé
- x = Proportion en peptide non phosphorylé
- S = Intensité des signaux
- P<sub>A</sub> = Différents facteurs pouvant influencer la détection de A tel que l'ionisation
- P<sub>B</sub> = Différents facteurs pouvant influencer la détection de B tel que l'ionisation

Notons que si P<sub>B</sub>=P<sub>A</sub> alors A/(A+B) = x. Ainsi, à l'aide de cette équation, des courbes de calibration ont été tracées en représentant en ordonnée le ratio observé en phosphopeptides et en abscisse le ratio réel dans le mélange. Cette technique est relativement lourde car elle nécessite de réaliser, en amont de la réaction, des courbes de calibration avec des concentrations connues en phosphopeptides impliquant de connaître par avance le site de phosphorylation ou du moins le type de résidu impliqué. Toutefois, cette publication permet de mettre en avant que l'intensité du signal d'un composé dépend de sa concentration dans un mélange. En effet, plus la concentration en phosphopeptide est importante plus l'intensité du pic augmente (**Fig. 114**).<sup>[172]</sup>



**Figure 114** : Spectres de masse d'un mélange peptide/phosphopeptide (RRLIEDNE(p)YTARG) contenant 40% (gauche) et 78% (droite) de phosphopeptide.<sup>[172]</sup>

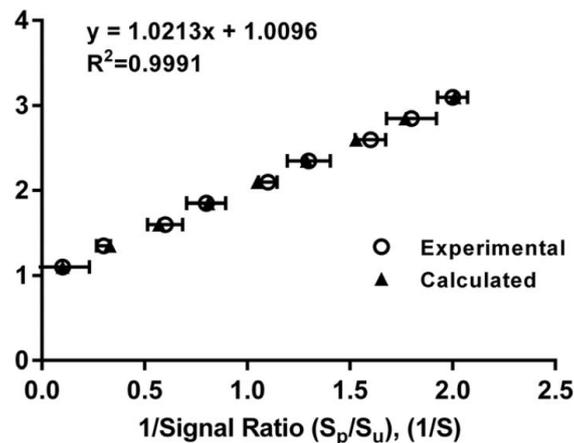
Récemment l'équipe de Chang a mis au point une technique permettant de s'affranchir des courbes de calibration et a démontré que l'intensité du signal est proportionnelle à la concentration en phosphopeptide dans un mélange peptide/phosphopeptide.<sup>[173]</sup> Pour cela, il est nécessaire de calculer la différence d'ionisation entre les des deux espèces (a) en utilisant l'équation suivante (Eq. 5) :

$$\text{Equation 5 : } 1/m = a/s + 1$$

Avec :

- m = fraction molaire en phosphopeptide P
- a = différence d'ionisation tel que a = ionisation P/Ionisation NP (non phosphorylé)
- S = différence d'intensité observé tel que S = I<sub>P</sub>/I<sub>NP</sub>

Ainsi pour différentes fractions molaires en peptide phosphorylé une droite a été obtenue confirmant que le facteur **a** est constant en fonction de l'intensité des signaux (Fig. 115).



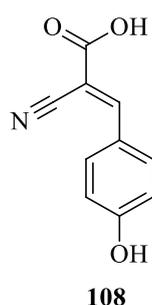
**Figure 115** : Courbe  $1/m = f(a/s + 1)$  obtenue pour un peptide de 14 résidus.<sup>[173]</sup>

Ces tests ont été réalisés sur plusieurs peptides et sont reproductibles, mettant en évidence l'importance de la détermination de **a** pour réaliser de la quantification absolue. De plus cette méthode a été appliquée pour des tests d'inhibition de l'activité de kinases (CDK).

Ces deux études sont intéressantes car elles prouvent que des analyses MALDI peuvent être utilisées pour réaliser de la quantification en prenant en compte la différence d'ionisation entre le peptide et son analogue phosphorylé. De plus, l'utilisation de cette technique permet de travailler avec des faibles quantités de produits, et notamment d'enzyme, ce qui a un impact direct sur le coût de la manipulation. Toutefois, dans notre cas, à ce stade de l'étude,

nous ne savions ni le nombre ni quels résidus allaient être phosphorylés. Or ces facteurs étant importants pour le calcul de la différence d'ionisation, il a donc été envisagé de travailler avec une méthode semi-quantitative ne prenant en compte que les aires et les intensités relatives des pics de manière à observer des tendances de conversion en peptides phosphorylés.

Les conditions de la réaction et de la détection ont été mises au point sur les deux peptides composés de 20 résidus P1 et P2 dont les masses exactes sont respectivement de 1996,3 et 1949,2. Afin de réaliser ces réactions de phosphorylation, il a été choisi de travailler avec 0.1mM de peptides puisque, lors d'essais préliminaires, il a été montré qu'à cette concentration les peptides sont parfaitement détectable par MS en utilisant comme matrice l'acide  $\alpha$ cyano-4-hydroxycinnamique **108** dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O+0,1% TFA : 70/30 (**Fig. 116**). Des ajustements ont été faits par la suite lors des mises au point afin de déterminer les proportions peptides/matrices permettant une détection optimale dépendant notamment de la composition de la solution tampon.

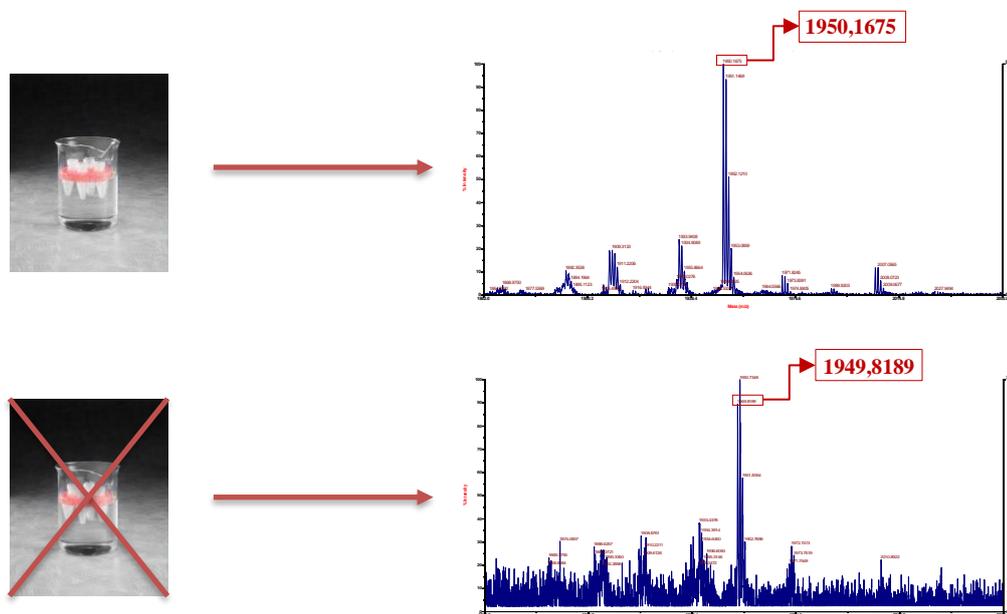


**Figure 116** : Structure de l'acide  $\alpha$ cyano-4-hydroxycinnamique **108**.

Afin de déterminer la quantité d'enzyme à engager dans la réaction, nous nous sommes basés sur les travaux décrits dans la littérature. De manière générale les catalyses sont réalisées avec 0,02 à 0,3 équivalents d'enzymes mais la cinétique est relativement rapide (5mn à 12h) et ne permet pas un suivi par MALDI à cause du temps de séchage du mélange analyte/matrice sur la plaque et surtout à cause de la disponibilité de l'appareil.<sup>[158],[168],[174]</sup> Il a donc été envisagé de travailler avec de plus faibles quantités en GSK3 $\beta$  (0,0035 à 0,007) permettant ainsi un suivi sur la semaine et de limiter le coût des manipulations. Il a également été nécessaire de choisir les enzymes chez les différents fournisseurs et les premiers essais ont été effectués avec la GSK3 $\beta$  commercialisée par Sigma Aldrich présentant une activité de 168U/mg. Concernant la solution tampon, il a été choisi de travailler avec l'HEPES qui est décrit dans plusieurs publications pour les phosphorylations de Tau par GSK3 $\beta$  et différents pH ont été testés de manière à trouver un pH optimal pour cette réaction.<sup>[158],[168],[174]</sup> Afin de préserver la

structure et l'activité de l'enzyme du DTT et de l'EDTA ont été ajoutés dans les solutions tampon en s'inspirant de la littérature pour les quantités. Enfin, différentes concentrations d'ATP et de  $MgCl_2$  ont également été testées de manière à pouvoir optimiser la réaction.

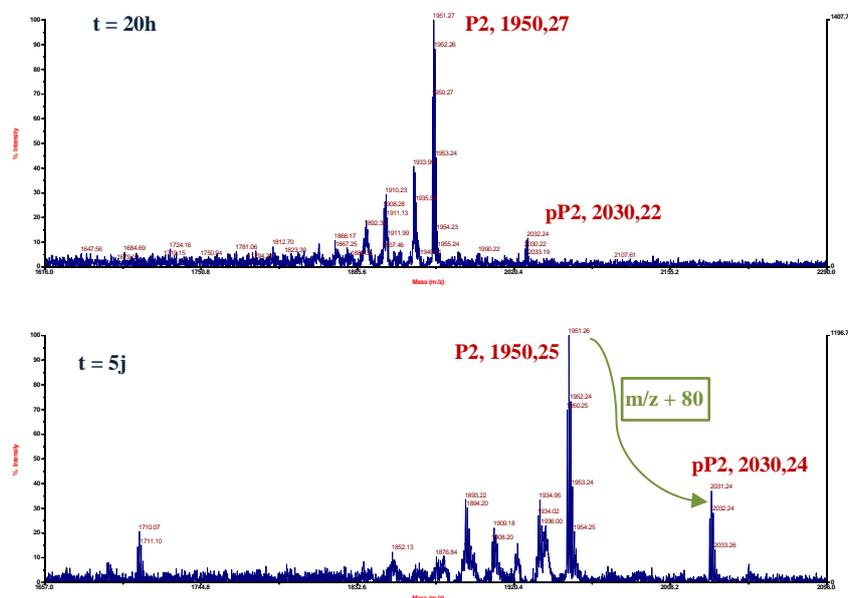
L'enzyme achetée chez Sigma est conservée dans 100 $\mu$ L d'une solution tampon (pH = 7) contenant 300mM de NaCl, 0,1mM d'imidazole, 0,1mM de PMSF, 0,2mM de DTT et 25% de glycérol. La présence en grande quantité de glycérol s'avère être problématique pour les analyses MALDI et conduit à des spectres de mauvaise qualité. Il a donc été nécessaire de mettre au point une purification préalable de la kinase et pour cela 2 dialyses sont nécessaires. Une première dans l'eau pendant 20mn permettant de retirer une partie du glycérol et une seconde dans la solution tampon utilisée pour l'expérience de manière à avoir une solution d'enzyme au pH souhaité pour la réaction (**Fig. 117, Annexe 7**).



**Figure 117 :** Spectre de masse de P2 obtenu avec et sans dialyse.

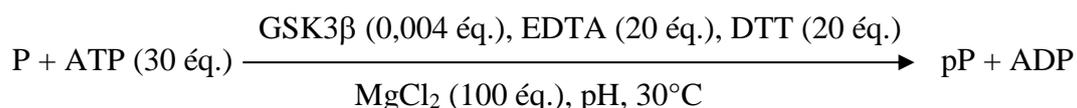
Les premiers essais ont été réalisés avec des concentrations constantes en DTT (2mM), en EDTA (2mM), en  $MgCl_2$  (10mM) et en ATP (3mM) pour les peptides P1 et P2. Le but était dans un premier temps d'évaluer l'effet du pH sur la conversion en peptides phosphorylés. Ainsi, 3 solutions de tampon HEPES avait été préparées et ajustées avec du NaOH de manière à avoir 3 pH différents en se basant sur les données de la bibliographie (pH = 7,5 ; 8 et 8,5). Pour ces premières optimisations seuls 2 suivis par semaine ont été réalisés dont un après seulement un jour de chauffage à 30°C et en utilisant environ 0,004 équivalents d'enzyme. Ainsi, dans le cas du peptide P1 après 5 jours de réaction aucune traces de l'analogue phosphorylé n'a été observé alors que pour le P2 des résultats intéressants ont été obtenus. En

effet, à pH = 8 après seulement 20h dans le milieu réactionnel, des traces du pP2 (P2 phosphorylé) ont été observées et l'intensité de ce pic a augmenté après 5 jours de réaction (**Fig. 118, p216**).



**Figure 118 :** Spectre de masse (MALDI) de P2 et pP2 obtenu après 20h et 5j à 30°C.

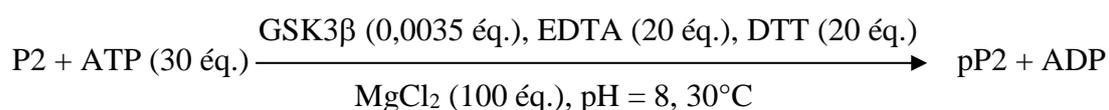
L'ajout du groupement phosphoryle se repère facilement sur le spectre de masse puisqu'une augmentation de +80 en masse monoisotopique ( $m/z$  avec  $z = 1$ ) est observable avec pP2  $[M+H^+] = 2030,24$ . De plus cette information révèle qu'un seul site est phosphorylé dans ce cas, alors que 4 sites sont potentiellement phosphorylables par GSK3 $\beta$  (S202, T205, T212 et T217). Afin de pouvoir comparer ces données avec celles obtenues pour les autres conditions de pH une conversion a été calculée à partir des aires sous les pics les plus intenses des massifs isotopiques donnant une valeur de 25% après 5j ( $A_{pP2}/[A_{P2}+A_{pP2}]$ ). Il est important de noter que cette valeur est calculée à titre indicatif et ne représente pas une conversion absolue puisque le rapport d'ionisation des 2 composés est considéré comme étant égal à 1. Après 5 jours de réaction pour un pH de 7,5, seules des traces du peptide phosphorylé sont observées et pour un pH de 8,5 la conversion est d'environ 20% (**Fig. 119**). Ainsi, ces différentes données permettent de mettre en évidence que la GSK3 $\beta$  n'a pas d'affinité envers le peptide P1 se traduisant par l'absence de détection de son analogue phosphorylé par MALDI alors que cette enzyme est capable de phosphoryler le peptide P2 lorsque le pH est égal à 8 et à 8,5.



Peptide	P1	P1	P2	P2	P2
pH	7,5	8	7,5	8	8,5
Conversion (Jour 5, %)	0	0	Traces	25%	20%

**Figure 119 :** Equation Bilan de la réaction de phosphorylation et résultats obtenus en fonction du pH.

Afin d'envisager un suivi en présence de procyanidines, il a été d ecid e de travailler à pH = 8 pour la mise au point puisque lorsque pH > 8 ces composés se dégradent. Lorsque l'on fait varier la concentration en ATP des résultats moins bons sont obtenus. En effet, une diminution de la quantité d'ATP ralentit la réaction, notamment avec 1mM ou seulement des traces sont observées après une semaine. Si on augmente la concentration en ATP la réaction est également très lente et même après un mois de réaction la conversion estimée est inférieure à 10%. Quelques essais ont également été r ealis es en modifiant la concentration en Mg<sup>2+</sup>, notamment en la diminuant, mais aucun résultat concluant n'a été obtenu. Pour la suite de l'étude nous avons donc choisi de travailler avec le P2 dans les conditions décrites sur la figure ci-dessous (**Fig. 120**).

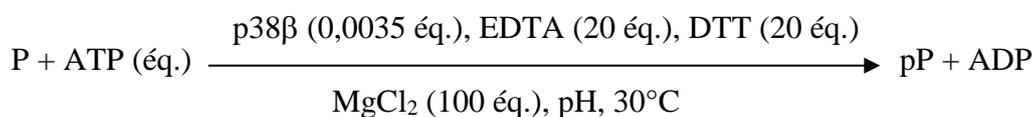


**Figure 120 :** Equation Bilan de la réaction de phosphorylation optimisée.

Afin de se rendre compte si l'activité de l'enzyme pouvait avoir un effet sur la cinétique de la réaction, l'enzyme a été achetée chez MERCK avec une activité du 681U/mg. La réaction a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment mais aucun effet notable a été observ e. L'enzyme a tout de même été achetée chez ce fournisseur pour la suite des travaux.

Des essais ont par la suite été r ealis es avec une autre enzyme, la P38 , afin de voir si le P1 et le P2 étaient phosphorylables avec de meilleures conversions estimées. Ainsi, les réactions de

phosphorylation ont été engagées de la même manière qu'avec la GSK3β à des pH de 7,5 et de 8 et avec 2 ou 3mM d'ATP mais aucun résultat concluant n'a été obtenu (**Fig. 121**).



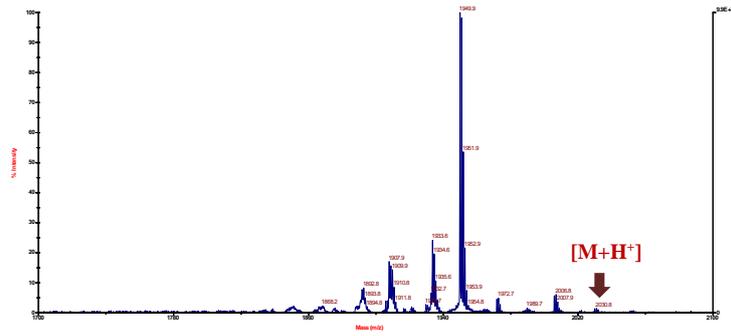
Peptide	P1	P1	P2	P2	P2	P2
pH	7,5	8	7,5	7,5	<b>8</b>	8
ATP (éq)	30	30	30	20	<b>30</b>	20
Conversion (Jour 6, %)	0	0	0	0	<b>Traces</b>	0

**Figure 121** : Conditions de phosphorylation avec p38β.

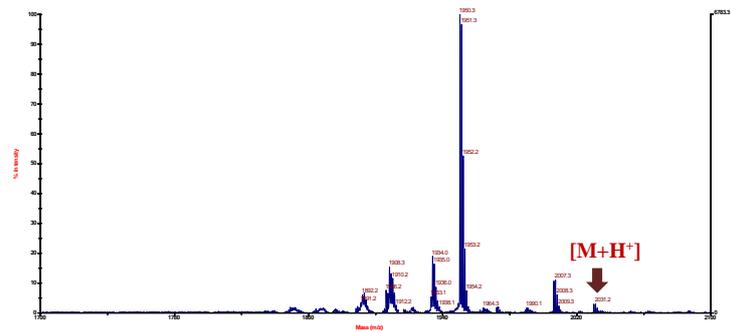
Une nouvelle fois aucune trace du peptide P1 phosphorylé n'est observée malgré les changements de pH. Des traces du peptide P2 ont été détectées à pH 8 montrant que la kinase possède une affinité préférentielle pour ce peptide. Toutefois, la conversion est très faible, malgré plusieurs conditions testées, ce qui ne permet pas d'envisager de travailler avec cette enzyme pour la suite du projet. C'est pour cette raison que nous avons choisi de travailler uniquement avec la GSK3β dans le cadre de l'évaluation de l'inhibition de la phosphorylation.

Dans l'optique de voir si les polyphénols permettent une inhibition du processus de phosphorylation par la GSK3β, un suivi journalier a été mis au point sur une semaine. Chaque jours une analyse a été faite en prenant soin de réaliser 3 spots qui ont chacun été analysés à l'aide de 5×200 shots et en veillant bien à parcourir tout le spot afin de tenir compte de la répartition de l'analyte. Ainsi une moyenne sur les 3 dépôts a été réalisée et une erreur de ± 5% sur les conversions estimées a été calculée ce qui reste une valeur correcte montrant la reproductibilité de l'analyse. Le suivi a donc été effectué pendant une semaine et les spectres montrent bien l'augmentation de l'intensité du signal correspondant au phosphopeptide traduisant ainsi une première tendance de la conversion de manière visuelle (**Fig. 122**).

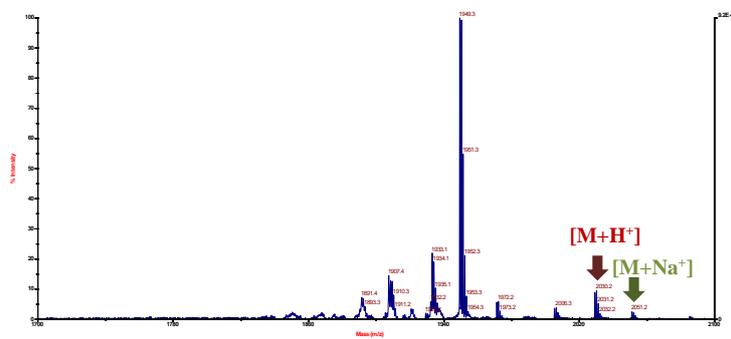
Jour 1



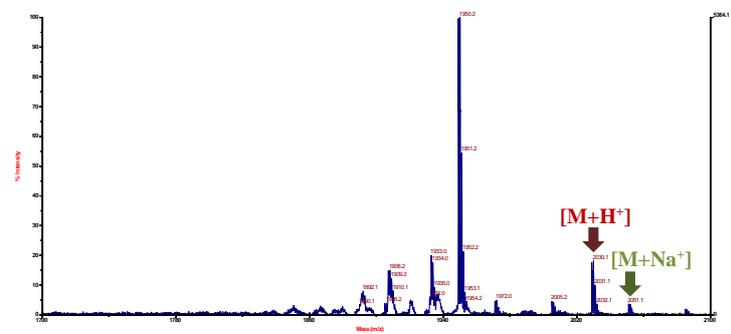
Jour 2

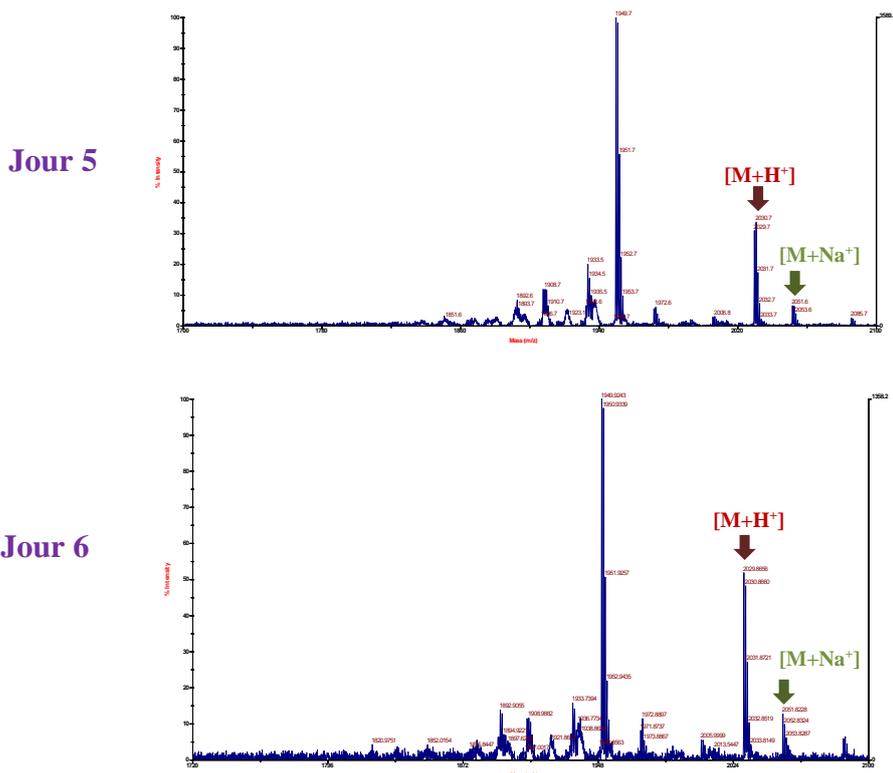


Jour 3



Jour 4





**Figure 122** : Spectres de masse montrant l'évolution de conversion de P2 et pP2 par jour (sur 6 jours).

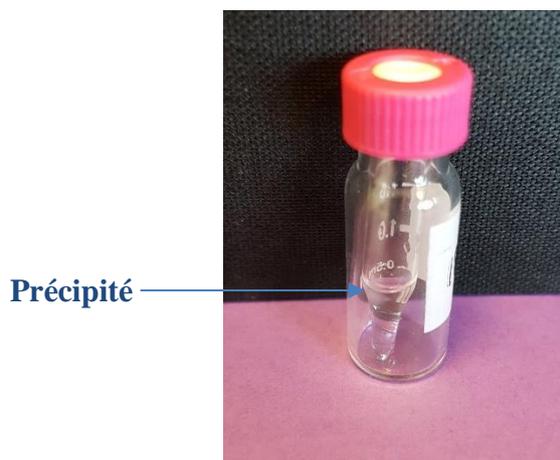
Sachant que l'intensité relative des pics est proportionnelle à la concentration en phosphopeptide dans le milieu, ces spectres nous permettent de donner une tendance de l'évolution de la conversion en fonction du temps. On peut remarquer une évolution progressive de la phosphorylation sur les 6 jours de réaction. Ces données ont été chiffrées en calculant une conversion estimée comme décrit précédemment dans l'optique de pouvoir comparer ces résultats en présence de polyphénols (**Tab. 8**).

Jour	1	2	3	4	5	6
Conversion (%)	Traces	4	10	16	25	30

**Tableau 8** : Conversions estimées par jour.

Après 6 jours de réaction il n'est plus possible de suivre la réaction puisque les pics correspondant au peptide et à son analogue phosphorylé ne sont plus détectables. L'explication de ce phénomène se traduit par la précipitation du P2 et de pP2 conduisant à un petit agrégat blanc (**Fig. 123**). Afin d'avoir une idée précise du taux de conversion conduisant à l'agrégation des tests de dénaturation ont été effectués en remplaçant le solvant par de l'acétonitrile, du THF, de l'éthanol ou encore du DMF mais cela n'a abouti à aucun résultat. La sonication, le chauffage (60°C) ou encore le changement de pH n'ont également pas été un

succès. Nous avons donc essayé *via* une dénaturation par voie chimique en utilisant du chlorure de guanidinium (2M) mais une nouvelle fois le précipité ne s'est pas solubilisé.<sup>[175]</sup>

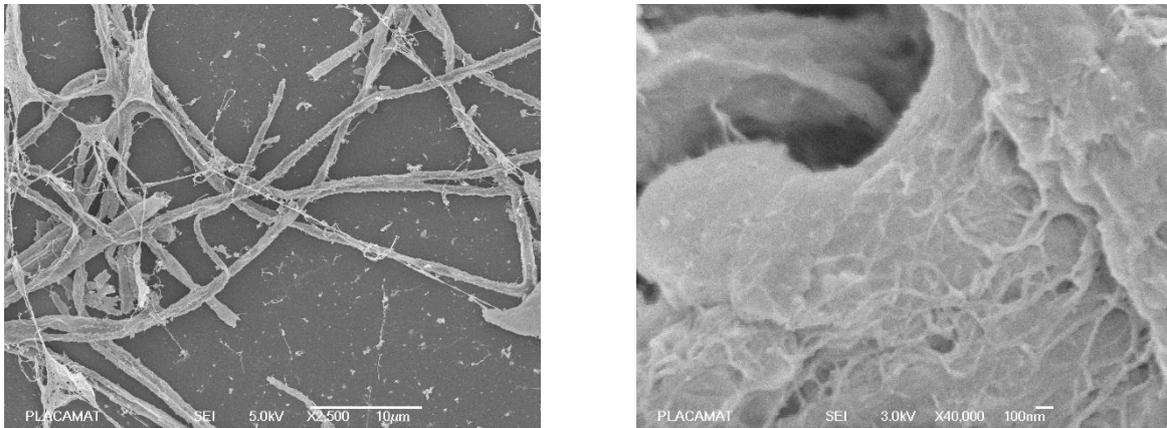


**Figure 123** : Précipité composé de P2 et de pP2.

Lors d'une analyse, la conversion estimée a été calculée autour de 40% avant la précipitation complète du peptide même si cette valeur est moins précise qu'après une dénaturation elle donne un ordre d'idée de la conversion estimée nécessaire pour que P2 et pP2 précipitent.

Afin d'avoir une idée sur la structure de l'agrégat une analyse par microscopie électronique a été envisagée. Pour cela, les échantillons ont été analysés par Philippe Legros à Placammat par microscopie électronique à balayage. Nous avons choisi de travailler *via* cette technique car l'appareillage permet d'analyser les échantillons cryogénisés (Cryo-MEB) permettant ainsi de préserver la morphologie qu'adopte les peptides dans l'eau. Avant l'analyse, les échantillons ont dû être préparés de manière à enlever tous les sels et composés introduits dans la solution tampon. Ainsi, le précipité a été lavé trois fois avec de l'eau de manière à enlever l'ATP, l'EDTA, l'HEPES, le DTT et le  $MgCl_2$  avant d'être placé sur une fine lamelle en verre et plongé dans l'azote liquide. L'échantillon a par la suite été introduit dans une chambre de transfert où le vide a été effectué avant l'introduction dans le microscope Cryo-MEB 6007 ( $T = -78^\circ C$ ). Après lyophilisation ( $T = -51^\circ C$ ) et métallisation du précipité par de l'Au-Pd en plasma (120s à 10mA) l'échantillon a été analysé à  $-170^\circ C$  à différents grossissements de manière à voir le plus précisément possible comment il s'organisait (**Fig. 124**). Avec un grossissement  $\times 2500$  on distingue des fibres d'un diamètre de 2-3 $\mu m$  et de longueurs variables. Ces fibres ne sont pas homogènes au niveau de la forme et semblent être creuses. Avec un grossissement supérieur  $\times 40000$  on distingue des nanofibres d'un diamètre de 20-

30nm. Ces petites fibres semblent enchevêtrées de manière à former les plus grandes caractérisées avec le grossissement précédent.



**Figure 124 :** Analyse du précipité par Cryo-MEB avec un grossissement  $\times 2500$  (gauche) et  $\times 40000$  (droite).

Ces résultats sont intéressants puisque l'on peut les corrélérer avec ce qu'il se passe *in vivo* avec la protéine entière. En effet, rappelons que dans le cerveau Tau s'agrège sous forme d'enchevêtrements neurofibrillaires (DNF). Il sera donc intéressant de voir si les polyphénols peuvent non seulement inhiber le processus de phosphorylation ainsi que l'agrégation.

A ce stade de la mise au point la seule information manquante est la détermination du site de phosphorylation. Cette donnée pourrait non seulement permettre de savoir si le site phosphorylé est connu comme étant un site important dans le cadre de la MA mais pourrait également donner accès à une étude pour une quantification absolue. La détermination de ce site a donc été effectuée en parallèle des tests d'inhibition.

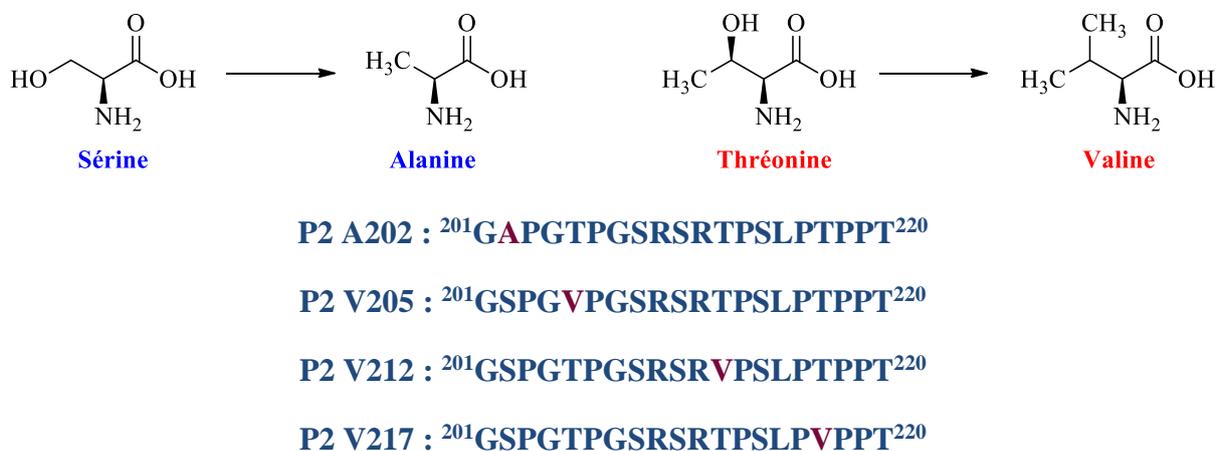
### 3) Détermination du site de phosphorylation

Le peptide P2 est phosphorylable sur 4 sites en utilisant la GSK3 $\beta$  puisque cette kinase appartient à la famille des PDPK (Proline-Directed Protein Kinase) c'est à dire que cette enzyme catalyse le transfert du groupement phosphorylé sur des motifs de type SP et TP (**Fig. 125**).



**Figure 125 :** Sites phosphorylables par GSK3 $\beta$ .

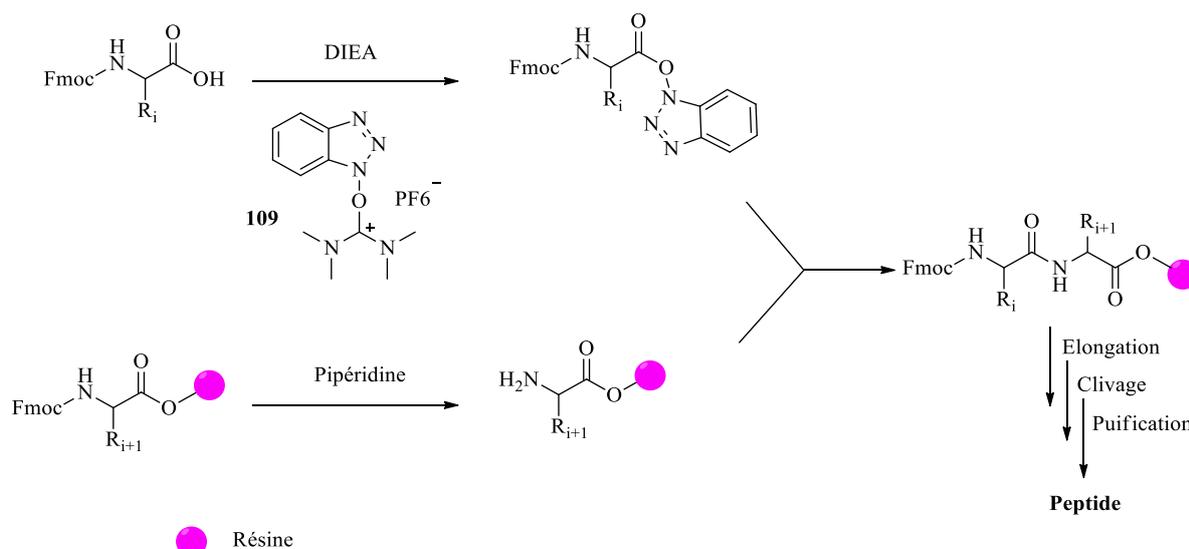
La stratégie adoptée pour trouver le site de phosphorylation a été de synthétiser 4 analogues de P2 où les résidus phosphorylables ont été remplacés par des résidus non phosphorylables tel que l’alanine et la valine dont les chaînes latérales carbonées sont relativement proches des sérines et thréonines (**Fig. 126**).



**Figure 126** : Structure des analogues du P2 et des résidus modifiés.

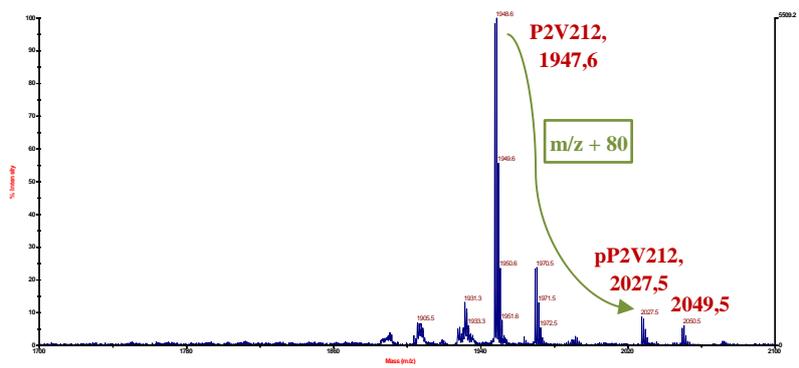
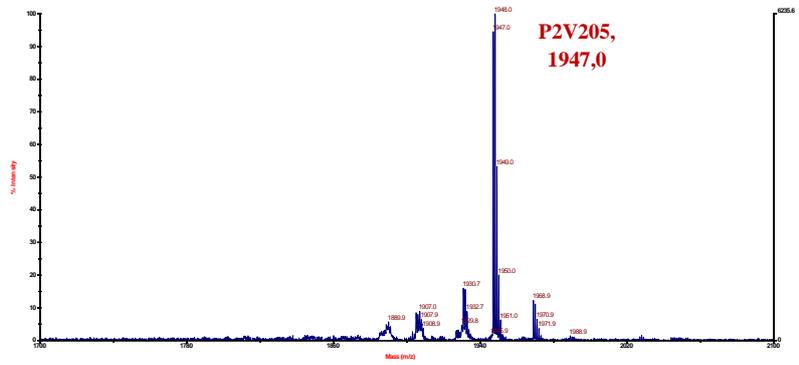
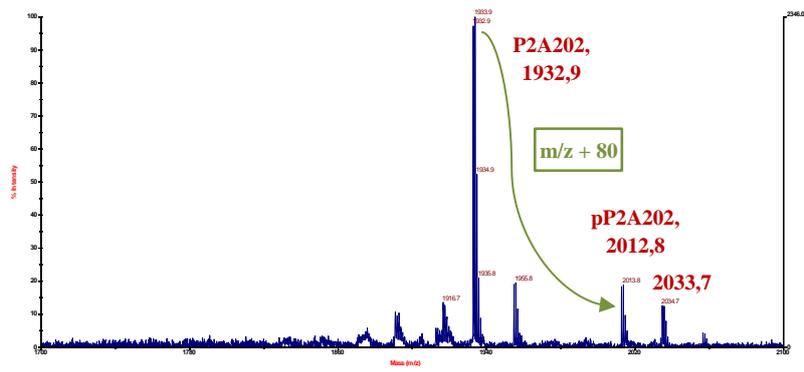
La première étape avant les essais de phosphorylation a été de synthétiser des 4 analogues *via* l’utilisation d’un synthétiseur automatisé Liberty 1. Depuis la synthèse peptidique développée par l’équipe de Merrifield en 1963 de nombreux chercheurs ont mis au point des conditions permettant l’optimisation des couplages peptidiques mais également l’augmentation de la taille du peptide à synthétiser.<sup>[176]</sup> En effet, cette méthodologie basée sur la synthèse sur support solide (SPPS, Synthèse Peptidique sur Support Solide) permet de synthétiser des petits peptides comprenant 20 à 30 résidus maximum. La synthèse sur support solide permet de coupler les différents acides aminés de manière consécutive en respectant un cycle d’élongation (déprotection, activation et couplage).<sup>[177]</sup> Dans notre cas la stratégie Fmoc a été privilégiée par rapport à la stratégie Boc puisque les chaînes latérales de certains acides aminés tel que les sérines, les thréonines et l’arginine sont protégés par des groupements protecteurs étant labiles dans un milieu contenant du TFA qui est nécessaire pour déprotéger les Boc . La résine qui a été utilisée est une résine Wang préchargée avec un thréonine protégé (T220). La première étape de la synthèse est une déprotection de l’amine du résidu nucléophile par un traitement basique avec de la pipéridine. La seconde étape est une activation de l’acide carboxylique du résidu électrophile par des activateurs tel que les carbodiimides, les sels de phosphoniums ou encore les sels d’aminiums.<sup>[178]</sup> Les sels d’aminiums étant décrits comme plus efficaces pour les réactions de couplage, nous avons choisis de travailler avec le HBTU (2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-TetraméthylUronium

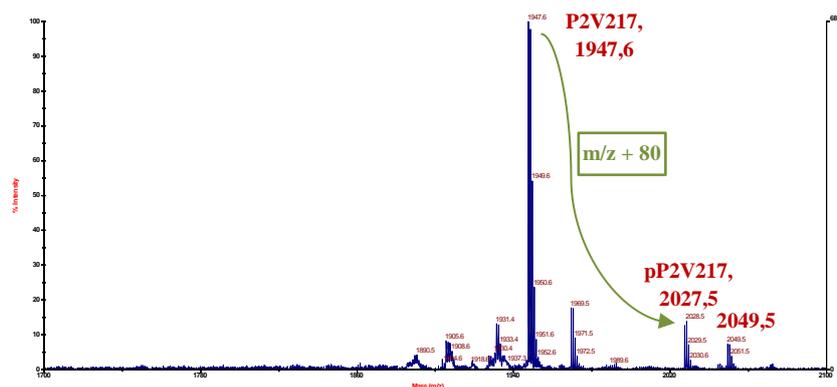
hexafluorophosphate) **109** en présence de diéthylamine (DIEA).<sup>[176]</sup> Après ces deux premières étapes d'activation/déprotection les deux résidus sont engagés dans le couplage peptidique et la séquence est répétée de manière à introduire les résidus suivants. Le peptide final a ensuite été clivé de la résine et déprotégé par une solution contenant de TFA contenant un mélange Phénol/eau/TIPS (5%/5%/2%, %v/v) pendant 4h à température ambiante. Par la suite, la résine a été lavée, filtrée et le peptide a été précipité à l'aide d'éther diéthylique froid avant d'être centrifugé et purifié par HPLC (**Fig. 127**).



**Figure 127** : Synthèse peptidique.

Afin de contrôler le bon déroulement de la synthèse, une analyse MALDI des 4 peptides a été effectuée. Ainsi pour PA202 une masse monoisotopique  $[M+H^+]$  de 1932,9 a été trouvée pour une masse monoisotopique calculée de 1934,0 et pour PV205, PV212 et PV217 des masses  $[M+H^+]$  de 1947,6 ont été détectées pour une masse monoisotopique calculée de 1948,00. Ces analyses confirment ainsi que les peptides correspondent bien à ceux désirés. Les 4 analogues du P2 ont donc été engagés dans des réactions de phosphorylation dans les mêmes conditions que pour le P2 et il s'est avéré qu'après 3 jours de réaction la phosphorylation est observable pour 3 peptides sur les 4. Ainsi, pour le P2A205 des masses  $[M+H^+]$  de 2012,8 et  $[M+Na^+]$  de 2033,7 sont détectées tandis que pour P2V212 et P2V217 des masses de 2027,5 et 2049,5 correspondant respectivement à l'adduit  $H^+$  et  $Na^+$  sont détectées (**Fig. 128**). Ces différentes masses correspondent bien à un incrément de 80 par rapport à la masse du peptide natif traduisant un ajout d'un groupement phosphoryle. Mais, dans le cas de P2V205 le peptide phosphorylé n'est pas détecté (seules des traces) montrant ainsi que la phosphorylation sur ce peptide ne se fait pas (**Fig. 128**).





**Figure 128** : Spectres de masse des peptides phosphorylés.

Ainsi, ces données permettent de conclure que le site de phosphorylation du peptide P2 est la thréonine T205. Ce résultat est intéressant puisque la phosphorylation de la T205 est décrite comme étant un site majeur de la phosphorylation de la protéine Tau induisant des changements conformationnels pouvant être responsables du détachement des microtubules.<sup>[43]</sup> Inhiber la phosphorylation sur ce site représente un enjeu important pour le maintien de l'affinité entre Tau et les microtubules et permettrait aussi de réguler la phosphorylation sur d'autres sites.<sup>[45]</sup>

La phosphorylation de T205 est reproductible mais des variations de conversions ont été observées lorsque les lots d'enzyme utilisés étaient différents et des problèmes au niveau de l'analyse ont été quelques fois rencontrés (problème de co-cristallisation). Après vérification de la reproductibilité les tests d'inhibition avec différents polyphénols ont pu être réalisés.

#### 4) Inhibition de la phosphorylation

Les essais ont été réalisés avec plusieurs polyphénols afin de voir si les différences structurales telles que le degré d'oligomérisation, la présence d'un groupement galloyle ou encore la régiosélectivité sont des paramètres importants dans l'inhibition de la phosphorylation de manière à voir s'il y a une corrélation avec les résultats obtenus pour les  $K_D$ .

La première réaction a tout d'abord été réalisée en présence de 1 à 3 équivalents d'EGCG 22 par rapport au P2. Avec 1 équivalent une chute d'environ 10% la conversion estimée a été observée à partir de 5 jours dans le milieu réactionnel toutefois un léger précipité se forme après 7 jour traduisant que la faible inhibition par **22** ne suffit pas à contrer le processus d'agrégation. Malgré ces premiers résultats encourageants, une augmentation de la quantité

d'EGCG dans le milieu réactionnel entraîne une augmentation de la conversion estimée à partir de 6 jours (**Tab. 9**).

Eq. EGCG Conversion %	0	1	2	3
<b>Jour 1</b>	Traces	1	1	1
<b>Jour 2</b>	4	4	4	3
<b>Jour 3</b>	10	5	9	7
<b>Jour 4</b>	16	7	14	14
<b>Jour 5</b>	25	12	26	26
<b>Jour 6</b>	30	13	30	45

**Tableau 9** : Conversions estimées par jour en présence d'une quantité variable d'EGCG.

Ces résultats ont été répétés plusieurs fois et dans chaque cas l'inhibition de la phosphorylation par l'EGCG n'est pas un succès. Dans certains cas, une conversion supérieure à 90% a pu être mesurée après une semaine de réaction. Ces résultats sont tout de même intéressants car bien que le processus de phosphorylation ne soit pas inhibé par l'EGCG, le processus d'agrégation l'est ce qui est cohérent avec des résultats décrits dans la littérature.<sup>[86]</sup> Toutefois, comme il en a été discuté dans la partie bibliographie, il est important d'inhiber en amont le processus d'agrégation de manière à conserver l'affinité Tau-Microtubules. Par conséquent, il a été choisi d'étudier le B3G ayant manifesté une affinité quasiment égale à celle de l'EGCG ( $K_D$ B3G = 1,2mM et  $K_D$ EGCG = 0,9mM) lors des études précédentes.

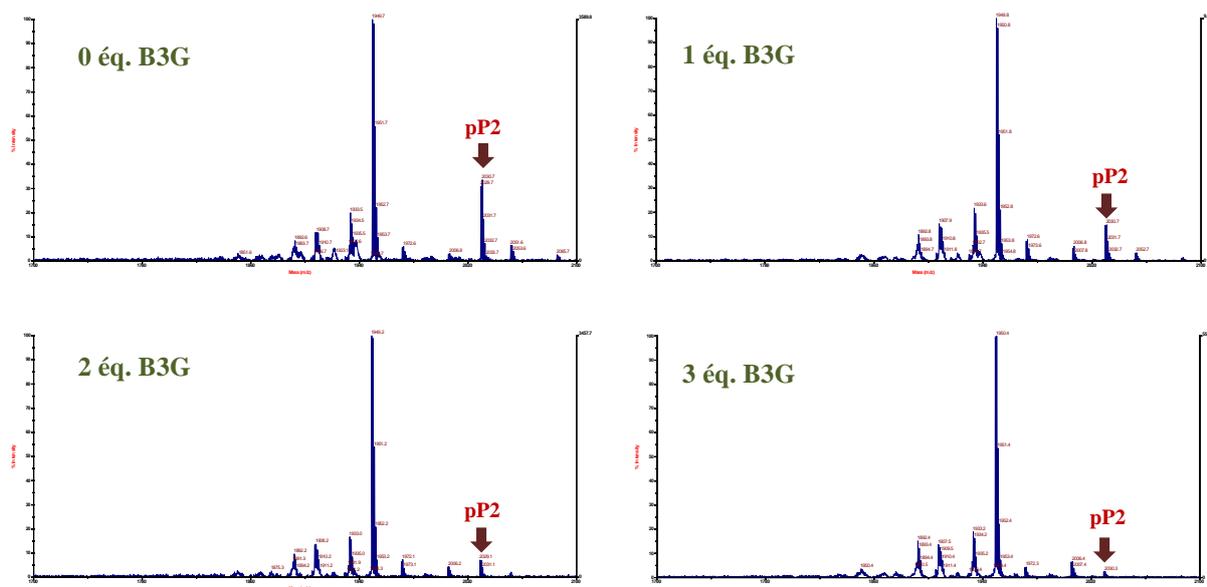
Ainsi, la réaction de phosphorylation a été réalisée en présence de 0,5 à 3 équivalents de B3G et dans ce cas-ci des résultats prometteurs ont été obtenus (**Tab. 10**).

Eq. B3G Conversion %	0	0,5	1	2	3
<b>Jour 1</b>	Traces	Traces	Traces	Traces	Traces
<b>Jour 2</b>	4	4	2	Traces	Traces
<b>Jour 3</b>	10	10	4	2	1
<b>Jour 4</b>	16	16	6	3	3
<b>Jour 5</b>	25	25	11	7	4
<b>Jour 6</b>	30	30	15	7	4

**Tableau 10** : Conversions estimées par jour en présence d'une quantité variable de B3G.

En effet, comme l'indique les conversions estimées, d'importantes diminutions sont observées à partir d'un ajout d'un équivalent de B3G où la quantité de peptide phosphorylée est divisée par un facteur 2. On remarque également que l'ajout d'un excès de B3G inhibe de manière

considérable le processus de phosphorylation, notamment à partir de 3 équivalents où seulement 4% de conversion estimée a été calculée après 6 jours à 30°C. Sur les spectres de masses cette inhibition est très claire puisque l'intensité des pics devient relativement faible à partir de deux équivalents de B3G après 5 jours de réaction (**Fig. 129**).



**Figure 129** : Spectres de masse des peptides P2 et pP2 en présence de B3G à t = 5j.

Ces données montrent clairement que le B3G inhibe la phosphorylation de la T205 et également le processus d'agrégation puisqu'avec 2 et 3 équivalents aucun précipité n'est observé après plusieurs semaines de réactions. La différence de comportement de la phosphorylation avec les composés **22** et **30** pourrait s'expliquer par le fait que l'EGCG serait à l'origine d'un phénomène d'allostérie qui n'est pas observée avec le B3G. Ainsi l'EGCG interagirait avec la kinase ce qui pourrait augmenter son activité, et donc la conversion en peptide phosphorylé. Dans le cas du B3G on peut supposer que l'interaction avec la thréonine 205 décrite par RMN est à l'origine de l'inhibition de la phosphorylation. Pour confirmer cette hypothèse il a été envisagé de faire des essais avec le B3 afin d'évaluer l'importance du groupement galloyle.

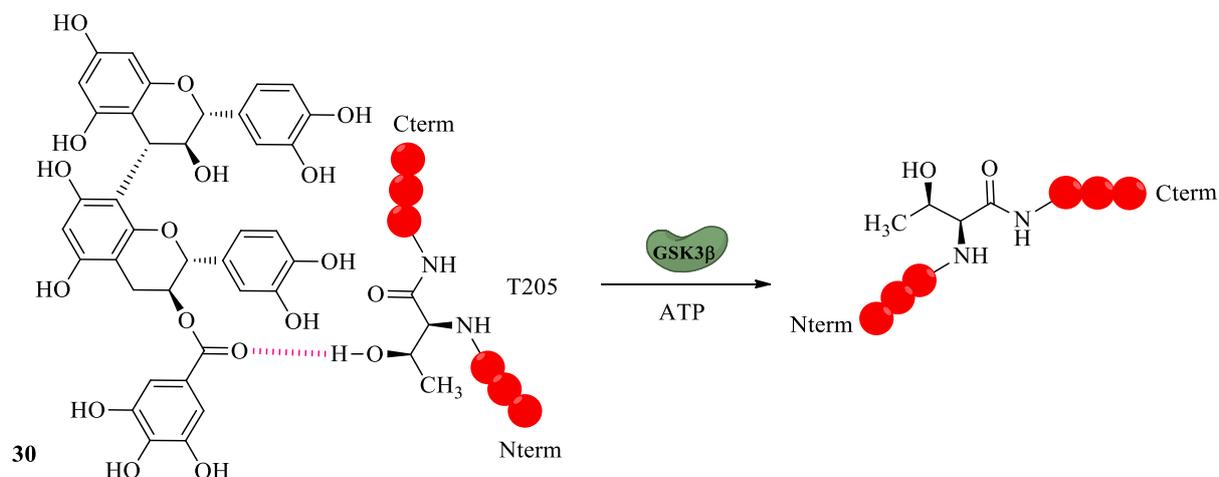
Les tests d'inhibition avec le B3 ont été réalisés avec un lot d'enzyme un peu moins bon que pour les autres et la conversion dans le blanc (avec 0 éq. de B3) était moins bonne, toutefois cela a suffi pour voir l'effet du B3. En effet, lorsque la phosphorylation est réalisée en présence de B3 une légère diminution de la conversion estimée est observée. Toutefois,

contrairement aux résultats obtenus avec le B3G, l'augmentation du nombre d'équivalents de B3 n'entraîne pas une diminution plus importante de la conversion estimée (**Tab. 11**).

Eq. B3 / Conversion %	0	1	2	3	4
Jour 1	4	4	3	3	Traces
Jour 2	6	6	3	5	4
Jour 3	10	6	4	7	6
Jour 4	13	12	8	9	7
Jour 5	16	12	8	12	12

**Tableau 11** : Conversions estimées par jour en présence d'une quantité variable de B3.

Ces données confirment l'importance du groupement galloyle dans l'inhibition du processus de phosphorylation. Si l'on recoupe ces résultats avec ceux obtenus par RMN, ayant permis de montrer que le galloyle interagit avec les sérines et les thréonines *via* une liaison hydrogène entre le carbonyle de l'ester et l'alcool des résidus, on peut donc supposer que cette liaison hydrogène entre le B3G et la T205 permet d'empêcher l'approche de l'enzyme et donc permet l'inhibition du processus de phosphorylation (**Fig. 130**).



**Figure 130** : Inhibition possible de la phosphorylation de P2 par le B3G 30.

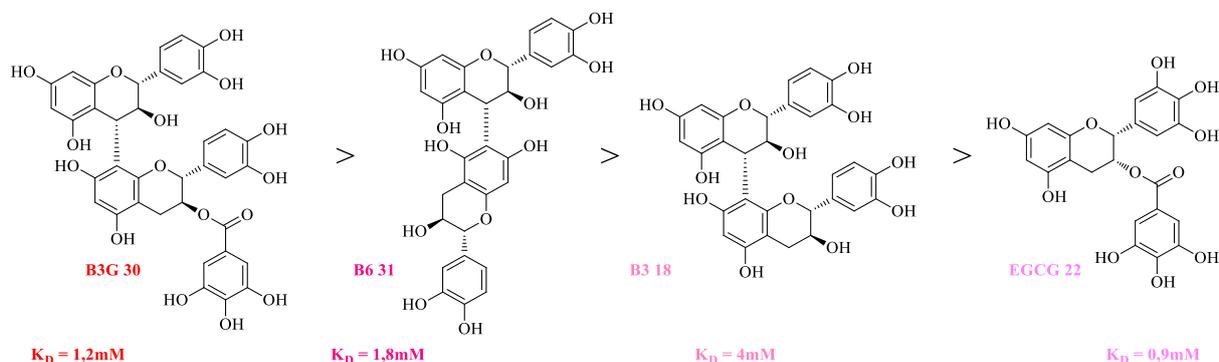
Afin de voir si la régiosélectivité de la liaison interflavane a un impact sur l'inhibition, des essais avec le **B6** ont également été réalisés. Ainsi, la réaction a été faite en présence de 1 à 4 équivalents de B6. Dans ce cas-ci, la phosphorylation sans présence de polyphénols (blanc) a conduit à des conversions estimées similaires jusqu'au 4<sup>ème</sup> jour mais les peptides ont commencé à s'agréger dès le 5<sup>ème</sup> jour, ce qui est peut-être dû à un lot de meilleure qualité (**Tab. 12**).

Eq. B6 Conversion %	0	1	2	3	4
Jour 1	2	Traces	Traces	Traces	3
Jour 2	4	3	Traces	4	6
Jour 3	10	3	Traces	4	6
Jour 4	17	4	2	6	10
Jour 5	Précipité	10	3	8	17

**Tableau 12** : Conversions estimées par jour en présence d'une quantité variable de B6.

Avec 1 et 2 équivalents de B6 une diminution de la conversion a été observée et les peptides ne précipitent pas avec 2 équivalents. Ces résultats sont assez similaires à ceux obtenus avec le B3G et si l'on compare ces résultats avec ceux obtenus pour le B3, la régiosélectivité de la liaison interflavane a bien un impact sur l'inhibition comme sur l'affinité ( $K_D B6 = 1,8mM$ ). Toutefois, lorsque l'on travaille avec un nombre d'équivalents supérieur à 2, une augmentation de la conversion estimée est observée bien qu'elle reste en dessous de celle calculée pour la phosphorylation sans l'ajout de polyphénols dans le milieu réactionnel. Il a été supposé qu'une compétition entre l'inhibition de la kinase et une augmentation de son activité, liée à un phénomène d'allostérie, serait à l'origine de la hausse de la conversion estimée lors de la présence d'une quantité trop importante de B6.

Les données récoltées lors de cette étude d'inhibition ont permis dans un premier temps, de classer les différents polyphénols selon leur capacité à inhiber les processus de phosphorylation. Ainsi, le B3G semble être le composé le plus prometteur puisqu'il inhibe non seulement le processus de phosphorylation mais aussi celui d'agrégation. De plus, l'ajout d'une quantité plus importante de B3G a un effet positif ce qui n'est pas le cas du B6 ou encore de l'EGCG où des activations de la catalyse enzymatique ont été observées. Enfin, le B3 n'a pas d'effet notable sur le processus de phosphorylation ce qui ne fait pas de cette molécule un candidat prometteur pour une éventuelle prévention de la MA (**Fig. 131**).



**Figure 131** : Classement des molécules selon leur potentiel d'inhibition.

Les résultats des tests d'inhibition ont été comparés avec les données issues de la RMN ( $K_D$ ). Globalement le potentiel d'inhibition de chaque composé est cohérent avec la constante de dissociation calculée par RMN, sauf dans le cas de l'EGCG où l'affinité pour le peptide ne semble pas refléter que cette molécule soit un mauvais inhibiteur du processus de phosphorylation. Toutefois, si l'on reprend les conversions estimées obtenues avec 1 équivalent de chaque composé l'EGCG a un potentiel d'inhibition comparable à celui du B3G. Cela montre donc que la suractivité de l'enzyme peut être causée par certaines molécules tel que l'EGCG et que l'augmentation de la conversion engendrée par ces composés n'est peut-être pas liée à une mauvaise interaction avec le peptide. De plus ces cohérences avec les constantes de dissociation montrent que l'inhibition de la phosphorylation doit être régie par les liaisons hydrogène établies entre les polyphénols et le P2.

Ainsi, nous pouvons conclure que le B3G est une molécule prometteuse pour l'inhibition de la phosphorylation de la protéine Tau et pourrait permettre de prévenir la formation des DNF puisque le processus d'agrégation est également inhibé par ce composé. Afin de confirmer ces résultats nous avons envisagé de mettre le B3G en présence d'un fragment plus important de la protéine Tau, tel que le P1P2, préalable à l'étude avec la protéine Tau intégrale.

#### 5) Mise au point de la phosphorylation sur P1P2

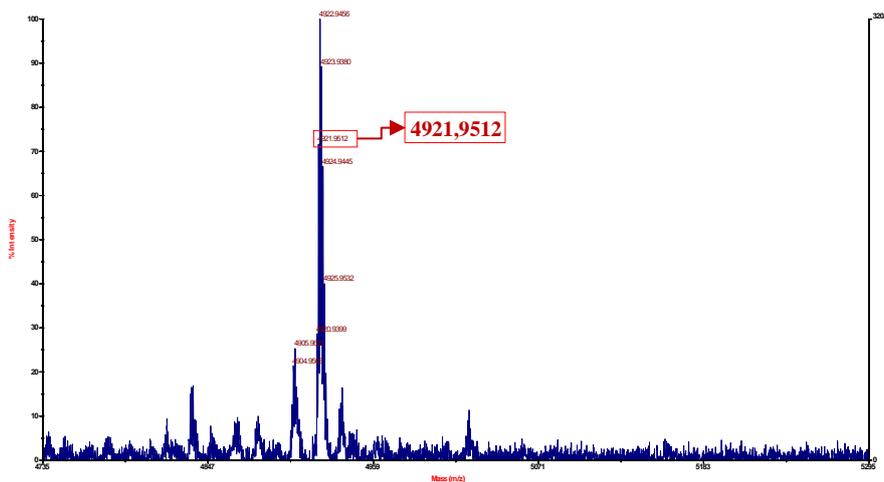
Le peptide P1P2 ( $^{171}\text{I-T}^{220}$ ), composé de 50 résidus, possède 7 sites phosphorylables par la GSK3 $\beta$ , il a donc semblé intéressant, dans un premier temps, de voir si plusieurs résidus peuvent être phosphorylés dans les conditions mises au point avec le P2 (**Fig. 132**).

$^{171}\text{IPAKTTPAPKTPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPT}^{220}$

**Figure 132 :** Sites phosphorylables du P1P2 par GSK3 $\beta$ .

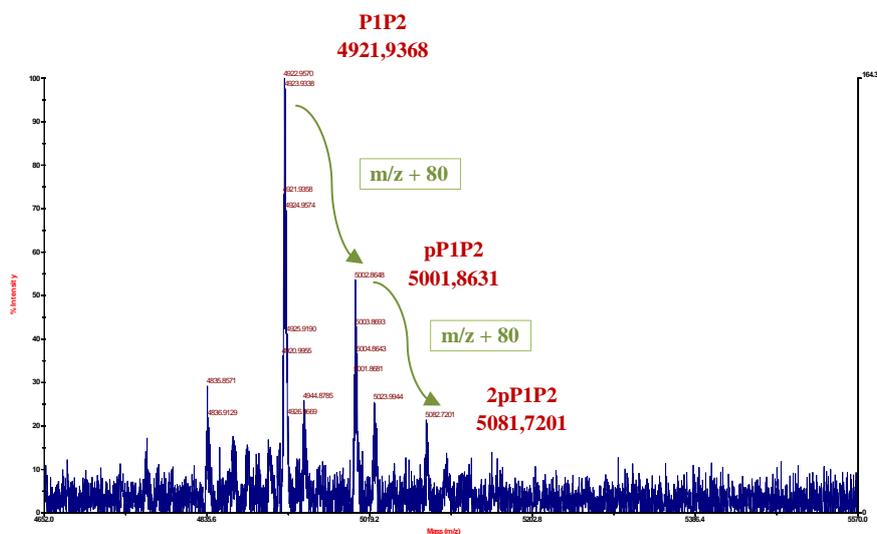
La phosphorylation de P1P2 a été réalisée dans des conditions identiques à celles utilisées pour le P2 et également en faisant varier le pH (7,5-8) et la quantité d'ATP (30-60 équivalents). Lors des premiers essais, la conversion n'a pas pu être suivie par spectrométrie de masse puisque le peptide n'était pas détectable en utilisant l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique comme matrice. D'autres matrices couramment utilisées au laboratoire telles que l'acide sinapinique **110** et l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) **111** ont également été testés mais une nouvelle fois le peptide n'a pas été détecté (**Fig. 133**).





**Figure 135 :** Spectre de masse du P1P2.

En utilisant les conditions décrites précédemment, un suivi de la phosphorylation du P1P2 a été effectué et après seulement 24h des pics correspondant au peptide phosphorylé ont été détectés. En effet, des masses monoisotopiques de 5001,86 et de 5081,72 correspondant respectivement au P1P2 monophosphorylé et diphosphorylé ont été observées (**Fig. 136, p216**).



**Figure 136 :** Spectre de masse du peptide P1P2 phosphorylé

Cette première observation est intéressante puisque deux sites sont phosphorylés dans ce cas et on pourrait supposer qu'il s'agisse de la T205 et de la S199 puisque dans le cas du P1 aucun site n'est phosphorylé et la S199 appartient aux 10 résidus n'appartenant ni à P1 ni à P2. De plus, la sérine 199 est phosphorylée par la GSK3 $\beta$  dans le cas de la MA. Des conversions ont été par la suite estimées mais la précipitation n'a pas été observée ce qui peut traduire une activité enzymatique non optimale (**Tab. 13**).

Jour	1	2	3	4	5	6
Conversion (%)	20	26	27	27	33	37

**Tableau 13** : Conversions estimées par jour.

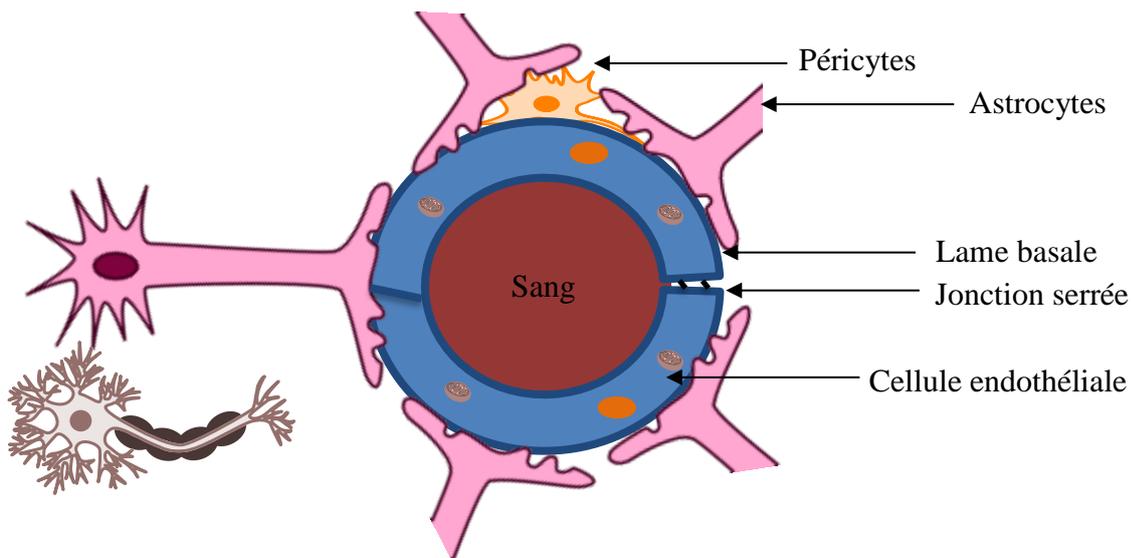
Par manque de temps, les expériences n'ont pas pu être répétées mais afin d'avoir des valeurs plus précises et répétables il est envisagé de refaire plusieurs fois cette réaction. De plus, des essais en présence de polyphénols doivent être également faits de manière à voir si, dans ce cas le processus est inhibé.

Les résultats de cette étude montrent la capacité de certains polyphénols, notamment du B3G, à pouvoir inhiber le processus de phosphorylation. Ces données sont prometteuses puisqu'il peut être envisagé d'utiliser les polyphénols comme moyen de prévenir l'apparition et/ou le développement de la formation des DNF et ainsi pour prévenir la MA. Toutefois, une information primordiale à savoir le passage des polyphénols à travers la BHE est requise pour envisager une éventuelle thérapie avec ces composés. Ainsi, si les polyphénols franchissent cette barrière biologique ils pourront être utilisés comme agents de prévention ou encore comme agents de détection de la MA grâce à l'affinité qu'ils ont avec Tau. Il a donc été envisagé de synthétiser des polyphénols marqués au  $^{18}\text{F}$  utilisable en imagerie TEP, ce qui permettrait non seulement de voir si les composés polyphénoliques passent la BHE mais également de proposer un agent détection précoce de la MA.

#### IV. Études du passage des polyphénols à travers la BHE

##### 1) Généralités

La barrière hémato-encéphalique (BHE) représente 95% de l'aire totale des barrières présentes entre le sang et le cerveau.<sup>[179]</sup> La BHE permet la protection des neurones contre de nombreux composés toxiques et pathogènes en maintenant constante la composition du milieu extracellulaire cérébral. Cette protection est optimale car la composition de la BHE est extrêmement complexe et ne permet pas aux composés hydrosolubles de diffuser facilement dans les membranes comme cela peut être le cas pour les barrières intestinales par exemple. En effet, les capillaires, qui assurent le transport de molécules du sang à travers le corps humain, ont des structures bien différentes en périphérie et dans le cerveau. Des pores de 6-7nm de diamètre entre les cellules composant les capillaires, nommées cellules endothéliales, sont présents en périphérie tandis que dans le cas des capillaires du cerveau ce sont des jonctions serrées qui assurent la diffusion des molécules.<sup>[180]</sup> Ces jonctions serrées contribuent de manière principale, à l'étanchéité de par le faible espace intracellulaire et de par leurs composition, notamment en protéines membranaires, ce qui permet une diminution considérable de la pénétration de molécules hydrosolubles. De plus, les capillaires trouvés dans le cerveau sont entourés de péricytes (30%), d'astrocytes et d'une lame basale que doivent aussi franchir les molécules avant d'atteindre les neurones (**Fig. 137**).<sup>[181]</sup>

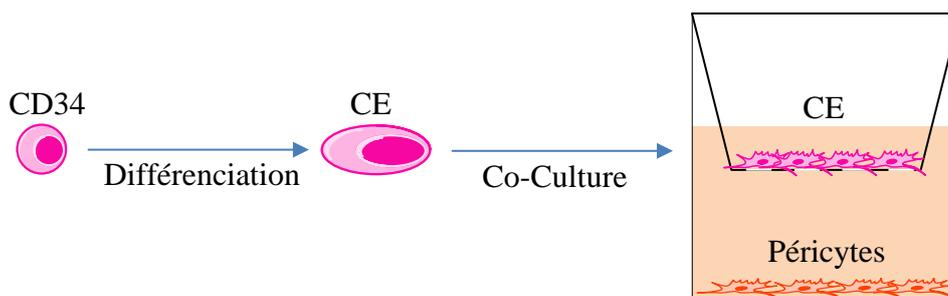


**Figure 137** : Capillaire de BHE.

La complexité de diffusion à travers la BHE pose un réel problème lorsque l'on développe des composés à visés thérapeutique et la question n'est plus seulement de savoir si la molécule est active envers sa cible mais de déterminer la capacité de ces molécules à atteindre cette cible en quantité suffisante.<sup>[182]</sup> Des chercheurs ont déterminés que sur 7000 molécules testées, seules 5% passent la barrière hémato encéphalique ce qui montre qu'il est donc primordial de déterminer la capacité des composés à passer la BHE pour envisager une thérapie.<sup>[180]</sup> L'imagerie médicale *in vivo*, telle que la TEP, et l'utilisation des modèles de BHE sont les deux techniques privilégiées à ce jour pour quantifier le transport d'une molécule à travers la BHE. Nous nous sommes intéressés à ces deux techniques dans le cas des polyphénols.

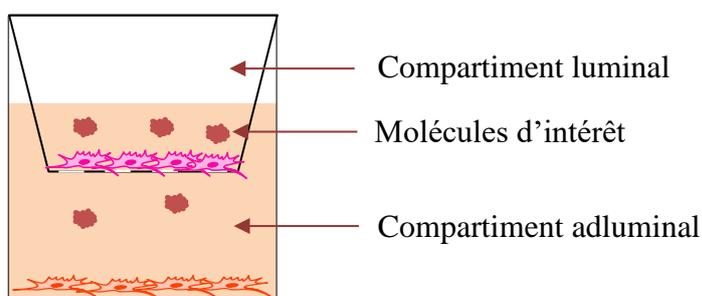
## 2) Les modèles de BHE

Depuis la génération des premières cellules endothéliales en culture, réalisée dans les années 1970, la recherche dans ce domaine a considérablement augmentée.<sup>[181]</sup> La réalisation d'un modèle de BHE repose sur des techniques de différenciation cellulaire conduisant à la formation de cellules endothéliales. Toutefois, il faut prendre en compte la complexité du phénotype de la BHE pour avoir des modèles proches de la réalité et cela va se traduire par une augmentation du nombre de jonctions serrées ainsi que par l'augmentation de l'activité de certaines protéines telle que la Glycoprotéine P (transporteur transmembranaire). Le laboratoire de la barrière hémato-encéphalique (LBHE), localisé à l'Université d'Artois, en collaboration avec le groupe de Lino Ferreira (Centre de Neurosciences et Biologie Cellulaire de l'Université de Coimbra) a mis au point des modèles de BHE présentant des marqueurs phénotypiques présents *in vivo*. Pour cela des cellules souches de type CD34<sup>+</sup> (cellules prélevées dans le sang du cordon ombilical) sont dans un premier temps différenciées en cellules endothéliales (CE) après 15-20j dans un milieu de culture. Ensuite, les cellules obtenues sont co-cultivées avec des péricytes pendant 6 jours de manière à ce que ces cellules endothéliales acquièrent le phénotype de la BHE (**Fig. 138**). Afin de vérifier la qualité du modèle, la mesure de la résistance transendothéliale (TEER) doit être faite avec un voltmètre-ohmmètre. En effet, la TEER d'un capillaire du cerveau est relativement élevée (1000-2000  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) comparée à celle d'un capillaire périphérique (10  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) ce qui se traduit par la présence de jonctions serrées.<sup>[180]</sup> Ces conditions de culture sont parfaitement reproductibles et les cellules endothéliales sont très stables, ce qui permet de faire des tests de perméabilité dans de bonnes conditions.



**Figure 138** : Procédé de formation d'un modèle de BHE.

Une fois le modèle prêt, les composés, dont on veut connaître la perméabilité membranaire, sont introduits dans le compartiment luminal, à une concentration connue, et la quantité de produit passant dans les cellules endothéliales est mesurée en fonction du temps dans le compartiment adluminal (**Fig. 139**).



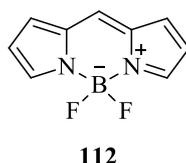
**Figure 139** : Passage des molécules d'intérêt pharmacologique à travers la BHE.

Afin de quantifier et de suivre le passage des molécules à travers la BHE plusieurs techniques peuvent être utilisées telles que le radio marquage ou l'introduction d'un motif fluorescent sur le composé.<sup>[180]</sup> D'autres voies, ne faisant pas intervenir d'étape de synthèse, peuvent également permettre la quantification du composé dans le compartiment adluminal telle que la LC-MS ou encore la HPLC.<sup>[183]</sup> Ainsi, avec ces données, la perméabilité des composés va pouvoir être calculée pour déterminer la capacité des molécules à traverser la BHE (Pe en cm/min). Au vu de la qualité des travaux réalisés dans le laboratoire LBHE, nous avons souhaité mettre en place une collaboration avec le Pr Laurence Tilloy, directrice scientifique de CELLIAL Technologies, la société de biotechnologies issue du LBHE. Nous avons choisi de travailler avec l'EGCG **22** et le B3G **30** pour réaliser ces essais puis, nous avons opté pour une quantification par HPLC à deux concentrations différentes. De manière générale, pour un composé qui passe mal la BHE, un maximum de passage de 5% a été estimé par le LBHE ce qui permet d'avoir une idée du seuil de détection par HPLC. En effet, il a été nécessaire dans un premier temps d'évaluer les teneurs auxquelles les polyphénols sont détectables afin de

savoir la concentration initiale à introduire dans le compartiment luminal. Ainsi, les teneurs maximales détectables par HPLC sont respectivement de 0,075mg/mL et de 0,1mg pour l'EGCG et le B3G. Ces tests ont été réalisés dans un tampon Ringer Hepes (RH), dans lequel sont faits les tests de perméabilité, constitué de NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, et de glucose. Le seuil de détection trouvé a impliqué de travailler avec des concentrations de 2 et 4mM de B3G et d'EGCG. Dans le cas de **30**, une toxicité pour les cellules a été observée ce qui indique que les concentrations utilisées sont trop importante alors que pour **22** c'est le composé qui semble se dégrader. Ces données indiquent très clairement que les concentrations utilisées ne sont pas adaptées pour ce genre de tests et qu'il faudrait réussir à diminuer ces concentrations à 10µM minimum. La spectrométrie de masse semble être bien plus adaptée dans ce cas, toutefois cela nécessite la mise au point d'une quantification LC-MS et le laboratoire ne possède pas l'expertise nécessaire dans ce domaine. Il a donc été envisagé d'introduire des fluorophores pour faciliter le suivi du passage des polyphénols à travers la BHE. Le LBHE nous a demandé d'utiliser des fluorophores dont les spectres excitation/émission se situent entre 400-700nm. Nous avons donc choisi de travailler avec des BODIPY, qui sont couramment utilisés en bio-imagerie, puisque les spectres excitation/émission sont classiquement décrits dans cette gamme de longueurs d'ondes.<sup>[184],[185]</sup>

- Les BODIPY

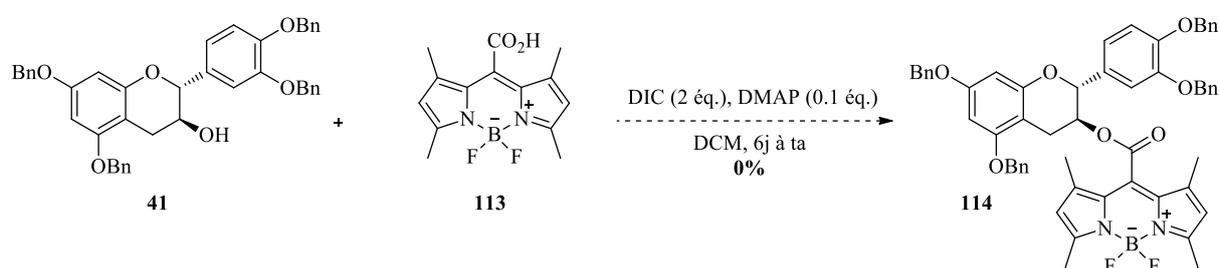
Depuis une dizaine d'année, le BODIPY **112** (difluoro-boron-dipyrrrométhène) et ses dérivés sont largement utilisés pour l'imagerie cellulaire et *in vivo* (**Fig. 140**).



**Figure 140** : Structure du BODIPY.

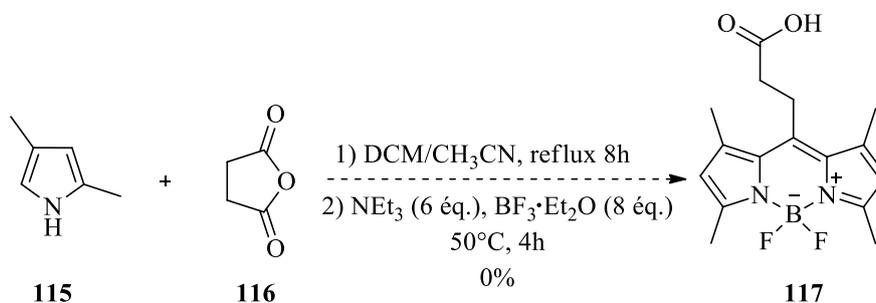
Ces composés trouvent leurs places dans les applications biologiques car ils sont stables dans le milieu cellulaire, ils possèdent un coefficient d'absorption molaire relativement élevé ainsi qu'un rendement quantique de fluorescence important. De plus ces molécules sont fonctionnalisables à différentes positions ce qui permet de les bioconjuguer avec des biomolécules telles que des protéines ou de l'ADN. Les essais de fonctionnalisation des polyphénols ont été réalisés sur la catéchine benzylée **41**. La première idée était de pouvoir

réaliser une réaction d'estérification entre l'alcool libre de **41** en position 3 et le BODIPY en se basant sur les travaux réalisés par l'équipe de Peng en 2009.<sup>[185]</sup> Cette stratégie repose sur la fonctionnalisation du BODIPY en position méso par un acide carboxylique pour ensuite bioconjuguer ce fluorophore à une protéine. Lors de précédents travaux au sein de l'équipe, réalisés par Thomas Cornilleau, la synthèse d'un BODIPY fonctionnalisé par un acide carboxylique **113** a été faite. Ainsi, un test de conjugaison a été réalisé sur **41** en utilisant du DIC en excès en présence d'une quantité catalytique de DMAP (**Fig. 141**). Malgré plusieurs jours de réaction aucune trace du produit désiré **114** n'a été détectée et seuls les produits de départ ont été récupérés en fin de réaction.



**Figure 141** : Synthèse du composé **114**.

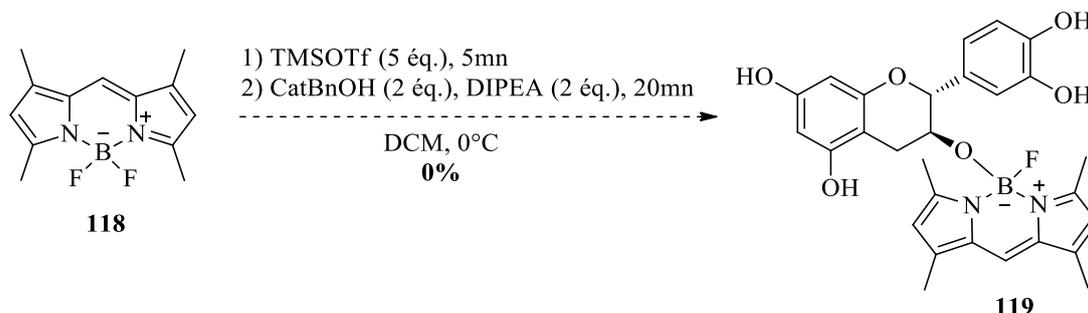
Il a été supposé que la réaction ne se faisait pas à cause de problèmes d'encombrement stérique, alors la synthèse d'un BODIPY avec un allongement de la chaîne carbonée portant la fonction carboxylique a été envisagée. Pour cela, les conditions mises au point par l'équipe de Peng ont été reproduites au laboratoire en mettant en présence le diméthylpyrole **115** et l'anhydride succinique **116**. Après 8h d'agitation à reflux de la triéthylamine et du trifluorure de bore diéthylétherate ont été ajoutés au milieu réactionnel. Après purification, le produit **117** n'a malheureusement pas été récupéré malgré un rendement de 21% annoncé dans la publication (**Fig. 142**).



**Figure 142** : Synthèse du BODIPY **117**.

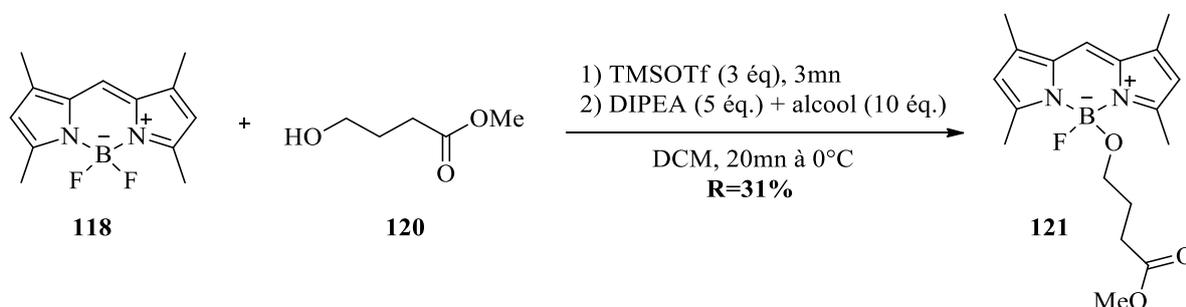
Malgré plusieurs essais, la synthèse de **117** n'a pas pu être reproduite, nous obligeant à revoir la stratégie de notre synthèse. En 2014, l'équipe de Mazitschek a mis un point une synthèse

basée sur la substitution d'un des atomes du fluor du BODIPY par des alcools substitués tel que l'éthylène glycol avec des rendements avoisinant les 40%.<sup>[184]</sup> Ainsi les conditions développées par cette équipe ont été testées en mettant en présence le BODIPY **118** de triflate de triméthylsilyle avant d'ajouter la catéchine benzylée **41** et de la DIPEA. Après traitement et purification aucune trace du produit attendu **119** n'a été observée (**Fig. 143**).



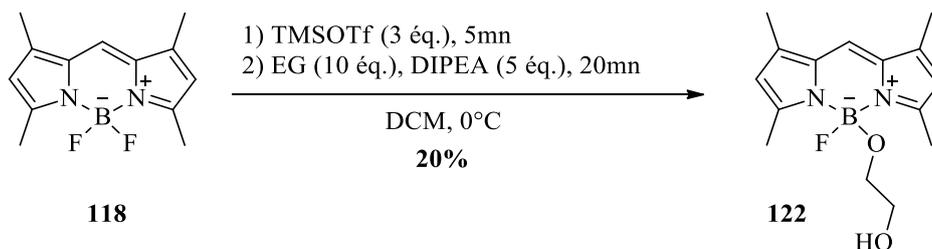
**Figure 143** : Synthèse de **119**.

Une nouvelle fois, l'hypothèse est que l'encombrement stérique ne permet pas la réaction. Afin de le vérifier, la réaction a été reproduite en utilisant l'ester **120** synthétisé à partir de la  $\gamma$ -butyrolactone. Dans ce cas le composé **121** a été obtenu avec un rendement de 31% après purification (**Fig. 144**, p217).



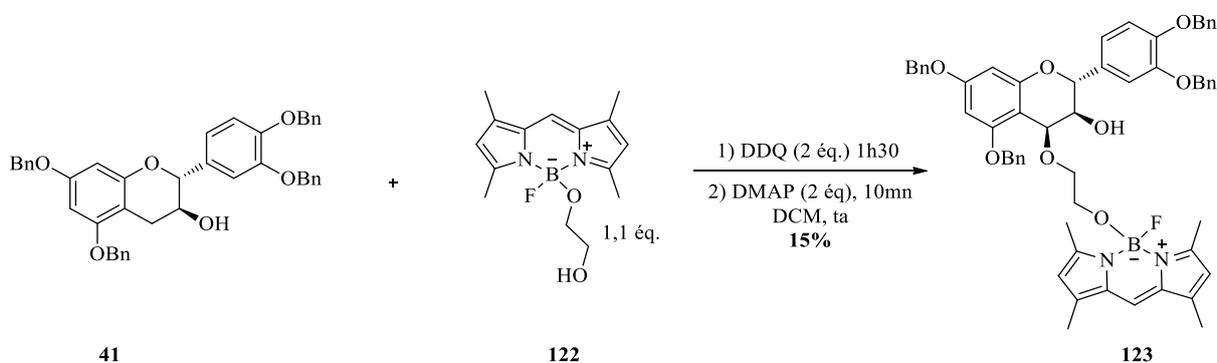
**Figure 144** : Synthèse de **121**.

Plusieurs essais ont été réalisés afin de saponifier l'ester **121** afin de pouvoir faire une estérification avec l'alcool en position C3 de la catéchine **41**. Toutefois, malgré plusieurs tests le composé souhaité n'a pas été obtenu et une perte de la chaîne alcoyle a été détectée. A partir de ces résultats, il a été envisagé de ne plus passer pas une étape d'estérification mais pas une oxydation de la position C4 en présence de DDQ. Pour cela, un fluor du BODIPY **118** a été substitué par l'éthylène glycol en se basant sur les conditions précédemment décrites avec le triflate de triméthylsilyle. Ainsi, après purification, le composé **122** a été obtenu avec un rendement de 20% (**Fig. 145**, p218).



**Figure 145** : Synthèse de **122**.

En se basant sur les conditions d'activation par l'éthylène glycol décrit en partie II, la catéchine **41** a été mis en présence de **122** et de DDQ pour conduire, après traitement et purification au composé **123** avec un rendement de 15% (**Fig. 146**).



**Figure 146** : Synthèse de **123**.

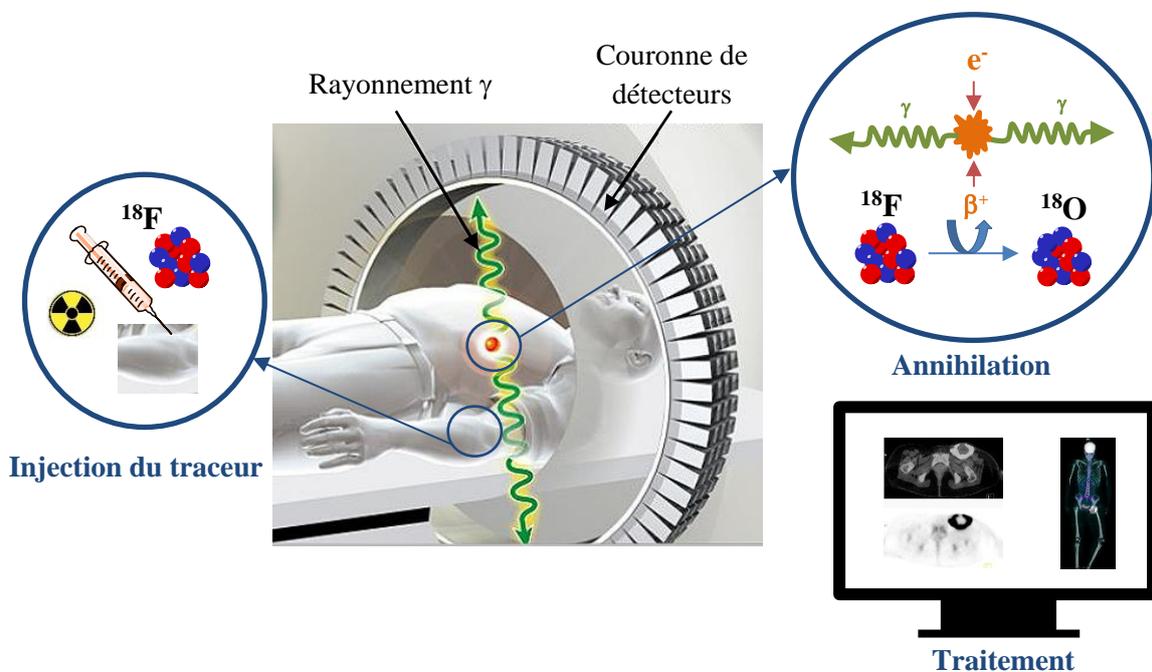
Bien que le produit ait été isolé, une quantité relativement faible a été obtenue (2mg) et le rendement laisse présager que dans le cas du B3G un rendement plus faible serait obtenu. Cette manipulation n'a pas été répétée mais des essais ont directement été effectués sur le B3G **30** et malheureusement le produit désiré n'a pas été détecté.

Au vu de ces résultats, il a été conclu que la mise au point d'une synthèse permettant l'accès à des polyphénols marqués avec une sonde fluorescente de type BODIPY est trop délicate et ne permet pas de conduire aux composés souhaités. Il est donc primordial de développer une synthèse efficace permettant l'accès à des polyphénols marqués analysables dans le cadre de tests de passage de la BHE. Le laboratoire travaillant par ailleurs sur la synthèse de radiotraceurs pour la TEP, nous avons envisagé de développer la synthèse de polyphénols marqués au  $^{18}\text{F}$  dans l'optique de pouvoir réaliser des tests *in vivo*.

### 3) Polyphénols et TEP

- Principe

La Tomographie Par Emission de positons est basée sur la détection d'une faible quantité d'une substance biologique, appelée traceur, marquée avec un radioélément émetteur de positons ( $\beta^+$ ).<sup>[186]</sup> Cette technique est utilisée de manière importante dans les domaines clinique, médicale et biologique puisqu'elle permet de suivre des phénomènes biologiques à l'échelle moléculaire. La TEP prend une place importante dans les domaines de l'oncologie, de la cardiologie et de la neurologie. Les avantages de cette technique est qu'elle est non invasive et qu'elle utilise des traceurs hautement spécifiques telles que des substances biologiques sans que leurs propriétés soient affectées par le radio marquage. Les émetteurs de positons généralement utilisés sont le  $^{11}\text{C}$ , le  $^{18}\text{F}$ , le  $^{15}\text{O}$  et le  $^{13}\text{N}$ . Ainsi, lors de la dégradation du radioélément en élément stable, un positon ( $\beta^+$ ) est émis et c'est sur cette particule que repose la technique. En effet, après une traversée de quelques mm dans les tissus, le positon s'annihile avec un électron ce qui génère 2 rayonnements  $\gamma$  qui évoluent dans des directions parfaitement opposées avec une énergie de 511keV. Ces rayonnements sont détectés en coïncidence par une couronne de détecteurs puis, après traitement des données *via* des logiciels informatiques, des images sont générées (**Fig. 147**).



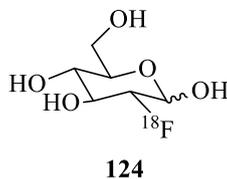
**Figure 147** : Principe de la TEP.

Les radionucléides ( $^{11}\text{C}$ , le  $^{18}\text{F}$ , le  $^{15}\text{O}$  et le  $^{13}\text{N}$ ) sont généralement produits lors d'une réaction nucléaire à l'aide d'un cyclotron. Ces radioéléments sont caractérisés par leur temps de demi-vie ( $t_{1/2}$ ) correspondant au temps nécessaire à la désintégration de la moitié des atomes radioactifs, par leur mode de décroissance et par leur radioactivité spécifique (RAS). Le temps de demi-vie des radioéléments est très court nécessitant une proximité entre le centre médical et le cyclotron mais également une radiochimie extrêmement efficace (**Tab. 14**).

Radioélément	$t_{1/2}$ (mn)	RAS (GBq/mol)	Produit de désintégration
$^{18}\text{F}$	109,8	$6,33 \cdot 10^{10}$	$^{18}\text{O}$
$^{11}\text{C}$	20,4	$3,41 \cdot 10^{11}$	$^{11}\text{B}$
$^{13}\text{N}$	9,96	$6,98 \cdot 10^{11}$	$^{13}\text{C}$
$^{15}\text{O}$	2,08	$3,36 \cdot 10^{12}$	$^{15}\text{N}$

**Tableau 14** : Caractéristiques des radioéléments émetteurs  $\beta^+$ .

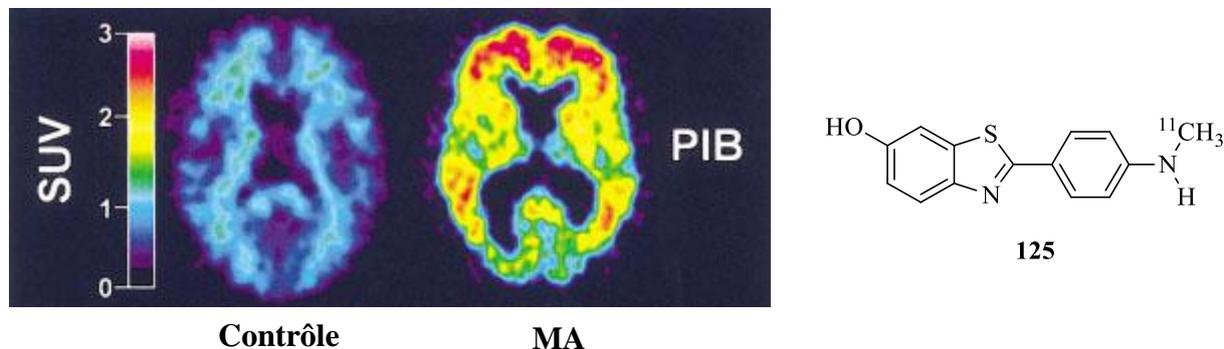
Le fluor est le radioélément principalement utilisé pour l'imagerie TEP et de nombreuses synthèses de traceurs sont abouties et ont conduit à des composés utilisés en clinique en routine dans le domaine médical tel que le [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG **124** (**Fig. 148**).



**Figure 148** : Structure du [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG.

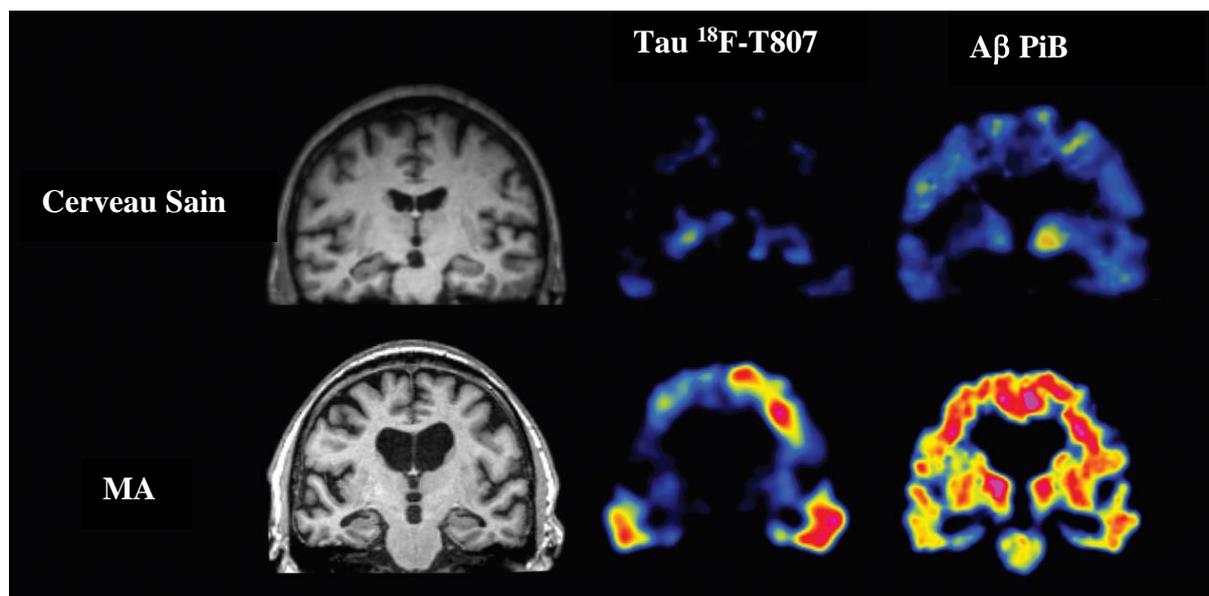
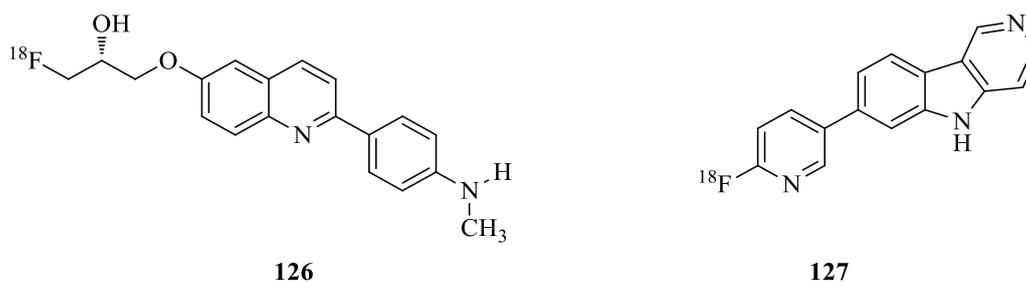
- TEP et MA

A ce jour, le diagnostic de la MA est relativement long à établir dès lors que les premiers symptômes apparaissent (24 mois en France). Ce diagnostic repose sur une évaluation neuropsychologique, un examen d'imagerie médicale et un examen neurologique. Toutefois, certains symptômes tel que le trouble oculomoteur ne sont pas détectables à un stade précoce de la maladie. Malgré un examen d'imagerie médicale permettant de visualiser une perte de volume du cerveau, les lésions cérébrales microscopiques telles que la formation de plaques amyloïdes ou de DNF ne peuvent être observées. Il n'existe donc à ce jour aucun moyen de détecter la MA de manière précoce, or, cette information est indispensable pour la prévention de cette maladie. La TEP semble être la technique la plus appropriée pour comprendre et visualiser les différents stades de l'agrégation de Tau. Depuis le succès des essais de visualisation des peptides A $\beta$  par le composé Pittsburgh B (PiB) **125**, un dérivé de la thioflavine T, de nombreuses molécules sont à ce jour en essai clinique pour le développement de traceurs spécifiques. En effet, en 2004 Klunk *et coll.* ont proposé les premiers traceurs permettant d'obtenir une information quantitative sur les dépôts de plaques amyloïdes chez certains patients avec le composé **125** (Fig. 149).<sup>[187]</sup>



**Figure 149** : Image issue de la TEP d'un cerveau sain (contrôle) et d'un cerveau atteint par la MA après injection de **125**. SUV : Standardized Uptake Value (index caractérisant la fixation du traceur).

Ces résultats sont prometteurs mais il est tout de même primordial de mettre au point un traceur permettant également de détecter la formation des DNF à un stade précoce de la MA. A la suite de ces résultats des traceurs, tels que le THF5117 **126** et le  $^{18}\text{F}$ -T807 **127**, ont été développés permettant de voir l'accumulation de PHF dans le cerveau (Fig. 150).<sup>[188]</sup>



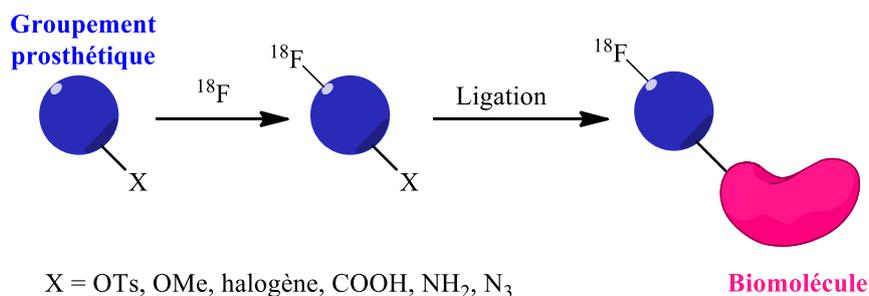
**Figure 150** : Structure de THF5117 **126** et le  $^{18}\text{F}$ -T807 **127** (haut) et imagerie médicale d'un cerveau sain et d'un cerveau atteint de la MA : (gauche) IRM, (milieu) TEP après injection de **127** et (droite) après injection de **125**.

Comme le montre les images TEP, la localisation des DNF et des plaques amyloïdes sont différentes ce qui montre la réelle nécessité de synthétiser des traceurs capables de cibler spécifiquement Tau et A $\beta$ . Cela permettra non seulement de réaliser une détection précoce des régions du cerveau affectées mais également de comprendre de manière plus précise les différents mécanismes conduisant à la MA. Les traceurs **126** et **127** ne sont malheureusement pas idéaux pour une quantification des agrégats de Tau dans le cerveau car des rétentions de ces molécules ont également été observées chez des patients non atteints par la MA. Ces données montrent l'importance de développer des nouveaux traceurs ciblant l'agrégation de la protéine Tau. Or, les polyphénols montrent une affinité envers cette protéine qui permet d'envisager d'utiliser ces composés pour l'imagerie TEP. Le laboratoire travaille depuis quelques années au développement de nouveaux traceurs pour la TEP. Des travaux ont donc été réalisés, en se basant sur ces précédentes études, de manière à proposer un traceur dérivant d'un polyphénol.

Au sein du groupe des stratégies de marquage au fluor 18 ont été mises au point et bien que cet élément de soit pas présent dans les biomolécules, les travaux précédents ainsi que le temps de demi-vie nous ont conduit à travailler avec ce radioélément.<sup>[189]</sup>

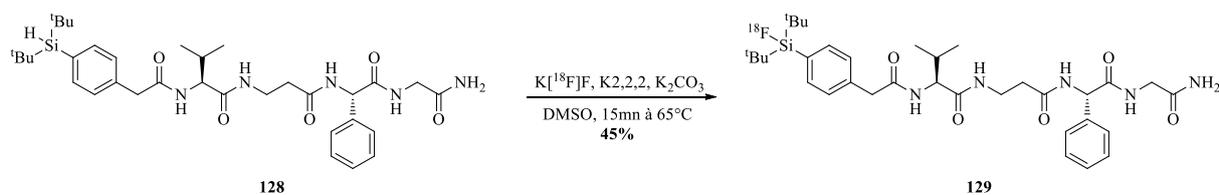
- Marquage au fluor

Deux types de fluoration sont à ce jour utilisées pour le radiomarquage de molécules d'intérêts : la fluoration directe et indirecte. La fluoration indirecte est une technique très répandue consistant à fluorer des molécules complexes et relativement sensibles aux conditions du fluoration classiques telles que les protéines. Cette technique nécessite l'utilisation d'une petite molécule robuste, appelée groupement prosthétique, préalablement radiomarquée et composé d'un site de ligation pour réaliser la réaction de couplage avec la biomolécule (**Fig. 151**).



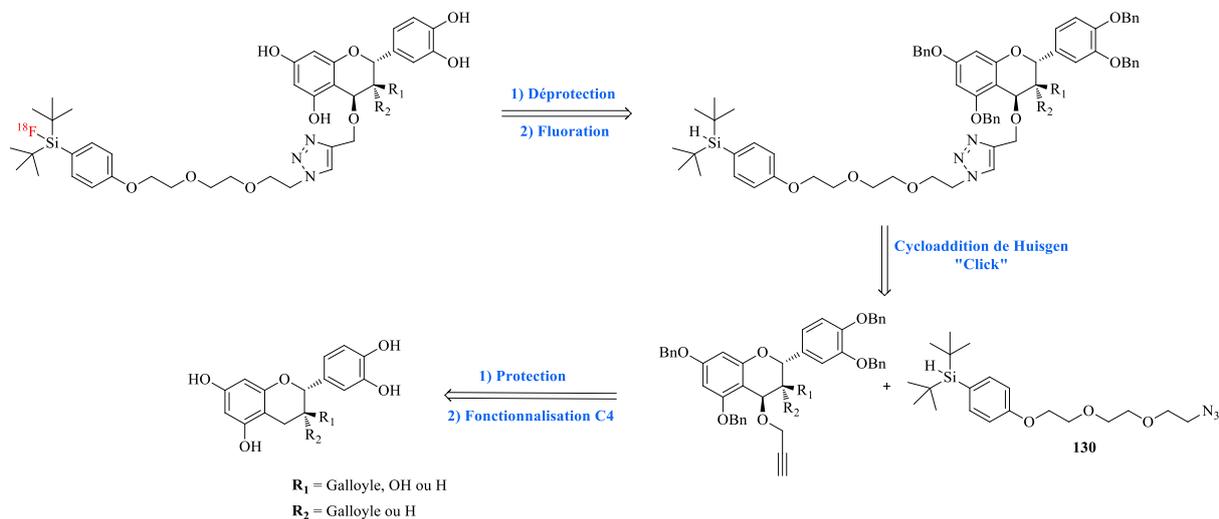
**Figure 151** : Stratégie de fluoration indirecte.

Bien que cette méthodologie permette de conserver l'intégrité des biomolécules elle n'est pas idéale car elle requière une synthèse multi-étapes augmentant le temps de synthèse. Or, le Fluor 18 possède un temps de demi-vie relativement court, il est donc primordial que l'insertion de ce radioélément se fasse en dernière étape de manière à avoir plus de temps et une meilleure résolution lors de l'analyse. C'est pourquoi, depuis quelques années plusieurs équipes de recherches développent des méthodologies de fluoration biocompatibles. La liaison Si-F possède une énergie plus forte que la liaison Si-C ce qui implique une meilleure stabilité *in vivo*, c'est pourquoi cette voie d'introduction du radioélément a été particulièrement étudiée. En effet, en 2008, le groupe d'Ametamey a proposé une fluoration directe du peptide **128** par une substitution nucléophile sur un atome de silicium conduisant à **129** avec un rendement corrigé de 45% (**Fig. 152**).<sup>[190]</sup>



**Figure 152** : Fluoration selon les conditions d'Ametamey.

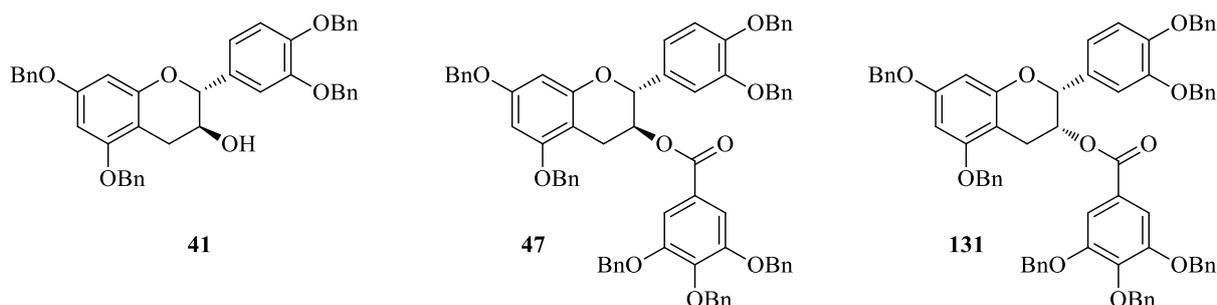
Bien que la liaison Si-F possède une haute énergie, elle reste hydrolysable et les substituants du Silicium ont une grande importance. Les substituants permettant une stabilisation optimale de cette liaison contre l'hydrolyse sont les groupements *t*Butyles. En effet, des temps de demi vie ont été estimés supérieurs à 170h pour des aryldi-*t*butylsilanes alors qu'avec des méthyles on descend à seulement 5mn. Les groupements isopropyles sont également utilisables puisque le temps de demi-vie de la liaison Si-F est d'environ de 10h.<sup>[190]</sup> Dans le cas de la synthèse d'Ametamey l'aryldi-*t*butylsilane a été introduit *via* un couplage peptidique. Au laboratoire, une stratégie utilisant la chimie « click », *via* la cycloaddition 1,3 dipolaire de Huisgen, a été mise au point pour introduire ce motif silylé sur des nucléosides et des oligonucléotides avec d'excellents rendements.<sup>[189],[191]</sup> Ces méthodologies développées au sein du groupe sont biocompatibles et parfaitement reproductibles, c'est pourquoi nous avons choisi de les appliquer aux polyphénols (**Fig. 153**).



**Figure 153** : Stratégie de fluoration des polyphénols.

a) Chimie « click » et polyphénols

Pour réaliser cette étude, trois polyphénols ont été utilisés : la catéchine benzylée **41** (modèle pour la mise au point de la déprotection), la catéchine benzylée galloylée **47** (dans l'optique de la préparation du B3G clickée) et l'épicatéchine galloylée **131** (structure proche de l'EGCG) (**Fig. 154**).

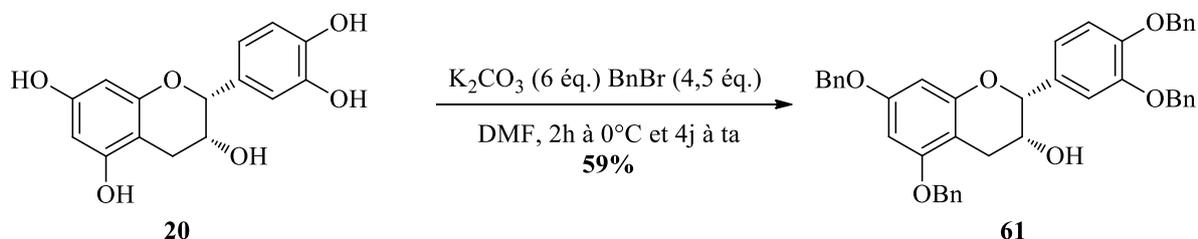


**Figure 154** : Polyphénols utilisés pour la mise au point de la stratégie de fluoration.

Dans un premier temps il a été nécessaire de propargylée ces différentes molécules ainsi que de préparer la plateforme silylée en vue du couplage par chimie « click ».

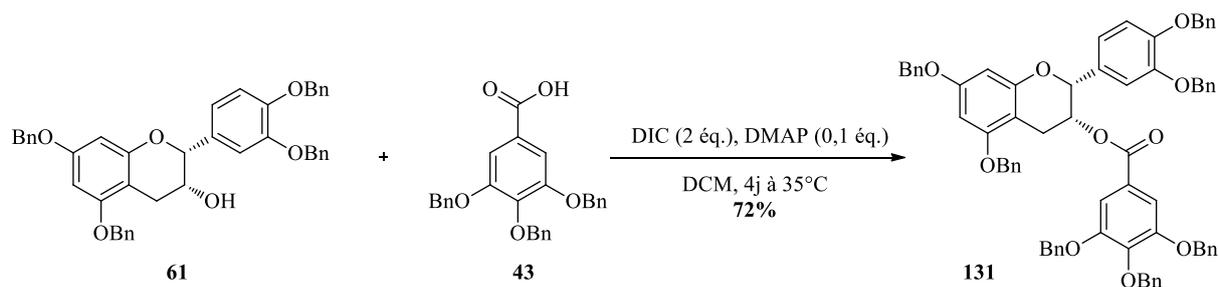
- Synthèse des monomères propargylés

Les conditions de synthèse des composés **41** et **47**, décrites dans la partie II, ont été reprises et appliquées à la préparation de l'épicatéchine galloylé (ECG) **131**. Ainsi, comme pour la catéchine, la protection des alcools phénoliques a été réalisée en mettant en présence l'épicatéchine **20**, le bromure de benzyle et le  $K_2CO_3$ . Ainsi, après 4 jours d'agitation à température ambiante, le produit a été purifié pour conduire à l'épicatéchine **61** avec un rendement de 59% (**Fig. 155, p219**).



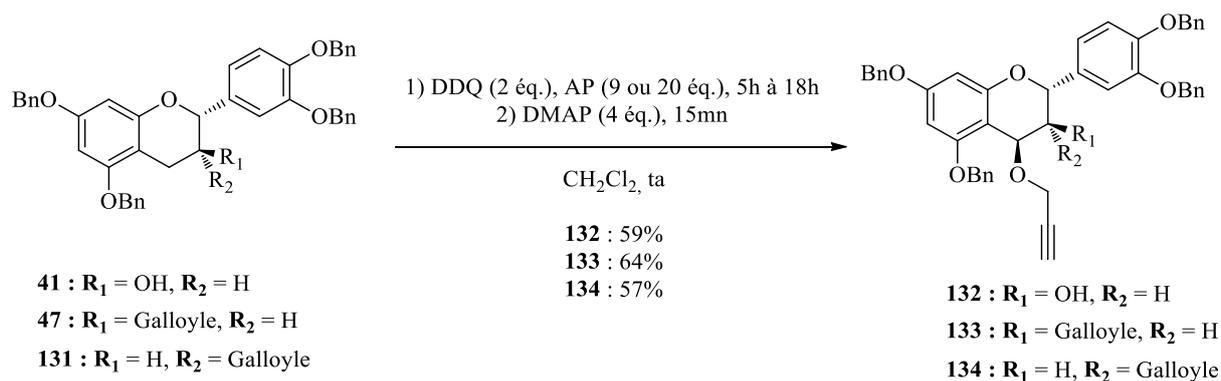
**Figure 155** : Benzylation de l'épicatéchine.

Le composé **61** a ensuite été galloylé de manière à obtenir **131** dans les mêmes conditions que celles décrites avec la catéchine **41** utilisant le DIC et la DMAP en présence d'acide gallique tri-benzylé **43**. Notons que, dans ce cas-ci, la réaction est plus longue (4 jours au lieu de 2) mais conduit au composé désiré **131** avec un rendement de 72% après purification (**Fig. 156, p220**). Des essais avaient également été conduits avec les conditions initialement mises au point par Marie Guéroux avec le DCC mais des rendements inférieurs à 20% ont été obtenus avec une purification relativement délicate.



**Figure 156** : Benzoylation de l'épicatéchine.

Pour réaliser la cycloaddition de Huisgen avec la plateforme silylée, l'introduction d'un alcyne sur le polyphénol a été nécessaire. En 2010 l'équipe de Hayes a proposé une activation du carbone 4 par l'alcool propargylique (AP) dans le but de réaliser la synthèse du dimère B3. Cette synthèse est basée sur le mode opératoire initialement décrit par l'équipe de Roux, c'est-à-dire *via* l'utilisation du DDQ ce qui a conduit à la catéchine benzylée propargylée **132** avec un rendement de 98%.<sup>[192]</sup> Les conditions décrites dans cette publication ont été optimisées lors de la thèse de Marie Guéroux, de manière à synthétiser divers dimères dont les monomères activés étaient soit la catéchine **41** ou l'épicatéchine **61**. La seule différence dans les conditions d'activation de ces deux monomères est le nombre d'équivalents d'alcool propargylique ajouté dans le milieu réactionnel (9 équivalents pour **41** et 20 pour **61**). Ainsi, ces conditions ont été appliquées à **41** (avec 9 équivalents d'AP), à **47** et à **131** (avec 20 équivalents d'AP) en utilisant un excès de DDQ à température ambiante. Après purification **132**, **133** et **134** ont été obtenus avec des rendements respectifs de 59%, 64% et 57% (**Fig. 157, p221-223**).

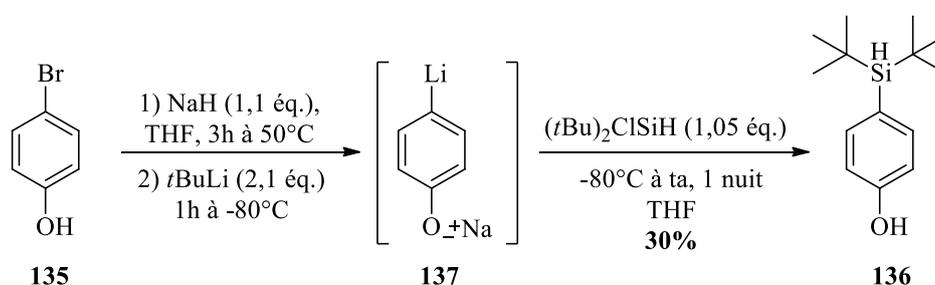


**Figure 157** : Propargylation des polyphénols.

- Synthèse de la plateforme silylée

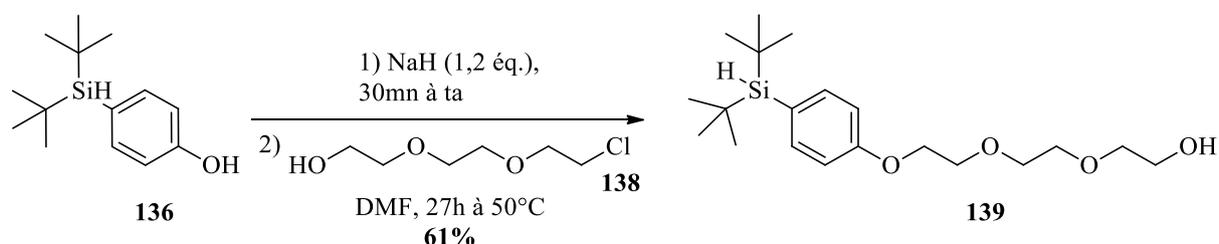
Afin de pouvoir radiomarquer les polyphénols avec du fluor 18, la synthèse du précurseur silylé **130** a été réalisée. Celui-ci se compose de l'arylsilane, portant deux groupements *t*Butyl nécessaire à la stabilité *in vivo* de la liaison Si-F, d'une chaîne PEG (polyéthylène Glycol), permettant de contrebalancer la lipophilie apportée par l'aryldi-*tert*-butylsilane, et d'un azoture intervenant dans l'étape de cycloaddition de Huisgen.

La première étape a été réalisée à partir du bromophénol **135** selon des conditions adaptées de Schreiber *et coll.* donnant ainsi accès à l'aryldi-*tert*-butylsilane **136** grâce à la formation d'un intermédiaire lithié.<sup>[193]</sup> Ainsi, le bromophénol est mis en présence de NaH pendant 3h, permettant de s'affranchir d'une étape de protection de l'alcool par formation d'un alcoolate, puis du *t*BuLi a été ajouté dans le milieu réactionnel de manière à obtenir l'intermédiaire **137**. Après 1h d'agitation le chlorodi-*tert*-butylsilane a été introduit puis, après 1 nuit la réaction, a été hydrolysée puis purifiée de manière à obtenir **136** avec un rendement de 30% (**Fig. 158**, p224).



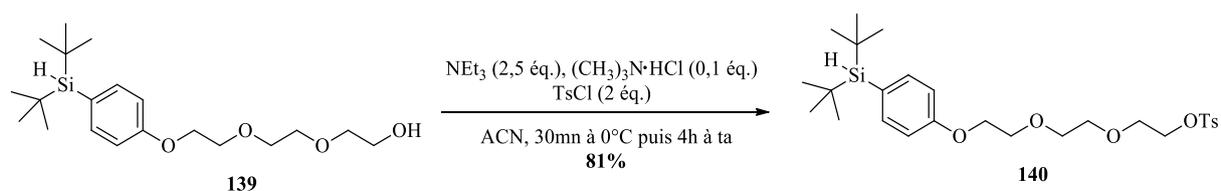
**Figure 158** : Synthèse de l'aryldi-*tert*-butylsilane **136**.

Le composé **136** a ensuite été fonctionnalisé par une chaîne PEG *via* une substitution nucléophile à partir du dérivé chloré du tri éthylène glycol **138**. Pour cela, **136** a été mis en présence de NaH et après 30mn d'agitation **138** a été ajouté au milieu réactionnel. L'arylsilane fonctionnalisé **139** a été obtenu avec un rendement de 61% après purification (**Fig. 159, p225**).



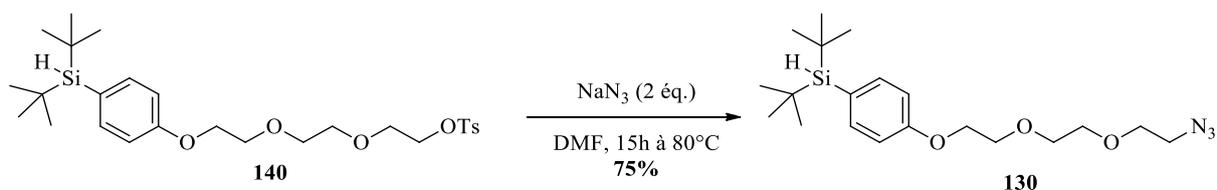
**Figure 159** : Synthèse de l'arylsilane fonctionnalisé avec une chaîne PEG **139**.

Afin de substituer l'alcool **139** par l'azoture, une augmentation du caractère nucléofuge de celui-ci doit être effectuée. Pour cela, l'alcool a été fonctionnalisé par un groupement tosylo selon les conditions établies par l'équipe de Tanabe.<sup>[194]</sup> Cette synthèse fait appel à l'utilisation d'une quantité catalytique de chlorhydrate de triméthylamine en présence d'un excès de triéthylamine. Cette technique permet de s'affranchir de l'utilisation d'un large excès de pyridine pouvant conduire à des réactions secondaires limitant les rendements de la réaction. Ainsi, **139** a été mis en présence de triéthylamine, de chlorhydrate de triméthylamine et de chlorure de tosylo pour conduire à **140** avec un rendement de 81% (**Fig. 160, p226**).



**Figure 160** : Tosylation de **139**.

La dernière étape conduisant à l'obtention de la plateforme **130**, a été l'introduction de l'azoture par une substitution nucléophile. Pour cela, **140** a été mis en présence d'azoture de sodium à 80°C pendant 15h pour conduire, après purification, à **130** avec un rendement de 75% (**Fig. 161, p227**).

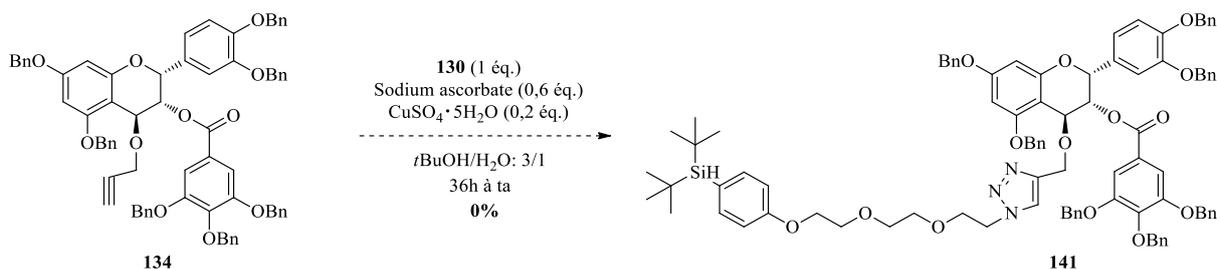


**Figure 161** : Substitution du tosyte par l'azoture.

Une fois les deux synthons de départ préparés, ils ont été engagés dans des réactions « click » de type cycloaddition de Huisgen.

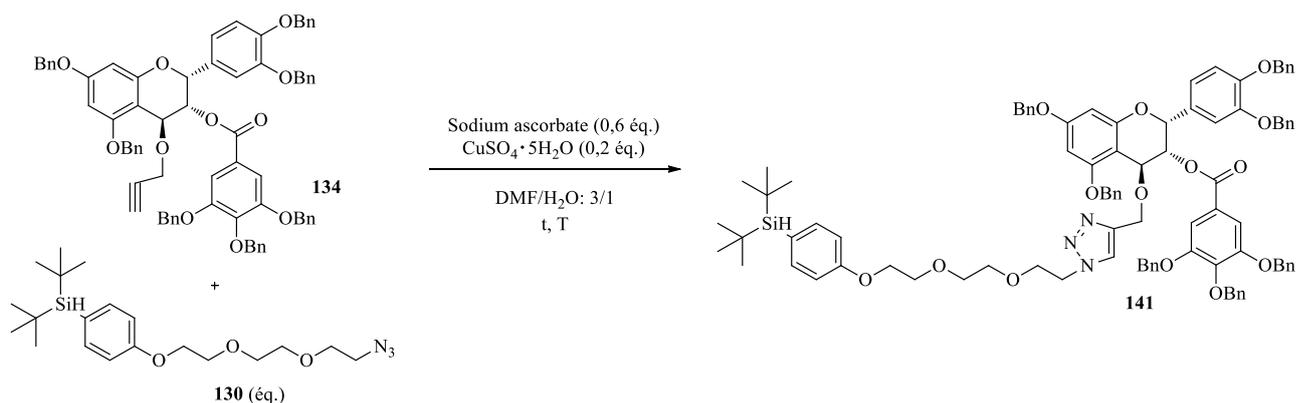
- Cycloaddition de Huisgen

La mise au point de la réaction a été faite sur l'épicatéchine galloylée **134** en reprenant dans un premier temps les conditions décrites par Thomas Bordenave au cours de ces travaux de thèse. Ainsi, **134** a été mis en présence de 0,6 équivalents d'ascorbate de sodium, 0,2 équivalents de sulfate de cuivre et de 1 équivalent de **130** dans un mélange tBuOH/H<sub>2</sub>O (3/1) à température ambiante. Toutefois, dans ces conditions **134** n'est pas soluble et malgré 36h dans le milieu réactionnel le produit attendu **141** n'est pas détecté (**Fig. 162**).



**Figure 162** : Conditions de chimie « click » mises au point par T. Bordenave.

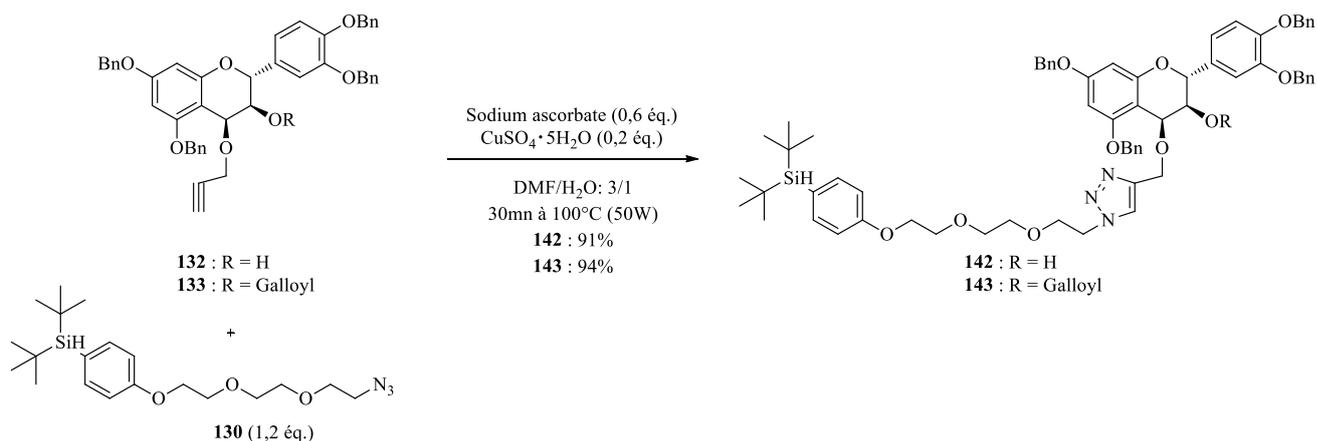
Afin de pallier à ce problème de solubilité il a été envisagé dans un premier temps de remplacer le solvant par un mélange DMF/H<sub>2</sub>O (9/1). Dans ce cas la solubilité est totale mais malgré plusieurs jours d'agitation à ta seules des traces du produit **141** sont observées. Ce résultat est encourageant, et nous avons choisie de travailler avec le DMF/H<sub>2</sub>O dans le ratio 3/1 de manière à également permettre la solubilité des espèces non miscibles dans les solvants organiques. Diverses conditions ont été testées, notamment en changeant la température et les sources de chauffage (micro-ondes ou bain d'huile), les temps de réactions et le nombre d'équivalents de **130** (**Fig. 163, p228**).



Entrée	Température (°C)	Equivalents 130	Temps	Rendement (%)
1	40°C	1	3h30	30%
2	50°C	1	22h	40%
3	100°C (MW)	1	30mn	28%
4	50°C	1,2	18h	90%
5	<b>100°C (MW)</b>	<b>1,2</b>	<b>30mn</b>	<b>92%</b>

**Figure 163** : Optimisation de la « click ».

D'après ces différentes données la température de travail semble avoir une forte influence sur le rendement et sur le temps de la réaction. En effet, lorsque l'on chauffe fortement (100°C) aux micro-ondes des rendements relativement proches sont observés mais les temps de réaction sont fortement diminués (**Entrée 1, 2 et 3**). Ces différents résultats montrent également qu'il faut travailler avec un excès de plateforme ce qui conduit à d'excellents rendements (**Entrée 4 et 5**). Au vu de ces différents résultats, il a été choisi de travailler sous activation micro-ondes à 100°C (50W) et avec un léger excès de plateforme **130**, ce qui a conduit à l'obtention de **141** avec un rendement de 92% après purification (**Entrée 5**). Ces conditions ont été appliquées sur la catéchine **132** et son analogue galloylée **133** et des rendements respectifs de 94% et 91% ont été obtenus (**Fig. 164, p229-230**). Ces résultats montrent donc que les conditions mises au point sont parfaitement applicables sur plusieurs polyphénols mais également parfaitement reproductibles.

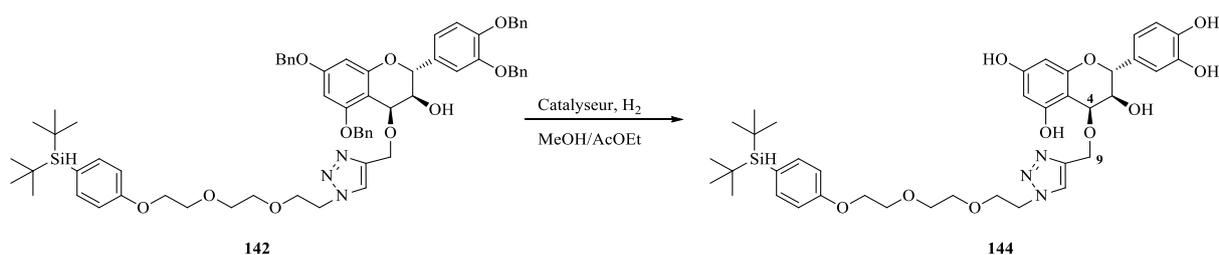


**Figure 164** : Réaction « click » sur la catéchine **132** et sur son analogue galloylé **133**.

La dernière étape avant la fluoration des composés, est la déprotection qui a été dans un premier temps envisagée par une hydrogénation.

- Déprotection

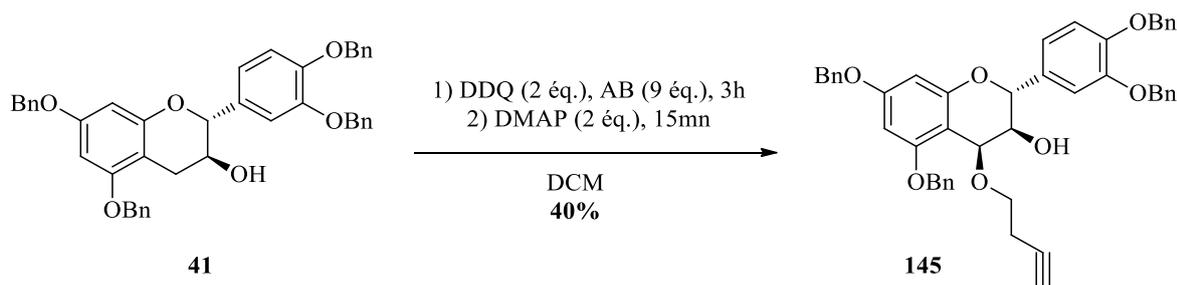
Les premiers essais ont été réalisés sur **142** en utilisant les conditions de déprotection décrites pour le B3 **18** et le B3G **30** avec le catalyseur de Pearlman (**Fig. 165, Entrée 1**). Malgré une perte totale des benzyles, la RMN est complexe et le produit ne semblait donc pas propre ce qui nous a conduit à tester d'autres conditions en changeant notamment le catalyseur et en travaillant avec le HCub<sup>®</sup> (**Fig. 165**).



Entrée	Solvant	Catalyseur	H <sub>2</sub>	Résultat
<b>1</b>	MeOH/AcOEt 1/1	Pd(OH <sub>2</sub> )/C	Baudruche	Dégradation
<b>2</b>	MeOH/AcOEt 1/1	Pd(OH <sub>2</sub> )/C	HCub <sup>®</sup>	Dégradation
<b>3</b>	MeOH/AcOEt 1/1	Pd/C	Baudruche	Dégradation

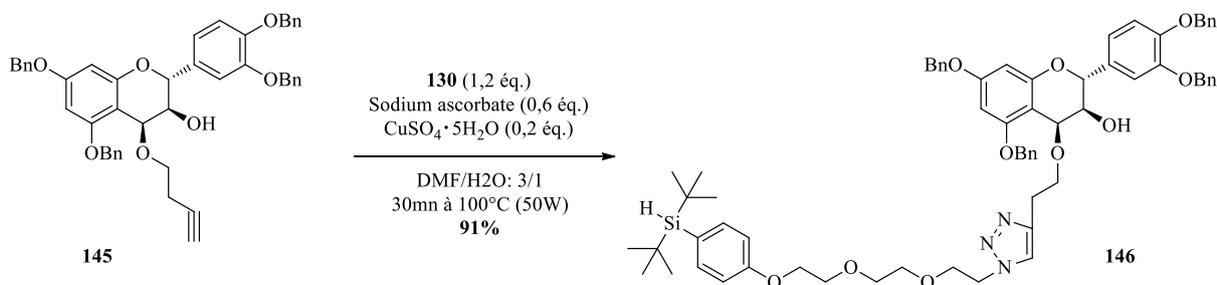
**Figure 165** : Débenzylation de **142**.

D'après des analyses en masse la molécule semble se cliver se traduisant par une perte de la plateforme silylée. Ne voyant pas les protons portés par le carbone 4 de **144** en RMN  $^1\text{H}$ , nous avons supposé que le clivage se faisait au niveau du carbone 9. Nous avons donc choisi d'allonger la chaîne carbonée liant le polyphénol au triazol en remplaçant l'alcool propargylique par un alcool butargylique. Ainsi, la catéchine **41** a été mise en présence d'alcool butargylique et de DDQ dans de l'acétonitrile. Après 3h d'agitation le produit a été purifié pour conduire à **145** avec un rendement de 40% (**Fig. 166, p231**).



**Figure 166** : Synthèse de la catéchine activée à l'alcool butargylique **145**.

Ensuite, la cycloaddition de Huisgen entre le composé **145** et **130** a été réalisée dans les conditions décrites précédemment (**Fig. 164**) ce qui a permis d'obtenir **146** avec un rendement de 91% (**Fig. 167, p232**).

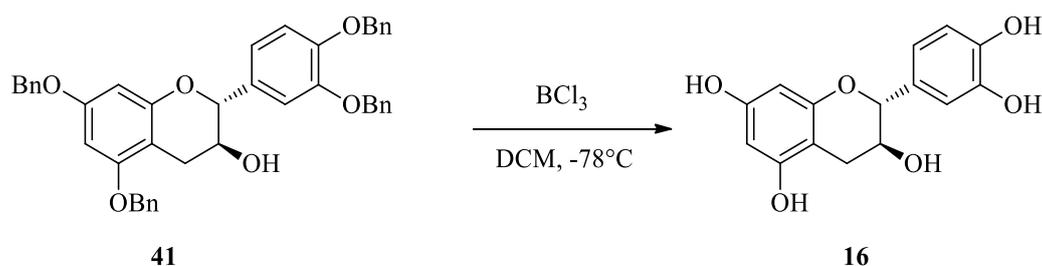


**Figure 167** : Réaction « click » sur la catéchine **145**.

Des essais de déprotection ont par la suite été réalisés sur **146** en utilisant le catalyseur de Pearlman. Malgré différents essais un clivage est toujours observé ce qui implique soit de changer de stratégie de déprotection soit de silylation des polyphénols.

Dans un premier temps, il a été choisi de travailler dans des conditions de déprotection différentes notamment en utilisant des acides de Lewis couramment décrites pour les réactions de déalkylation d'éthers.<sup>[195]</sup>

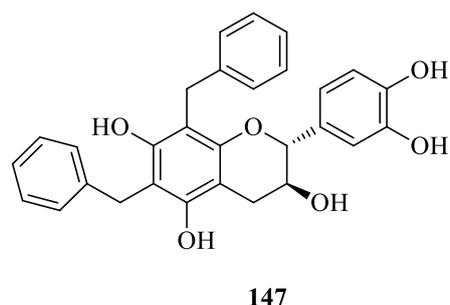
La mise au point de cette réaction de déprotection a été réalisée sur la catéchine benzylée **41** en utilisant du trichlorure de bore ( $\text{BCl}_3$ ). Les premiers essais ont été conduits dans le DCM à  $-78^\circ\text{C}$  en faisant varier le nombre d'équivalents d'acide ainsi que la durée de la réaction. Avec 4 équivalents, la déprotection semble partielle et conduit à un mélange complexe de produits après 2h de réaction (**Entrée 1**), alors que l'utilisation de 8 équivalents d'acide permet une débenzylation totale (**Entrée 2, Fig. 168**).



Entrée	Equivalents $\text{BCl}_3$	Temps	Débenzylation
<b>1</b>	4	2h	Partielle
<b>2</b>	8	30mn	Totale
<b>3</b>	8	5mn	Partielle

**Figure 168** : Débenzylation de la catéchine **41** par  $\text{BCl}_3$ .

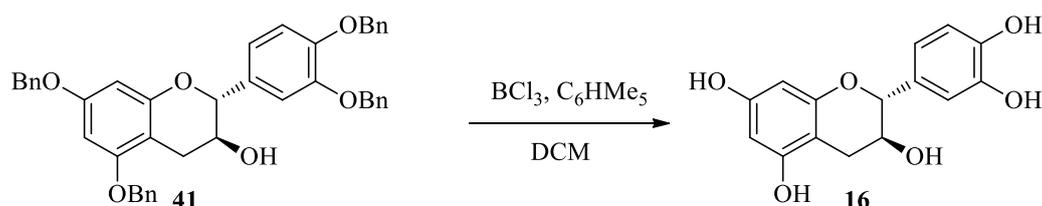
Malgré une débenzylation totale, le produit n'est pas celui attendu (**16**). En effet, en RMN  $^1\text{H}$  on observe une disparition des signaux correspondant aux protons H6 et H8 et après caractérisation il s'est avéré que le composé obtenu est un produit de C-alkylation résultant d'une réaction de Friedel Crafts conduisant de manière totale à **147** (**Fig. 169**).



**Figure 169** : Sous-produit de la réaction de débenzylation.

En 2008, l'équipe Tokuyama a décrit cette réaction parasite dans le cadre de la synthèse totale de la Yatakemycine et a empêché la réaction de Friedel Crafts par l'introduction d'un piègeur de cations, le pentaméthylbenzène ( $\text{C}_6\text{HMe}_5$ ).<sup>[196]</sup> Ainsi, de nouveaux essais ont été réalisés en présence de cet additif dans le milieu réactionnel, dans différentes proportions (4 et 20 équivalents). Lorsque 4 équivalents du pentaméthylbenzène sont introduits dans le milieu réactionnel, le sous-produit **147** se forme de manière totale (**Entrée 1**), alors que lorsque

qu'un large excès du piègeur est présent, la C-alkylation ne se fait pas. Toutefois, des ajustements au niveau de la quantité de  $\text{BCl}_3$  et de la température ont dû être effectués afin d'avoir une conversion optimale (**Entrée 4**). En effet, lorsque l'on a utilisé 4 équivalents d'acide la réaction n'était pas totale (39% de conversion à  $-50^\circ\text{C}$ ) alors que l'utilisation de 8 équivalents de  $\text{BCl}_3$  permet d'atteindre une conversion de 88% instantanément à  $-20^\circ\text{C}$  (**Fig. 170**).



Entrée	Equivalents $\text{C}_6\text{HMe}_5$	Equivalents $\text{BCl}_3$	Temps	Température ( $^\circ\text{C}$ )	Conversion (%)
1	4	4	5mn	$-78^\circ\text{C}$	100% <b>147</b>
2	20	4	Instantanée	$-50^\circ\text{C}$	39% <b>16</b>
3	20	8	Instantanée	$-78^\circ\text{C}$	37% <b>16</b>
4	<b>20</b>	<b>8</b>	<b>Instantanée</b>	<b><math>-20^\circ\text{C}</math></b>	<b>88% 16</b>

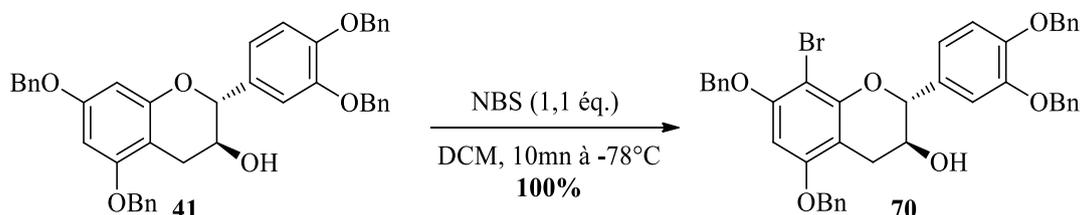
**Figure 170** : Optimisation de la réaction de débenzylation.

Des essais ont ensuite été réalisés sur les molécules **142** et **146** avec les conditions optimales (**Entrée 4**) mais un clivage de la plateforme a été de nouveau observé. Ces résultats montrent la fragilité des liaisons à la position 4 et nous a conduit à essayer une nouvelle stratégie de silylation. Pour cela nous nous sommes basés sur les conditions de synthèse de l'aryldi-*tert*-butylsilane **136** en imaginant une silylation directe sur le C8 des polyphénols. Cette voie permettrait non seulement de limiter les étapes de synthèse mais également de ne pas modifier de façon importante les structures des polyphénols, ce qui peut avoir des effets sur l'interactions avec Tau.

#### b) Silylation directe des polyphénols en position 8

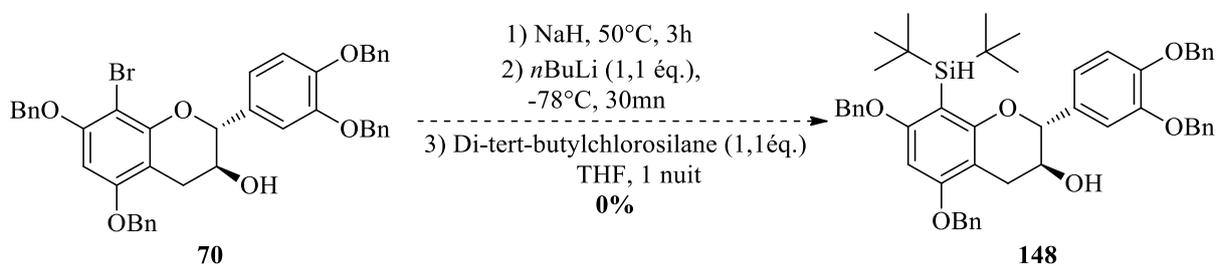
Afin de réaliser cette silylation, il a été envisagé de réaliser un échange halogène-lithium en utilisant du *n*BuLi puis, de substituer le lithium par un silane tel que cela a été réalisé avec **136**. Les réactions ont été mises au point sur la catéchine benzylée **41** et la première synthèse a donné accès à la catéchine bromée **70**. Pour cela, **41** a été mis en présence de NBS à  $-78^\circ\text{C}$

dans du DCM et après traitement le composé **70** a été obtenu de manière quantitative (**Fig. 171, p233**).



**Figure 171** : Bromation de la catéchine **41**.

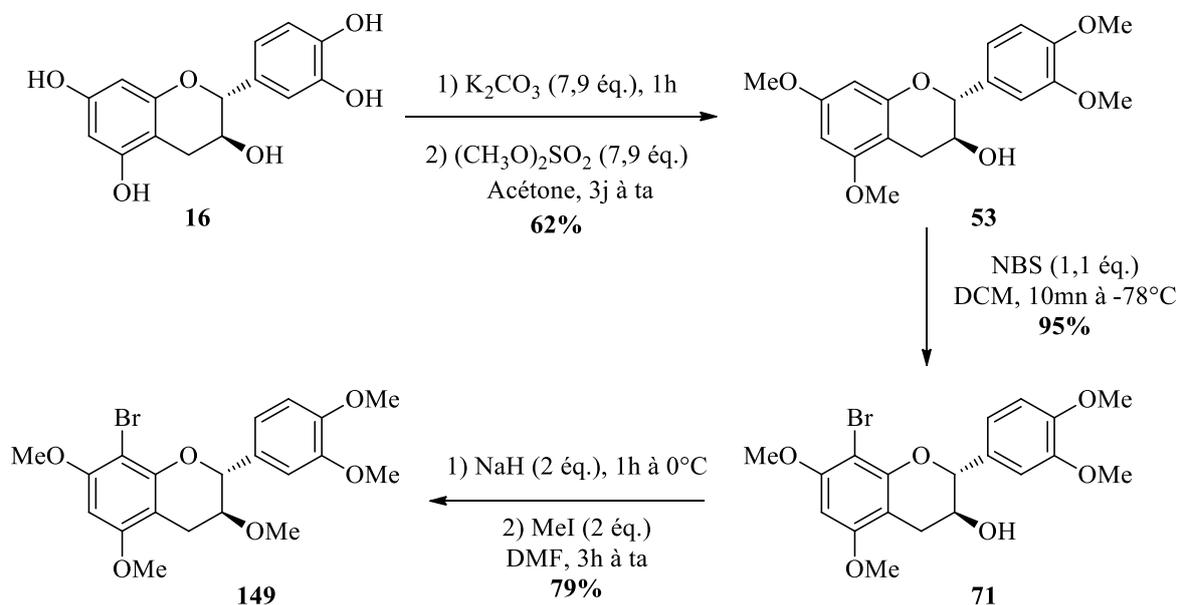
En se basant des conditions de préparation de **136**, la protection préalable de l'alcool en C3 n'a pas été faite mais un ajout de NaH dans le milieu réactionnel a été réalisée pour un essai. Ainsi, **70** a été mis en présence de NaH pendant 3h et 1 équivalent de *n*BuLi a été ajouté dans le mélange puis l'agitation a été maintenue 30mn avant l'ajout du di-*tert*-butylchlorosilane. D'après la RMN <sup>1</sup>H du brut de la réaction, la protection au NaH semble suffire pour ne pas silyler l'hydroxyle en C3 (traces), mais seulement de la catéchine benzylée **41** et le produit **70** sont récupérés après purification (**Fig. 172**).



**Figure 172** : Essai de silylation de la catéchine bromée **70**.

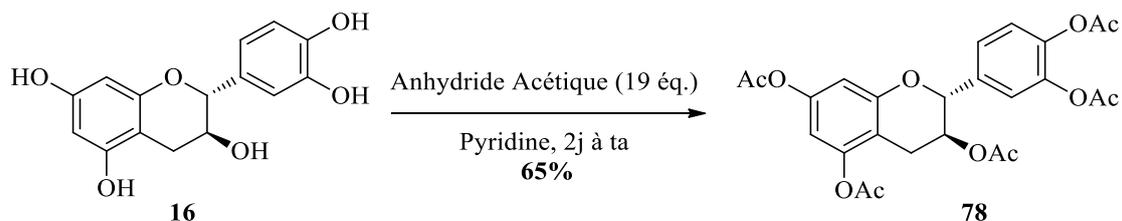
Il a été supposé que l'origine de cet échec soit liée à des contraintes stériques et un changement de groupements protecteurs pourrait éviter ce problème. Or, deux autres types de groupements protecteurs sont utilisés pour protéger les polyphénols, les méthyles et les acétates. Ainsi, ces deux protections ont été réalisées sur la catéchine **16**. Afin d'éviter des réactions parasites, la position C3 a également été protégée dans les deux cas, ce qui implique une étape supplémentaire dans le cas de la protection par des méthyles. La catéchine méthylée **53** a été synthétisée à partir de la catéchine en utilisant du carbonate de potassium et du sulfate de diméthyle en excès dans de l'acétone. Après 2j d'agitation **53** a été obtenu avec un rendement de 62%. Le composé **53** a ensuite été engagé dans une réaction de bromation par

du NBS ce qui a conduit à **71** avec un rendement de 95%. Enfin, la protection de l'hydroxyle en C3 de **71** a été réalisée en utilisant de l'iodure de méthyle en présence de NaH. Le composé **149** a ainsi été obtenu avec un rendement de 79% après purification (**Fig. 173, p234-236**).



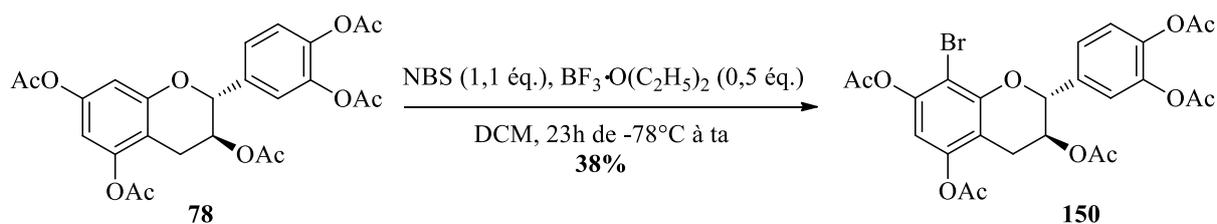
**Figure 173** : Protection par des méthyles et bromation de la catéchine.

Afin de protéger la catéchine par des groupements acétates, **16** a été mis en présence d'un excès d'anhydride acétique dans de la pyridine ce qui, après 2j de réaction, a conduit à l'obtention de **78** avec un rendement de 65% (**Fig. 174, p237**).



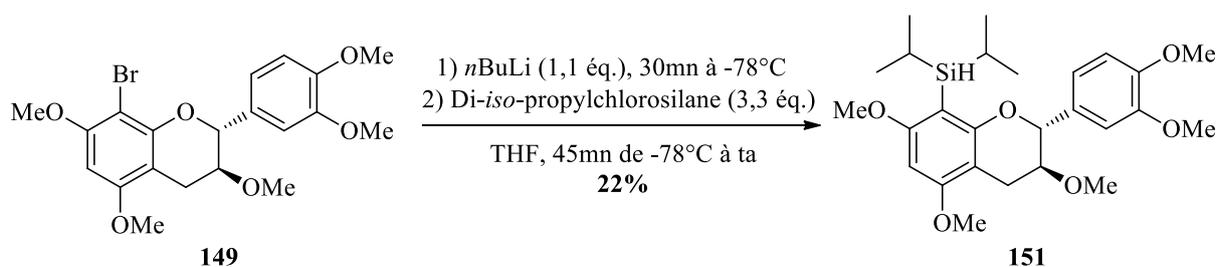
**Figure 174** : Protection par des acétates de la catéchine.

La catéchine acétylée a ensuite été engagée dans une réaction de bromation mais les conditions précédemment décrites ont dû être modifiées puisqu'un manque de réactivité a été rencontré. Ainsi, **78** a été bromé en C8 par du NBS en présence de 0,5 équivalents de diéthyléthérate trifluorure de bore ce qui a permis d'obtenir **150** avec un rendement de 38% (**Fig. 175, p238**).



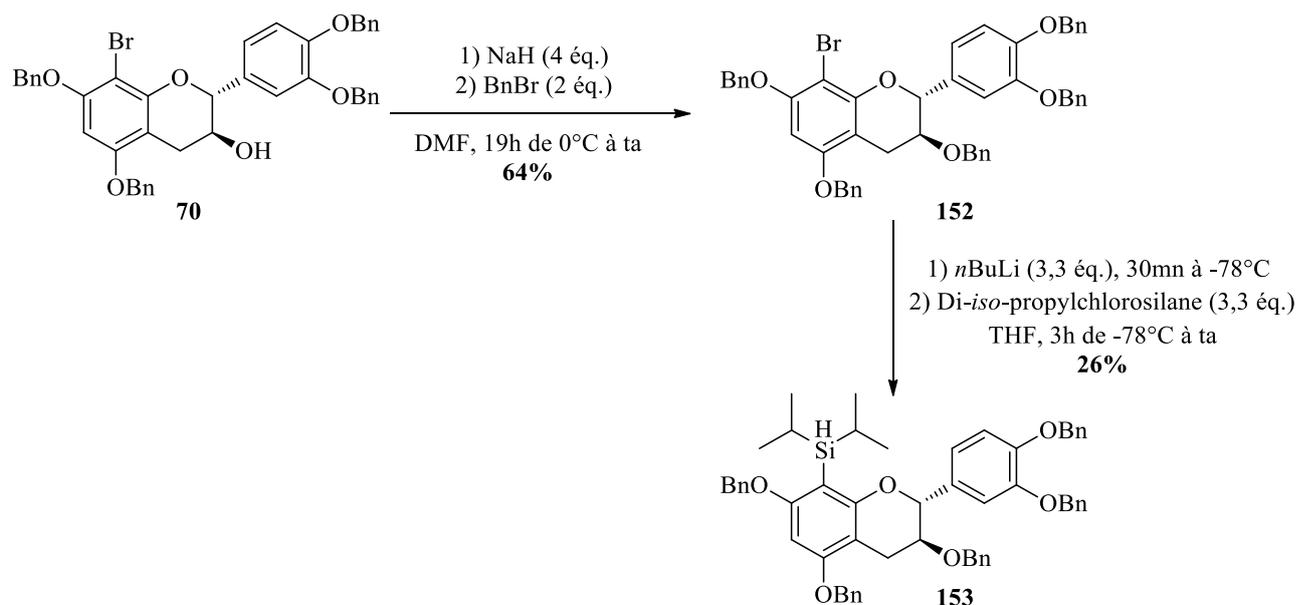
**Figure 175** : Bromation de la catéchine acétylée.

Les premiers essais de silylation ont été réalisés avec **149** et le di-*tert*-butylchlorosilane, malheureusement, malgré plusieurs essais, le composé désiré n'a jamais été obtenu même si un bon échange halogène-lithium a été observé. Nous avons donc opté pour une substitution du lithium par le di-*iso*-propylchlorosilane présentant l'avantage d'être moins encombré et pouvant être également utilisé *in vivo*. Ainsi, après plusieurs mises au point faisant notamment varier la quantité de silane et le temps de réaction, le composé méthylé silylé **151** a été isolé à hauteur de 22% après 45mn d'agitation à température ambiante (**Fig. 176, p239**).



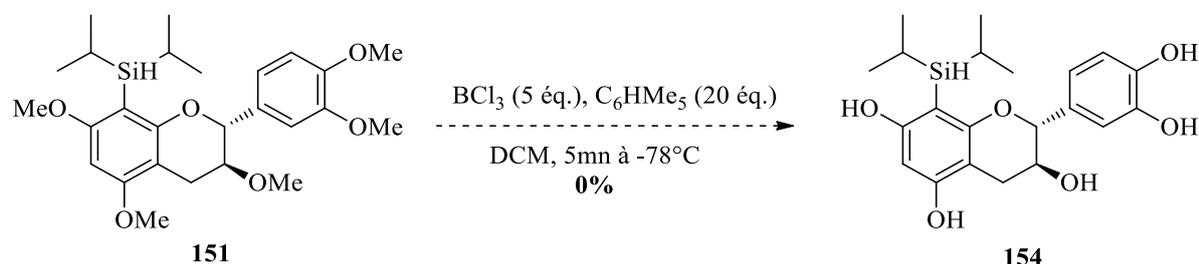
**Figure 176** : Silylation de la catéchine méthylée **149**.

Lors de cette réaction le produit majoritaire est la catéchine méthylée traduisant bien que l'étape limitante soit la substitution du lithium par le silane. Des essais ont également été réalisés avec la catéchine acétylée **150** mais aucun n'a abouti à un résultat prometteur. Après avoir obtenu ce résultat avec **151**, en parallèle des essais de déprotection, des tests ont été réalisés sur la catéchine benzylée de manière à pouvoir déprotéger la catéchine silylée dans les conditions douces d'hydrogénation. Dans un premier temps, l'hydroxyle en C3 a été protégé par un benzyle en mettant **70** en présence de bromure de benzyle et de NaH, ce qui a permis d'isoler **152** avec un rendement de 64%. La catéchine pentabenzylée bromée **152** a ensuite été engagée dans la réaction de silylation *via* l'utilisation de *n*BuLi et de di-*iso*-propylchlorosilane ce qui a conduit à **153** avec un rendement de 26% après purification (**Fig. 177, p240-241**). Toutefois, le rendement annoncé est le meilleur obtenu et il s'est avéré que la réaction n'est pas répétable et conduit à trop peu de produit ce qui n'a pas permis d'envisager des tests de déprotection.



**Figure 177** : Benzylation et silylation de la catéchine benzylée **70**.

Au vu de ces résultats, les essais de déprotection ont été réalisés avec **151** et dans un premier temps la réaction a été réalisée dans les conditions décrites précédemment avec  $\text{BCl}_3$  et le pentaméthylbenzène (**Fig. 170**). Malgré la mise au point précédemment décrite, ces conditions ne sont pas applicables à la catéchine méthylée qui semble se dégrader (**Fig. 178**).



**Figure 178** : Essai de déprotection de **151**.

Afin de déprotéger **151**, des tests ont également été faits avec  $\text{BBr}_3$  mais une nouvelle fois les déprotections sont partielles et conduisent à des mélanges complexes de produits. De plus, la C-alkylation a constamment été observée en position 6 et 8 malgré la présence de piègeurs de cations tel que le pentaméthylbenzène et le thioanisole.

La protection par des groupements méthyles ou acétates ne semblent pas être la stratégie la plus adaptée dans le cadre de la synthèse des polyphénols et il semble donc impératif de pouvoir travailler avec les benzyles. Ainsi, une déprotection dans des conditions douces pourraient être effectuée ce qui permettraient d'obtenir les composés silylés désirés. Toutefois, il semble important de développer une nouvelle plateforme ou de mettre au point

des réactions de silylation catalysées par des métaux tel que le palladium.<sup>[197]</sup> Par manque de temps, nous n'avons pas pu mettre au point d'autres stratégies de fluoration.

Malgré ce manque de nouveaux résultats vis-à-vis du passage des polyphénols à travers la BHE, l'équipe de Victor de Freitas a montré, en 2010, que certains polyphénols et notamment la catéchine, sont capables de passer la BHE ce qui est encourageant pour notre étude.<sup>[198]</sup>

# **Conclusions et Perspectives**

L'objectif principal de la thèse était de déterminer si les polyphénols, et plus particulièrement les procyanidines, ont la capacité d'inhiber la phosphorylation de la protéine Tau du fait de l'affinité existante entre la Région Riche et Prolines (RRP) de Tau et ces composés.

Initialement, des études RMN réalisées par Marie Guéroux ont montré que les procyanidines interagissent avec des fragments de la protéine Tau, P1 ( $^{171}\text{I-K}^{190}$ ) et P2 ( $^{201}\text{G-T}^{220}$ ) *via* l'établissement de liaisons hydrogène avec des  $K_D$  dont l'ordre de grandeur est du mM. Lors de ces travaux, l'attribution complète d'un fragment plus long, représentant 57% de la RRP, le P1P2 ( $^{171}\text{I-T}^{220}$ ), a permis d'étudier de manière plus précise l'interaction entre ce peptide et les polyphénols, notamment l'EGCG. Une affinité d'un même ordre de grandeur que pour P1 et P2 a été trouvée ainsi que des sites de fixation similaires tels que T181, T212 et T217. Souhaitant aller plus loin, ces expériences RMN ont été réalisées sur la protéine Tau intégrale avec le B3G **30** et l'EGCG **22**. Cette étude a montré que la fixation des polyphénols était localisée dans le domaine de la RRP et dans le domaine de liaison aux microtubules mais sans une grande spécificité. En effet, les variations d'intensités et de déplacements chimiques sont relativement importantes dans ces régions. Malgré cela, dans la RRP, des variations de déplacements chimiques un peu plus importantes ont été localisées autour de certaines thréonines telles que T181, T212 et T217 ce qui peut être directement corrélées aux résultats obtenus sur les peptides modèles. De plus, il semble que les affinités entre la RRP de Tau et les polyphénols soient également dans un ordre de grandeur du mM. Ces corrélations entre fragments et protéine Tau intégrale sont très intéressantes puisqu'elles ont permis de valider l'utilisation des modèles pour la suite de l'étude. Ainsi, sachant que les procyanidines sont capables d'interagir avec la protéine Tau avec une affinité dont l'ordre de grandeur est le même qu'entre les PRP et les kinases, il a été envisagé de s'intéresser au processus d'inhibition de la phosphorylation.

La mise au point de la phosphorylation par GSK3 $\beta$ , une enzyme décrite comme ayant un rôle important dans le développement de la MA, a tout d'abord permis de montrer une affinité de cette enzyme pour le fragment P2 et plus particulièrement pour la T205. Le suivi semi quantitatif, réalisé par MS, a permis de suivre la réaction et également d'avoir une idée de la capacité d'inhibition des polyphénols lors de ce processus. En effet, cette technique a permis de montrer que l'EGCG, souvent étudié pour ses capacités à inhiber le processus d'agrégation de Tau, n'est pas le meilleur candidat pour l'inhibition de la phosphorylation et entraîne même une augmentation de l'activité enzymatique. Toutefois, ce composé empêche bien la formation d'agrégats de P2 et pP2 ce qui est cohérent avec les résultats décrits dans la

littérature. Le meilleur candidat pour réduire la phosphorylation semble être le B3G **30**. Ce composé permet non seulement d'inhiber l'activité de la kinase mais également de prévenir la formation d'agrégats de peptides phosphorylés. Ces résultats, corrélés avec les données RMN, montrent que la liaison hydrogène s'établissant entre le carbonyle de l'ester du B3G et l'hydroxyle de T205, empêche l'approche de GSK3 $\beta$  et permet donc de prévenir l'hyperphosphorylation du P2. Or, il est connu que la T205 est un site de phosphorylation important dans le cas du développement de la MA impliquant notamment des changements de conformations de Tau privilégiant la phosphorylation sur d'autres résidus. Empêcher la phosphorylation sur ce site est donc un enjeu important mais il faut s'assurer que le B3G inhibe ce processus de façon spécifique. Ainsi, dans les perspectives, il faudrait étudier l'influence du B3G sur la phosphorylation d'autres résidus, et voir le comportement de cette molécule avec d'autres kinases. C'est pour cela qu'il est nécessaire de continuer à mettre au point la réaction sur le P1P2 et pour quoi pas, sur la protéine intégrale.

Un autre dimère a montré une capacité particulière à inhiber le processus de phosphorylation, le B6. Jusqu'à présent la formation de la liaison interflavane en 4-6 était réalisée *via* des réactions non régiosélectives conduisant à des mélanges complexes de produits. Basée sur les voies de synthèse bien connues dans le laboratoire pour l'élaboration de dimères de type 4-8 et sur la synthèse de Suzuki, une nouvelle voie de synthèse a été proposée. Ainsi, en utilisant un monomère nucléophile chloré et déprotégé **98** et un couplage à l'or, la formation de la liaison interflavane a été effectuée de manière régio et stéréosélective avec un rendement de 78%. Toutefois, la déprotection du chlore est une étape délicate nécessitant encore des optimisations. Il est envisagé de réaliser cette étape en utilisant un HCub<sup>®</sup> fonctionnel montant correctement en pression puisque la chimie en flux semble être la plus efficace pour enlever le chlore.

Enfin, l'évaluation du passage des polyphénols à travers la BHE nous a conduit à développer la fonctionnalisation de polyphénols avec des synthons silylés. Ces travaux nous ont permis d'obtenir des flavanols silylés avec de très bons rendements par utilisation de la chimie « click ». Malheureusement les difficultés rencontrées lors de l'étape de déprotection ne nous ont pas permis de mettre au point la fluoration des molécules. Cette information reste tout de même importante et il est nécessaire de continuer à optimiser les synthèses de manière à obtenir des polyphénols utilisables pour l'imagerie TEP. Il peut être également envisagé de marquer les polyphénols au tritium (<sup>3</sup>H), radioélément détectable par le LBHE. De plus, en

1998 l'équipe de Fujiki a décrit le radiomarquage de l'EGCG au tritium, ce qui peut donc être envisageable en mettant en place de nouvelles collaborations.<sup>[199]</sup>

# **Experimental Section**

### General remarks:

All reactions were carried out in dried glassware under inert atmosphere (nitrogen or argon) with dry solvents.

$^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR,  $^{19}\text{F}$  NMR,  $^{29}\text{Si}$  NMR and  $^{31}\text{P}$  NMR were recorded on Bruker DPX-200 FT ( $^1\text{H}$ : 200 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 50.2 MHz), Bruker AVANCE-300 FT ( $^1\text{H}$ : 300 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 75.5 MHz), Bruker DPX-400 FT ( $^1\text{H}$ : 400 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 100.2 MHz), Bruker DPX-600 FT ( $^1\text{H}$ : 600 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 150 MHz) and HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  spectra were recorded on a 900MHz Avance III NMR Spectrometer equipped with a triple resonance cryogenic probehead (Bruker, Karlsruhe, Germany). apparatus using indicated internal reference. The chemical shifts ( $\delta$ ) and coupling constants ( $J$ ) are expressed in ppm and Hz respectively. The following abbreviations are used to describe the multiplicities: s = singlet; d = doublet, t = triplet; q = quartet, dd = doublet of doublet and m = multiplet.

High resolution mass spectra were performed by the CESAMO (Talence, France) and were recorded on Qq-TOF tandem mass spectrometer (API Q-STAR Elite, Applied Biosystems). Positive ion mode ESI-MS was used for the analysis. MALDI-MS spectra were performed by the CESAMO (Talence, France) on a Voyager mass spectrometer (Applied Biosystems). The instrument is equipped with a pulsed  $\text{N}_2$  laser (337 nm) and a time-delayed extracted ion source. Melting points were uncorrected and determined using a Büchi-Totolli apparatus and Stuart Scientific apparatus (SMP3).

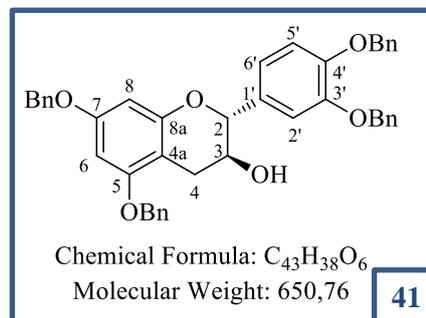
High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) purification were performed using a Luna C18 Column (250×10mm, 10 $\mu\text{m}$ , 5mL/mn).

The synthesis of P2 and P2 analogs were performed using the Fmoc strategy on a Liberty 1 Automated Microwave Peptide Synthesizer.

Continuous hydrogenation were performed using an HCub® HC-2.SS from ThalesNano and the microwave reaction were done using a Biotage system.

**(2R,3S)-5,7-bis(benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)chroman-3-ol**

To an ice-cold stirred solution of catechin **16** (1.01 g, 3.5 mmol) in DMF (17.5 mL) was added  $K_2CO_3$  (2.86 g, 20.7 mmol) and 1.85 mL of benzyl bromide (2.66 g, 15 mmol). The solution was stirred 2h at 0°C and 48h at room temperature. The solution was dissolved in  $Et_2O$  (100 mL) and washed with brine (3×30 mL). The organic layers were combined, dried over  $Na_2SO_4$ , filtered and evaporated to dryness to get a brownish solid, which was purified by column chromatography, eluted with Cyclohexane/ $EtOAc$  (80/20), to furnish **41** as a white solid (1.97 g, 87%).



**R<sub>f</sub>** = 0.32 (Cyclohexane/ $EtOAc$  : 80/20).

**m.p** : 127 °C.

**IR (Neat)** :  $\nu_{max}$  3456, 3417, 1618, 1592, 1513, 1498, 1454, 1378, 1263, 1217, 1116, 1026, 735, 696  $cm^{-1}$ .

**$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 300 MHz)** :  $\delta$ 7.33-7.54 ( $H_{Ar}Bn$ , m, 20 H); 7.08 ( $H_{2'}$ , s, 1H); 6.98 ( $H_{5'}$  and  $H_{6'}$ , s, 2H); 6.33 and 6.28 ( $H_6$  and  $H_8$ , d, 2H,  $J_{6,8} = 2.3$  Hz); 5.20 ( $CH_2Bn$ , s, 4H); 5.04 ( $CH_2Bn$ , s, 4H); 4.66 ( $H_2$ , d, 1H,  $J_{2,3} = 8.3$  Hz); 3.99 ( $H_3$ , m, 1H); 3.11 ( $H_{4\beta}$ , dd, 1H,  $J_{4\beta,4\alpha} = 16.4$  Hz and  $J_{4\beta,3} = 3.1$  Hz); 2.64 ( $H_{4\alpha}$ , dd, 1H,  $J_{4\alpha,4\beta} = 16.4$  Hz and  $J_{4\alpha,3} = 8.8$  Hz).

**$^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 75 MHz)** :  $\delta$ 158.8 (C7); 157.8 (C5); 155.29 (C8a); 149.4 and 149.1 (C4' and C3'); 137.2 (CqBn); 137.0 (CqBn); 136.9 (2 CqBn); 139.9 (C1'); 128.7 (2 CHBn); 128.5 (6 CHBn); 128.0 (CHBn); 127.9 (CHBn); 127.8 (2 CHBn); 127.5 (4 CHBn); 127.2 (2 CHBn); 127.1 (2 CHBn); 120.6 (C6'); 115.0 (C5'); 113.9 (C2'); 102.3 (C4a); 94.4 (C8); 93.9 (C6); 81.6 (C2); 71.3 (2  $CH_2Bn$ ); 70.1 ( $CH_2Bn$ ); 69.9 ( $CH_2Bn$ ); 68.2 (C3); 27.6 (C4).

**HRMS** :  $[M+H]^+$  : mass calculated for  $C_{43}H_{38}O_6$  : 651.2746 and mass found 651.2747.

### 3,4,5-tris(benzyloxy)benzoic acid

To an ice-cold stirred solution of methyl gallate **48** (1.5 g, 8.1 mmol) in DMF (30 mL) was added  $K_2CO_3$  (7.43 g, 54 mmol) and 5 mL of benzyl bromide (7.19 g, 41 mmol). The solution was stirred 2h at 0°C and 18h at room temperature. The solution was dissolved in  $Et_2O$  (100 mL) and washed with brine (3×30 mL). The organic layers were combined, dried over  $Na_2SO_4$ , filtered and evaporated to dryness to get a brownish solid, which was purified by column chromatography, eluted with Cyclohexane/ $EtOAc$  (95/5 to 90/10), to furnish Methyl 3,4,5-tris(benzyloxy)benzoate **49** as a white solid (3.6 g, 98%). The product was directly engaged in a saponification reaction.

To a stirred solution of **49** (2.155 g, 4.6 mmol) in a mixture of  $EtOH/H_2O$  (126 mL/42 mL) was added  $KOH$  (5.33 g, 95 mmol). The resulting white suspension was stirred 1h at reflux. The yellow mixture was concentrated until dryness, dissolved in 500 mL of  $H_2O$  and acidified with sulfuric acid to obtain a white suspension. The solid was filtered on Buchner and recrystallized in  $EtOH$  and dried under vacuum to afford **43** as a white solid (1.64 g, 81%).

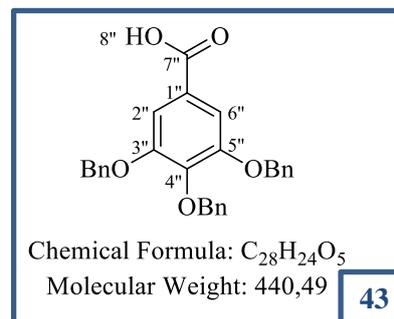
**m.p** : 195°C.

**IR (Neat)** :  $\nu_{max}$  2842, 1686, 1595, 1432, 1337, 1130, 732, 693  $cm^{-1}$ .

**$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 300 MHz)** :  $\delta$ 7.33-7.12 ( $H_{ArBn}$ ,  $H_{2''}$  and  $H_{6''}$ , m, 17H); 5.11 ( $CH_2Bn$ , s, 4H); 5.07 ( $CH_2Bn$ , s, 2H).

**$^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 75 MHz)** :  $\delta$ 167.3 ( $C_{7''}$ ); 152.4 ( $C_{3''}$  and  $C_{5''}$ ); 141.3 ( $C_{4''}$ ); 137.7 ( $C_{1''}$ ); 137.2 (3  $C_{qBn}$ ); 128.8 (4  $CHBn$ ); 128.4 (2  $CHBn$ ); 128.3 ( $CHBn$ ); 127.8 (4  $CHBn$ ); 126.4 ( $CHBn$ ); 108.5 ( $C_{2''}$  and  $C_{6''}$ ); 74.6 ( $CH_2Bn$ ); 70.5 (2  $CH_2Bn$ ).

**HRMS** :  $[M+H]^+$  : mass calculated for  $C_{28}H_{24}O_5$  : 439.1545 and mass found 439.1594.



**(2R,3S)-5,7-bis(benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)chroman-3-yl 3,4,5-tris(benzyloxy)benzoate**

To a stirred solution of **41** (100 mg, 0.150 mmol) and **43** (132 mg, 0.300 mmol) in dry DCM (25 mL) was added 47  $\mu$ L of DIC (38 mg, 0.300 mmol) and DMAP (1.8 mg, 0.015 mmol). The solution was stirred 2d at 35°C and washed with brine (3 $\times$ 20 mL). The organic layers were combined, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and evaporated to dryness to get a yellow oil, which was purified by column chromatography, eluted with Cyclohexane/EtOAc (80/20), to furnish **47** as a white solid (90 mg, 56 %).

**R<sub>f</sub>** = 0.42(Cyclohexane/EtOAc : 80/20).

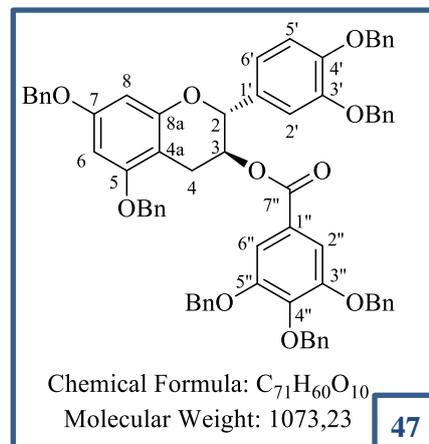
**m.p** : 131°C.

**IR (Neat)** :  $\nu_{\text{max}}$  3031, 2869, 1715, 1591, 1454, 1428, 1331, 1210, 1116, 1023, 736, 696  $\text{cm}^{-1}$ .

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** :  $\delta$ 7.46-7.21 (H<sub>A</sub>Bn, m, 35 H) ; 7.22 (H<sub>2''</sub> and H<sub>6''</sub>, s, 2H); 7.03 (H<sub>2'</sub>, d, 1H,  $J_{2',6'} = 1.5$  Hz); 6.92 (H<sub>6'</sub>, dd, 1H,  $J_{6',5'} = 7.9$  Hz and  $J_{6',2'} = 1.5$  Hz); 6.87 (H<sub>5'</sub>, d, 1H,  $J_{5',6'} = 7.9$  Hz); 6.32 (H<sub>6</sub> and H<sub>8</sub>, m, 2H); 5.50 (H<sub>3</sub>, m, 1H); 5.19-5.00 (CH<sub>2</sub>Bn, m, 14H); 4.56 (H<sub>2</sub>, s, 1H); 3.04 (H<sub>4 $\beta$</sub> , dd, 1H,  $J_{4\beta,4\alpha} = 16.7$  Hz and  $J_{4\beta,3} = 5.5$ Hz); 2.82 (H<sub>4 $\alpha$</sub> , dd, 1H,  $J_{4\alpha,4\beta} = 16.7$  Hz and  $J_{4\alpha,3} = 7.4$  Hz).

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)** :  $\delta$ 165.4 (C7''); 159.7 (C7); 158.0 (C5); 155.3 (C8a); 152.7 (C3''); 149.3 and 149.1 (C4' and C3'); 142.8 (C5''); 137.7 (CqBn); 137.4 (CqBn); 137.3 (CqBn); 137.1 (CqBn); 136.9 (CqBn); 131.4 (C4''); 128.9-127.5 (CHBn); 125.3 (C1''); 120.3 (C6'); 115.2 (C5'); 113.7 (C2'); 109.4 (C2'', C6''); 101.7 (C4a); 94.7 (C8); 94.1 (C6); 78.7 (C2); 75.4 (CH<sub>2</sub>Bn); 71.7 (CH<sub>2</sub>Bn); 71.5 (CH<sub>2</sub>Bn); 70.3 (C3); 31.4 (C4).

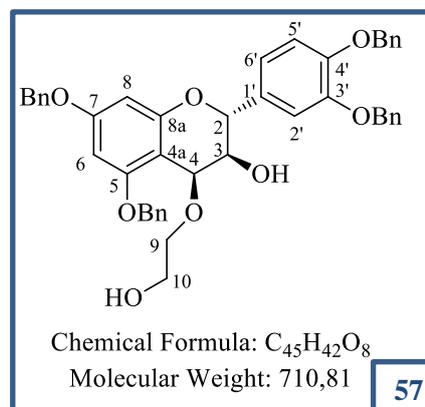
**HRMS** : [M+H]<sup>+</sup> : mass calculated for C<sub>71</sub>H<sub>60</sub>O<sub>10</sub> : 1073.4265 and mass found 1073.4260.



**47**

**(2R,3S)-5,7-bis(benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)-4-(2-hydroxyethoxy)chroman-3-ol**

To a stirred solution of **41** (200 mg, 0.307 mmol) in dry DCM (4 mL) was added 103  $\mu$ L of ethylene glycol (115 mg, 1.84 mmol) and a solution of DDQ (139 mg, 0.614 mmol) in dry DCM (4 mL). The resulting green solution was stirred 3h at room temperature and DMAP was added (75 mg, 0.614 mmol). The brown mixture was stirred 15 mn and the solution was concentrated until dryness and was purified by column chromatography, eluted with Cyclohexane/AcOEt (80/20 to 60/40), to yield **57** as brown solid (162 mg, 75%).



**m.p** : 121 °C.

**R<sub>f</sub>** = 0.30 (Cyclohexane/EtOAc : 60/40).

**IR (Neat)** :  $\nu_{\text{max}}$  3583, 3063, 3031, 2908, 1635, 1604, 1513, 1499, 1454, 1423, 1380, 1320, 1263, 1216, 1179, 1128, 1027, 735, 696 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** :  $\delta$ 7.51-7.37 (H<sub>Ar</sub>Bn, m, 20H); 7.10 (H<sub>2'</sub>, d, 1H,  $J_{2',6'}$  = 1.5Hz); 7.03 (H<sub>6'</sub>, dd, 1H,  $J_{6',5'}$  = 8.5 Hz and  $J_{6',2'}$  = 1.5Hz); 6.98 (H<sub>5'</sub>, d, 1H,  $J_{5',6'}$  = 8.5 Hz); 6.28 (H<sub>6</sub>, d, 1H,  $J_{6,8}$  = 1.9 Hz); 6.16 (H<sub>8</sub>, d, 1H,  $J_{8,6}$  = 1.9 Hz); 5.18 (CH<sub>2</sub>Bn, s, 4H); 5.06 (H<sub>2</sub>, d, 1H,  $J_{2,3}$  = 12.0 Hz); 5.00 (CH<sub>2</sub>Bn, s, 4H); 4.82 (H<sub>4</sub>, d, 1H,  $J_{4,3}$  = 3.5 Hz); 3.98-3.78 (H<sub>3</sub> and H<sub>9</sub>, m, 3H); 3.71 (H<sub>10</sub>, m, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)** :  $\delta$ 160.9 (C<sub>7</sub>); 158.6 (C<sub>5</sub>); 156.0 (C<sub>8a</sub>); 149.4 (C<sub>4'</sub>); 149.0 (C<sub>3'</sub>); 137.3 (C<sub>q</sub>Bn); 137.2 (C<sub>q</sub>Bn); 136.5 (C<sub>q</sub>Bn); 136.4 (C<sub>q</sub>Bn); 130.6 (C<sub>1'</sub>); 128.7-127.3 (CHBn, 20C); 121.3 (C<sub>6'</sub>); 115.5 (C<sub>5'</sub>); 114.7 (C<sub>2'</sub>); 103.8 (C<sub>4a</sub>); 94.9 (C<sub>8</sub>); 93.8 (C<sub>6</sub>); 73.3 (C<sub>9</sub>); 71.6-71.0 (CH<sub>2</sub>Bn, 4C); 71.3 (C<sub>3</sub>); 68.1 (C<sub>2</sub>); 70.6 (C<sub>4</sub>); 62.4 (C<sub>10</sub>).

**HRMS**: [M+Na]<sup>+</sup>: mass calculated for C<sub>45</sub>H<sub>42</sub>O<sub>8</sub>Na : 733.8134 and mass found : 733.2881.

**(2R,3S)-5,7-bis(benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)-8-bromo-4-(2hydroxyethoxy)chroman-3-ol**

To a stirred solution of **57** (131 mg, 0.18 mmol) in dry DCM (1 mL) was added a solution of NBS (36 mg, 0.20 mmol) in dry DCM (2 mL) at -78°C. The solution was stirred 30mn at room temperature. The solution was dissolved in AcOEt (30 mL) and washed with brine (3×20 mL). The organic layers were combined, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and evaporated to dryness to get **56** as a white solid (145 mg, 100%).

**R<sub>f</sub>** = 0.28 (Cyclohexane/EtOAc : 60/40).

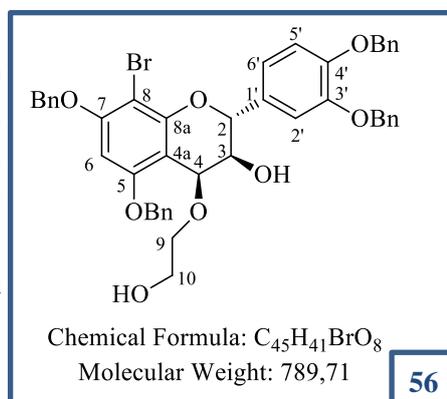
**m.p** : 152 °C.

**IR (Neat)** :  $\nu_{\text{max}}$  3385, 3063, 3031, 2924, 2868, 1604, 1578, 1516, 1498, 1454, 1421, 1380, 1346, 1265, 1216, 1069, 1028, 885, 812, 782, 735, 696 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** :  $\delta$ 7.49-7.30 (H<sub>Ar</sub>Bn, m, 20H); 7.14 (H<sub>2'</sub>, d, 1H,  $J_{2',6'}$  = 1.5Hz); 7.05 (H<sub>6'</sub>, dd, 1H,  $J_{6',5'}$  = 8.5 Hz and  $J_{6',2'}$  = 1.5Hz); 6.98 (H<sub>5'</sub>, d, 1H,  $J_{5',6'}$  = 8.5 Hz); 6.26 (H<sub>6</sub>, s, 1H); 5.19 (CH<sub>2</sub>Bn, s, 4H); 5.13 (CH<sub>2</sub>Bn, s, 2H); 5.03 (CH<sub>2</sub>Bn, s, 2H); 4.82 (H<sub>2</sub>, d, 1H,  $J_{2,3}$  = 4.2 Hz); 3.92-3.79 (H<sub>3</sub> and H<sub>9</sub>, m, 3H); 3.77 (H<sub>4</sub>, d, 1H,  $J_{4,3}$  = 4.7 Hz); 3.69 (H<sub>10</sub>, m, 2H).

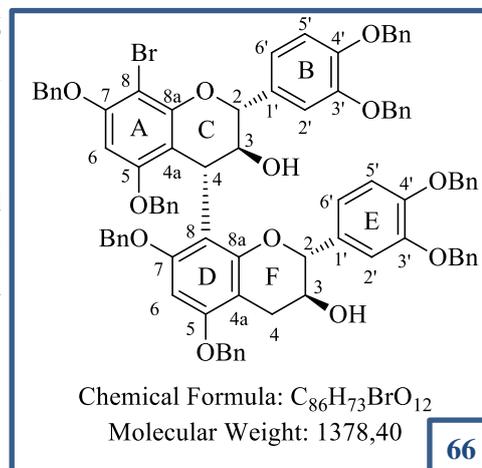
**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)** :  $\delta$ 159.8 (C<sub>5</sub>); 158.6 (C<sub>7</sub>); 154.0 (C<sub>8a</sub>); 149.4 (C<sub>4'</sub>); 149.0 (C<sub>3'</sub>); 137.3 (C<sub>q</sub>Bn); 137.2 (C<sub>q</sub>Bn); 136.5 (C<sub>q</sub>Bn); 136.4 (C<sub>q</sub>Bn); 130.6 (C<sub>1'</sub>); 128.7-127.3 (CHBn, 20C); 121.3 (C<sub>6'</sub>); 115.5 (C<sub>5'</sub>); 114.7 (C<sub>2'</sub>); 103.8 (C<sub>4a</sub>); 94.9 (C<sub>8</sub>); 93.8 (C<sub>6</sub>); 73.3 (C<sub>9</sub>); 71.6-71.0 (CH<sub>2</sub>Bn, 4C); 71.3 (C<sub>3</sub>); 68.1 (C<sub>2</sub>); 70.6 (C<sub>4</sub>); 62.4 (C<sub>10</sub>).

**HRMS** : [M+Na]<sup>+</sup>: mass calculated for C<sub>45</sub>H<sub>41</sub>BrO<sub>8</sub>Na : 811.7015 and mass found : 811.1879.



**(2R,2'R,3S,3'S,4R)-5,5',7,7'-tetrakis(benzyloxy)-2,2'-bis(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)-8-bromo-[4,8'-bichroman]-3,3'-diol**

To a stirred solution of **41** (26 mg, 0.04 mmol) and **56** (32 mg, 0.04 mmol) in dry DCM (1 mL) was added NaAuCl<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (0.8 mg, 2 μmol). The resulting orange solution was stirred 5h30 at room temperature. The solution was dissolved in AcOEt (15 mL) and washed with brine (3×10 mL). The solution was evaporated to dryness to get an oil, which was purified by column chromatography, eluted with Cyclohexane/EtOAc (80/20 to 75/25), to furnish **66** as an orange oil (34 mg, 62 %).



**R<sub>f</sub>** = 0.41 (Cyclohexane/AcOEt : 70/30).

**m.p** : 76°C.

**IR (Neat)** :  $\nu_{\text{max}}$  3568, 3062, 3029, 2865, 1600, 1509, 1498, 1454, 1419, 1380, 1339, 1263, 1213, 1172, 1114, 1026, 909, 847, 808, 734, 695 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, mixture of two rotamers 63/37)** :  $\delta$ 7.53-7.22 (H<sub>Ar</sub>, m, 40H); 7.15-7.03 (H<sub>2</sub>'B and H<sub>2</sub>'E, Maj and min, m, 2H); 6.98-6.81 (H<sub>5</sub>'B, Maj and min and H<sub>5</sub>'E Maj, m, 1.63H); 6.93-6.83 (H<sub>6</sub>'B, Maj and min, m, 1H); 6.78 (H<sub>5</sub>'E, min, d, 0.37H,  $J_{5'E,6'E} = 1.5$  Hz); 6.32 (H<sub>6</sub>D, Maj, s, 0.63H); 6.29 (H<sub>6</sub>'E, min, d, 0.37H,  $J_{5'E,6'E} = 1.5$  Hz); 6.26 (H<sub>6</sub>A, min and H<sub>6</sub>'E, Maj, s, 1H); 6.24 (H<sub>6</sub>A, Maj, s, 0.63H); 6.15 (H<sub>6</sub>D, min, s, 0.37H); 5.34-4.49 (CH<sub>2</sub>Bn, Maj and min, m, 16H); 4.84 (H<sub>4</sub>C, min, d, 0.37H,  $J_{4C,3C} = 8.3$  Hz); 4.80 (H<sub>4</sub>C, Maj, d, 0.63H,  $J_{4C,3C} = 9.03$  Hz); 4.60 (H<sub>2</sub>C, Maj and min, d, 1H,  $J_{2C,3C} = 9.8$  Hz); 4.44 (H<sub>2</sub>F, min, d, 0.37H,  $J_{2F,3F} = 8.7$  Hz); 4.32 (H<sub>3</sub>C, Maj, m, 0.63H); 4.19 (H<sub>3</sub>C, min, m, 0.37H); 3.73 (H<sub>3</sub>F, Maj and min, m, 1H); 3.72 (H<sub>2</sub>F, Maj, d, 0.63H,  $J_{2F,3F} = 12.1$  Hz); 3.26 and 2.70 (H<sub>4</sub>F $\alpha$  and H<sub>4</sub>F $\beta$ , min, ABX, 0.74H,  $J_{4F\alpha,4F\beta} = 16.6$  Hz,  $J_{4F\alpha,3F} = 5.8$  Hz and  $J_{4F\beta,3} = 9.4$  Hz); 3.11 and 2.46 (H<sub>4</sub>F $\alpha$  and H<sub>4</sub>F $\beta$ , Maj, ABX, 1.26H,  $J_{4F\alpha,4F\beta} = 16.2$  Hz,  $J_{4F\alpha,3F} = 8.5$  Hz and  $J_{4F\beta,3F} = 4.9$  Hz).

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)** :  $\delta$ 157.4 (C<sub>7</sub>A, min); 156.8 (C<sub>7</sub>A, min); 156.7 (C<sub>7</sub>D, Maj); 156.3 (C<sub>7</sub>D, Maj); 156.3 (C<sub>5</sub>D, min); 156.1 (C<sub>5</sub>D, Maj); 154.8 (C<sub>5</sub>A, Maj); 154.7 (C<sub>5</sub>A, min); 154.5 (C<sub>8a</sub>A, Maj); 154.2 (C<sub>8a</sub>A, min); 154.0 (C<sub>8a</sub>D, Maj); 153.4 (C<sub>8a</sub>D, min); 149.8-148.6 (C<sub>3</sub>'B, C<sub>3</sub>'E, C<sub>4</sub>'B, C<sub>4</sub>'E, Maj and min); 137.2-137.0 (C<sub>q</sub>Bn, Maj and min); 132.3 (C<sub>1</sub>'E, Maj); 132.2 (C<sub>1</sub>'B, min); 132.1 (C<sub>1</sub>'B, Maj); 130.6 (C<sub>1</sub>'E, min); 130.2-127.5 (CHBn, Maj and min); 121.6 (C<sub>6</sub>'B, Maj); 121.1 (C<sub>6</sub>'B, min); 120.7 (C<sub>6</sub>'E, Maj); 120.3 (C<sub>6</sub>'E, min); 116.1 (C<sub>5</sub>'B, min); 115.4 and 115.2 (C<sub>5</sub>'B and C<sub>5</sub>'E, Maj); 115.1 (C<sub>5</sub>'E, min); 114.5 (C<sub>2</sub>'B and C<sub>2</sub>'E, min); 114.1 (C<sub>2</sub>'B and C<sub>2</sub>'E, Maj); 112.2 (C<sub>8</sub>D, min); 111.9 (C<sub>8</sub>D, Maj); 111.2 (C<sub>4a</sub>A, Maj); 111.1 (C<sub>4a</sub>A, min); 104.0 (C<sub>4a</sub>D, min); 103.0 (C<sub>4a</sub>D, Maj); 94.4 (C<sub>8</sub>A, min); 94.3 (C<sub>8</sub>A, Maj); 94.1 (C<sub>6</sub>A, Maj); 93.8 (C<sub>6</sub>A, min); 92.3 (C<sub>6</sub>D, min); 91.8 (C<sub>6</sub>D, Maj); 82.7 (C<sub>2</sub>C, Maj); 82.3 (C<sub>2</sub>C, min); 81.9 (C<sub>2</sub>F, min); 81.3 (C<sub>2</sub>F, Maj); 73.8 (C<sub>3</sub>C, min); 73.6 (C<sub>3</sub>C, Maj); 71.9-70.5 (CH<sub>2</sub>Bn, Maj and min); 69.3 (C<sub>3</sub>F, min); 69.0 (C<sub>3</sub>F, Maj); 38.0 (C<sub>4</sub>C, min); 37.9 (C<sub>4</sub>C, Maj); 29.1 (C<sub>4</sub>F, min); 28.6 (C<sub>4</sub>F, Maj).

**HRMS** : [M+Na]<sup>+</sup>: mass calculated for C<sub>86</sub>H<sub>73</sub>BrO<sub>12</sub>Na : 1399.4183 and mass found : 1399.4160.

**(2R,2'R,3S,3'S,4R)-5,5',7,7'-tetrakis(benzyloxy)-2,2'-bis(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)-8-bromo-3-hydroxy-[4,8'-bichroman]-3'-yl 3,4,5-tris(benzyloxy)benzoate**

To a stirred solution of **56** (59 mg, 0.074 mmol) and **47** (73 mg, 0.068 mmol) in dry DCM (3 mL) was added NaAuCl<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (1.3 mg, 3.4 μmol). The resulting yellow solution was stirred 4h at room temperature. The solution was evaporated to dryness to get a brown foam, which was purified by column chromatography, eluted with Cyclohexane/EtOAc (90/10 to 85/15), to furnish **67** as a yellow foam (59 mg, 49 %).

**R<sub>f</sub>** = 0.5 (Cyclohexane/AcOEt : 80/20).

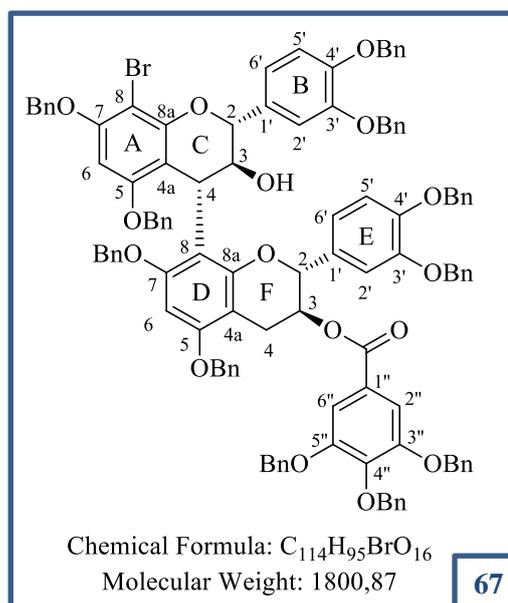
**m.p** : 91°C.

**IR (Neat)** :  $\nu_{\max}$  3031, 2924, 2855, 1714, 1598, 1498, 1454, 1427, 1262, 1211, 1111, 1023, 735, 696 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, mixture of two rotamers 60/40)** : 87.53-7.23 (H<sub>Ar</sub>, m, 55H); 7.33-7.32 (H6'' and H2'', Maj and min, s, 2H); 7.17 (H2'E, Maj and min, s, 1H); 7.12 (H2'B, Maj and min, s, 1H); 6.93 (H6'E and H5'E, Maj and min, s, 2H); 6.91 (H5'B, min, d, 0.4H,  $J_{5'B,6'B} = 7.9$  Hz); 6.90 (H6'B, Maj, d, 0.6H,  $J_{6'B,5'B} = 7.9$  Hz); 6.81 (H5'B, Maj, d, 0.6H,  $J_{5'B,6'B} = 7.9$  Hz); 6.43 (H6'B, min, d, 0.4H,  $J_{6'B,5'B} = 7.9$  Hz); 6.40 (H6D, Maj, s, 0.6H); 6.31 (H6A, min, s, 0.4H), 6.25 (H6A, Maj, s, 0.6H); 6.23 (H6D, min, s, 0.4H); 5.42-4.60 (CH<sub>2</sub>Bn, H3F, Maj and min and H2C, min, m, 23.4H); 4.97 (H4C, Maj or min, s); 4.90 (H4C, Maj or min, s); 4.75 (H2C, Maj, s, 0.6H); 4.37 (H3C, min, m, 0.4H); 4.28 (H3C, Maj, m, 0.6H); 4.20 (H2F, min, d, 0.4H,  $J_{2F,3F} = 9.3$  Hz); 4.13 (H2F, Maj, d, 0.6H,  $J_{2F,3F} = 9.3$  Hz); 3.36-2.70 (H4F, Maj and min, ABX, 2H,  $J_{4F\alpha,4F\beta} = 16.4$  Hz,  $J_{4F\beta,3F} = 5.6$  Hz and  $J_{4F\alpha,3F} = 9.2$  Hz).

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)** :  $\delta$ 165.0 (CO); 157.0 (C7D, Maj or min); 156.1 (C5A); 155.6-155.5 (C5D and C7D, Maj or min, C3'', C4'', C5''); 154.2 (C7A, min); 154.1 (C7A, Maj); 154.0 (C8aD, min); 153.7 (C8aA, min); 152.4 (C8aA, Maj); 152.4 (C8aD, Maj); 149.2-148.3 (C3'B, C3'E, C4'B, C4'E); 142.7 (C1'', min); 142.6 (C1'', Maj); 137.5-136.6 (CqBn); 131.6-130.3 (C1'B and C1'E); 128.9-127.0 (CHBn); 121.0 (C6'D, Maj or min); 120.4 (C6A, Maj or min); 120.2 (C6'D, Maj or min); 119.9 (C6'A, Maj or min); 115.0-114 (C5'B, C5'E and C2'B, Maj or min); 113.7 (C2'E, Maj); 113.5 (C2'E, min); 111.8 (C8D, min); 111.5 (C8D, Maj); 110.7 (C4aA, Maj); 110.2 (C4aA, min); 109.2 (C6'' and C2''); 102.4 (C4aD, min); 101.8 (C4aD, Maj); 93.7 (C8A); 93.5 (C6A, Maj); 93.2 (C6A, min); 91.6 (C6D, min); 91.3 (C6D, Maj); 82.2 (C2C, Maj); 81.9 (C2C, min); 78.3 (C2F, min); 77.8 (C2F, Maj); 72.5-69.6 (CH<sub>2</sub>Bn, C3F, Maj and min); 73.0 (C3C, min); 72.5 (C3C, Maj); 37.5 (C4C, min); 37.3 (C4C, Maj); 26.1 (C4F, Maj); 25.6 (C4F, min).

**HRMS** : [M+Na]<sup>+</sup>: mass calculated for C<sub>114</sub>H<sub>95</sub>BrO<sub>16</sub>Na : 1821.5701 and mass found : 1821.60.

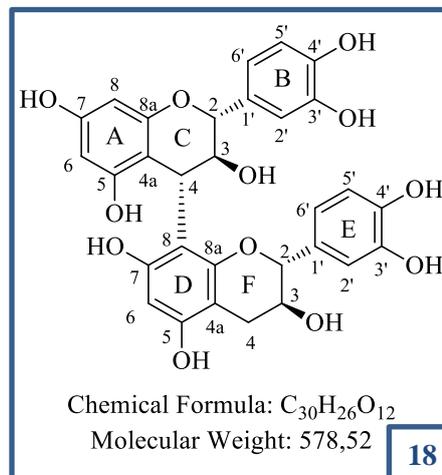


**(2R,2'R,3S,3'S,4S)-2,2'-bis(3,4-dihydroxyphenyl)-[4,8'-bichroman]-3,3',5,5',7,7'-hexaol**

**66** (50 mg, 0.036 mmol) was dissolved in MeOH/AcOEt (4 mL, 50/50), 25 mg of Pd(OH)<sub>2</sub>/C and few drops of NEt<sub>3</sub> were added to the mixture. The reaction was stirred 24h under Hydrogen atmosphere, filtered on Millipore before removing the solvent in vacuo. The orange solid was purified on C18 micro column to furnish **18** as an orange solid (14 mg, 70%).

**m.p** : 218°C.

**IR (Neat)** :  $\nu_{\max}$  3375, 1610, 1522, 1451, 1375, 1283, 1207, 1144, 1106, 1092, 1061, 870, 818, 780, 668, 621 cm<sup>-1</sup>.



**<sup>1</sup>H (H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O : 9/1, 600 MHz, ppm)** :  $\delta$ 6.87 (H5'B, d, 1H,  $J_{5'B,6'B} = 8.2$  Hz); 6.83 (H5'E, d, 1H,  $J_{5'E,6'E} = 8.2$  Hz); 6.80 (H2'B, d, 1H,  $J_{2'B,6'B} < 1$  Hz); 6.61 (H2'E, d, 1H,  $J_{2'E,6'E} < 1$  Hz); 6.61 (H6'B, dd, 1H,  $J_{6'B,2'B} < 1$  Hz and  $J_{6'B,5'B} = 8.2$  Hz); 6.46 (H6'E, dd, 1H,  $J_{6'E,2'E} < 1$  Hz and  $J_{6'E,5'E} = 8.2$  Hz); 6.15 (H6D, s, 1H); 6.00 (H6A, s, 1H); 5.71 (H8A, s, 1H); 4.58 (H2F, d, 1H,  $J_{2F,3F} = 7.9$  Hz); 4.39 (H2C, d, 1H,  $J_{2C,3C} = 10.0$  Hz); 4.36 (H4C, d, 1H,  $J_{4C,3C} = 10.5$  Hz); 4.29 (H3C, m, 1H); 3.92 (H3F, m, 1H); 2.85 and 2.49 (H4F $\alpha$  and H4F $\beta$ , ABX, 2H,  $J_{4F\alpha,4F\beta} = 15.8$  Hz,  $J_{4F\alpha,3F} = 8.5$  Hz and  $J_{4F\beta,3F} = 5.6$  Hz).

**<sup>13</sup>C (H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O : 9/1, 150 MHz, ppm)** :  $\delta$ 156.8 (C8aA); 155.2 (C5A); 154. (C7A); 154.1 (C7D); 153.2 (C8aD); 153.0 (C5D); 144.7; 144.1; 144.0 and 143.9 (C4'B, C3'E, C4'E and C3'B); 130.8 (C1'E); 130.7 (C1'B); 120.5 (C6'B); 120.2 (C6'E); 116.4 (C5'B); 116.0 (C2'B); 115.8 (C5'E); 115.2 (C2'E); 109.3 (C8D); 107.3 (C4aA); 101.5 (C4aD); 96.9 (C6A); 95.7 (C6D); 95.6 (C8A); 82.0 (C2C); 80.6 (C2F); 72.9 (C3C); 67.3 (C3F); 37.1 (C4C); 27.5 (C4F).

**HRMS** : [M+Na]<sup>+</sup>: mass calculated for C<sub>30</sub>H<sub>26</sub>O<sub>12</sub>Na : 601.1322 and mass found : 601.1319.

**(2R,2'R,3S,3'S,4S)-2,2'-bis(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,5',7,7'-pentahydroxy-[4,8'-bichroman]-3'-yl 3,4,5-trihydroxybenzoate**

**67** (50 mg, 0.028 mmol) was dissolved in MeOH/AcOEt (3 mL, 50/50) and 25 mg of Pd(OH)<sub>2</sub>/C and few drops of NEt<sub>3</sub> were added to the mixture. The reaction was stirred 26h under Hydrogen atmosphere, filtered on Millipore before removing the solvent in vacuo. The orange solid was purified on C18 micro column to furnish **30** as an orange solid (19 mg, 100%).

**m.p** : 198°C.

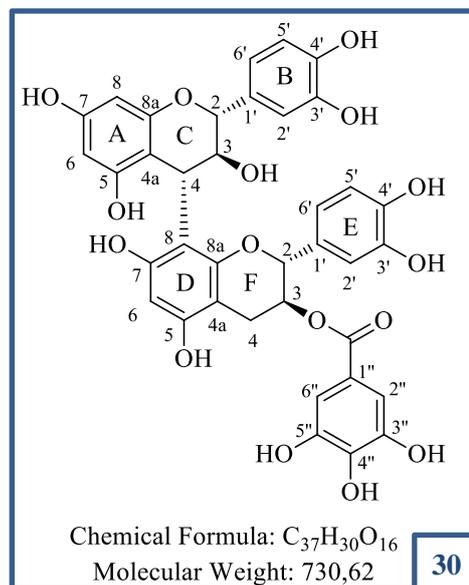
**IR (Neat)** :  $\nu_{\max}$  3406, 2924, 2853, 1703, 1614, 1520, 1451, 1384, 1218, 1143, 1108, 1029 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (MeOD, 300 MHz, mixture of two rotamers 60/40)** :  $\delta$ 7.19 (H6'' and H2'' Maj, s, 1.2H);

7.18 (H6'' and H2'', min, s, 0.8H); 7.03 (H2'E, Maj and min, H2'B, min, s, 1.4H); 6.98 (H2'B, Maj, s, 0.6H); 6.80 (H6'E and H5'E, s, 2H); 6.76 (H6'B, Maj, d, 0.6H,  $J_{6'B,5'B} = 7.9$  Hz); 6.68 (H5'B, Maj and min, s, 1H,  $J_{5'B,6'B} = 7.9$  Hz); 6.30 (H6'B, min, d, 0.4H,  $J_{6'B,5'B} = 7.9$  Hz); 6.26 (H6D, Maj, s, 0.6H); 6.18 (H6A, min, s, 0.4H); 6.11 (H6A, Maj, s, 0.6H); 6.10 (H6D, min, s, 0.4H); 5.24 (H3F, Maj or min, m); 5.16 (H3F, Maj or min, m); 5.42-4.60 (CH<sub>2</sub>Bn, m, 22H); 4.85 (H2F, Maj or min, d,  $J_{2F,3F} = 7.6$  Hz); 4.82 (H4C, Maj or min, d,  $J_{4C,3C} = 8.74$  Hz); 4.74 (H4C, min or Maj, s, 1H); 4.55 (H2C, Maj, d, 0.6H,  $J_{2C,3C} = 9.6$  Hz); 4.46 (H2C, min, d, 0.4 H,  $J_{2C,3C} = 9.7$  Hz); 4.23 (H3C, min, m, 0.4H); 4.14 (H3C, Maj, m, 0.6H); 3.99 (H2F, Maj or min, d,  $J_{2F,3F} = 8.7$  Hz); 3.22-2.57 (H4F $\alpha$  and H4F $\beta$ , Maj and min, ABX, 2H,  $J_{4F\alpha,4F\beta,Maj} = 16.3$  Hz,  $J_{4F\alpha,3F,Maj} = 6.7$  Hz,  $J_{4F\beta,3F,Maj} = 5.8$  Hz,  $J_{4F\alpha,4F\beta,min} = 16.7$  Hz,  $J_{4F\alpha,3F,min} = 8.7$  Hz and  $J_{4F\beta,3F,min} = 7.9$  Hz).

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)** :  $\delta$ 165.0 (CO); 157.0 (C7D, Maj or min); 156.1 (C5A); 155.6–155.5 (C5D and C7D, Maj or min); 154.2 (C7A, min); 154.1 (C7A, Maj); 154.0 (C8aD, min); 153.7 (C8aA, min); 153.0 (C3'',C4'',C5'', Maj and min); 152.4 (C8aA, Maj); 152.4 (C8aD, Maj); 149.2 (C4'B, Maj or min); 149.0 (C3'B, C3'E, C4'B, C4'E, Maj and min); 148.3 (C4'B, Maj or min); 142.7 (C1'', min); 142.6 (C1'', Maj); 137.5–136.6 (CqBn); 131.6 and 131.0 (C1'E, Maj or min); 131.1 and 130.3 (C1'B, Maj or min); 128.9–127.0 (CHBn); 121.0 (C6'E, Maj or min); 120.4 (C6'B, Maj or min); 120.2 (C6'E, Maj or min); 119.9 (C6'B, Maj or min); 115.0-114.4 (C5'B and C5'E, Maj or min); 114.5 and 113.5 (C2'B, Maj or min); 114.0 and 113.7 (C2'E, Maj or min); 111.8 (C8D, min); 111.5 (C8D, Maj); 110.7 (C4aA, Maj); 110.2 (C4aA, min); 109.2 (C6'' and C2'', Maj and min); 102.4 (C4aD, min); 101.8 (C4aD, Maj); 93.7 (C8A); 93.5 (C6A, Maj); 93.2 (C6A, min); 91.6 (C6D, min); 91.3 (C6D, Maj); 82.2 (C2C, Maj); 81.9 (C2C, min); 78.3 (C2F, min); 77.8 (C2F, Maj); 72.5–69.6 (C2B, Maj and min); 73.0 (C3C, min); 72.5 (C3C, Maj); 71.7 and 70.0 (C3F Maj or min); 37.5 (C4C, min); 37.3 (C4C, Maj); 26.1 (C4F, Maj); 25.6 (C4F, min).

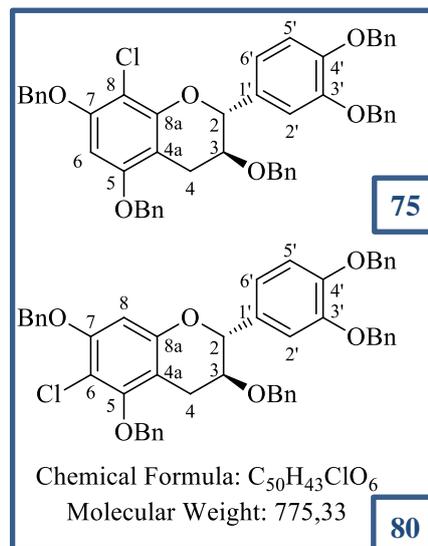
**HRMS** : [M-H]<sup>-</sup>: mass calculated for C<sub>37</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub> : 729.1456 and mass found : 729.1456.



**(2R,3S)-3,5,7-tris(benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)-8-chlorochroman**

To a solution of a mixture of **81** and **82** (**70/30**) (85 mg, 0.124 mmol) in dry DMF (0.21 mL) was added a solution of NaH (4.46 mg, 0.186 mmol) in dry DMF (0.06 mL) at 0°C. The solution was stirred 10 mn and 0.023 mL of benzyl chloride was added (25 mg, 0.198 mmol). The solution was stirred 2h and the reaction was quenched using 1 mL of water. The product was extracted with Et<sub>2</sub>O (3×10 mL), the organic layers were combined, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and evaporated to dryness. The product was purified on silica gel eluted with Cyclohexane/EtOAc (70/30 to 50/50) to afford a mixture of **75** and **80** (**70/30**) as yellow foam (57 mg, 58%).

**R<sub>f</sub>** = 0.40 (hexane/EtOAc, 3/1).



**IR (Neat)** :  $\nu_{\max}$  3012, 2908, 2277, 2202, 2119, 1606, 1586, 1511, 1489, 1418, 1364, 1328, 1271, 1202, 1127, 1107, 1052, 1030, 839, 820, 755, 542 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) :**

**C8** :  $\delta$ 7.49-7.22 (H<sub>Ar</sub> Bn, m, 25H); 7.1 (H6', m, 1H); 6.99 (H2', d, 1H,  $J_{2',6'}$  = 1.03 Hz); 6.91 (H5', s, 1H); 6.27 (H6, s, 1H); 5.19 (CH<sub>2</sub>Bn, s, 2H); 5.10 (CH<sub>2</sub>Bn, s, 4H); 4.97 (CH<sub>2</sub>Bn, s, 2H); 4.59 (H2, d, 1H,  $J_{2,3}$  = 7.8 Hz); 4.29 (CH<sub>2</sub>Bn, m, 2H); 3.73 (H3, m, 1H); 2.89 (H4 $\beta$ , dd, 1H,  $J_{4\beta,4\alpha}$  = 16.5 Hz and  $J_{4\beta,3}$  = 5.3 Hz); 2.73 (H4 $\alpha$ , dd, 1H,  $J_{4\alpha,4\beta}$  = 16.5 Hz and  $J_{4\alpha,3}$  = 7.6 Hz).

**C6** :  $\delta$ 7.49-7.22 (H<sub>Ar</sub> Bn, m, 25H); 7.01 (H6', m, 1H); 6.94 (H2', d, 1H,  $J_{2',6'}$  = 1.03 Hz); 6.87 (H5', s, 1H); 6.72 (H6, s, 1H); 5.20 (CH<sub>2</sub>Bn, s, 2H); 5.09 (CH<sub>2</sub>Bn, s, 4H); 5.00 (CH<sub>2</sub>Bn, s, 2H); 4.77 (H2, d, 1H,  $J_{2,3}$  = 8.5 Hz); 4.16 (CH<sub>2</sub>Bn, m, 2H); 3.63 (H3, m, 1H); 2.88 (H4 $\beta$ , dd, 1H,  $J_{4\beta,4\alpha}$  = 16.5 Hz and  $J_{4\beta,3}$  = 5.3 Hz); 2.64 (H4 $\alpha$ , dd, 1H,  $J_{4\alpha,4\beta}$  = 16.5 Hz and  $J_{4\alpha,3}$  = 8.6 Hz).

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) :** **C8**  $\delta$ 155.4 (C5); 153.9 (C7); 151.0 (C8a); 149.4 (C3'); 149 (C4'); 137.4-136.68 (CHBn); 130.6 (C1'); 128.9-127.1 (CHBn); 120.1 (C6'); 114.9 (C5'); 113.7 (C2'); 104.1 (C4a); 103.6 (C8); 93.1 (C6); 81.7 (C2); 77.6 (C3); 71.4 (CH<sub>2</sub>Bn); 27.4 (C4).

**HRMS** : [M+Na]<sup>+</sup>: mass calculated for C<sub>50</sub>H<sub>43</sub>ClO<sub>6</sub>Na : 797.3302 and mass found : 797.2676.

**(2R,3S)-5,7-bis(benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)-4-(2-ethoxyethoxy)chroman-3-ol**

To a stirred solution of **41** (100 mg, 0.154 mmol) in 2mL of DCM was added 20  $\mu$ L of 2-ethoxyethanol (18 mg, 0.21 mmol) and DDQ (50 mg, 0.22 mmol). The reaction mixture was stirred 2h at room temperature and DMAP was added (40 mg, 0.308 mmol). The solution was stirred 10mn and the solvent was evaporated to dryness to get a black solid. The product was purified by column chromatography eluted with Cyclohexane/EtOAc (70/30) to furnish **83** as a brown solid (107 mg, 94%).

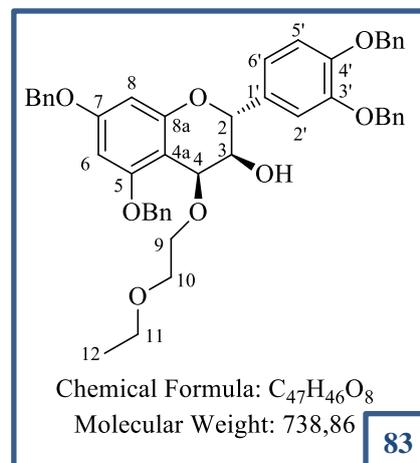
**R<sub>f</sub>** = 0.3 (Cyclohexane/EtOAc).

**m.p** : 111 °C.

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** :  $\delta$ 7.51-7.37 (H<sub>A</sub>Bn, m, 20H); 7.12 (H<sub>2'</sub>, d, 1H,  $J_{2',6'} = 1.5$  Hz); 7.02 (H<sub>6'</sub>, dd, 1H,  $J_{6',5'} = 8.5$  Hz and  $J_{6',2'} = 1.5$  Hz); 6.98 (H<sub>5'</sub>, d, 1H,  $J_{5',6'} = 8.5$  Hz); 6.26 (H<sub>6</sub>, d, 1H,  $J_{6,8} = 1.9$  Hz); 6.15 (H<sub>8</sub>, d, 1H,  $J_{8,6} = 1.9$  Hz); 5.16 (CH<sub>2</sub>Bn, s, 6H); 5.06 (H<sub>2</sub> and H<sub>4</sub>, d, 2H,  $J_{4,3} = 4$  Hz); 5.00 (CH<sub>2</sub>Bn, s, 2H); 4.77 (H<sub>3</sub>, d, 1H,  $J_{3,4} = 4$  Hz); 4.12 (H<sub>11</sub>, m, 2H); 3.49-3.40 (OCH<sub>2</sub>, m, 2H); 3.38 (OCH<sub>2</sub>, m, 2H); 1.1 (H<sub>12</sub>, t, 2H,  $J_{12,11} = 7$  Hz).

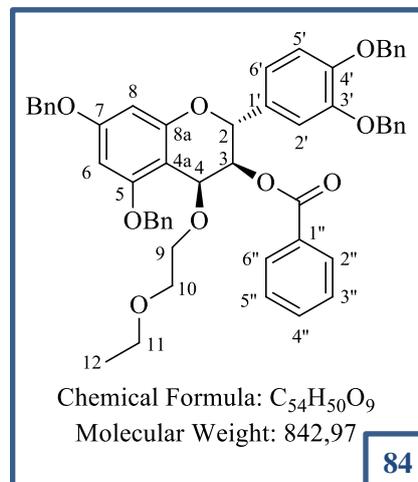
**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)** :  $\delta$ 160.9 (C<sub>7</sub>); 158.6 (C<sub>5</sub>); 156.0 (C<sub>8a</sub>); 149.4 (C<sub>4'</sub>); 149.0 (C<sub>3'</sub>); 137.3 (C<sub>q</sub>Bn); 137.2 (C<sub>q</sub>Bn); 136.5 (C<sub>q</sub>Bn); 136.4 (C<sub>q</sub>Bn); 130.6 (C<sub>1'</sub>); 128.7-127.3 (CHBn, 20C); 121.3 (C<sub>6'</sub>); 115.5 (C<sub>5'</sub>); 114.7 (C<sub>2'</sub>); 101.1 (C<sub>4a</sub>); 94.9 (C<sub>8</sub>); 93.8 (C<sub>6</sub>); 84.7 (C<sub>2</sub>); 72.7 (OCH<sub>2</sub>); 72 (C<sub>4</sub>); 71.8 (C<sub>3</sub>); 71.6-71.0 (CH<sub>2</sub>Bn, 4C); 70.4 (OCH<sub>2</sub>); 66.6 (OCH<sub>2</sub>); 15.2 (C<sub>12</sub>).

**HRMS** : [M+Na]<sup>+</sup>: mass calculated for C<sub>47</sub>H<sub>46</sub>O<sub>8</sub>Na : 761.3084 and mass found : 761.3066.



**(2R,3S)-5,7-bis(benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)-4-(2-ethoxyethoxy)chroman-3-yl benzoate**

To a stirred solution of **83** (80 mg, 0.109 mmol) in 1.13 mL of DCM was added 30  $\mu$ L of triethylamine (22 mg, 0.218 mmol), 18  $\mu$ L of benzoyl chloride (20 mg, 0.158 mmol) and DMAP (1.35 mg, 0.011 mmol). The reaction mixture was stirred 14h at room temperature and the reaction was quenched using 0.2 mL of *N,N'*-Dimethylethylenediamine and 0.2 mL of HCl 1M. The product was extracted using EtOAc (3 $\times$ 15 mL) and the organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and evaporated to dryness. The mixture was purified using column chromatography eluted with 80/20 Cyclohexane/EtOAc to furnish **84** as a white solid (83 mg, 90%).



**R<sub>f</sub>** = 0.60 (hexane/EtOAc, 3/1).

**m.p** : 120 °C.

**IR (Neat)** :  $\nu_{\text{max}}$  3226, 3010, 2096, 2277, 2190, 2119, 1600, 1575, 1511, 1481, 1428, 1408, 1356, 1327, 1271, 1202, 1186, 1171, 1126, 1094, 1052, 1030, 1000, 960, 839, 820, 786, 756, 667, 543  $\text{cm}^{-1}$ .

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** :  $\delta$ 7.91 (H2'' and H6'', d, 2H,  $J_{2'',4''}, 6'',4''} = 7.3$  Hz); 7.52 (H4'', t, 1H,  $J_{4'',2''}, 4'',6''} = 7.3$  Hz); 7.45-7.29 (H<sub>Ar</sub>Bn, H3'' and H5'', m, 22H); 7.12 (H2', d, 1H,  $J_{2',6'} = 1.8$  Hz); 7.07 (H6', dd, 1H,  $J_{6',5'} = 8.2$  Hz and  $J_{6',2'} = 1.8$  Hz); 6.89 (H5', d, 1H,  $J_{5',6'} = 8.2$  Hz); 6.28 (H6, d, 1H,  $J_{6,8} = 2.2$  Hz); 6.20 (H8, d, 1H,  $J_{8,6} = 2.2$  Hz); 5.46 (H2 and H3, m, 2H); 5.08 (CH<sub>2</sub>Bn, s, 2H), 5.06 (CH<sub>2</sub>Bn, s, 2H); 5.01 (CH<sub>2</sub>Bn and H4, s, 5H); 3.80 (OCH<sub>2</sub>, m, 2H); 3.45 (OCH<sub>2</sub>, m, 2H); 3.35 (OCH<sub>2</sub>, m, 2H); 1.1 (H12, m, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)** :  $\delta$ 165.9 (CO); 160.9 (C7); 158.6 (C5); 156.0 (C8a); 149.4 (C4'); 149.0 (C3'); 137.3 (CqBn); 137.2 (CqBn); 136.5 (CqBn); 136.4 (CqBn); 133 (C4''); 130.6 (C1'); 130.2 (C1''); 128.7-127.3 (CHBn, C2'', C3'', C5'' and C6'', 24C); 121.3 (C6'); 115.5 (C5'); 114.7 (C2'); 103.8 (C4a); 94.9 (C8); 93.8 (C6); 88.3 (C3); 76.8 (C2); 72.7 (OCH<sub>2</sub>); 72 (C4); 71.6-71.0 (CH<sub>2</sub>Bn, 4C); 70.4 (OCH<sub>2</sub>); 66.6 (OCH<sub>2</sub>); 15.2 (C12).

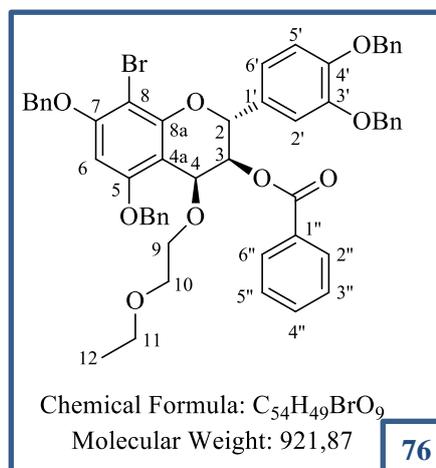
**HRMS** : [M+Na]<sup>+</sup>: mass calculated for C<sub>54</sub>H<sub>50</sub>O<sub>9</sub>Na : 864.9674 and mass found : 865.3523.

**(2R,3S)-5,7-bis(benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)-8-bromo-4-(2-ethoxyethoxy)chroman-3-yl benzoate**

To a stirred solution of **84** (45 mg, 0.053 mmol) in dry DCM (0.6 mL) was added a solution of NBS (10 mg, 0.058 mmol) in dry DCM (0.6 mL) at  $-60^{\circ}\text{C}$ . The solution was stirred 5 min at room temperature. The solution was dissolved in AcOEt (10 mL) and washed with brine (3x10 mL). The organic layers were combined, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered and evaporated to dryness to get **76** as a pink solid (32 mg, 66%).

**R<sub>f</sub>** = 0.55 (hexane/EtOAc, 3/1).

**m.p** :  $116^{\circ}\text{C}$ .



**IR (Neat)** :  $\nu_{\text{max}}$  3064, 3010, 2973, 2927, 2869, 2278, 2205, 2119, 1723, 1603, 1578, 1512, 1485, 1451, 1418, 1365, 1328, 1315, 1272, 1201, 1189, 1121, 1106, 1053, 1029, 1000, 840, 820, 755, 713,  $544\text{ cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)** :  $\delta$  7.91 ( $\text{H}_{2''}$  and  $\text{H}_{6''}$ , d, 2H,  $J_{2'',4''}, 6'',4''} = 7.3\text{ Hz}$ ); 7.52 ( $\text{H}_{4''}$ , t, 1H,  $J_{4'',2''}, 4'',6''} = 7.3\text{ Hz}$ ); 7.42-7.27 ( $\text{H}_{\text{ArBn}}$ ,  $\text{H}_{3''}$  and  $\text{H}_{5''}$ , m, 22H); 7.11 ( $\text{H}_{2'}$ , d, 1H,  $J_{2',6'} = 1.8\text{ Hz}$ ); 7.05 ( $\text{H}_{6'}$ , dd, 1H,  $J_{6',5'} = 8.2\text{ Hz}$  and  $J_{6',2'} = 1.8\text{ Hz}$ ); 6.87 ( $\text{H}_{5'}$ , d, 1H,  $J_{5',6'} = 8.2\text{ Hz}$ ); 6.17 ( $\text{H}_6$ , s, 1H); 5.55 ( $\text{H}_2$ , d, 1H,  $J_{2,3} = 10.7\text{ Hz}$ ); 5.3 ( $\text{H}_3$ , dd, 1H,  $J_{3,2} = 10.7\text{ Hz}$  and  $J_{3,4} = 3.26\text{ Hz}$ ); 5.15 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ , s, 4H); 5.08 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ , s, 2H); 5.00 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$  and  $\text{H}_4$ , s, 3H); 3.77 ( $\text{OCH}_2$ , m, 2H); 3.45 ( $\text{OCH}_2$ , m, 2H); 3.36 ( $\text{OCH}_2$ , m, 2H); 1.1 ( $\text{H}_{12}$ , m, 2H).

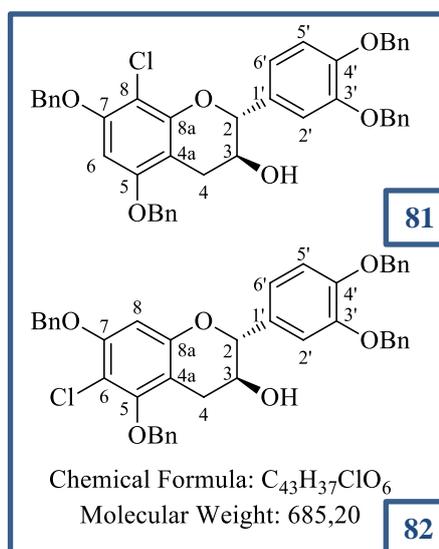
**$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)** :  $\delta$  166.3 (CO); 159.9 (C7); 157.7 (C5); 153.1 (C8a); 149.4 ( $\text{C}_{4'}$ ); 149.0 ( $\text{C}_{3'}$ ); 137.3 (CqBn); 137.2 (CqBn); 136.5 (CqBn); 136.4 (CqBn); 133 ( $\text{C}_{4''}$ ); 130.6 ( $\text{C}_{1'}$ ); 130.2 ( $\text{C}_{1''}$ ); 128.7-127.3 ( $\text{CHBn}$ ,  $\text{C}_{2''}$ ,  $\text{C}_{3''}$ ,  $\text{C}_{5''}$  and  $\text{C}_{6''}$ , 24C); 120.8 ( $\text{C}_{6'}$ ); 115.5 ( $\text{C}_{5'}$ ); 114.7 ( $\text{C}_{2'}$ ); 103.8 ( $\text{C}_{4a}$ ); 95.5 (C8); 94.6 (C6); 88.1 (C3); 76.8 (C2); 72.7 (C9); 72 (C4); 71.6-71.0 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ , 4C); 70.4 (C10); 66.6 (C11); 15.2 (C12).

**HRMS** :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : mass calculated for  $\text{C}_{54}\text{H}_{49}\text{BrO}_9\text{Na}$  : 944.8714 and mass found : 944.8940.

**(2R,3S)-5,7-bis(benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)-8-chlorochroman-3-ol;**  
**(2R,3S)-5,7-bis(benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)-6-chlorochroman-3-ol**

To an ice-cold stirred solution of **41** (100 mg, 0.15 mmol) in DCM (1 mL) was added a solution of NCS (23 mg, 0.17 mmol) in 2 mL of DCM and a solution of  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (0.077 mmol). The solution was stirred 30 min at  $0^\circ\text{C}$  and the reaction was quenched with 0.2 mL of  $\text{NEt}_3$  and 0.2 mL of  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ . The product was extracted with EtOAc. The organic layers were combined, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered and evaporated to dryness to get a yellow oil, which was purified by flash chromatography, eluted with Cyclohexane/EtOAc (85/15 to 80/20), to furnish the mixture of **81** and **82** (80/20) as a white solid (104 mg, 100 %).

$R_f = 0.17$  (Cyclohexane/EtOAc : 80/20).



**IR (Neat) :**  $\nu_{\text{max}}$  3012, 2908, 2277, 2202, 2119, 1606, 1586, 1511, 1489, 1418, 1364, 1328, 1271, 1202, 1127, 1107, 1052, 1030, 839, 820, 755, 542  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) :**

**-81 :**  $\delta$ 7.44-7.28 ( $\text{H}_{\text{Ar}}\text{Bn}$ , m, 20H); 7.01 ( $\text{H}_{2'}$ , s, 1H); 6.90 ( $\text{H}_{5'}$  and  $\text{H}_{6'}$ , s, 2H); 6.23 ( $\text{H}_6$ , s, 1H); 5.14 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ , s, 4H); 5.10 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ , s, 2H); 4.94 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ , s, 2H); 4.76 ( $\text{H}_2$ , d, 1H,  $J_{2,3} = 8.2$  Hz); 3.96 ( $\text{H}_3$ , m, 1H); 2.98 ( $\text{H}_{4\beta}$ , dd, 1H,  $J_{4\beta,4\alpha} = 16.4$  Hz and  $J_{4\beta,3} = 6.8$  Hz); 2.64 ( $\text{H}_{4\alpha}$ , dd, 1H,  $J_{4\alpha,4\beta} = 16.4$  Hz and  $J_{4\alpha,3} = 8.2$  Hz).

**-82 :**  $\delta$ 7.47-7.38 ( $\text{H}_{\text{Ar}}\text{Bn}$ , m, 20H); 7.00 ( $\text{H}_{2'}$ , s, 1H); 6.89 ( $\text{H}_{5'}$  and  $\text{H}_{6'}$ , s, 2H); 6.44 ( $\text{H}_8$ , s, 1H); 5.18 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ , s, 4H); 5.07 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ , s, 2H); 4.98 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ , s, 2H); 4.80 ( $\text{H}_2$ , d, 1H,  $J_{2,3} = 8.2$  Hz); 3.93 ( $\text{H}_3$ , m, 1H); 2.97 ( $\text{H}_{4\beta}$ , dd, 1H,  $J_{4\beta,4\alpha} = 16.4$  Hz and  $J_{4\beta,3} = 6.8$  Hz); 2.63 ( $\text{H}_{4\alpha}$ , dd, 1H,  $J_{4\alpha,4\beta} = 16.4$  Hz and  $J_{4\alpha,3} = 8.2$  Hz).

**$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100.2 MHz) :**

**-81 :**  $\delta$ 155.44 (C5); 153.9 (C7); 151.0 (C8a); 149.4 (C3'); 149 (C4'); 137.4; 137.2; 136.9; 136.8 (CqBn, 4C); 130.6 (C1'); 128.9-127.1 (C2 and CHBn, 20C); 120.1 (C6'); 114.9 (C5'); 113.7 (C2'); 104.1 (C4a); 103.6 (C8); 93.1 (C6); 81.7 (C2); 71.4 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ , 4C); 67.89 (C3); 27.4 (C4).

**-82:**  $\delta$ 155.4 (C5); 153.9 (C7); 151.0 (C8a); 149.4 (C3'); 149 (C4'); 137.4; 137.2; 136.9; 136.7 (CqBn, 4C); 130.6 (C1'); 128.9-127.1 (C2 and CHBn, 20C); 120.1 (C6'); 114.9 (C5'); 113.7 (C2'); 104.1 (C4a); 103.6 (C6); 93.1 (C8); 81.7 (C2); 71.4 (4C,  $\text{CH}_2\text{Bn}$ ); 67.8 (C3); 27.4 (C4).

**HRMS :**  $[\text{M}+\text{H}]^+$  : mass calculated for  $\text{C}_{43}\text{H}_{37}\text{ClO}_6$  : 685.2158 and mass found 684.2722.

**(2R,3S)-8-chloro-2-(3,4-dihydroxyphenyl)chroman-3,5,7-triol and (2R,3S)-6-chloro-2-(3,4-dihydroxyphenyl)chroman-3,5,7-triol**

A mixture of **81** and **82** (70 mg, 0.102 mmol) was dissolved in MeOH/AcOEt (10 mL, 50/50) and Pd(OH)<sub>2</sub>/C (35 mg, 0.050 mmol) was added to the mixture. The reaction was stirred 2h30 under Hydrogen atmosphere and was filtered on milipore before removing the solvent in vacuo. 31 mg of a white solid was obtained and purified by HPLC eluted with : 95% H<sub>2</sub>O / 5% ACN to 80% H<sub>2</sub>O / 20% ACN at 30 minutes and to 15% H<sub>2</sub>O / 85% ACN at 35 minutes, to furnish **98** and of **99** as white foams after lyophilization (C8/C6 : 16 mg/ 9 mg, 76%).

**Tr:** C6 : 24 min 30 sec, C8 : 25 min 30 sec.

**IR (Neat) :**  $\nu_{\max}$  3469, 2918, 1591, 1505, 1451, 1415, 1383, 1342, 1258, 1221, 1178, 1118, 1029, 731, 695 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (MeOD, 300 MHz) :**

**-98 :**  $\delta$ 6.82 (H2', d, 1H,  $J_{2',6'} = 1.9$  Hz); 6.76 (H5', d, 1H,  $J_{5',6'} = 8.2$  Hz); 6.70 (H6', dd, 1H,  $J_{6',5'} = 8.2$  Hz and  $J_{6',2'} = 1.9$  Hz); 6.08 (H6, s, 1H); 4.76 (H2, d, 1H,  $J_{2,3} = 6.56$  Hz); 4.03 (H3, m, 1H), 2.78 (H4 $\beta$ , dd, 1H,  $J_{4\beta, 4\alpha} = 16.5$  Hz and  $J_{4\beta, 3} = 5.3$  Hz); 2.56 (H4 $\alpha$ , dd, 1H,  $J_{4\alpha, 4\beta} = 16.5$  Hz and  $J_{4\alpha, 3} = 5.3$  Hz).

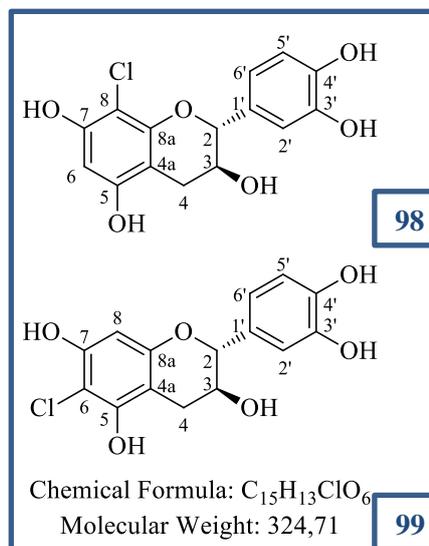
**-99 :**  $\delta$ 6.81 (H2', d, 1H,  $J_{2',6'} = 2.2$  Hz); 6.76 (H5', d, 1H,  $J_{5',6'} = 8$  Hz); 6.70 (H6', dd, 1H,  $J_{6',5'} = 8$  Hz and  $J_{6',2'} = 2.2$  Hz); 6.04 (H8, s, 1H); 4.60 (H2, d, 1H,  $J_{2,3} = 7.32$  Hz); 4.00 (H3, m, 1H), 2.87 (H4 $\beta$ , dd, 1H,  $J_{4\beta, 4\alpha} = 16.2$  Hz and  $J_{4\beta, 3} = 5.2$  Hz); 2.57 (H4 $\alpha$ , dd, 1H,  $J_{4\alpha, 4\beta} = 16.2$  Hz and  $J_{4\alpha, 3} = 5.2$  Hz).

**<sup>13</sup>C NMR (MeOD, 75 MHz):**

**-98 :**  $\delta$ 155.5 (C5); 153.4 (C7); 152.1 (C8a); 146.25 (C3'); 146.21 (C4'); 131.87 (C1'); 119.58 (C5'); 116.17 (C6'); 114.91 (C2'); 102.09 (C4a); 100.23 (C8); 96.61 (C6); 82.86 (C2); 68.26 (C3); 27.94 (C4).

**-99 :**  $\delta$ 154.83 (C5); 153.41 (C7); 152.87 (C8a); 146.28 (C3'); 146.24 (C4'); 130.93 (C1'); 119.88 (C5'); 116.13 (C6'); 115.09 (C2'); 102.20 (C4a); 101.67 (C6); 94.48 (C8); 82.79 (C2); 68.49 (C3); 28.83 (C4).

**HRMS :** [M+H]<sup>+</sup> : mass calculated for C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>ClO<sub>6</sub> : 324.7173 and mass found 323.0328.



## B6BnBrCl

In a biotage microwave vial was dissolved **56** (24 mg, 0.03 mmol), **98** (10 mg, 0.03 mmol) and NaAuCl<sub>4</sub> (0.6 mg, 1.84 μmol) in 2 mL of acetonitrile. The mixture was stirred 30mn at 100°C under microwave activation. 24 mg of **56** was added and the reaction was stirred 30mn at 100°C under microwave activation. This step was repeated 3 times and the solvent was evaporated to furnish an orange oil which was purified by HPLC eluting with 30-70 H<sub>2</sub>O-ACN to 15-85 in 25mn to 5-95 in 28mn. The solvent was evaporated in vacuo to get **100** as a white solid (25 mg, 78%).

**Tr:** C6 : 11 min 20 sec.

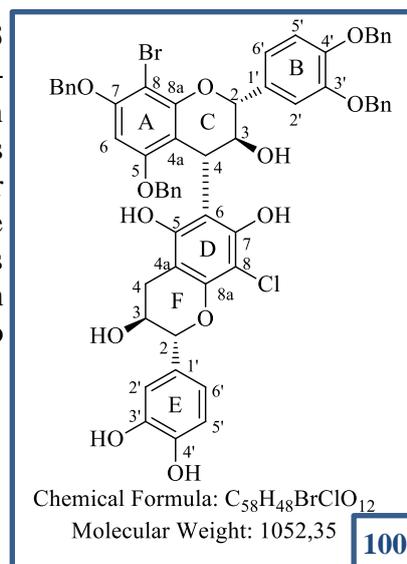
**m.p :** 93°C.

**IR (Neat) :** ν<sub>max</sub> 3443, 1650, 1384, 1205, 1140, 803, 725 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz, mixture of two rotamers 67/33) :** δ7.49-7.18 (H<sub>Ar</sub>, m, 20H); 7.31 (H2'B, Maj and min, m, 1H); 7.26 (H5'B, Maj and min, m, 1H); 7.18-7.01 (H6'B, Maj and min, m, 1H); 6.97 (H2'E, Maj and min, d, 1H, J<sub>2'E,6'E</sub> = 7.3Hz); 6.84 (H5'E, Maj and min, s, 1H); 6.72 (H6'E, min, m, 0.33H); 6.68 (H6'E, Maj, s, 0.67H); 6.32 (H6A, Maj, s, 0.67H); 6.31 (H6A, min, s, 0.33H); 5.16-5.01 (CH<sub>2</sub>Bn, m, 8H); 6.73-4.67 (H4C, Maj and min, m, 1H); 4.64 (H2F, Maj and min, m, 1H); 4.57 (H2C, Maj and min, d, 1H, J<sub>2C,3C</sub> = 9.1 Hz); 4.31-4.25 (H3C, Maj and min, m, 1H); 3.98 (H3F, min, m, 0.33H); 3.93 (H3F Maj, m, 0.67H); 2.70-2.61 (H4F<sub>α</sub>, Maj and min, m, 1H); 2.70-2.61 (H4F<sub>β</sub>, Maj, and min, m, 1H).

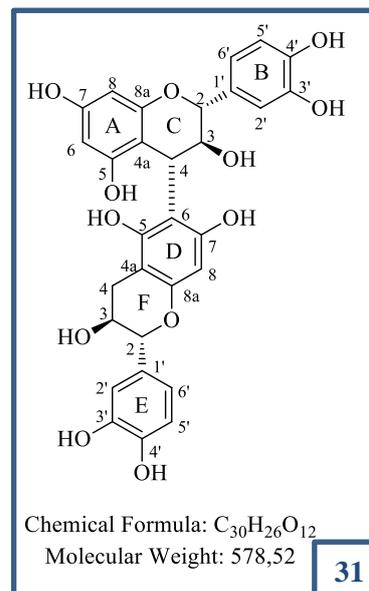
**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 150 MHz) :** δ157.8 (C7A, Maj and min); 155.7 (C5A, Maj and min); 155.2 (C7D, Maj); 155.1 (C7D, min); 154.1 (C8aA, Maj); 154.0 (C7A, min); 154.0 (C8aD, min); 150.5 (C5D, Maj and min); 150.2 (C3'B, Maj and min); 150.1 (C4'B, Maj and min); 149.5 (C8aD, Maj and min); 146.3 (C3'E and C4'E, Maj and min); 138.9-138.3 (CqBn, Maj); 133.8 (C1'B, Maj); 133.6 (C1'B, min); 131.8 (C1'E, Maj); 131.7 (C1'E, min); 129.4-128.4 (CHBn); 128.3 (C2'E, Maj and min); 122.6 (C6'B, Maj); 122.5 (C6'B, min); 119.7 (C6'E, min); 119.6 (C6'E, Maj); 116.1 (C5'B, Maj); 115.9 (C2'B, Maj); 115.8 (C5'B and C2'B, min); 115.1 (C5'E, min); 115.0 (C5'E, Maj); 112.7 (C6D, Maj); 111.8 (C8D, Maj); 102.8 (C4Ad, Maj and min); 101.7 (C4aA, Maj); 94.7 (C6A, Maj); 93.6 (C8A, min); 84.1 (C2C, Maj); 83.9 (C2C, min); 82.7 (C2F, Maj and min); 74.3 (C3C, Maj); 74.2 (C3C, min); 72.6-71.3 (CH<sub>2</sub>Bn); 68.5 (C3F, Maj); 68.4 (C3F, min); 40.5 (C4C, Maj); 40.1 (C4C, min); 28.8 (C4F, Maj); 28.6 (C4F, min).

**MS :** [M-H]<sup>-</sup> : mass calculated for C<sub>58</sub>H<sub>48</sub>BrClO<sub>12</sub> : 1051.2027 and mass found: 1051.2.



**100** (12 mg, 0.011 mmol) was dissolved in MeOH (1.2 mL) and Pd/C (6 mg, 0.006 mmol) was added to the mixture. The reaction was stirred 24h under hydrogen atmosphere, filtered on milipore before removing the solvent in vacuo to give **102** as a brown solid (7 mg, 100%). **102** was directly engaged in the dechlorination reaction. **102** (5 mg, 8.1  $\mu$ mol) was dissolved in MeOH and 0.5eq of NEt<sub>3</sub> were added. The solution was injected in the HCub<sup>®</sup> at 40°C (0.3 mL/min) and the solvent was evaporated in vacuo. The process was repeated twice and the compound was purified by HPLC eluted with: 90% H<sub>2</sub>O / 10% ACN to 50% H<sub>2</sub>O / 50% ACN in 20 minutes and to 10% H<sub>2</sub>O / 90% ACN in 22 minutes, to furnish **31** as a brown solid after lyophilization (1 mg, 21%).

**Tr:** B6 : 8.91mn and B6Cl : 10.95mn.



**<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 600 MHz, 2 rotamers 48/52)** :  $\delta$ 7.04 (H2'B, min, s, 0.48H); 6.99 (H2'B, Maj, s, 0.52H); 6.96 (H2'E, min, s, 0.48H); 6.95 (H2'E, Maj, s); 6.95 (H6'B, min, s, 0.48H); 6.94 (H5'B or H5'E, Maj or min, s); 6.93 (H5'B or H5'E, Maj or min, s); 6.92 (H6'B, Maj, s, 0.52H); 6.87 (H6'E, Maj and min, m, 1H); 6.14 (H8D, Maj, s); 6.05 (H6A, Maj or min, s); 6.03 (H8A, Maj or min, s); 6.02 (H8D, min, s, 0.48H); 6.01 (H8A, Maj or min, s); 6.00 (H6A, Maj or min, s); 4.69 (H2C, min, d, 0.48H,  $J_{2C,3C} = 7.92$  Hz); 4.67 (H2F, Maj or min, d,  $J_{2F,3F} = 8.76$  Hz); 4.59 (H2C, maj, d, 0.52H); 4.54 (H3C, min, m, 0.48H); 4.51-4.49 (H3C, Maj, H4C, Maj or min, m); 4.16 (H3F, Maj or min, m); 3.01 (H4F $\alpha$ , min, dd, 0.48H,  $J_{4\alpha,4\beta} = 16.40$  Hz and  $J_{4\alpha,3} = 5.49$  Hz); 2.78 (H4F $\alpha$ , Maj, dd, 0.52H,  $J_{4\alpha,4\beta} = 16.40$  Hz and  $J_{4\alpha,3} = 5.65$  Hz); 2.39 (H4F $\beta$ , min, m, 0.48H); 2,39 (H4F $\beta$ , Maj, m, 0.52H).

**<sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O, 150 MHz)** :  $\delta$ 156.5 (C8aA, min); 156.4 (C8aA, Maj); 155.5-154.7 (C5A and C7A, Maj and min); 154.2 (C7D, Maj and min); 153.5 (C5D, min); 153.3 (C5D, Maj); 152.5 (C8aD, min); 152.3 (C8aD, Maj); 144.0 (C4'B and C4'E, Maj and min); 144.3 (C3'E, Maj and min); 144.6 (C3'B, min); 144.4 (C3'B, Maj); 130.3 and 130.2 (C1'E, Maj and min); 130.0 and 129.9 (C1'B, Maj and min); 120.8 (C6'B, min); 120.5 (C6'B, Maj); 120.2 and 120.0 (C6'E, Maj and min); 116.2 and 116.1 (C5'C and C5'E, Maj and min); 115.6 (C2'B, min); 115.2 (C2'B, Maj); 115.0 (C2'E, min); 114.9 (C2'E, Maj); 111.5 (C6D, min); 111.3 (C6D, Maj); 95.2 (C6A, Maj and min); 106.9 (C4aA, min); 106 (C4aA, Maj); 102.6 (C4aD, Maj); 101.6 (C4aD, min); 97.0 (C8A, Maj and min); 95.8 (C8D, Maj); 82.4 and 81.9 (C2C, Maj and min); 80.8 and 80.6 (C2F, Maj and min); 72.0 (C3C, Maj); 71.8 (C3C, min); 66.8 and 66.6, (C3F, Maj and min); 37.7 (C4C, min); 36.9 (C4C, Maj); 27.7 (C4F, min); 26.8 (C4F, Maj).

**HRMS** : [M+Na]<sup>+</sup>: mass calculated for C<sub>30</sub>H<sub>26</sub>O<sub>12</sub>Na : 601.1417 and found: 601.1415.

## Phosphorylation

Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) was obtained from Merck Milipore (France). The active protein was stored in 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1 mM EGTA, 0.03% Brij-35, 270 mM sucrose, 0.2 mM PMSF, 1 mM benzamidine, 0.1% 2-mercaptoethanol. Specific activity : 681 U/mg. To purify the enzyme, two dialysis were realized (20mn in water and 20mn in the buffer used for the reaction).

### **P2 : <sup>201</sup>GSPGTPGSRSRTPSLTPPT<sup>220</sup>**

Phosphorylation was carried out on the P2 peptide (0.1 mM) at 30°C in HEPES, pH 8, 3 mM ATP, 2 mM EDTA, 2 mM DTT and 10 mM MgCl<sub>2</sub>. The reaction was initiated by the addition of the kinase (0.0035 eq.). MALDI spectrometry was used for the kinetic monitoring of phosphorylation. A mixture of our solution with a solution of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid in ACN/H<sub>2</sub>O + 0.1% TFA (70/30) in a proportion of 50/50 was used for the analysis.

### **P2 : <sup>201</sup>GSPG<sub>p</sub>TPGSRSRTPSLTPPT<sup>220</sup>**

Phosphorylation of the P1P2 peptide (0.1 mM) was carried out at 30°C in HEPES, pH 8, 3 mM ATP, 2 mM EDTA, 2 mM DTT and 10 mM MgCl<sub>2</sub>. The reaction was initiated by the addition of the kinase (0.0035 eq.). MALDI spectrometry was used for the kinetic monitoring of phosphorylation. A mixture of our solution, purified on ZipTip<sup>®</sup>, with a solution of DHB in ACN/H<sub>2</sub>O + 0.1% TFA (70/30) in a proportion of 50/50 was used for the analysis.

### **P2 : <sup>171</sup>IPAKTPPAPKTPPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLTPPT<sup>220</sup>**

**5-fluoro-5-(4-methoxy-4-oxobutoxy)-1,3,7,9-tetramethyl-5H-dipyrrolo[1,2-c:2',1'f][1,3,2]diazaborinin-4-ium-5-uide**

To an ice-cold solution of **118** (20 mg, 0.08 mmol) in 0.5 mL of dry DCM was added TMSOTf (66 mg, 0.3 mmol) in 0.2 mL of DCM. The red mixture was stirred 2mn30 and a solution of **120** (90 mg, 0.8 mmol) with DIPEA (50 mg, 0.4 mmol) in 0.3mL of DCM was added. After 20mn the black solution was evaporated in vacuo and purified eluted with Cyclohexane/AcOEt (90/10 to 80/20) to furnish **121** as a red solid (8 mg, 31%).

**Rf** = 0.3 (Cyclohexane/EtOAc : 50/50).

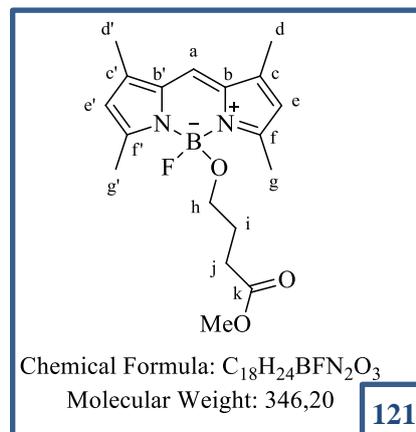
**mp** : 164°C.

**IR (Neat)** :  $\nu_{\max}$  3202, 2921, 2849, 2241, 1608, 1191, 968, 748  $\text{cm}^{-1}$ .

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)**:  $\delta$ 7.01 (Ha, s, 1H); 6.03 (He and He', s, 2H); 3.60 (CH<sub>3</sub>O, s, 3H); 2.93 (Hj, t, 2H,  $J_{j,i}$  = 6.3 Hz); 2.52 (Hg and Hg', s, 6H); 2.34 (Hh, t, 2H,  $J_{h,i}$  = 7.51 Hz); 2,24 (Hd and Hd', s, 6H); 1.73 (Hi, m, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)**:  $\delta$ 174,2 (Ck); 157, (Cf and Cf'); 140.7 (Cc and Cc'); 120.2 (Ca); 134 (Cb and Cb'); 118.9 (Ce and Ce'); 60.6 (Cj); 51.5 (CH<sub>3</sub>O); 31.2 (Ch); 27.09 (Ci) 14.6 (Cg and Cg'); 11.5 (Cd and Cd').

**HRMS** : [M+Na]<sup>+</sup> : mass calculated for C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>BFN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Na : 369.1756 and mass found 369.1767.



**121**

**5-fluoro-5-(2-hydroxyethoxy)-1,3,7,9-tetramethyl-5H-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-4-ium-5-uide**

To an ice-cold solution of **118** (100 mg, 0.4 mmol) in 5 mL of dry DCM was added TMSOTf (267 mg, 1.2 mmol) in 2 mL of DCM. The red mixture was stirred 2mn30 and a solution of ethylene glycol (252 mg, 4 mmol) with DIPEA (258 mg, 2 mmol) in 3 mL of DCM was added. The black solution was evaporated after 20mn in vacuo and purified eluted with Cyclohexane/AcOEt (60/40 to 50/50) to furnish **122** as a red solid (23 mg, 20%).

**Rf** = 0.3 (Cyclohexane/EtOAc : 60/40).

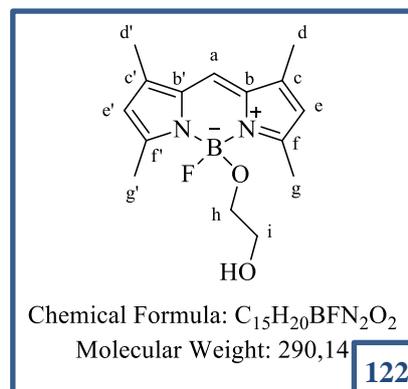
**mp** : 154°C.

**IR (Neat)** :  $\nu_{\max}$  2962, 1603, 1260, 1093, 1024, 799  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)**:  $\delta$ 7.03 (Ha, s, 1H); 6.05 (He and He', s, 2H); 3.54 (Hh, t, 2H,  $J_{h,i} = 4.44$  Hz); 3.01 (Hi, t, 2H,  $J_{i,h} = 4.44$  Hz); 2.53 (Hg and Hg', s, 6H); 2.25 (Hd and Hd', s, 6H).

**$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)**:  $\delta$ 156.7 (Cf and Cf'); 140.6 (Cc and Cc'); 134 (Cb and Cb'); 120.1 (Ca); 119.1 (Ce and Ce'); 62.8 (Ch); 62.7 (Ci); 14.8 (Cg and Cg'); 11.3 (Cd and Cd').

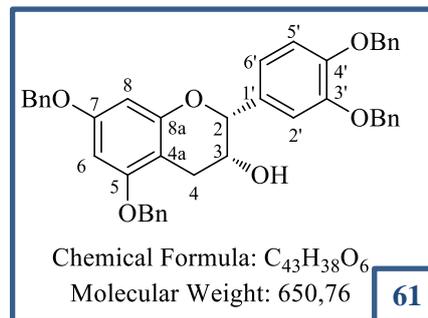
**HRMS** :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  : mass calculated for  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{BFN}_2\text{O}_2\text{Na}$  : 313.1494 and mass found 313.1504.



**122**

**(2R,3R)-5,7-bis(benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)chroman-3-ol**

To an ice-cold stirred solution of epicatechin **20** (1 g, 3.44 mmol) in DMF (10 mL) was added  $K_2CO_3$  (2.86 g, 20.6 mmol) and benzyl bromide (1.8 mL, 15 mmol). The solution was stirred 2h at 0°C and 4d at room temperature. The solution was dissolved in EtOAc (100 mL) and washed with brine (4×50 mL). The organic layers were combined, dried over  $Na_2SO_4$ , filtered and evaporated to dryness to get a brownish foam, which was purified by column chromatography, eluted with Cyclohexane/EtOAc (90/10), to furnish **61** as a yellow foam (1.33 g, 59%).



**R<sub>f</sub>** = 0.29 (Cyclohexane/EtOAc : 80/20).

**m.p** : 135°C.

**IR (Neat)** :  $\nu_{max}$  3440, 1618, 1592, 1512, 1498, 1454, 1378, 1263, 1142, 1217, 1113, 1026, 735, 696  $cm^{-1}$ .

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** :  $\delta$ 7.45-7.32 ( $H_{Ar}Bn$ , m, 20H); 7.20 ( $H_{2'}$ , d, 1H,  $J_{2',6'} = 1.2$  Hz); 6.97 ( $H_{5'}$ , d, 1H,  $J_{5',6'} = 8.4$  Hz); 6.90 ( $H_{6'}$ , dd, 1H,  $J_{6',5'} = 8.4$  Hz and  $J_{6',2'} = 1.2$  Hz); 6.32 ( $H_6$  and  $H_8$ , m, 2H); 5.21 ( $CH_2Bn$ , s, 2H); 5.17 ( $CH_2Bn$ , s, 2H); 5.04 ( $CH_2Bn$ , s, 4H); 4.94 ( $H_2$ , s, 1H); 4.23 ( $H_3$ , m, 1H); 2.99 ( $H_{4\alpha}$  and  $H_{4\beta}$ , m, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)** :  $\delta$ 159.1 ( $C_7$ ); 158.7 ( $C_5$ ); 155.5 ( $C_{8a}$ ); 149.5 and 149.4 ( $C_{3'}$  and  $C_{4'}$ ); 137.7 ( $C_{qBn}$ ); 137.6 ( $C_{qBn}$ ); 137.4 ( $C_{qBn}$ ); 137.3 ( $C_{qBn}$ ); 131.9 ( $C_{1'}$ ); 129.0 (2  $CHBn$ ); 128.9 (6  $CHBn$ ); 128.4 (4  $CHBn$ ); 128.0 (2  $CHBn$ ); 127.9 (2  $CHBn$ ); 127.7 (2  $CHBn$ ); 127.6 (2  $CHBn$ ); 119.9 ( $C_{6'}$ ); 115.5 ( $C_{5'}$ ); 113.9 ( $C_{2'}$ ); 101.4 ( $C_{4a}$ ); 95.1 ( $C_8$ ); 94.5 ( $C_6$ ); 78.8 ( $C_2$ ); 71.8 (2  $CH_2Bn$ ); 70.6 ( $CH_2Bn$ ); 70.4 ( $CH_2Bn$ ); 66.8 ( $C_3$ ); 28.6 ( $C_4$ ).

**HRMS** :  $[M+H]^+$  : mass calculated for  $C_{43}H_{38}O_6$  : 651.2747 and mass found 651.2739.

**(2R,3R)-5,7-bis(benzyloxy)-2-(3,4,5-tris(benzyloxy)phenyl)chroman-3-yl 3,4,5-tris(benzyloxy)benzoate**

To a stirred solution of **61** (200 mg, 0.307 mmol) and **43** (270 mg, 0.615 mmol) in dry DCM (20 mL) was added 95  $\mu$ L of DIC (77 mg, 0.615 mmol) and DMAP (3.75 mg, 0.0307 mmol). The solution was stirred 4d at 35°C and washed with brine (3 $\times$ 20 mL). The organic layers were combined, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and evaporated to dryness to get a yellow oil, which was purified by column chromatography, eluted with Cyclohexane/EtOAc (90/10 to 85/15), to furnish **131** as a white foam (236 mg, 72%).

**R<sub>f</sub>** = 0.4 (Cyclohexane/EtOAc : 80/20).

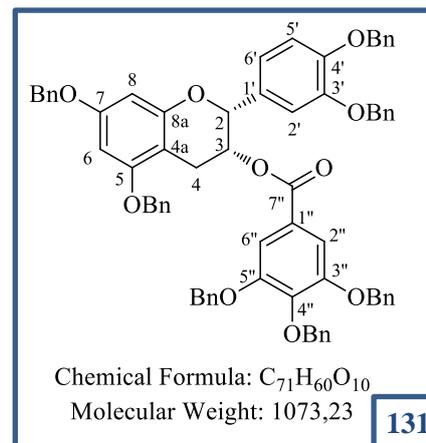
**m.p** : 139°C.

**IR (Neat)** :  $\nu_{\text{max}}$  3031, 2926, 1715, 1591, 1498, 1428, 1372, 1213, 1112, 1028, 736, 696 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** :  $\delta$ 7.41-7.23 (H<sub>Ar</sub> Bn, m, 35 H); 7.24 (H2'', H6'', s, 2H); 7.03 (H2', d, 1H,  $J_{2',6'}$  = 1.9 Hz); 6.90 (H6', dd, 1H,  $J_{6',5'}$  = 7.9 Hz and  $J_{6',2'}$  = 1.9 Hz); 6.82 (H5', d, 1H,  $J_{5',6'}$  = 7.9 Hz); 6.37 (H6, d, 1H,  $J_{6,8}$  = 2.3 Hz); 6.32 (H8, d, 2H,  $J_{8,6}$  = 2.3 Hz); 5.63-5.58 (H3, m, 1H); 5.08-4.97 (CH<sub>2</sub>Bn, m, 14H); 5.02 (H2, s, 1H); 4.72 (CH<sub>2</sub>Bn, d, 2H,  $J_{\text{CH}\alpha\text{H}\beta\text{Bn}-\text{CH}\beta\text{H}\alpha\text{Bn}}$  = 11.7 Hz); 3.11 (H4 $\alpha$  et H4 $\beta$ , m, 2H).

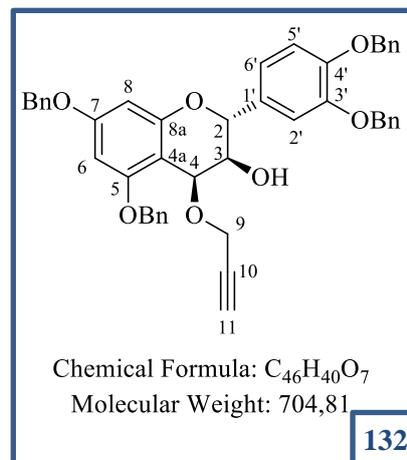
**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)** :  $\delta$ 165.3 (C7''); 159.2 (C7); 158.3 (C5); 156.3 (C8a); 152.6 (C3''); 151.3 and 149.3 (C4' et C3'); 149.2 (C5''); 142.8 (C4''); 137.8-136.8 (CqBn); 131.4 (C1'); 128.9-127.5 (CHBn); 125.3 (C1''); 120.3 (C6'); 115.0 (C5'); 114.0 (C2'); 109.6 (C6''); 109.4 (C2''); 105.4 (C4a); 95.0 (C6); 94.2 (C8); 77.9 (C2); 75.4-70.3 (CH<sub>2</sub>Bn); 68.9 (C3); 26.4 (C4).

**HRMS** : [M+H]<sup>+</sup> : mass calculated for C<sub>71</sub>H<sub>60</sub>O<sub>10</sub> : 1073.4592 and mass found 1073.4224.



**(2R,3S,4S)-5,7-bis(benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)-4-(prop-2-yn-1-yloxy)chroman-3-ol**

To a stirred solution of **41** (200 mg, 0.308 mmol) in dry DCM (4 mL) was added 145  $\mu$ L of propargylic alcohol (133 mg, 2.38 mmol) and a solution of DDQ (140 mg, 0.628 mmol) in dry DCM (4 mL). The resulting purple solution was stirred 5h at room temperature and DMAP was added (75 mg, 0.628 mmol). The brown mixture was stirred 15mn and the solution was concentrated until dryness and was purified by column chromatography, eluted with Cyclohexane/AcOEt (90/10 to 85/15), to yield **132** as white solid (128 mg, 59%).



**R<sub>f</sub>** = 0.5 (Cyclohexane/AcOEt : 80/20).

**m.p** : 117 °C.

**IR (Neat)** :  $\nu_{\text{max}}$  3438, 3032, 2924, 1591, 1515, 1454, 1264, 1216, 1119, 1051, 810, 737, 697  $\text{cm}^{-1}$ .

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** :  $\delta$ 7.49-7.28 (H<sub>Ar</sub>Bn, m, 20H); 7.10 (H<sub>2'</sub>, d, 1H,  $J_{2',6'}$  = 1.6 Hz); 7.03 (H<sub>6'</sub>, dd, 1H,  $J_{6',5'}$  = 8.2 Hz and  $J_{6',2'}$  = 1.6 Hz); 6.99 (H<sub>5'</sub>, s, 1H); 6.27 (H<sub>6</sub>, d, 1H,  $J_{6,8}$  = 2 Hz); 6.17 (H<sub>8</sub>, d, 1H,  $J_{8,6}$  = 2 Hz); 5.18 (CH<sub>2</sub>Bn, s, 4H); 5.99 (CH<sub>2</sub>Bn, s, 4H); 5.06 (H<sub>2</sub>, d, 1H,  $J_{2,3}$  = 6.2 Hz); 4.95 (H<sub>4</sub>, d, 1H,  $J_{4,3}$  = 3.1 Hz); 4.38 (H<sub>9</sub>, m, 2H); 3.93 (H<sub>3</sub>, dd, 1H,  $J_{3,2}$  = 6.2 Hz and  $J_{3,4}$  = 3.1Hz); 2.36 (H<sub>11</sub>, s, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)** :  $\delta$ 161.6 (C<sub>7</sub>); 158.2 (C<sub>5</sub>); 156.5 (C<sub>8a</sub>); 149.5 (C<sub>4'</sub>); 149.2 (C<sub>3'</sub>); 137.4 (C<sub>q</sub>Bn); 137.4 (C<sub>q</sub>Bn); 136.7 (C<sub>q</sub>Bn); 136.3 (C<sub>q</sub>Bn); 131.5 (C<sub>1'</sub>); 128.8 (CHBn); 128.5 (CHBn); 128.3 (CHBn); 128.1 (CHBn); 127.9 (CHBn); 127.7 (CHBn); 127.6 (4 CHBn); 127.3 (2 CHBn); 121.4 (C<sub>6'</sub>); 115.0 (C<sub>5'</sub>); 114.5 (C<sub>2'</sub>); 103.1 (C<sub>4a</sub>); 94.5 (C<sub>8</sub>); 93.6 (C<sub>6</sub>); 80.7 (C<sub>10</sub>); 77.2 (C<sub>2</sub>); 74.5 (C<sub>11</sub>); 71.6 (CH<sub>2</sub>Bn); 71.3 (CH<sub>2</sub>Bn); 70.6 (CH<sub>2</sub>Bn); 70.4 (CH<sub>2</sub>Bn); 70.3 (C<sub>3</sub>); 69.0 (C<sub>4</sub>); 58.3 (C<sub>9</sub>).

**HRMS** : [M+H]<sup>+</sup>: mass calculated for C<sub>46</sub>H<sub>40</sub>O<sub>7</sub>: 704.2867 and mass found : 704.2887.

**(2R,3S,4S)-5,7-bis(benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)-4-(prop-2-yn-1-yloxy)chroman-3-yl 3,4,5-tris(benzyloxy)benzoate**

To a stirred solution of **47** (90 mg, 0.084 mmol) in dry DCM (5 mL) was added 98  $\mu$ L of propargylic alcohol (94 mg, 1.68 mmol) and DDQ (38 mg, 0.168 mmol). The resulting green solution was stirred 18h at room temperature and DMAP was added (41 mg, 0.335 mmol). The black mixture was stirred 10mn and the solution was concentrated until dryness and was purified by column chromatography, eluted with Cyclohexane/EtOAc (90/10), to yield **133** as pink foam (60 mg, 64%).

**R<sub>f</sub>** = 0.32 (Cyclohexane/EtOAc, 90/10).

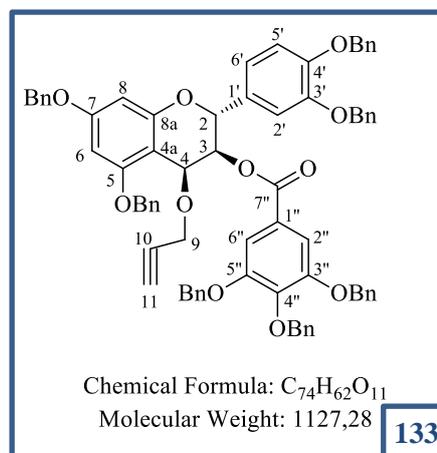
**m.p** : 126°C.

**IR (Neat)** :  $\nu_{\text{max}}$  3089, 3064, 3032, 2925, 2856, 1699, 1621, 1593, 1504, 1454, 1427, 1337, 1262, 1130, 1015, 973, 745, 696  $\text{cm}^{-1}$ .

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** :  $\delta$ 7.47-7.21 (H<sub>Ar</sub> Bn, m, 35H); 7.19 (H2'' and H6'', s, 2H); 7.06 (H2', d, 1H,  $J_{2',6'} = 1.96$  Hz); 6.97 (H6', dd, 1H,  $J_{6',5'} = 8.23$  Hz and  $J_{6',2'} = 1.96$  Hz); 6.82 (H5', d, 1H,  $J_{5',6'} = 8.23$  Hz); 6.28 (H6, d, 1H,  $J_{6,8} = 2.29$  Hz); 6.18 (H8, d, 1H,  $J_{8,6} = 2.29$  Hz); 5.38 (H2 and H3 s, 2H); 5.11-4.95 (CH<sub>2</sub>Bn, m, 14H); 5.00 (H4, s, 1H); 4.31 (H9, m, 2H), 2.11 (H11, t, 1H,  $J_{11,9} = 2.39$  Hz).

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)** :  $\delta$ 164.9 (CO); 161.3 (C7); 158.5 (C5); 156.0 (C8a); 152.5 (C3'' and C5''); 149.4 (C4'); 149.1 (C3'); 142.6 (C4''); 137.6 (CqBn); 137.1 (CqBn); 137.1 (CqBn); 136.7 (CqBn); 136.6 and 136.5 (CqBn); 130.5 (C1'); 128.7-127.3 (CHBn); 124.8 (C1''); 121.5 (C6'); 114.8 (C5'); 114.4 (C2'); 109.2 (C6'' and C2''); 103.4 (C4a); 94.5 (C8); 94.0 (C6); 80.7 (C9); 75.14 (CH<sub>2</sub>Bn); 74.5 (CH<sub>2</sub>Bn); 74.2 (C2); 73.2 (C3); 71.3 (C4); 71.5-70.2 (CH<sub>2</sub>Bn); 58.8 (C10); 31.3 (C11).

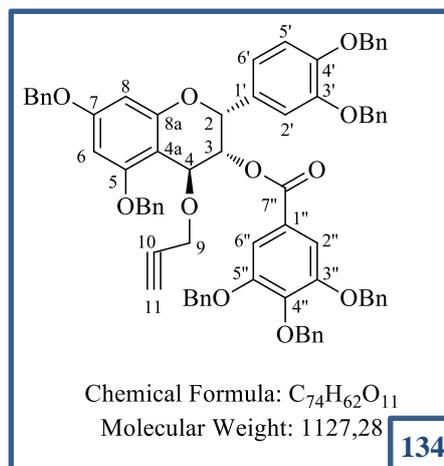
**HRMS** : [M+Na]<sup>+</sup> : mass calculated for C<sub>74</sub>H<sub>62</sub>O<sub>11</sub>Na : 1149.4184 and mass found : 1149.4191.



**133**

**(2R,3R, 4S)-5,7-bis(benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)-4-(prop-2-yn-1-yloxy)chroman-3-yl 3,4,5-tris(benzyloxy)benzoate**

To a stirred solution of **131** (140 mg, 0.13 mmol) in dry DCM (3 mL) was added 152  $\mu$ L of propargylic alcohol (146 mg, 2.61 mmol) and a solution of DDQ (59 mg, 0.26 mmol) in dry DCM (4 mL). The resulting green solution was stirred 16h at room temperature and DMAP was added (63 mg, 0.52 mmol). The brown mixture was stirred 10mn and the solution was concentrated until dryness and was purified by column chromatography, eluted with Cyclohexane/EtOAc (90/10 to 85/15), to yield **134** as white foam (83 mg, 57%).



**R<sub>f</sub>** = 0.45 (Cyclohexane/AcOEt : 80/20).

**m.p** : 113 °C.

**IR (Neat)** :  $\nu_{\text{max}}$  3289, 3032, 2924, 1721, 1591, 1498, 1455, 1429, 1372, 1204, 1104, 1078, 738, 697  $\text{cm}^{-1}$ .

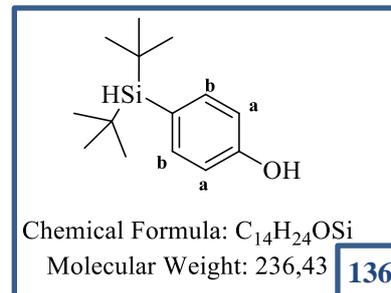
**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** :  $\delta$ 7.43-7.23 (H<sub>A</sub>Bn, m, 35H); 7.19 (H<sub>2''</sub> and H<sub>6''</sub>,s, 2H); 7.06 (H<sub>2'</sub>, d, 1H,  $J_{2',6'}$  = 1.80 Hz); 6.90 (H<sub>6'</sub>, dd, 1H,  $J_{6',5'}$  = 8.41 Hz and  $J_{6',2'}$  = 1.80 Hz); 6.83 (H<sub>5'</sub>, d, 1H,  $J_{5',6'}$  = 8.41 Hz); 6.36 (H<sub>6</sub>, d, 1H,  $J_{6,8}$  = 2.21 Hz); 6.32 (H<sub>8</sub>, d, 1H,  $J_{8,6}$  = 2.21 Hz); 5.51 (H<sub>3</sub>, dd, 1H,  $J_{3,4}$  = 2.67 Hz and  $J_{3,2}$  = 1.00 Hz); 5.35 (H<sub>2</sub>, s, 1H); 5.12-4.94 (CH<sub>2</sub>Bn, m, 12H); 4.73 (CH<sub>2</sub>Bn, m, 2H); 4.69 (H<sub>4</sub>, s, 1H); 4.41 (H<sub>9</sub>, m, 2H); 2.40 (H<sub>11</sub>, t, 1H,  $J_{11,9}$  = 2.33 Hz).

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)** :  $\delta$ 167.7 (CO); 160.8 (C<sub>7</sub>); 156.6 (C<sub>5</sub>); 156.5 (C<sub>8a</sub>); 152.3 (C<sub>3''</sub> and C<sub>5''</sub>); 149.0 (C<sub>4'</sub>); 148.9 (C<sub>3'</sub>); 143.4 (C<sub>4''</sub>); 137.4 (C<sub>q</sub>Bn); 137.2 (C<sub>q</sub>Bn); 137.0 (C<sub>q</sub>Bn); 136.5 (C<sub>q</sub>Bn); 136.4 (C<sub>q</sub>Bn); 130.4 (C<sub>1'</sub>); 128.6-127.2 (CHBn); 124.5 (C<sub>1''</sub>); 120.3 (C<sub>6'</sub>); 114.8 (C<sub>5'</sub>); 113.8 (C<sub>2'</sub>); 109.0 (C<sub>6''</sub> et C<sub>2''</sub>); 101.8 (C<sub>4a</sub>); 94.3 (C<sub>8</sub>); 94.1 (C<sub>6</sub>); 80.3 (C<sub>9</sub>); 75.14 (CH<sub>2</sub>Bn); 74.5 (CH<sub>2</sub>Bn); 74.1 (C<sub>2</sub>); 71.3 (C<sub>4</sub>); 71.2-70.1 (CH<sub>2</sub>Bn); 69.8 (C<sub>3</sub>); 68.6 (C<sub>10</sub>); 57.6 (C<sub>11</sub>).

**HRMS** : [M+Na]<sup>+</sup> : mass calculated for C<sub>74</sub>H<sub>62</sub>O<sub>11</sub>Na : 1149.4184 and mass found : 1149.4191.

### 4-di-*tert*-butylsilanephenol

To a solution of 4-bromophenol **135** (1.5 g, 8.7 mmol.) in dry THF (35 mL), was added, carefully, dry sodium hydride (229 mg, 9.5 mmol) portion by portion and the purple solution was stirred at 50°C for 3h. The reaction mixture was cooled down to -80°C and a solution of *tert*-butyl lithium (30 mL, C = 0.61 M in pentane, 18 mmol) was introduced very slowly. After 1h, 1.84 mL of Di-*tert*-butylchlorosilane (1.63 g, 9.1 mmol) was added, and the solution was warmed to room temperature and stirred overnight. A solution of NH<sub>4</sub>Cl sat (100 mL), was added, and the mixture was extracted with Et<sub>2</sub>O (200 mL). The organic layer was washed with brine (100 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and the solvent was removed under reduced pressure to give the crude product as a yellow oil. The crude product was chromatographed on silica gel eluted with Cyclohexane/AcOEt (90/10) to afford **136** (600 mg, 30%) as a white solid.



**R<sub>f</sub>** = 0.28 (EtOAc/PE : 10/90).

**m.p** : 83°C.

**IR (Neat)** :  $\nu_{\text{max}}$  3253, 2928, 2855, 2100, 1583, 1503, 1466, 1664, 1231, 822 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** :  $\delta$ 7.47 (H<sub>b</sub>, d, 2H,  $J_{b,a}$  = 8.5 Hz); 6.82 (H<sub>a</sub>, 2H, d,  $J_{a,b}$  = 8.5 Hz); 4.86 (OH, s, 1H); 3.83 (Si-H, s, 1H); 1.03 (CH<sub>3</sub>tBu, s, 18H).

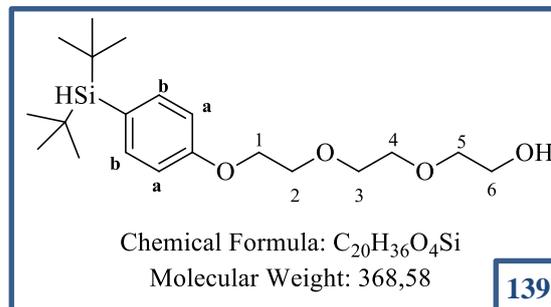
**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)** :  $\delta$ 172.5 (CO); 129.8 (C<sub>b</sub>, 2C); 129.1 (C<sub>Ar</sub>-Si); 128.8 (C<sub>a</sub>, 2C); 28.8 (CH<sub>3</sub>tBu, 6C); 19.1 (Si-CtBu, 2C).

**<sup>29</sup>Si NMR (CDCl<sub>3</sub>, 60 MHz)** :  $\delta$ 12.93.

**HRMS** : [M+Ag]<sup>+</sup> : mass calculated for C<sub>14</sub>H<sub>24</sub>OSiAg : 343.0641 and mass found 343.0637.

### (4-(2-(2-(2-ethoxy)ethoxy)ethoxy)phenyl)di-*tert*-butylsilane

To a solution of **136** (250 mg, 1 mmol) in dry DMF (10 mL) was slowly added dry sodium hydride (30 mg, 1.2 mmol). The resulting yellow solution was stirred at 25°C for 30 min. A solution of (2-(2-(2-chloroethoxy)ethoxy)ethanol **138** (357 mg, 2.1 mmol) in dry DMF (1 mL) was added dropwise and the resulting solution was stirred at 50°C for 27h. The reaction mixture was quenched with a solution of NH<sub>4</sub>Cl sat (30 mL) and extracted with Et<sub>2</sub>O (30 mL). The aqueous layer was additionally extracted with Et<sub>2</sub>O (2×30 mL), the combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and the solvent was removed under reduced pressure to give the crude product as a colorless oil. The crude product was chromatographed on silica gel eluted with Cyclohexane/EtOAc (60/40 to 50/50) to afford **139** (225 mg, 61 %) as a colorless oil.



**R<sub>f</sub>** = 0.11 (EtOAc/PE : 25/75).

**IR (Neat)** :  $\nu_{\text{max}}$  3434, 2926, 2855, 1593, 1464, 1266, 1107, 1266, 1107, 824, 740 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** :  $\delta$ 7.47 (H<sub>b</sub>, d, 2H,  $J_{b,a}$  = 8.0 Hz); 6.90 (H<sub>a</sub>, d, 2H,  $J_{a,b}$  = 8.0 Hz); 4.14 (H<sub>1</sub>, t, 2H,  $J_{1,2}$  = 4.4 Hz); 3.87 (H<sub>2</sub>, t, 2H,  $J_{2,1}$  = 4.4 Hz); 3.82 (Si-H, s, 1H); 3.75-3.69 (H<sub>4</sub>, H<sub>3</sub> and H<sub>5</sub>, m, 6H); 3.62 (H<sub>6</sub>, t, 2H,  $J_{6,5}$  = 4.3 Hz); 1.02 (CH<sub>3</sub>*t*Bu, s, 18H).

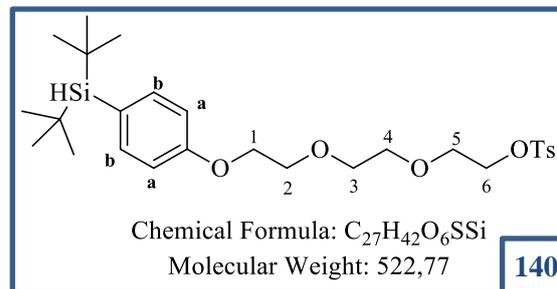
**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)** :  $\delta$ 159.5 (C<sub>Ar</sub>-O); 137.2 (C<sub>b</sub>, 2C); 126.7 (C<sub>Ar</sub>-Si); 114.0 (C<sub>a</sub>, 2C); 72.6 (CH<sub>2</sub>); 70.9 (CH<sub>2</sub>); 70.5 (CH<sub>2</sub>); 69.8 (C<sub>2</sub>); 67.0 (C<sub>1</sub>); 61.8 (C<sub>6</sub>); 29.0 (CH<sub>3</sub>*t*Bu, 6C); 19.1 (Si-C*t*Bu, 2C).

**<sup>29</sup>Si NMR (CDCl<sub>3</sub>, 60 MHz)** :  $\delta$ 12.51.

**HRMS** : [M+Na]<sup>+</sup> : mass calculated for C<sub>20</sub>H<sub>36</sub>O<sub>4</sub>SiNa : 391.2275 and mass found 391.2272.

(4-(2-(2-(2-*O*-tosylethoxy)ethoxy)ethoxy)phenyl)di-*tert*-butylsilane

At 0°C, to a solution of **139** (225 mg, 0.6 mmol) in dry ACN (6 mL) were added 213  $\mu$ L of triethylamine freshly distilled (155 mg, 1.5 mmol), trimethylamine hydrochloride (5.8 mg, 0.061 mmol) and tosyl chloride (232 mg, 1.22 mmol) in one portion. After stirring 4h at rt, The reaction mixture was quenched with water (20 mL) and extracted with Et<sub>2</sub>O (20 mL). The aqueous layer was extracted two times (2 $\times$ 20 mL). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and the solvent was removed under reduced pressure to give the crude product. The slightly yellow oil was chromatographed on silica gel eluted with Cyclohexane/EtOAc (80/20) to give **140** (258 mg, 81%) as a slightly yellow oil.



**R<sub>f</sub>** = 0.30 (Et<sub>2</sub>O/PE : 50/50).

**IR (Neat)** :  $\nu_{\text{max}}$  3443, 2930, 2856, 2095, 1594, 1470, 1360, 1246, 1180, 1105, 1013, 924, 814, 664, 555 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** :  $\delta$ 7.80 (HTs, d, 2H,  $J$  = 8.5 Hz); 7.48 (HTs, d, 2H,  $J$  = 8.5 Hz); 7.32 (Hb, d, 2H,  $J_{\text{b,a}}$  = 8.2 Hz); 6.88 (Ha, d, 2H,  $J_{\text{a,b}}$  = 8.2 Hz); 4.17 (H1, t, 2H,  $J_{\text{1,2}}$  = 4.7 Hz); 4.11 (H2, t, 2H,  $J_{\text{2,1}}$  = 4.7 Hz); 3.84-3.80 (Si-H and H6, m, 3H); 3.71-3.60 (Si-H, H4, H3 and H5, m); 1.03 (CH<sub>3</sub>tBu, s, 18H).

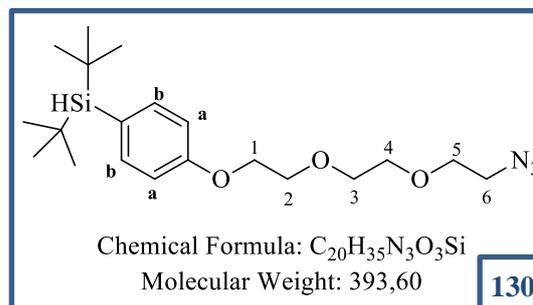
**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)** :  $\delta$ 159.6 (C<sub>Ar</sub>-O); 144.9 (C<sub>Ar</sub>-SO<sub>3</sub>); 137.3 (Cb, 2C); 133.2 (C<sub>Ar</sub>-CH<sub>3</sub>); 130.0 (CHTs, 2C); 128.1 (C-HTs, 2C); 126.7 (C<sub>Ar</sub>-Si); 114.0 (Ca, 2C); 71.0 (CH<sub>2</sub>); 70.9 (CH<sub>2</sub>); 69.9 (CH<sub>2</sub>); 69.4 (C2); 68.9(C1); 67.1 (C6); 29.1 (CH<sub>3</sub>tBu, 6C); 21.8 (CH<sub>3</sub>); 19.2 (Si-CtBu, 2C).

**<sup>29</sup>Si NMR (CDCl<sub>3</sub>, 60 MHz)** :  $\delta$ 12.56.

**HRMS** : [M+Na]<sup>+</sup> : mass calculated for C<sub>27</sub>H<sub>42</sub>SO<sub>6</sub>SiNa : 545.2363 and mass found 545.2380.

(4-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)phenyl)di-*tert*-butylsilane

To a solution of **140** (256 mg, 0.49 mmol) in dry DMF (8 mL), was added sodium azide (64 mg, 0.98 mmol) in one portion. The reaction mixture was stirred at 80°C for 15h. The solvent was removed under reduced pressure and the solid deposit was chromatographed on silica gel eluted with Cyclohexane/EtOAc (90/20) to afford **130** (145 mg, 75%) as colorless oil.



**R<sub>f</sub>** = 0.14 (PE/EtOAc : 90/10).

**IR (Neat)** :  $\nu_{\text{max}}$  2929, 2856, 2105, 1593, 1503, 1456, 1363, 1272, 1246, 1184, 1113, 1012, 937, 812 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** :  $\delta$ 7.47 (H<sub>b</sub>, d, 2H,  $J_{b,a}$  = 8.7 Hz); 6.90 (H<sub>a</sub>, d, 2H,  $J_{a,b}$  = 8.7 Hz); 4.15 (H<sub>1</sub>, t, 2H,  $J_{1,2}$  = 4.7 Hz); 3.88 (H<sub>2</sub>, t, 2H,  $J_{2,1}$  = 4.7 Hz); 3.83 (Si-H, s, 1H); 3.77-3.73 (H<sub>3</sub> or H<sub>4</sub>, m, 2H); 3.71-3.67 (H<sub>3</sub> or H<sub>4</sub> and H<sub>5</sub>, m, 4H); 3.38 (H<sub>6</sub>, t, 2H,  $J_{6,5}$  = 5.3 Hz, 2H); 1.03 (CH<sub>3</sub>tBu, s, 18H).

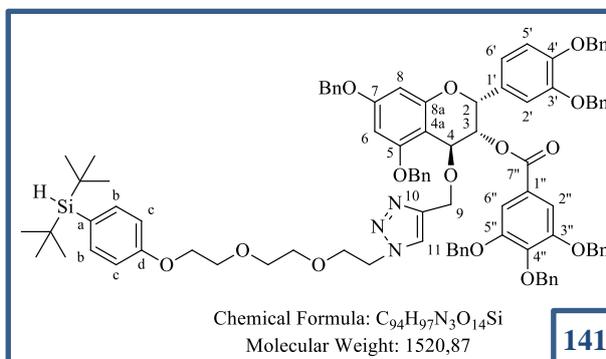
**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)** :  $\delta$ 159.5 (C<sub>Ar</sub>-O); 137.1 (C<sub>b</sub>, 2C); 126.4 (C<sub>Ar</sub>-Si); 113.9 (C<sub>a</sub>, 2C); 70.8 (CH<sub>2</sub>); 70.7 (CH<sub>2</sub>); 70.0 (CH<sub>2</sub>); 69.8 (C<sub>2</sub>); 67.0 (C<sub>1</sub>); 50.6 (C<sub>6</sub>); 28.9 (CH<sub>3</sub>tBu, 6C); 19.0 (Si-CtBu, 2C).

**<sup>29</sup>Si NMR (CDCl<sub>3</sub>, 60 MHz)** :  $\delta$ 12.53.

**HRMS** : [M+Na]<sup>+</sup> : mass calculated for C<sub>20</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>SiNa : 416.2339 and mass found 416.2344.

**(2R,3R, 4S)-5,7-bis(benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)-4-((1-(2-(2-(2-(4-(di-tert-butylsilyl)phenoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)chroman-3-yl 3,4,5-tris(benzyloxy)benzoate**

To a stirred solution of **134** (30 mg, 26.7  $\mu\text{mol}$ ) in DMF/H<sub>2</sub>O (3/1, 2 mL) was added a solution of **130** (13 mg, 33  $\mu\text{mol}$ ) in DMF/H<sub>2</sub>O (3/1, 0.5 mL), sodium ascorbate (3.2 mg, 16.2  $\mu\text{mol}$ ) and CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (1.3 mg, 5.2  $\mu\text{mol}$ ). The mixture was stirred 30 mn at 100°C under microwave activation, dissolved in brine (30 mL) and extracted with Et<sub>2</sub>O (3×15 mL). The organic layers were combined, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and evaporated to dryness to get a yellow oil, which was purified by column chromatography, eluted with Cyclohexane/EtOAc (50/50), to furnish **141** as a white foam (37 mg, 92 %).



**R<sub>f</sub>** = 0.4 (Cyclohexane/EtOAc : 50/50).

**m.p.** : 95 °C.

**IR (Neat)** :  $\nu_{\text{max}}$  3031, 2956, 2856, 2100, 1719, 1593, 1501, 1455, 1270, 1246, 1107, 1028, 813, 737, 697 cm<sup>-1</sup>.

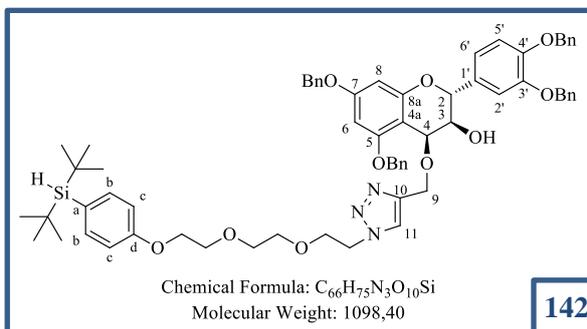
**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** :  $\delta$ 7.49 (H11, s, 1H); 7.46 (H<sub>b</sub>, d, 2H,  $J_{b,c}$  = 8.58 Hz); 7.41-7.22 (H<sub>A</sub>Bn, m, 35H); 7.19 (H2'', H6'', s, 2H); 7.09 (H2', d, 1H,  $J_{2',6'}$  = 1.92 Hz); 6.95 (H6', dd, 1H,  $J_{6',5'}$  = 8.05 Hz and  $J_{6',2'}$  = 1.92 Hz); 6.86 (H<sub>c</sub>, d, 2H,  $J_{c,b}$  = 8.58 Hz); 6.82 (H5', d, 1H,  $J_{5',6'}$  = 8.05 Hz); 6.35 (H6, d, 1H,  $J_{6,8}$  = 2.18 Hz); 6.31 (H8, d, 1H,  $J_{8,6}$  = 2.18 Hz); 5.44 (H3, d, 1H,  $J_{3,4}$  = 1.5 Hz); 5.35 (H2, s, 1H); 5.08-4.95 (CH<sub>2</sub>Bn, m, 12H); 4.79 (H4, d, 1H,  $J_{4,3}$  = 1.5 Hz); 4.76 (CH<sub>2</sub>Bn, m, 2H); 4.45 (H9, t, 2H,  $J_{9,11}$  = 5.33 Hz); 4.05 (OCH<sub>2</sub>, m, 2H); 3.84 (OCH<sub>2</sub>, m, 4H); 3.81 (Si-H, s, 1H); 3.76 (OCH<sub>2</sub>, m, 2H); 3.65-3.57 (OCH<sub>2</sub>, m, 4H); 1.01 (CH<sub>3</sub>*t*Bu, s, 18H).

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)** :  $\delta$ 164.75 (CO); 160.6 (C7); 159.53 (C<sub>d</sub> and C8<sub>a</sub>); 159.4 (C5); 152.4 (C3'' and C5''); 149.02 (C4' and C3'); 145.05 (C4''); 142.5 (C<sub>b</sub>); 137.4-136.5 (C<sub>q</sub>Bn); 130.5 (C1'); 128.6-127.4 (CHBn); 127.27 (C<sub>c</sub>); 124.5 (C1''); 123.9 (C11); 120.2 (C6'); 113.9 (C<sub>a</sub>, C2' and C5'); 109.0 (C6'' and C2''); 102.1 (C4<sub>a</sub>); 94.3 (C6); 94.1 (C8); 75.1 (C2); 71.2-69.8 (CH<sub>2</sub>Bn and OCH<sub>2</sub>); 69.91 (C10); 66.9 (C4); 65.3 (C3); 63.4 (OCH<sub>2</sub>); 60.4 (C9); 29.9 (CH<sub>3</sub>*t*Bu, 6C); 19.1 (Si-C*t*Bu, 2C).

**HRMS** : [M+Na]<sup>+</sup> : mass calculated for C<sub>94</sub>H<sub>97</sub>N<sub>3</sub>O<sub>14</sub>SiNa : 1544.28 and mass found : 1544.3751.

**(2R,3S,4S)-5,7-bis(benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)-4-((1-(2-(2-(2-(4-(di-tert-butylsilyl)phenoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)chroman-3-ol**

To a stirred solution of **132** (50 mg, 71  $\mu\text{mol}$ ) and of **130** (34 mg, 85  $\mu\text{mol}$ ) in DMF/H<sub>2</sub>O (3/1, 2.5 mL) was added sodium ascorbate (8 mg, 43  $\mu\text{mol}$ ) and CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (4 mg, 14.2  $\mu\text{mol}$ ). The mixture was stirred 30mn at 100°C under microwave activation, dissolved in brine (30 mL) and extracted with Et<sub>2</sub>O (3×10 mL). The organic layers were combined, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and evaporated to dryness to get a yellow oil, which was purified by column chromatography, eluted with Cyclohexane/EtOAc (70/30), to furnish **142** as a white oil (71 mg, 91 %).



**R<sub>f</sub>** = 0.5 (PE/EtOAc : 30/70).

**m.p** : 62°C.

**IR (Neat)** :  $\nu_{\text{max}}$  3067, 3027, 2920, 2853, 2091, 1730, 1613, 1591, 1500, 1454, 1266, 1242, 1187, 1141, 1113, 1111, 1064, 1050, 1024, 1014, 816, 737, 697 cm<sup>-1</sup>.

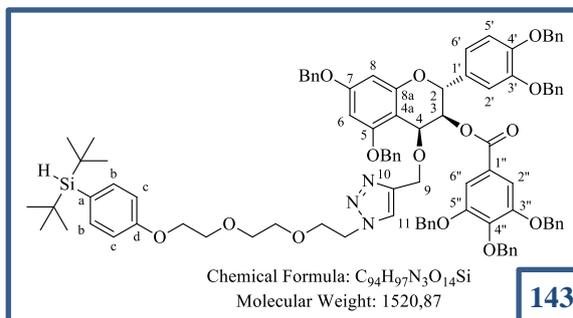
**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** :  $\delta$ 7.48-7.32 (H<sub>A</sub>Bn, Hb, H11, m, 23H); 7.11 (H2', d, 1H,  $J_{2',6'}$  = 1.61 Hz); 7.00 (H6', dd, 1H,  $J_{6',5'}$  = 8.20 Hz and  $J_{6',2'}$  = 1.61 Hz); 6.95 (H5', d, 1H,  $J_{5',6'}$  = 8.20 Hz); 6.85 (Hc, d, 2H,  $J_{c,b}$  = 8.26 Hz); 6.33 (H6, d, 2H,  $J_{6,8}$  = 2.3 Hz); 6.28 (H8, d, 2H,  $J_{8,6}$  = 2.3 Hz); 5.30 (H3, s, 1H); 5.16 (CH<sub>2</sub>Bn, s, 4H); 5.06 (H4, s, 1H); 4.99 (CH<sub>2</sub>Bn, s, 4H); 4.94 (H2, d, 1H,  $J_{2,3}$  = 3.29 Hz); 4.87 (H9, s, 2H); 4.43 (CH<sub>2</sub>, m, 2H); 4.07 (CH<sub>2</sub>, m, 2H); 3.82 (CH<sub>2</sub>, Si-H, s, 3H); 3.77(CH<sub>2</sub>, m, 2H); 3.65-3.60 (CH<sub>2</sub>, m, 4H); 1.03 (CH<sub>3</sub>tBu, s, 18H).

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)** :  $\delta$ 161.2 (C7); 159.5 (Cd); 158.7 (C5); 156.4 (C8a); 149.4 and 149.2 (C4' and C3'); 142.3 (C10); 137.5-136.6 (CqBn); 131.9 (C1'); 128.8 (Cb, 2C); 128.7-127.6 (CHBn); 128.5 (C11); 127.4 (C<sub>A</sub>-Si); 121.5 (Cc, 2C); 116.1 (C6'); 115.1 (C5'); 114.1 (Ca); 113.8 (C2'); 103.8 (C4a); 93.9 (C8); 93.6 (C6); 77.4 (C2); 71.5-69.8 (CH<sub>2</sub>Bn and CH<sub>2</sub>); 69.6 (C4); 69.4 (C3); 67.0 (CH<sub>2</sub>); 66.1 (C9); 50.3 (CH<sub>2</sub>); 29.8-29.0 (CH<sub>3</sub>tBu, 6C); 19.2 (Si-CtBu, 2C).

**HRMS** : [M+Na]<sup>+</sup>: mass calculated for C<sub>66</sub>H<sub>75</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>NaSi : 1120.5203 and mass found : 1120.5117.

**(2R,3S,4S)-5,7-bis(benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)-4-((1-(2-(2-(2-(4-(di-tert-butylsilyl)phenoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)chroman-3-yl 3,4,5-tris(benzyloxy)benzoate**

To a stirred solution of **133** (26 mg, 23  $\mu\text{mol}$ ) and of **130** (11 mg, 28  $\mu\text{mol}$ ) in DMF/H<sub>2</sub>O (3/1, 1.2 mL) was added sodium ascorbate (2.7 mg, 14  $\mu\text{mol}$ ) and CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (1.1 mg, 4.6  $\mu\text{mol}$ ). The mixture was stirred 30mn at 100°C under microwave activation, dissolved in brine (30 mL) and extracted with Et<sub>2</sub>O (3×10 mL). The organic layers were combined, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and evaporated to dryness to get a yellow oil, which was purified by column chromatography, eluted with Cyclohexane/EtOAc (70/30), to furnish **143** as a white oil (33 mg, 94 %).



**R<sub>f</sub>** = 0.47 (Cyclohexane/EtOAc : 70/30).

**IR (Neat)** :  $\nu_{\text{max}}$  3089, 3032, 2928, 2856, 2094, 1716, 1615, 1592, 1501, 1453, 1428, 1336, 1268, 1245, 1203, 1108, 814, 738, 697 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** :  $\delta$ 7.45 (H<sub>b</sub>, d, 2H,  $J_{b,c}$  = 8.57 Hz); 7.42-7.22 (H<sub>A</sub>tBn, m, 35H); 7.27 (H<sub>11</sub>, s, 1H); 7.22 (H<sub>2''</sub>, H<sub>6''</sub>, s, 2H); 7.06 (H<sub>2'</sub>, d, 1H,  $J_{2',6'}$  = 1.86 Hz); 6.94 (H<sub>6'</sub>, dd, 1H,  $J_{6',5'}$  = 8.08 Hz and  $J_{6',2'}$  = 1.86 Hz); 6.83 (H<sub>c</sub>, d, 2H,  $J_{c,b}$  = 8.57 Hz); 6.80 (H<sub>5'</sub>, d, 1H,  $J_{5',6'}$  = 8.08 Hz); 6.29 (H<sub>6</sub>, d, 1H,  $J_{6,8}$  = 2.31 Hz); 6.19 (H<sub>8</sub>, d, 1H,  $J_{8,6}$  = 2.31 Hz); 5.42 (H<sub>3</sub>, s, 1H); 5.41 (H<sub>2</sub>, s, 1H); 5.15-4.89 (CH<sub>2</sub>Bn, m, 13H); 5.01 (H<sub>4</sub>, d, 1H,  $J_{4,3}$  = 1.5 Hz); 4.75 (CH<sub>2</sub>Bn, m, 1H); 4.27 (H<sub>9</sub>, t, 2H,  $J_{9,11}$  = 5.34 Hz); 4.01 (OCH<sub>2</sub>, m, 2H); 3.81 (Si-H, s, 1H); 3.71 (OCH<sub>2</sub>, m, 4H); 3.61-3.50 (OCH<sub>2</sub>, m, 6H); 1.02 (CH<sub>3</sub>tBu, s, 18H).

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)** :  $\delta$ 164.40 (CO); 161.0 (C7); 159.4 (Cd and C5); 155.8 (C8a); 152.3 (C3'' and C5''); 149.3 (C4' and C3'); 145.90 (C4''); 136.9 (Cb); 137.57-136.50 (CqBn); 130.2 (C1'); 128.3-127.6 (CHBn); 124.5 (C1''); 123.0 (C11); 121.6 (C6'); 113.9 (Cc); 114.20 (Ca, C2' and C5'); 109.2 (C6'' and C2''); 104.3 (C4a); 94.14 (C8); 93.79 (C6); 74.9 (C4); 73.9 (C2); 71.4-69.5 (CH<sub>2</sub>Bn and OCH<sub>2</sub>); 71.0 (C3); 68.30 (C10); 49.76 (C9); 28.9 (CH<sub>3</sub>tBu, 6C); 19.1 (Si-CtBu, 2C).

**HRMS** : [M+Na]<sup>+</sup> : mass calculated for C<sub>94</sub>H<sub>97</sub>N<sub>3</sub>O<sub>14</sub>SiNa : 1544.28 and mass found : 1544.3751.

**(2R,3S,4S)-5,7-bis(benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)-8-bromo-4-(but-3-yn-1-yloxy)chroman-3-ol**

To a stirred solution of **41** (100 mg, 0.154 mmol) in 2 mL of dry ACN was added 0.104 mL of 3-butyn-1-ol (97 mg, 1.38 mmol) and DDQ (70 mg, 0.308 mmol). The resulting purple solution was stirred 3h at room temperature and DMAP (38 mg, 0.308 mmol) was added. The brown mixture was stirred 15mn, concentrated until dryness and purified by column chromatography eluted with Cyclohexane/EtOAc (85/15) to furnish **145** as white foam (44 mg, 40%).

**R<sub>f</sub>** = 0.27 (Cyclohexane/EtOAc, 85/15).

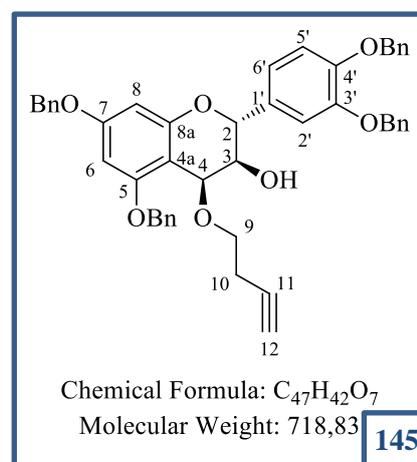
**m.p** : 108°C.

**IR (Neat)** :  $\nu_{\text{max}}$  3507, 3292, 3032, 2924, 2873, 1614, 1591, 1514, 1454, 1378, 1264, 1215, 1203, 1151, 1116, 1067, 1050, 1027, 736, 697  $\text{cm}^{-1}$ .

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)** :  $\delta$ 7.4-7.31 (H<sub>A</sub>-Bn, m, 20H); 7.11 (H<sub>2'</sub>, d, 1H,  $J_{2',6'} = 1.7$  Hz); 7.03 (H<sub>6'</sub>, dd, 1H,  $J_{6',5'} = 8.2$  Hz and  $J_{2',6'} = 1.7$  Hz); 6.98 (H<sub>5'</sub>, d, 1H,  $J_{5',6'} = 8.2$  Hz); 6.28 (H<sub>6</sub>, d, 1H,  $J_{6,8} = 2$  Hz); 6.18 (H<sub>8</sub>, d, 1H,  $J_{6,8} = 2$  Hz); 5.18 (CH<sub>2</sub>Bn, s, 4H); 5.08-4.94 (CH<sub>2</sub>Bn, m, 4H); 4.94 (H<sub>2</sub>, s, 1H); 4.82 (H<sub>4</sub>, d, 1H,  $J_{4,3} = 3.4$  Hz); 3.88 (H<sub>9</sub>, m, 2H); 3.74 (H<sub>3</sub>, m, 1H); 2.38 (H<sub>10</sub>, m, 2H); 1.96 (H<sub>12</sub>, t, 1H,  $J_{12,10} = 2.37$  Hz).

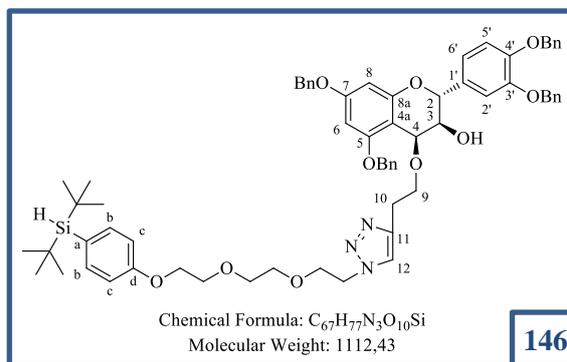
**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100.6 MHz)** :  $\delta$ 161.1 (C7); 158.8 (C5); 156.4 (C8a); 149.5 (C4'); 149.2 (C3'); 137.5 (CqBn); 137.4 (CqBn); 136.7 (CqBn); 136.4 (CqBn); 131.7 (C1'); 128.8-127.3 (CHBn); 121.5 (C6'); 114.9 (C5'); 114.7 (C2'); 103.5 (C4a); 94.5 (C8); 93.6 (C6); 82.2 (C10); 77.3 (C2); 71.5 (CH<sub>2</sub>Bn); 71.4 (CH<sub>2</sub>Bn); 70.8 (CH<sub>2</sub>Bn); 70.7 (CH<sub>2</sub>Bn); 70.9 (C9); 69.7 (C11); 69.2 (C4); 68.6 (C3); 20.3 (C12).

**HRMS** : [M+Na]<sup>+</sup>: mass calculated for C<sub>47</sub>H<sub>42</sub>O<sub>7</sub>Na: 741.2822 and mass found : 741.2834.



**(2R,3S,4S)-5,7-bis(benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)-4-(2-(1-(2-(2-(2-(4-(di-tert-butylsilyl)phenoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)ethoxy)chroman-3-ol**

To a stirred solution of **145** (22 mg, 31  $\mu\text{mol}$ ) and of **130** (14 mg, 35  $\mu\text{mol}$ ) in DMF/H<sub>2</sub>O (3/1, 1.75 mL) was added sodium ascorbate (4 mg, 18  $\mu\text{mol}$ ) and CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (2 mg, 6.2  $\mu\text{mol}$ ). The mixture was stirred 30mn at 100°C under microwave activation, dissolved in brine (20 mL) and extracted with Et<sub>2</sub>O (3×20 mL). The organic layers were combined, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and evaporated to dryness to



get a yellow oil, which was purified by column chromatography, eluted with Cyclohexane/EtOAc (50/50), to furnish **146** as a white oil (31 mg, 91 %).

**R<sub>f</sub>** = 0.3 (Cyclohexane/EtOAc : 50/50).

**IR (Neat)** :  $\nu_{\text{max}}$  2928, 2093, 1592, 1500, 1455, 1268, 1185, 1115, 1051, 812, 736 cm<sup>-1</sup>.

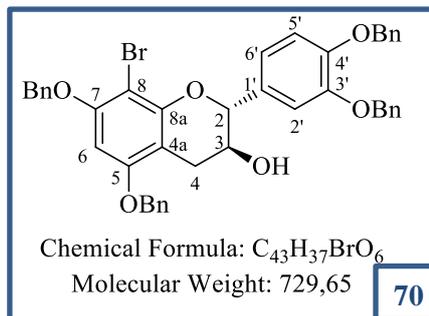
**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** :  $\delta$ 7.49-7.28 (H<sub>Ar</sub>, m, 20H); 7.46 (H<sub>b</sub>, d, 2H,  $J_{b,c}$  = 8.7 Hz); 7.43 (H<sub>c</sub>, d, 2H,  $J_{c,b}$  = 8.7 Hz); 7.20 (H<sub>2'</sub>, d, 1H,  $J_{2',6'}$  = 1.85 Hz); 6.97 (H<sub>6'</sub>, dd, 1H,  $J_{6',5'}$  = 8.2 Hz and  $J_{6',2'}$  = 1.85 Hz); 6.86 (H<sub>5'</sub>, d, 1H,  $J_{5',6'}$  = 8.2 Hz); 6.25 (H<sub>6</sub>, d, 2H,  $J_{6,8}$  = 2.2 Hz); 6.15 (H<sub>8</sub>, d, 2H,  $J_{8,6}$  = 2.2 Hz); 5.22-4.98 (CH<sub>2</sub>Bn, m, 8H); 4.92 (H<sub>2</sub>, d, 1H,  $J_{2,3}$  = 10.5 Hz); 4.84 (H<sub>4</sub>, d, 1H,  $J_{4,3}$  = 3.47 Hz); 4.43 (H<sub>9</sub>, m, 2H); 4.07 (H<sub>10</sub>, m, 2H); 3.88 (H<sub>3</sub>, dd, 1H,  $J_{3,2}$  = 10.5 Hz and  $J_{3,4}$  = 3.47 Hz); 3.89-3.75 (OCH<sub>2</sub>, m, 6H); 3.81 (Si-H, s, 1H); 3.55-3.36 (OCH<sub>2</sub>, m, 6H); 1.01 (CH<sub>3</sub>*t*Bu, s, 18H).

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)** :  $\delta$ 160.7 (C7); 159.4 (Cd); 158.6 (C5); 156.1 (C8a); 149.0 (C4' and C3'); 145.1 (Cb); 137.7-136.6 (CqBn); 132.3 (C1'); 128.6-126.6 (CHBn); 122.6 (C12); 120.9 (C6'); 115.0 (C5'); 114.7 (C2'); 113.8 (C<sub>Ar</sub>-Si, Ca and Cc); 104.3 (C4a); 94.3 (C6); 93.5 (C8); 77.1 (C2); 71.7 (C3); 71.3-68.9 (CH<sub>2</sub>Bn and OCH<sub>2</sub>); 69.5 (C4); 68.9 (C11); 66.9 (C10); 50.2 (C9); 28.9 (CH<sub>3</sub>*t*Bu, 6C); 19.0 (Si-C*t*Bu, 2C).

**HRMS** : [M+Na]<sup>+</sup>: mass calculated for C<sub>67</sub>H<sub>77</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>NaSi : 1134.5270 and mass found : 1135.5302.

**(2R,3S)-8-bromo-2-(3,4-dihydroxyphenyl)chroman-3,5,7-triol**

To a stirred solution of **41** (100 mg, 0.15 mmol) in DCM (1 mL) was added a solution of NBS (30 mg, 0.17 mmol) in DCM (1 mL) at -78°C. The solution was stirred 10mn and was dissolved in 20 mL of EtOAc. The solution was washed with brine (3×10 mL), the organic layers were combined, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and evaporated to dryness to get **70** as a yellow oil (111 mg, 100 %).



**70**

**Rf** = 0.1 (Cyclohexane/EtOAc : 85/15).

**IR (Neat)** :  $\nu_{\max}$  3441, 3032, 2921, 2872, 1711, 1605, 1497, 1454, 1416, 1264, 1176, 1119, 1026, 736, 696 cm<sup>-1</sup>.

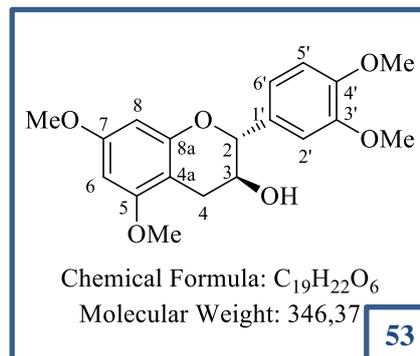
**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** :  $\delta$ 7.47-7.27 (H<sub>Ar</sub> Bn, m, 20H); 7.04 (H<sub>2'</sub>, s, 1H); 6.93 (H<sub>5'</sub> and H<sub>6'</sub>, s, 2H); 6.25 (H<sub>6</sub>, s, 1H); 5.17 (CH<sub>2</sub>Bn, s, 4H); 5.12 (CH<sub>2</sub>Bn, s, 2H); 4.98 (CH<sub>2</sub>Bn, s, 2H); 4.82 (H<sub>2</sub>, d, 1H,  $J_{2,3} = 7.3$  Hz); 3.99 (H<sub>3</sub>, m, 1H); 3.00 (H<sub>4 $\beta$</sub> , dd, 1H,  $J_{4 $\beta$ ,4 $\alpha$ } = 16.7$  Hz and  $J_{4 $\beta$ ,3} = 5.4$ Hz); 2.69 (H<sub>4 $\alpha$</sub> , dd, 1H,  $J_{4 $\alpha$ ,4 $\beta$ } = 16.7$  Hz and  $J_{4 $\alpha$ ,3} = 5.4$  Hz).

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)** :  $\delta$ 156.41 (C<sub>5</sub>); 154.87 (C<sub>7</sub>); 151.74 (C<sub>8a</sub>); 149.16 (C<sub>3'</sub>); 148.97 (C<sub>4'</sub>); 137.26-136.65 (C<sub>q</sub>Bn, 4C); 130.78 (C<sub>1'</sub>); 128.69-127.16 (C<sub>2</sub> and CHBn, 20C); 119.95 (C<sub>6'</sub>); 114.89 (C<sub>5'</sub>); 113.46 (C<sub>2'</sub>); 104.01 (C<sub>4a</sub>); 92.89 (C<sub>6</sub>); 92.81 (C<sub>6</sub>); 81.65 (C<sub>2</sub>); 71.39-70.29 (CH<sub>2</sub>Bn, 4C); 67.82 (C<sub>3</sub>); 27.28 (C<sub>4</sub>).

**HRMS** : [M+Na]<sup>+</sup> : mass calculated for C<sub>43</sub>H<sub>37</sub>BrO<sub>6</sub>Na : 751.1665 and mass found 751.1678.

**(2R,3S)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-5,7-dimethoxychroman-3-ol**

To a solution of **16** (500 mg, 1.7 mmol) in Acetone (14 mL) was added  $K_2CO_3$  (1.87 g, 13.5 mmol). The resulting mixture was stirred 1h and 1.3 mL of dimethylsulfate (1.7 g, 13.5 mmol) was added dropwise. After 3 days the mixture was filtered and 10 mL of a 28% solution of ammonia was added in the filtrate. The product was extracted with EtOAc (3×20 mL) and the organic layers were dried over  $Na_2SO_4$ , filtered and evaporated in vacuo to get a white solid which was purified by column chromatography eluted with Cyclohexane/EtOAc (70/30 to 60/40) to furnish **53** as a white solid (372 mg, 62%).



**R<sub>f</sub>** = 0.18 (Cyclohexane/EtOAc : 60/40).

**mp** : 91°C.

**IR (Neat)** :  $\nu_{max}$  3344, 3002, 2940, 2838, 1594, 1518, 1456, 1264, 1215, 1200, 1144, 1119, 1054, 1027, 8010  $cm^{-1}$ .

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)**:  $\delta$ 6.96 (H6', d, 1H,  $J_{6',5'} = 7.93$  Hz); 6.94 (H2', s, 1H); 6.84 (H5', d, 1H,  $J_{5',6'} = 7.93$  Hz); 6.11 (H6, d, 1H,  $J_{6,8} = 2.18$  Hz); 6.08 (H8, d, 1H,  $J_{8,6} = 2.18$  Hz); 4.62 (H2, d, 1H,  $J_{2,3} = 8.32$  Hz); 4.01 (H3, m, 1H); 3.85 (CH<sub>3</sub>, s, 3H); 3.84 (CH<sub>3</sub>, s, 3H); 3.77 (CH<sub>3</sub>, s, 3H); 3.71 (CH<sub>3</sub>, s, 3H); 3.03 (H4 $\alpha$ , dd, 2H,  $J_{4\alpha,4\beta} = 16.45$  Hz and  $J_{4\alpha,3} = 8.92$  Hz); 2.54 (H4 $\beta$ , dd, 2H,  $J_{4\beta,4\alpha} = 16.45$  Hz and  $J_{4\beta,3} = 5.74$  Hz).

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz)**:  $\delta$ 160.1 (C7); 159.8 (C5); 155.9 (C8a); 149.6 (C3' et C4'); 130.8 (C1'); 120.3 (C6'); 111.5 (C5'); 110.3 (C2'); 103.0 (C4a); 93.4 (C8); 92.2 (C6); 82.1 (C2); 68.5 (C3); 56.3 (CH<sub>3</sub>); 56.3 (CH<sub>3</sub>); 58.9 (CH<sub>3</sub>); 56.7 (CH<sub>3</sub>); 28.1 (C4).

**HRMS** :  $[M+Na]^+$  : mass calculated for  $C_{19}H_{22}O_6Na$  : 369.1310 and mass found 369.1308.

**(2R,3S)-8-bromo-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-5,7-dimethoxychroman-3-ol**

To a stirred solution of **53** (200 mg, 0.57 mmol) in DCM (3 mL) was added a solution of NBS (113 mg, 0.63 mmol) in DCM (3 mL) at -78°C. The solution was stirred 10mn and was dissolved in 20 mL of EtOAc. The solution was washed with brine (3×10 mL), the organic layers were combined, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and evaporated to dryness to get **71** as a pink solid (230 mg, 95 %).

**R<sub>f</sub>** = 0.3 (Cyclohexane/EtOAc : 75/25).

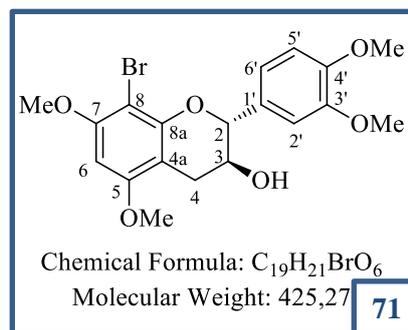
**mp** : 169°C.

**IR (Neat)** :  $\nu_{\text{max}}$  3457, 2930, 1605, 1517, 1261, 1124, 1099, 1025, 800 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)**:  $\delta$ 6.97 (H2', s, 1H); 6.94 (H6', d, 1H,  $J_{6',5'} = 7.93$  Hz); 6.88 (H5', d, 1H,  $J_{5',6'} = 7.93$  Hz); 6.15 (H6, s, 2H); 4.87 (H2, d, 1H,  $J_{2,3} = 7.32$  Hz); 4.08 (H3, m, 1H); 3.94 (CH<sub>3</sub>, s, 3H); 3.89 (CH<sub>3</sub>, s, 6H); 3.82 (CH<sub>3</sub>, s, 3H); 2.93 (H4 $\alpha$ , dd, 1H,  $J_{4\alpha,4\beta} = 16.48$  Hz and  $J_{4\alpha,3} = 7.94$  Hz); 2.67 (H4 $\beta$ , dd, 1H,  $J_{4\beta,4\alpha} = 16.48$  Hz and  $J_{4\beta,3} = 5.24$  Hz).

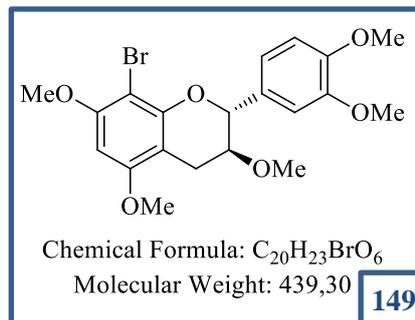
**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)**:  $\delta$ 158.9 (C7); 156.2 (C5); 155.0 (C8a); 149.5 (C3' and C4'); 130 (C1'); 119.4 (C6'); 111.6 (C5'); 110.1 (C2'); 103.4 (C4a); 91.2 (C8); 89.6 (C6); 82.1 (C2); 68.1 (C3); 56.9 (CH<sub>3</sub>); 56.3 (2 CH<sub>3</sub>); 56.0 (CH<sub>3</sub>); 27.4 (C4).

**HRMS** : [M+Na]<sup>+</sup> : mass calculated for C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>O<sub>6</sub>BrNa : 447.0433 and mass found 447.0413.



**(2R,3S)-8-bromo-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-3,5,7-trimethoxychroman**

To a stirred solution of **71** (230 mg, 0.54 mmol) in dry DMF (9 mL) was added NaH (24 mg, 1.08 mmol) at 0°C. The resulting yellow solution was stirred 1h and 68  $\mu$ L of MeI was added (153 mg, 1.08 mmol). The resulting mixture was stirred 3h at room temperature. The product was extracted with EtOAc (3 $\times$ 10 mL). The organic layers were combined, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and evaporated to dryness to get a yellow oil, which was purified by flash chromatography, eluted with Cyclohexane/EtOAc (60/40), to furnish **149** as a pink solid (187 mg, 79 %).



**R<sub>f</sub>** = 0.27 (Cyclohexane/EtOAc, 75/25).

**m.p** : 154°C.

**IR (Neat)** :  $\nu_{\text{max}}$  3014, 2998, 2938, 2907, 2840, 1607, 1518, 1463, 1344, 1261, 1204, 1130, 1106, 793, 763 cm<sup>-1</sup>.

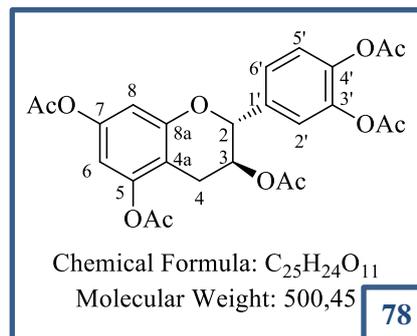
**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** :  $\delta$ 6.96 (H2', s, 1H); 6.93 (H6', dd, 1H,  $J_{6',5'} = 8.2$  Hz and  $J_{6',2'} = 0.63$  Hz); 6.84 (H5', d, 1H,  $J_{5',6'} = 8.2$  Hz); 6.14 (H6, s, 1H); 5.12 (H2, d, 1H,  $J_{2,3} = 6.3$  Hz); 3.89 (CH<sub>3</sub>, s, 3H); 3.87 (CH<sub>3</sub>, s, 3H); 3.85 (CH<sub>3</sub>, s, 3H); 3.82 (CH<sub>3</sub>, s, 3H); 3.72 (H3, m, 1H); 3.32 (CH<sub>3</sub>, s, 3H); 2.83 (H4 $\alpha$ , dd, 1H,  $J_{4\alpha,4\beta} = 16.7$  Hz and  $J_{4\alpha,3} = 5.1$ Hz); 2.69 (H4 $\beta$ , dd, 1H,  $J_{4\beta,4\alpha} = 16.7$  Hz and  $J_{4\beta,3} = 5.1$  Hz).

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)** :  $\delta$ 157.5 (C7); 155.9 (C5); 151.5 (C8a); 149 and 148.7 (C3' and C4'); 131.4 (C1'); 118.6 (C6'); 111.2 (C5'); 109.8 (C2'); 103.0 (C4a); 91.5 (C8); 89.2 (C6); 79.13 (C2); 76.28 (C3); 57.42 (CH<sub>3</sub>); 56.68 (CH<sub>3</sub>); 56.06 (CH<sub>3</sub>); 56.02 (CH<sub>3</sub>); 55.71 (CH<sub>3</sub>); 23.84 (C4).

**HRMS** : [M+H]<sup>+</sup>: mass calculated for C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>O<sub>6</sub>Br : 438.06780 and mass found 438.0699.

**(2R,3S)-2-(3,4-diacetoxyphenyl)chroman-3,5,7-triyl triacetate**

To stirred solution of catechin **16** (500 mg, 1.72 mmol) in pyridine (12.5 mL) was added acetic anhydride (3.34 g, 32 mmol). The solution was stirred 2d at room temperature. The product was dissolved in DCM (3×20 mL) and the organic layers were washed with brine (3×30 mL). The organic layers were combined, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and evaporated to dryness to get a brownish solid, which was purified by column chromatography, eluted with DCM/EtOAc (95/5), to furnish **78** as a white solid (559 mg, 65 %).



**R<sub>f</sub>** = 0.62 (DCM/EtOAc 90/10).

**m.p** : 88°C.

**IR (Neat)** :  $\nu_{\text{max}}$  3477, 1769, 1623, 1371, 1202, 1124, 1041, 900 cm<sup>-1</sup>.

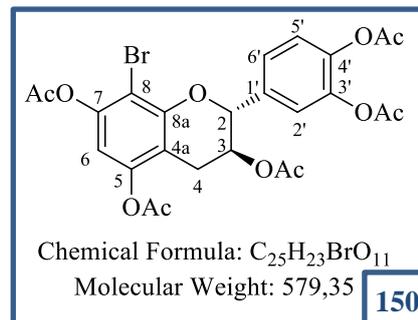
**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** :  $\delta$ 7.26 (H6', dd, 1H,  $J_{6',5'} = 7.5\text{ Hz}$  and  $J_{6',2'} = 2.1\text{ Hz}$ ); 7.21 (H5', d, 1H,  $J_{5',6'} = 7.5\text{ Hz}$ ); 7.17 (H2', d, 1H,  $J_{2',6'} = 2.1\text{ Hz}$ ); 6.66 (H6, d, 1H,  $J_{6,8} = 2.24\text{ Hz}$ ); 6.59 (H8, d, 1H,  $J_{8,6} = 2.24\text{ Hz}$ ); 5.25 (H3, m, 1H); 5.14 (H2, d, 1H,  $J_{2,3} = 6.26\text{ Hz}$ ); 2.87 (H4 $\beta$ , dd, 1H,  $J_{4\beta, 4\alpha} = 16.8\text{ Hz}$  and  $J_{4\beta,3} = 4.97\text{ Hz}$ ); 2.67 (H4 $\alpha$ , dd, 1H,  $J_{4\alpha,4\beta} = 16.8\text{ Hz}$  and  $J_{4\alpha,3} = 4.97\text{ Hz}$ ); 2.28 (CH<sub>3</sub>, s, 6H); 2.27 (CH<sub>3</sub>, s, 3H); 2.26 (CH<sub>3</sub>, s, 3H); 1.99 (CH<sub>3</sub>, s, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)** :  $\delta$ 170.11 (CO); 168.94 (CO); 168.35 (CO); 168.05 (CO); 154.37 (C5); 149.86 (C7); 149.43 (C8a); 142.12 (C3'); 142.09 (C4'); 136.13 (C1'); 124.40 (C6'); 123.71 (C5'); 121.78 (C2'); 110.18 (C4a); 108.78 (C8); 107.68 (C6); 77.64 (C2); 71.38 (C3); 23.92 (C4); 21.08 (CH<sub>3</sub>); 20.94 (CH<sub>3</sub>); 20.77 (CH<sub>3</sub>); 20.64 (CH<sub>3</sub>); 20.61 (CH<sub>3</sub>).

**HRMS** : [M+Na]<sup>+</sup> : mass calculated for C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>O<sub>11</sub>Na : 523.1210 and mass found 523.1214.

**(2R,3S)-8-bromo-2-(3,4-diacetoxyphenyl)chroman-3,5,7-triyl triacetate**

To an ice-cold solution of **78** (36 mg, 72  $\mu\text{mol}$ ) in DCM (1 mL) was added NBS (14 mg, 74  $\mu\text{mol}$ ) and  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (0.25 mL, 36  $\mu\text{mol}$ ). The reaction mixture was stirred at room temperature during 23h and dissolved in 20 mL of brine. The product was extracted with EtOAc (3 $\times$ 10mL) and the organic layers were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and evaporated to dryness to get a yellow oil. The oil was purified by column chromatography eluted with Cyclohexane/EtOAc (65/35 to 70/30) to furnish **150** as a yellow oil (16 mg, 38%).



**150**

$R_f = 0.3$  (Cyclohexane/EtOAc 60/40).

**IR (Neat)** :  $\nu_{\text{max}}$  3061, 2939, 1178, 1612, 1506, 1423, 1370, 1183, 1109, 1048, 897, 735  $\text{cm}^{-1}$ .

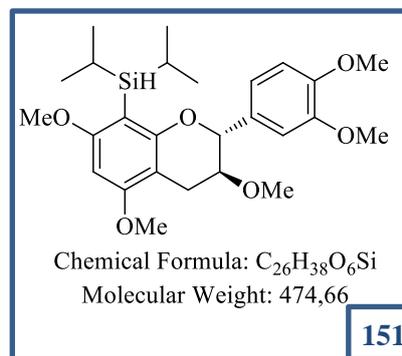
**$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)** :  $\delta$ 7.23 ( $\text{H}_{6'}$ , dd, 1H,  $J_{6',5'} = 8.4$  Hz and  $J_{6',2'} = 1.4$  Hz); 7.20 ( $\text{H}_{5'}$ , d, 1H,  $J_{5',6'} = 8.4$  Hz); 7.15 ( $\text{H}_{2'}$ , d, 1H,  $J_{2',6'} = 1.4$  Hz); 6.75 ( $\text{H}_6$ , s, 1H); 5.25 ( $\text{H}_3$ , m, 1H); 5.16 ( $\text{H}_2$ , d, 1H,  $J_{2,3} = 5.98$  Hz); 2.88 ( $\text{H}_{4\beta}$ , dd, 1H,  $J_{4\beta,4\alpha} = 16.7$  Hz and  $J_{4\beta,3} = 4.69$  Hz); 2.68 ( $\text{H}_{4\alpha}$ , dd, 1H,  $J_{4\alpha,4\beta} = 16.7$  Hz and  $J_{4\alpha,3} = 5.96$  Hz); 2.35 ( $\text{CH}_3$ , s, 3H); 2.34 ( $\text{CH}_3$ , s, 3H); 2.29 ( $\text{CH}_3$ , s, 6H); 2.00 ( $\text{CH}_3$ , s, 3H).

**$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz)** :  $\delta$ 170.23 (CO); 168.33 (CO); 168.17 (CO); 167.55 (CO); 153.47 (C5); 148.12 (C7); 147.93 (C8a); 142.34 (C3'); 142.28 (C4'); 135.96 (C1'); 124.45 (C6'); 123.93 (C5'); 121.85 (C2'); 112.89 (C4a); 109.93 (C6); 103.20 (C8); 77.93 (C2); 71.38 (C6'); 68.08 (C3); 24.51 (C4); 21.07 ( $\text{CH}_3$ ); 20.92 ( $\text{CH}_3$ ); 20.79 ( $\text{CH}_3$ ); 20.77 ( $\text{CH}_3$ ); 20.61 ( $\text{CH}_3$ ).

**HRMS** :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  : mass calculated for  $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{BrO}_{11}\text{Na}$  : 601.0315 and mass found 601.0322.

**((2R,3S)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-3,5,7-trimethoxychroman-8-yl)diisopropylsilane**

To a stirred solution of **149** (50 mg, 0.114 mmol) in dry THF (1 mL) was added *n*BuLi (104  $\mu$ L, 0.12 mmol) at  $-78^{\circ}\text{C}$ . The resulting yellow solution was stirred 30mn and 64  $\mu$ L of *i*Pr<sub>2</sub>ClSiH was added (57 mg, 0.38 mmol). The resulting mixture was stirred 45mn at room temperature. The product was extracted with AcOEt (3 $\times$ 10 mL). The organic layers were combined, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and evaporated to dryness to get a yellow oil, which was purified by flash chromatography, eluted with Cyclohexane/EtOAc (85/15 to 80/20), to furnish **151** as a colorless oil (12 mg, 22 %).



**R<sub>f</sub>** = 0.35 (Cyclohexane/EtOAc, 80/20).

**IR (Neat)** :  $\nu_{\text{max}}$  2996, 2938, 2859, 2836, 2121, 1597, 1517, 1462, 1394, 1329, 1262, 1203, 1129, 1105, 1029, 798  $\text{cm}^{-1}$ .

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** :  $\delta$ 6.96 (H2', s, 1H); 6.95 (H6', dd, 1H,  $J_{6',5'} = 8.1$  Hz and  $J_{6',2'} = 1.77$  Hz); 6.86 (H5', d, 1H,  $J_{5',6'} = 8.1$  Hz); 6.11 (H6, s, 1H); 4.66 (H2, d, 1H,  $J_{2,3} = 8.3$  Hz); 3.98 (Si-H, t, 1H,  $J_{\text{Si-H,CHiPr}_2} = 3.7$  Hz); 3.90 (CH<sub>3</sub>, s, 3H); 3.87 (CH<sub>3</sub>, s, 3H); 3.86 (CH<sub>3</sub>, s, 3H); 3.77 (CH<sub>3</sub>, s, 3H); 3.57 (H3, m, 1H); 3.18 (CH<sub>3</sub>, s, 3H); 3.09 (H4 $\beta$ , dd, 2H,  $J_{4\beta,4\alpha} = 16.3$  Hz and  $J_{4\beta,3} = 5.8$  Hz); 2.56 (H4 $\alpha$ , dd, 2H,  $J_{4\alpha,4\beta} = 16.3$  Hz and  $J_{4\alpha,3} = 5.8$  Hz); 1.16 (SiCH, m, 2H); 0.96 (SiCH<sub>3</sub>, m, 4H); 0.95 (SiCH<sub>3</sub>, m, 4H); 0.93 (SiCH<sub>3</sub>, s, 1H); 0.87 (SiCH<sub>3</sub>, s, 2H); 0.84 (SiCH<sub>3</sub>, s, 1H).

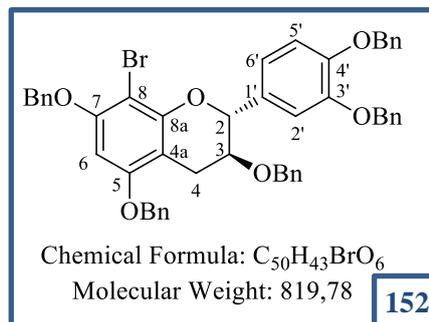
**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)** :  $\delta$ 165.0 (C7); 160.3 (C5); 160.2 (C8a); 14.8 and 148.7 (C3' and C4'); 131.9 (C1'); 120.0 (C5'); 110.7 (C6'); 110.1 (C2'); 101.5 (C4a); 100.4 (C8); 88.1 (C6); 80.1 (C2); 77.4 (C3); 57.5 (CH<sub>3</sub>); 55.9 (CH<sub>3</sub>); 55.9 (CH<sub>3</sub>); 55.8 (CH<sub>3</sub>); 55.4 (CH<sub>3</sub>); 26.25 (C4); 19.57 (SiCH<sub>3</sub>); 19.54 (SiCH<sub>3</sub>); 19.35 (SiCH<sub>3</sub>); 19.20 (SiCH<sub>3</sub>); 11.47 (SiCH); 11.43 (SiCH).

**<sup>29</sup>Si NMR (CDCl<sub>3</sub>, 60 MHz)** :  $\delta$ 83.51.

**HRMS** : [M+Na]<sup>+</sup> : mass calculated for C<sub>26</sub>H<sub>38</sub>O<sub>6</sub>SiNa : 497.2329 and mass found 497.2322.

### (2R,3S)-3,5,7-tris(benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)-8-bromochroman

To a solution of **70** (108 mg, 0.15 mmol) in dry DMF (1 mL) was added NaH (14 mg, 0.59 mmol). The resulting yellow mixture was stirred 20mn and was placed at 0°C before the addition of 36  $\mu$ L of benzyl bromide (51 mg, 0.3 mmol). The reaction was stirred during one night at room temperature and was quenched with water. The product was extracted with Toluene (3 $\times$ 10 mL) and the organic layers were combined, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and evaporated to dryness to get a yellow oil, which was purified by column chromatography, eluted with Cyclohexane/EtOAc (95/5 to 90/10) to furnish **152** as a colorless oil (78 mg, 64%).



**152**

**R<sub>f</sub>** = 0.49 (Cyclohexane/EtOAc : 85/15).

**IR (Neat)** :  $\nu_{\max}$  3031, 2924, 2869, 1605, 1514, 1454, 1415, 1262, 1124, 1096, 1026, 736, 696 cm<sup>-1</sup>.

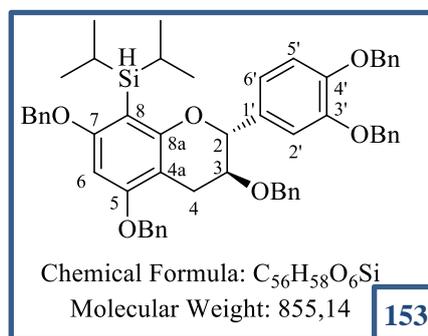
**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)**:  $\delta$ 7.49-7.12 (H<sub>A</sub>,Bn, m, 25H); 7.02 (H2', s, 1H); 6.93 (H5' and H6', s, 2H); 6.25 (H6, s, 1H); 5.20 (CH<sub>2</sub>Bn, s, 2H); 5.17 (CH<sub>2</sub>Bn, s, 4H); 5.12 (CH<sub>2</sub>Bn, s, 2H); 5.02 (H2, d, 1H,  $J_{2,3} = 7.16$  Hz); 4.37 and 4.25 (CH<sub>2</sub>Bn, d, 2H,  $J_{\text{CH}\alpha\text{H}\beta\text{Bn}-\text{CH}\beta\text{H}\alpha\text{Bn}} = 12.6$  Hz); 3.75 (H3, m, 1H); 2.91 (H4 $\alpha$ , dd, 2H,  $J_{4\alpha,4\beta} = 16.58$  Hz and  $J_{4\alpha,3} = 7.91$ Hz), 2.75 (H4 $\beta$ , dd, 2H,  $J_{4\beta,4\alpha} = 16.58$  Hz and  $J_{4\beta,3} = 5.28$  Hz).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm)** :  $\delta$ 156.5 (C7); 155.0 (C5); 152.1 (C8a); 148.9 (C4' and C3'); 138.3 (CqBn); 137.6 (CqBn); 137.4 (CqBn); 137.2 (CqBn); 136.9 (CqBn); 132.1 (C1'); 127.9 (2CHBn); 127.6 (2 CHBn); 127.5 (4 CHBn); 127.3 (2 CHBn); 128.4 (4 CHBn); 128.0 (2 CHBn); 127.5 (2 CHBn); 127.5 (3 CHBn); 127.2 (2 CHBn); 127.1 (2 CHBn); 120.5 (C6'); 114.9 (C5'); 113.8 (C2'); 104.7 (C4a); 92.9 (C8); 92.8 (C6); 80.0 (C2); 74.4 (C3); 71.7 (CH<sub>2</sub>Bn); 71.4 (2 CH<sub>2</sub>Bn); 71.2 (CH<sub>2</sub>Bn); 70.4 (CH<sub>2</sub>Bn); 25.9 (C4).

**MS (MALDI)**: [M+Na]<sup>+</sup> : mass calculated for C<sub>50</sub>H<sub>43</sub>BrO<sub>6</sub>Na : 841.1 and mass found 841.2.

**diisopropyl((2R,3S)-3,5,7-tris(benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)chroman-8-yl)silane.**

To a stirred solution of **152** (30 mg, 0.036 mmol) was added *n*BuLi (100  $\mu$ L, 0.12 mmol) at  $-78^{\circ}\text{C}$ . After 30mn, 20 mL of *i*Pr<sub>2</sub>ClSiH was added (18  $\mu$ g, 0.12 mmol). The resulting mixture was stirred 3h at room temperature. The product was extracted with EtOAc (3 $\times$ 10 mL). The organic layers were combined, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and evaporated to dryness to get a yellow oil, which was purified on preparative chromatography, eluting with Cyclohexane/EtOAc (95/5), to furnish **153** as a colorless oil (8 mg, 26 %).



**R<sub>f</sub>** = 0.34 (Cyclohexane/EtOAc : 95/5).

**IR (Neat)** :  $\nu_{\text{max}}$  3032, 2961, 2860, 2122, 1595, 1454, 1261, 1092, 1026, 801, 137, 697  $\text{cm}^{-1}$ .

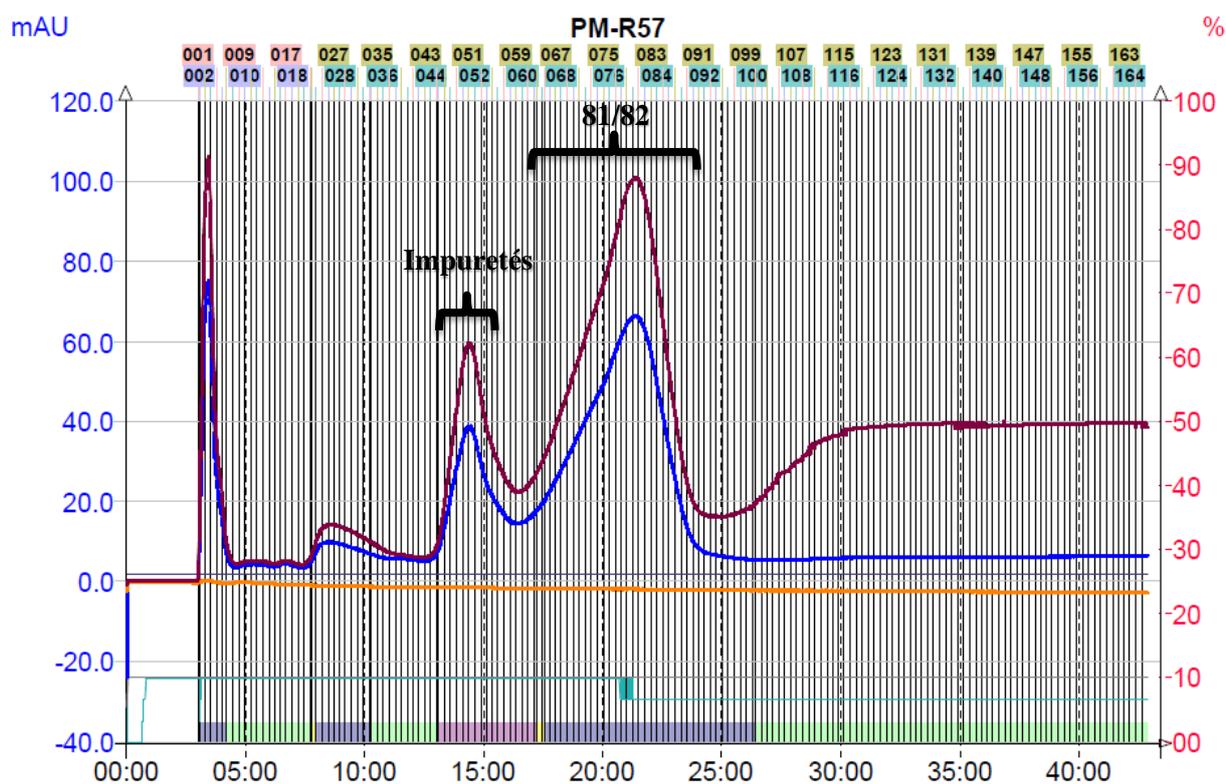
**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)**:  $\delta$ 7.48-7.18 (Har Bn, m, 25H); 7.03 (H<sub>2'</sub>, s, 1H); 6.98 (H<sub>5'</sub>, m, 1H); 6.93 (H<sub>6'</sub>, s, 1H); 6.20 (H<sub>6</sub>, s, 1H); 5.20 (CH<sub>2</sub>Bn, s, 2H); 5.09 (CH<sub>2</sub>Bn, m, 2H); 5.01 (CH<sub>2</sub>Bn, s, 4H); 4.65 (H<sub>2</sub>, d, 1H,  $J_{2,3} = 8.21$  Hz); 4.17 and 4.01 (CH<sub>2</sub>Bn, d, 2H,  $J_{\text{CH}\alpha\text{H}\beta\text{Bn}, \text{CH}\beta\text{H}\alpha\text{Bn}} = 11.9$  Hz); 4.07 (SiH, t, 1H,  $J_{\text{SiH}, \text{SiCH}} = 3.79$  Hz); 3.62 (H<sub>3</sub>, m, 1H); 3.07 (H<sub>4 $\alpha$</sub> , ABX, 2H,  $J_{4\alpha, 4\beta} = 16.55$  Hz and  $J_{4\alpha, 3} = 9.17$ Hz); 2.66 (H<sub>4 $\beta$</sub> , ABX, 1H,  $J_{4\beta, 4\alpha} = 16.55$  Hz and  $J_{4\beta, 3} = 5.87$ ); 1.16 (SiCH, m, 1H); 0.98-0.83 (SiCH<sub>3</sub>, m, 12H).

**<sup>13</sup>C NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm)** :  $\delta$ 163.9 (C<sub>7</sub>); 160.3 (C<sub>5</sub>); 159.4 (C<sub>8a</sub>); 148.7 (C<sub>4'</sub> and C<sub>3'</sub>); 138.3 (C<sub>q</sub>Bn); 137.6 (C<sub>q</sub>Bn); 137.5 (C<sub>q</sub>Bn); 137.4 (C<sub>q</sub>Bn); 137.2 (C<sub>q</sub>Bn); 132.6 (C<sub>1'</sub>); 128.7-127.4 (CHBn); 121 (C<sub>6'</sub>); 114.7 (C<sub>5'</sub>); 113.8 (C<sub>2'</sub>); 102.4 (C<sub>4a</sub>); 101.3 (C<sub>8</sub>); 90.9 (C<sub>6</sub>); 80.4 (C<sub>2</sub>); 75.3 (C<sub>3</sub>); 71.9 (CH<sub>2</sub>Bn); 71.5 (2 CH<sub>2</sub>Bn); 71.2 (CH<sub>2</sub>Bn); 70.8 (CH<sub>2</sub>Bn); 70.1 (CH<sub>2</sub>Bn); 27.2 (C<sub>4</sub>); 19.7 (SiCH<sub>3</sub>); 19.6 (SiCH<sub>3</sub>); 19.3 (SiCH<sub>3</sub>); 11.5 (SiCH); 11.4 (SiCH).

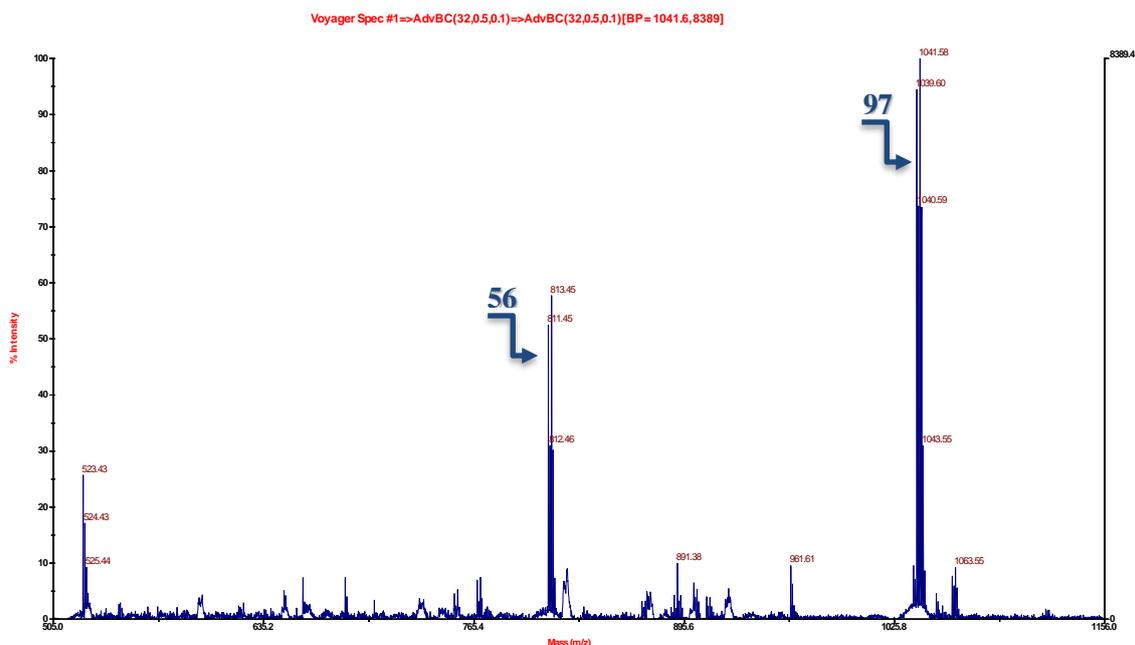
**HRMS** : [M+Na]<sup>+</sup> : mass calculated for C<sub>56</sub>H<sub>58</sub>O<sub>6</sub>SiNa : 877.3900 and mass found 877.3875.



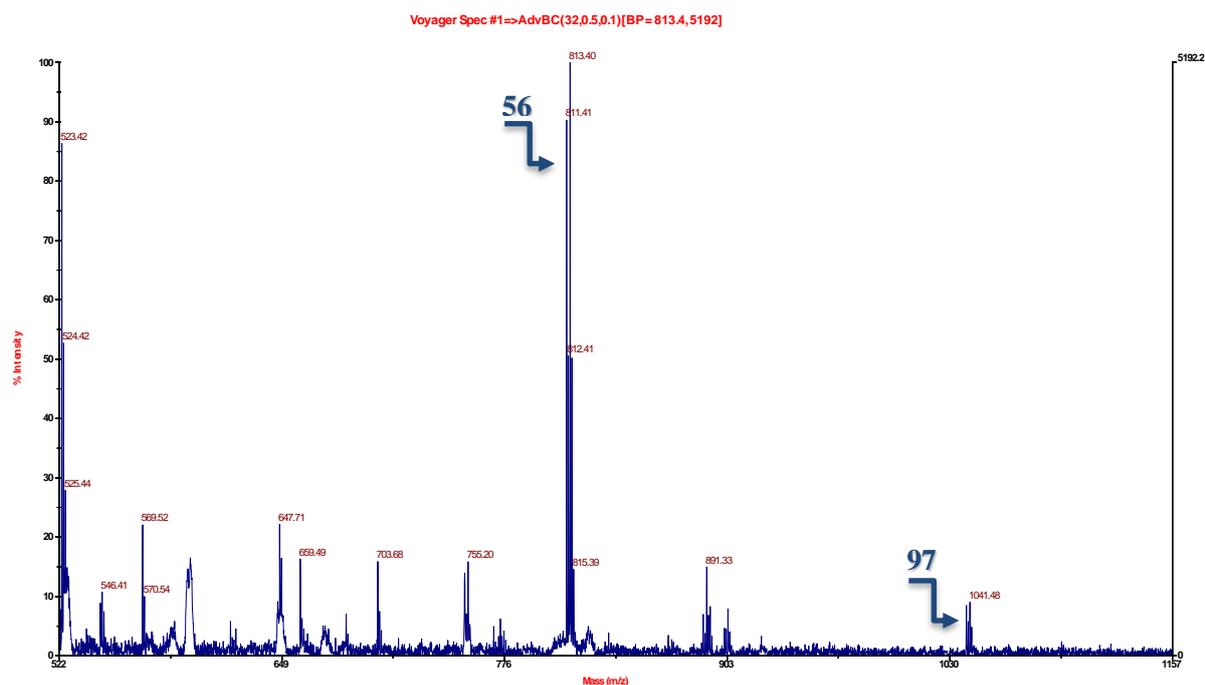
# **Annexes**



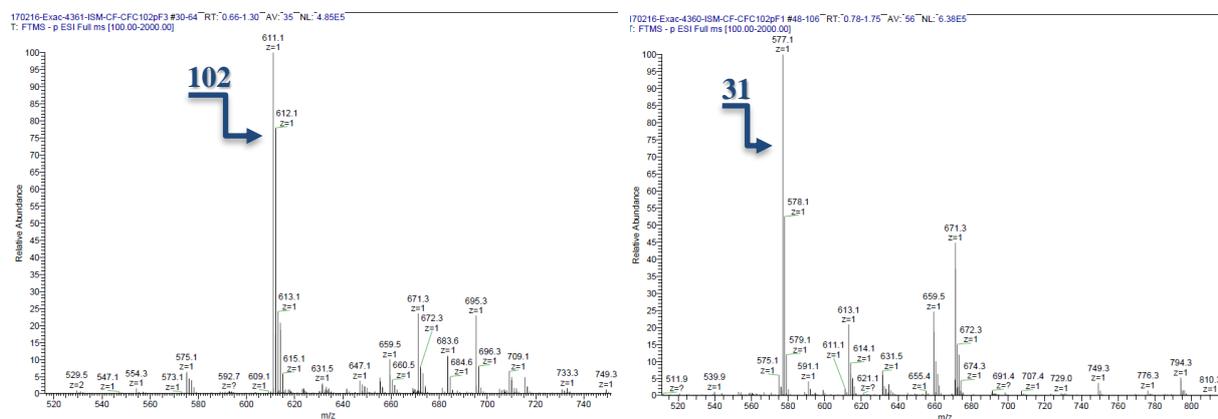
**Annexe 1** : Séparation de 81 et 82 au puriflash. Courbe rose :  $\lambda=235\text{nm}$ , Courbe bleue :  $\lambda=354\text{nm}$ . Tubes 54-59 : 81 + 43, tubes 60-90 : 81 et 82.



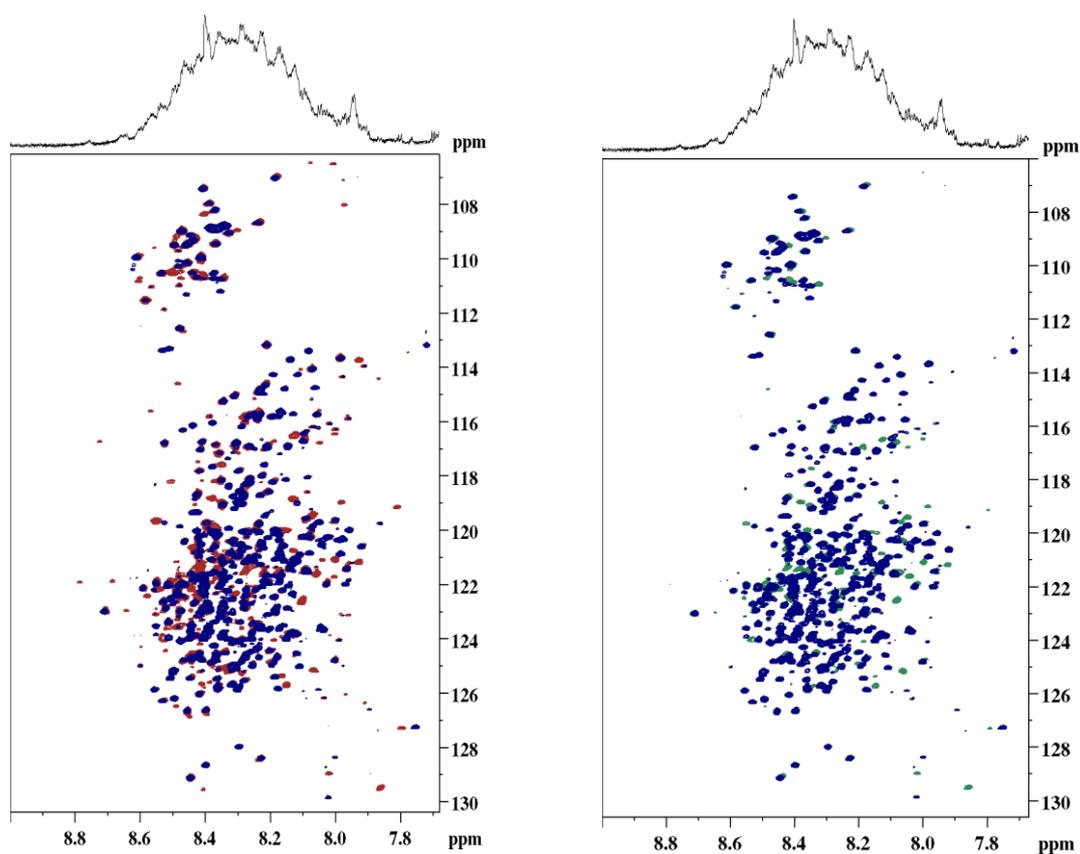
**Annexe 2** : Spectre de masse du couplage entre la catéchine activée **56** et la catéchine **16** sous activation micro-ondes. Conditions d'analyse : MALDI, ionisation positive, Matrice : dctb dans le Méthanol.



**Annexe 3:** Spectre de masse du couplage entre la catéchine activée **56** et la catéchine **16** à température ambiante. Conditions d'analyse : MALDI, ionisation positive, Matrice : dctb dans le Méthanol.



**Annexe 4:** Spectre de masse du B6Cl (gauche) et du B6 (droite). Conditions d'analyse : Source ESI, ionisation négative, Solvant Méthanol.



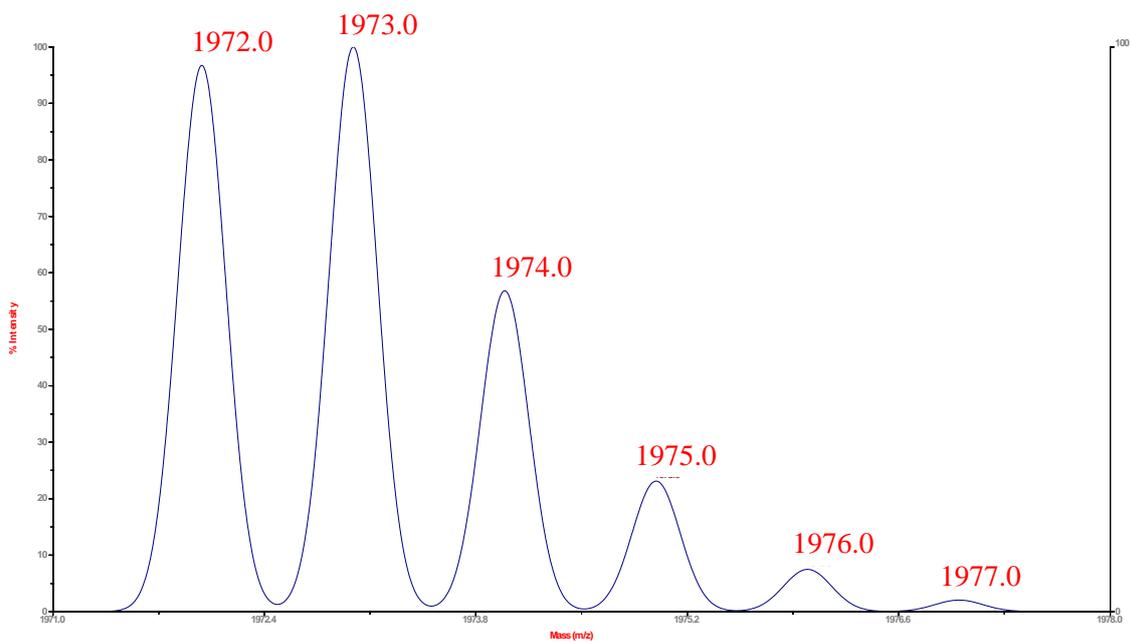
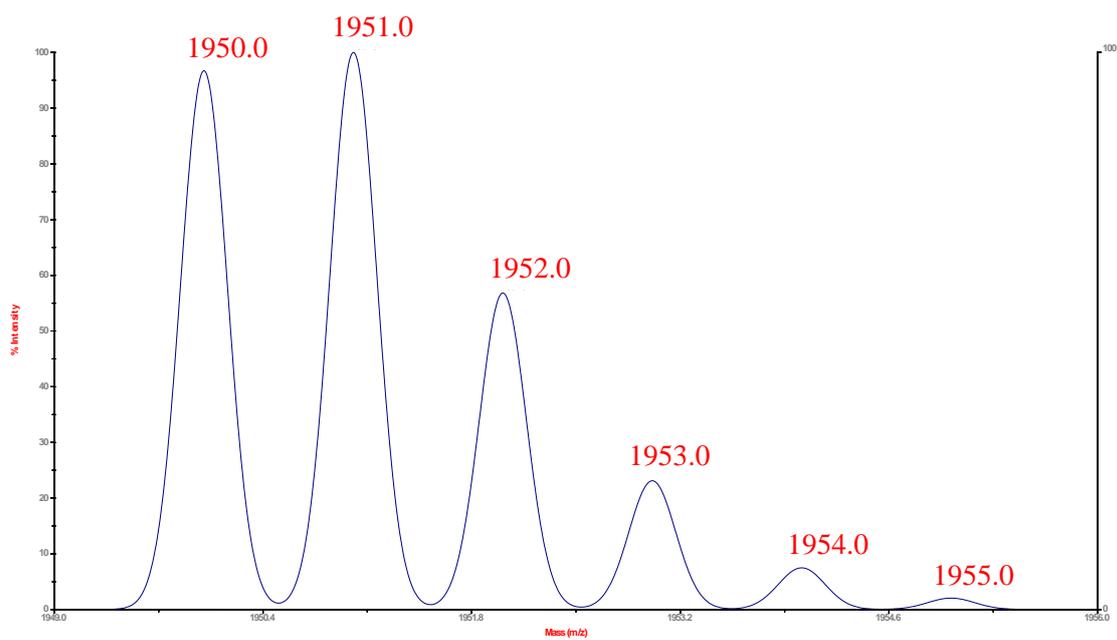
**Annexe 5** : HSQC 1H-15N de Tau (bleu) superposé avec Tau+10éq. B3G (gauche, rouge) et avec Tau+10éq. EGCG (droite, vert).

```

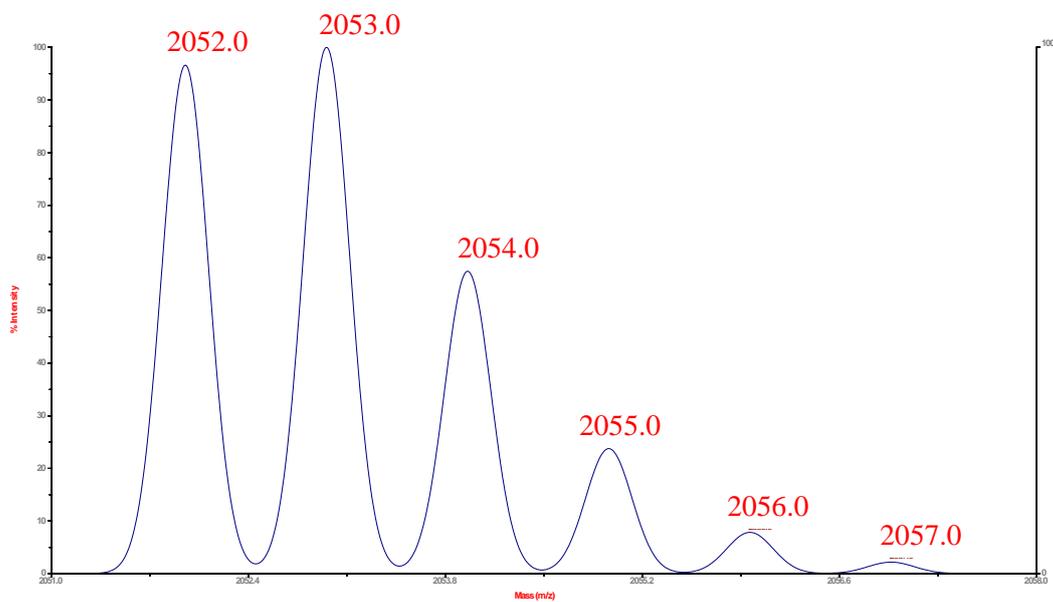
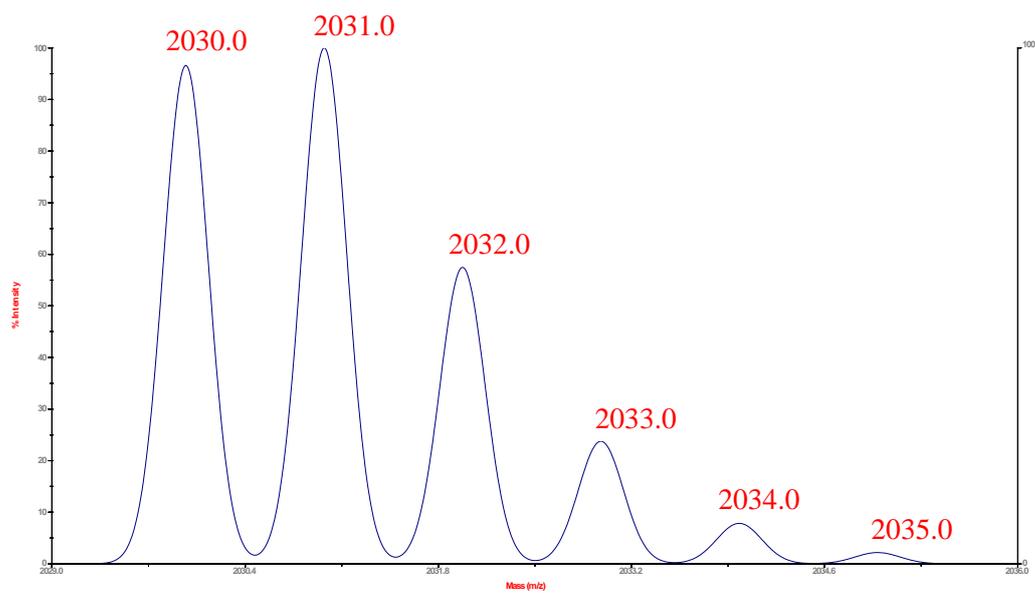
1 MAHHHHHHGS ATMEFMPMES GRPRTTSAE SCKPVQPSA FGSMKVS RDK DGSKVTTVVA
61 TPGQGPDRPQ EVSYTDTKVI GNGSFGVYQ AKLCDSGELV AIKKVLQDKR FKNRELQIMR
121 KLDHCNIVRL RYFFYSSGEK KDEVYLNVLV DYVPETVYRV ARHYSRAKQT LPVIYVKLYM
181 YQLFRSLAYI HSFGICHRDI KPQNLLDPD TAVLKLCDFG SAKQLVRGEP NVSYICSRY Y
241 RAPELIFGAT DYTSSIDVWS AGCVLAELL GQPIFPDSDG VDQLVEIIV LGTPTREQIR
301 EMNPNYTEFK FPQIKAHPWT KVFRPRTPE AIALCSRLLE YTPARLTPL EACAHSFFDE
361 LRDPNVKLPN GRDTPALFNF TTQELSSNPP LATILIPPHA RIQAAASTPT NATAASDANT
421 GDRGQTNNA SASASNST

```

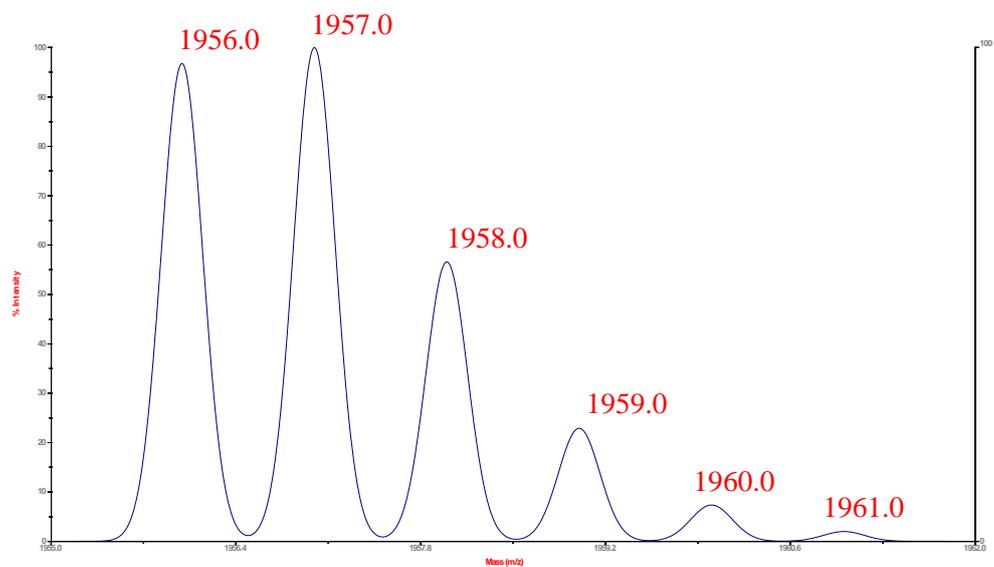
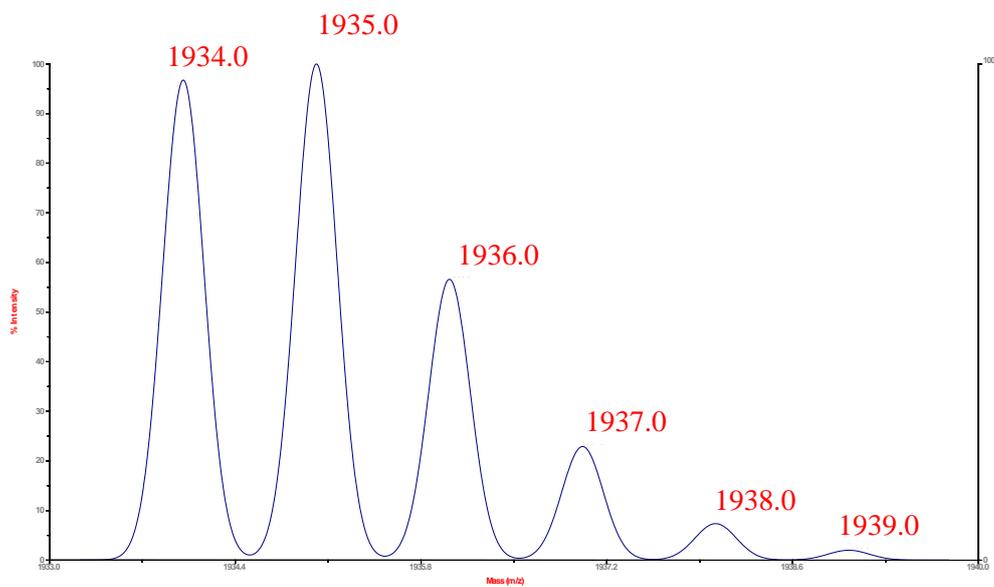
**Annexe 6** : Structure primaire de la GSK3 $\beta$



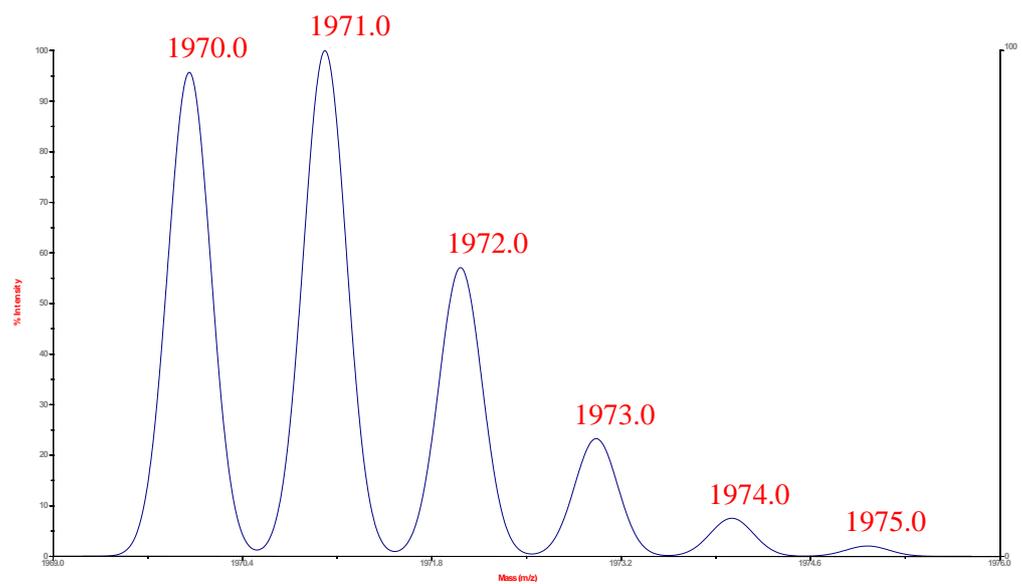
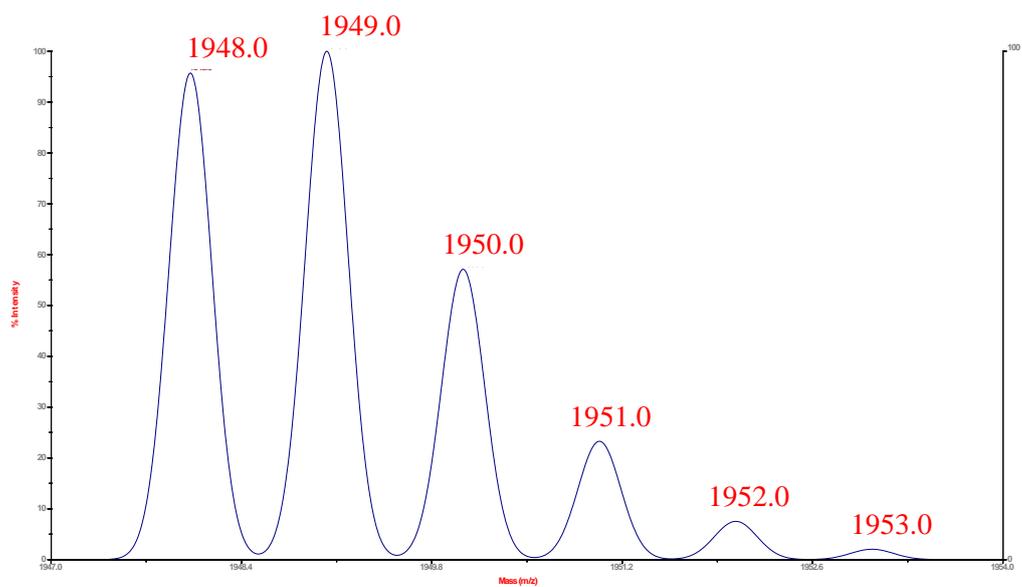
**Annexe 7** : Massif isotopique théorique du peptide P2. Adduits H<sup>+</sup> (haut) et Na<sup>+</sup> (bas).



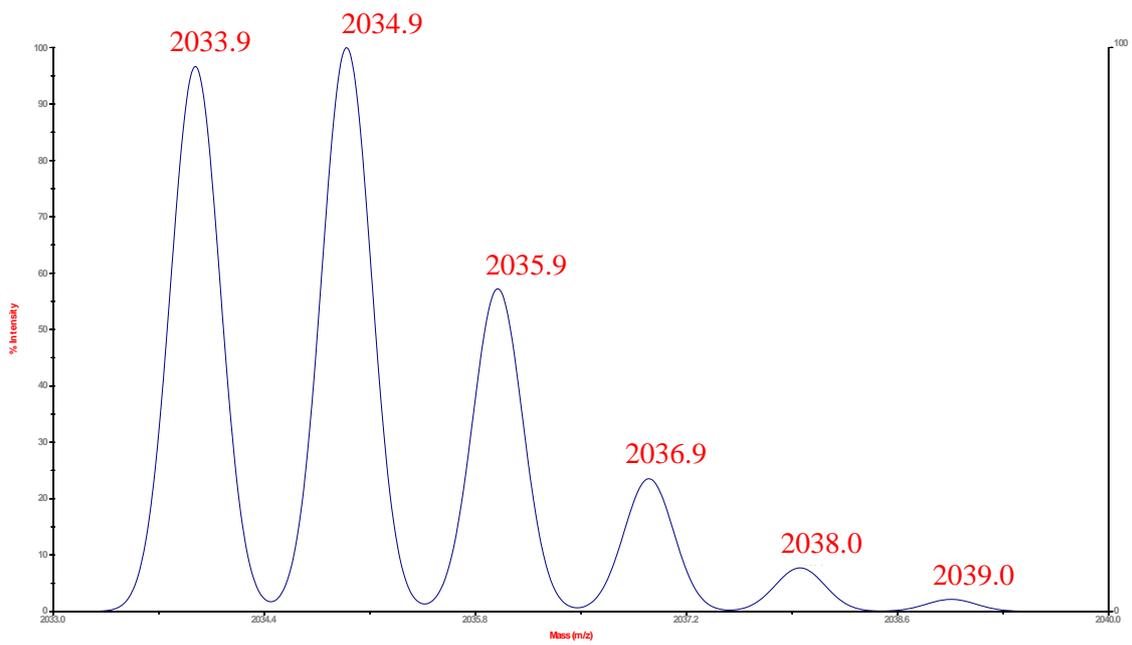
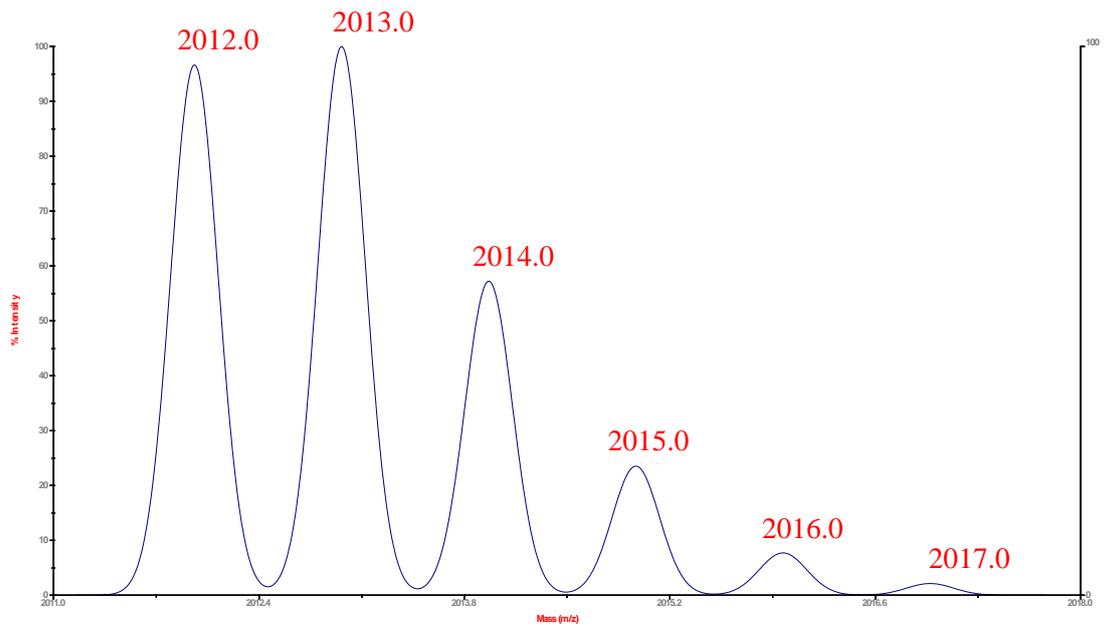
**Annexe 7** : Massif isotopique théorique du peptide P2 phosphorylé. Adduits H<sup>+</sup> (haut) et Na<sup>+</sup> (bas).



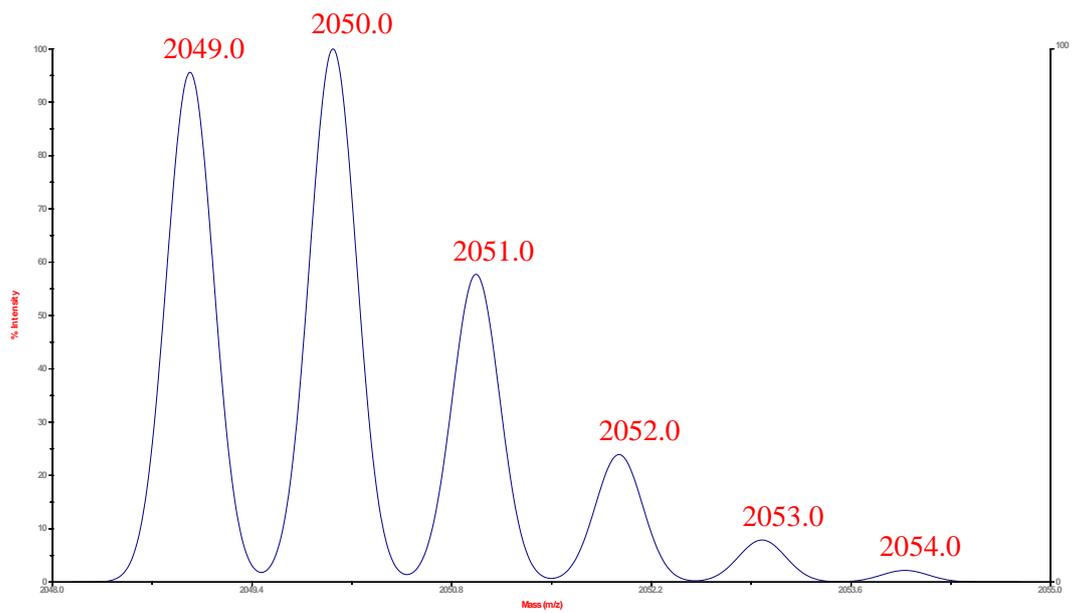
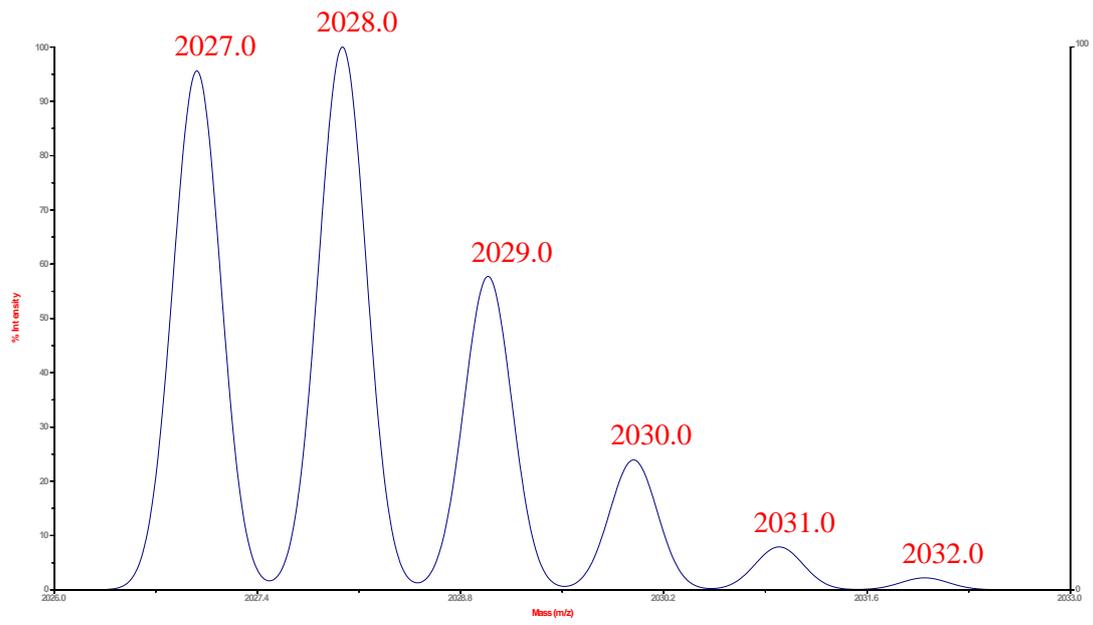
**Annexe 8** : Massif isotopique théorique du peptide P2A202. Adduits H<sup>+</sup> (haut) et Na<sup>+</sup> (bas).



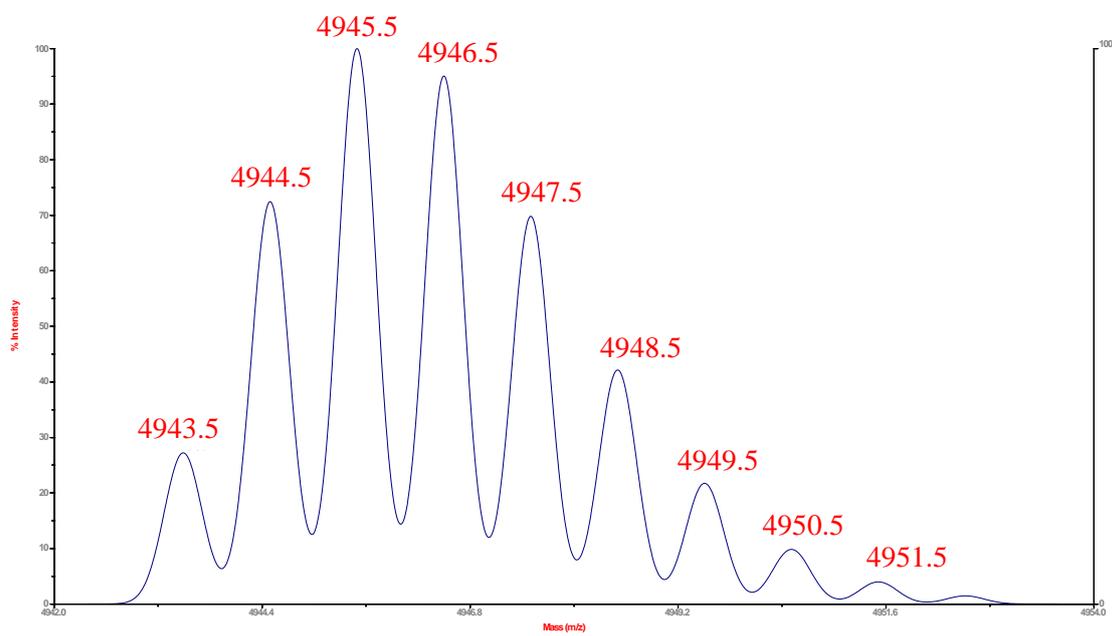
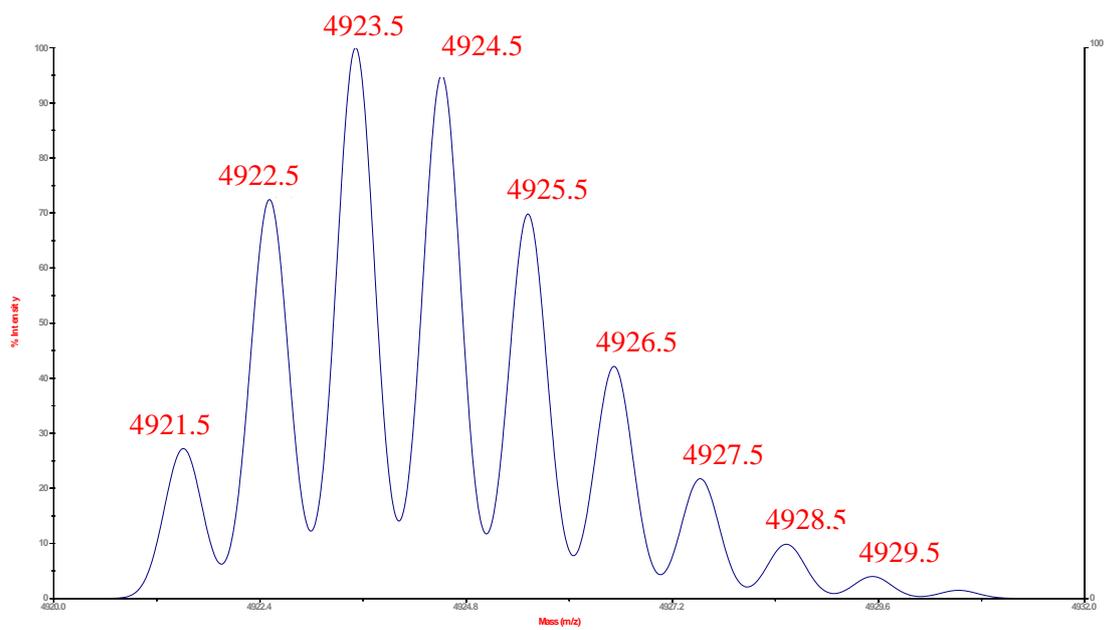
**Annexe 9** : Massif isotopique des peptides P2V205, P2V212 et P2V217. Adduits  $H^+$  (haut) et  $Na^+$  (bas).



**Annexe 10** : Massif isotopique théorique du peptide P2A202 phosphorylé. Adduits  $H^+$  (haut) et  $Na^+$  (bas).

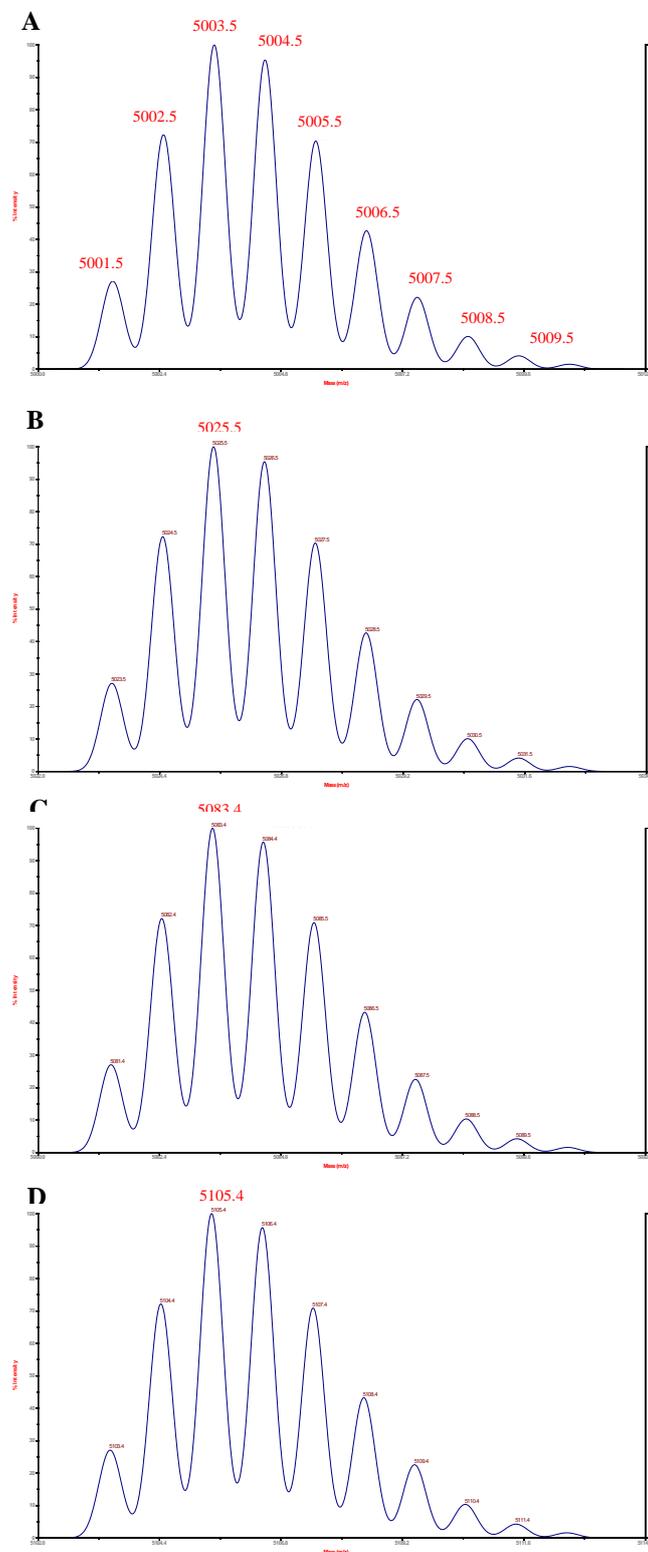


**Annexe 11** : Massif isotopique théorique des peptides P2V205, P2V212 et P2V217 phosphorylés. Adduits  $H^+$  (haut) et  $Na^+$  (bas).



**Annexe 12** : Massif isotopique théorique P1P2. Adduits H<sup>+</sup> (haut) et Na<sup>+</sup> (bas).

**Annexe 13** : Massif isotopique théorique du peptide P1P2 phosphorylé. Adduits H<sup>+</sup> (A) et Na<sup>+</sup> (B) de P1P2 monophosphorylé et adduits H<sup>+</sup> (C) et Na<sup>+</sup> (D) du P1P2 diphosphorylé.



# Références Bibliographique

- [1] L. Buée, T. Bussière, V. Buée-Scherrer, A. Delacourte, P.R. Hof, *Brain Research Reviews*, **2000**, 33, 95–130.
- [2] C. Holscher, *Neurobiology of disease*, **1998**, 5, 129-141.
- [3] D. P. Hanger, B. H. Anderton, W. Noble, *Trends in Molecular Medicine*, **2009**, 15, 112-119.
- [4] M. Bourdenx, N. S. Koulakiotis, D. Sanoudou, E. Bezard, B. Dehay, A. Tsaibopoulos, *Progress in Neurobiology*, **2017**, 155, 171-193.
- [5] J.Q. Trojanowski, *FASEB*, **1995**, 9, 1570–1576.
- [6] X. Han, T. Shen, H. Lou, *Int. J. Mol. Sci.*, **2007**, 8, 950-998.
- [7] B. Bulic, M. Pickhardt, E. M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Neuropharmacology*, **2010**, 59, 276-289.
- [8] M. Guéroux, M. Szlosek-Pinaud, E. Fouquet, V. De Freitas, M. Laguerre, I. Pianet, *Tetrahedron*, **2015**, 71, 3163-3170.
- [9] S. D. Skaper, *International Review of neurobiology*, **2012**, 102, 277-316.
- [10] G. G. Glenner, C. W. Wong, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1984**, 120, 885–890.
- [11] T. Mohamed, A. Shakeri, P. P. N. Rao, *European journal of medicinal chemistry*, **2016**, 113, 258-272.
- [12] S. H. Barage, K. D. Sonawane, *Neuropeptides*, **2015**, 52, 1-12.
- [13] I. Ayala., A. Colanzi, *Tissue and Cell*, **2017**, 49, 133-140.
- [14] F. M. LaFerla, K. N. Green, S. Oddo, *Nature Rev. Neurosci.*, **2007**, 8 , 499–509.
- [15] D. J. Selkoe, *Nature*, **2003**, 42, 900–904.
- [16] J. A. Hardy, G. A. Higgins, *Science*, **1992**, 256, 184-185.
- [17] C. H. Lin, T. F. Chen, M. J. Chiu, T. D. Way, J. K. Lin, *Neurobiology of Aging*, **2009**, 30, 81–92.
- [18] M. Inoue, S. Kaida, S. Nakano, C. Annoni, E. Nakata, T. Konno, T. Morii, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2014**, 22, 6471–6480.
- [19] J. Hardy, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1997**, 94, 2095-2097.
- [20] G. W. Small, *The Journal of clinical psychiatry*, **1998**, 59 (supp 9), 7-14.

- [21] S. Salloway, R. Sperling, N. C. Fox, K. Blennow, W. Klunk, M. Raskind, M. Sabbagh, L. S. Honig, A. P. Porsteinsson, S. Ferris, M. Reichert, N. Ketter, B. Nejadnik, V. Guenzler, M. Miloslavsky, D. Wang, Y. Lu., J. Lull, I. C. Tudor, E. Liu, M. Grundman, E. Yuen, R. Black, H. R. Brashear, *New England Journal of Medicine*, **2014**, *370*, 322-333.
- [22] R. S. Doody, R. G. Thomas, M. Farlow, T. Iwatsubo, B. Vellas, S. Joffe, K. Kieburtz, R. Raman, X. Sun, P. S. Aisen, E. Siemers, H. Liu-Seifert, R. Mohs, *New England Journal of Medicine*, **2014**, *370*, 311-321.
- [23] H. Coman, B. Nemes, *International journal of Gerontology*, **2017**, *11*, 2-6.
- [24] M. Kolarova, F. Garcia-Sierra, A. Bartos, J. Ricny, D. Ripova, *International Journal of Alzheimer's Disease*, **2012**, *2012*, 1-13.
- [25] O. Schweers, E. Schonbrunn-Hanebeck, A. Marx, E. Mandelkow, *The Journal of biological chemistry*, **1994**, *269*, 24290-24297.
- [26] J. Avila, J. L. Jose, M. Pérez, F. Hernández, *Physiol Rev*, **2004**, *84*, 362-376.
- [27] M. Goedert, M. G. Spillantini, R. Jakes, D. Rutherford, R.A. Crowther, *Neuron*, **1989**, *3*, 519-526.
- [28] M. Goedert, R. Jakes, *EMBO J.*, **1990**, *9*, 4225-4230.
- [29] T. L. Spires-Jones, W. H. Stoothoff, A. de Calignon, P. B. Jones, B. T. Hyman, *Trends in Neurosciences*, **2009**, *32*, 150-159.
- [30] E. Sontag, V. Nunbhakdi-Craig, G. Leei, R. Brand, C. Kamibayashi, J. Kuret, C. L. White, M. C. Mumby, G. S. Bloom, *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 25490-25498.
- [31] C. R. Torres, G. W. Hart, *J Biol Chem* **1984**, *259*, 3308-3317.
- [32] R. S. Haltiwanger, W. G. Kelly, E. P. Roquemore, M. A. Blomberg, L. Y. Dong, L. Kreppel, T. Y. Chou, G. W. Hart, *Biochem. Soc. Trans.*, **1992**, *20*, 264-269.
- [33] L. K. Kreppel, M. A. Blomberg, G. W. Hart, *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, 9308-9315.
- [34] G. W. Hart, L. K. Kreppel, F. I. Comer, C. S. Arnold, D. M. Snow, Z. Ye, X. Cheng, D. DellaManna, D. S. Caine, B. J. Earles, Y. Akimoto, R. N. Cole, B. K. Hayes, *Glycobiology*, **1996**, *6*, 711-716.
- [35] C. X. Gong, F. Liu, K. Iqbal, *Alzheimer's & Dementia* , **2016**, *12*, 1078-1089.
- [36] T. Lefebvre, S. Ferreira, L. Dupont-Wallois , T. Bussiere, M. J. Dupire, A. Delacourte, J.C Michalski, M. L. Caillet-Boudin, *Biochim Biophys Acta*, **2003**, *1619*, 167-176.
- [37] L. A. Demetrius, J. Driver, *Biogerontology*, **2013**, *14*, 641-649.

- [38] S. Hoyer, *Exp Gerontol.*, **2000**, *35*, 1363–1372.
- [39] X. Li, F. Lu, J. Z. Wang, C. X. Gong, *Eur.J. Neurosci.*, **2006**, *23*, 2078–2086.
- [40] D. P. Hanger, H. L. Byers, S. Wray, K.Y. Leung, M. J. Saxton, A. Seereeram, C. H. Reynolds, M. A. Ward, B. H. Anderton, *Journal of Biological Chemistry*, **2007**, *282*, 23645-23654.
- [41] M. Morishima-Kawashima, M. Hasegawa, K. Takio, M. Suzuki, H. Yoshida, K. Titani, Y. Ihara, *J. Biol. Chem.*, **1995**, *270*, 823–829.
- [42] M. Morishima-Kawashima, M. Hasegawa, K. Takio, M. Suzuki, H. Yoshida, A. Watanabe, K. Titani, Y. Ihara, *Neurobiol. Aging*, **1995**, *16*, 365–371.
- [43] L. Martin, X. Latypovac, C. M. Wilson, A. Magnaudeix, M. L. Perrin, C. Yardin, F. Terro, *Ageing Research Reviews*, **2012**, *12*, 289–309.
- [44] B. Hall, E. Mak, S. Cervenka, F. I. Airbirhio, J. B. Rowe, J. T. O'Brien, *Ageing Research Reviews*, **2017**, *36*, 50-63.
- [45] J. Bertrand, V. Plouffe, P. Senechal, N. Leclerc, *Neuroscience*, **2010**, *168*, 323-324.
- [46] A. del C. Alonso, T. Zaidi, M. Novak, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, *PNAS*, **2001**, *98*, 6923-6928.
- [47] G. Šimic, M. Babic Leko, S. Wray, C. Harrington, I. Delalle, N. Jovanov-Milošević, D. Bažadona, L. Buée, R. de Silva, G. Di Giovanni, C. Wischik, P. R. Hof, *Biomolecules*, **2016**, *6*, 1-28.
- [48] J. Kuret, C. N. Chirita, E. E. Congdon, T. Kanaanayakal, G. Li, M. Necula, H. Yin, Q. Zhong, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2005**, *1739*, 167-178.
- [49] Y. Wang, E. Mandelkow, *Nature Reviews Neuroscience*, **2016**, *17*, 22-35.
- [50] H. Moreno, G. Morfini, L. Buitrago, G. Uljaki, S. Choi, E. Yu, J. E. Moreiga, J. Avila, S. T. Brady, H. Pant, M. Sugimori, R. R. Llinas, *Neurosciences*, **2016**, *325*, 30-38.
- [51] G. Drewes, *Trends in Biochemical Sciences*, **2004**, *29*, 548-555.
- [52] S. Majd, J. H. T. Power, S. A. Koblar, H. J. M. Grantham, *IBRO Reports*, **2017**, *2*, 1-13.
- [53] A. Abraha, N. Ghoshal, T. C. Gamblin, V. Cryns, R. W. Berry, J. Kuret, L. I. Binder, *Journal of cell science*, **2000**, *113*, 3737-3745.
- [54] C. Haase, J. T. Stieler, T. Arendt, M. Holzer, *Journal of Neurochemistry*, **2004**, *88*, 1509-1520.
- [55] X. Z. Zhou, O. Kops, A. Werner, P-J. Lu, M. Shen, G. Kullertz, M. Stark, G. Fischer, K. P. Lu, *Molecular Cell*, **2000**, *6*, 873-883.

- [56] S. Illenberger, Q. Zheng-Fishhofer, U. Preuss, K. Stamer, K. Baumann, B. Trinczek, J. Biernat, R. Godemann, E-M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Molecular Biology of Cell*, **1998**, *9*, 1495-1512.
- [57] E. Beurel, S. F. Grieco, R. S. Jope, *Pharmacology & Therapeutics*, **2014**, *148*, 114-131.
- [58] C. Hooper, R. Killick, S. Lovestone, *Journal of Neurochemistry*, **2008**, *104*, 1433-1439.
- [59] C. H. Reynolds, J. C. Betts, W. P. Blackstock, A. R. Nebreda, B. H. Anderton, *J. Neurochem.*, **2000**, *74*, 1587-1595.
- [60] D. S. Himmelstein, S. M. Ward, J. K. Lancia, K. R. Patterson, L. I. Blinder, *Pharmacology & Therapeutics*, **2012**, *136*, 8-22.
- [61] I. Khan, M. A. Tantray, M. S. Alam, H. Hamid, *European journal of Medicinal Chemistry*, **2017**, *125*, 464-477.
- [62] J. Kim, Y. Moon, S. Hong, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2016**, *26*, 5669-5673.
- [63] D. Vauzour, *Cahiers de nutrition et de diététique*, **2014**, *49*, 181-187.
- [64] M. Singh, M. Arseneault, T. Sanderson, V. Murthy, C. Ramassamy, *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 4855-4873.
- [65] W. Hümmel, P. Schreier, *Mol. Nutr. Food Res.*, **2008**, *52*, 1381-1398.
- [66] P. M. Aron, J. A. Kennedy, *Mol. Nutr. Food Res.*, **2008**, *52*, 79-104.
- [67] Y. Shao, J. Bao, *Food Chemistry*, **2015**, *180*, 86-97.
- [68] J. C. Stoclet, V. Schini-Kerth, *Annales Pharmaceutiques Françaises*, **2011**, *69*, 78-90.
- [69] L. Hooper, P. A. Kroon, E. B. Rimm, J. S. Cohn, I. Harvey, K. A. Le Cornu, J. Ryder, W. L. Hall, C. Aedín, *Am. J. Clin. Nutr.*, **2008**, *88*, 38-50.
- [70] J. Pincemail, K. Bonjean, K. Cayeux, J. O. Defraigne, *Nutrition clinique et métabolisme*, **2002**, *16*, 233-239.
- [71] J. Yi, H. Qu, Y. Wu, Z. Wang, L. Wang, *International Journal of Biological Macromolecules*, **2017**, *94*, 735-744.
- [72] E. Haslam, *J. Nat. Prod*, **1996**, *59*, 205-215.
- [73] D. Y. Choi, Y. J. Lee, J. T. Hong, H. J. Lee, *Brain Research Bulletin*, **2012**, *87*, 144-153.
- [74] A. Gramza, J. Korczak, R. Amarowicz, Pol., *J. Food. Nutr. Sci.*, **2005**, *14*, 219-235.

- [75] K. P. Devi, T. Rajavel, M. Daglia, S. F. Nabavi, A. Bishayee, S. M. Nabavi, *Seminars in cancer Biology*, **2017**, In press, corrected proof.
- [76] J. M. Awika, K.G. Duodu, *Journal of Functional Foods*, **2016**, Article in Press.
- [77] R. A. Vacca, D. Valenti, S. Caccamese, M. Daglia, N. Braidy, S. M. Nabavi, *Neurosciences and Biobehavioral Reviews*, **2016**, *71*, 865-877.
- [78] D. Reglodi, J. Renaud, A. Tamas, Y. Tizabi, S. B. Socias, E. Del-Bel, R. Raisman-Vozari, *Progress in Neurobiology*, **2017**, *155*, 120-148.
- [79] M. Rahimifard, F. Maqbool, S. Moeini-Nodeh, K. Niaz, M. Abdollahi, N. Braidy, S. M. Nabavi, S. F. Nabavi, *Ageing Research Review*, **2017**, *36*, 11-19.
- [80] H. Li, X. Wu, Q. Wu, D. Gong, M. Shi, L. Guan, J. Zhang, J. Liu, B. Yuan, G. Han, Y. Zou, *Nutrition*, **2014**, *30*, 337-342.
- [81] J. L. Cummings, T. Morstorf, K. Zhong, *Alzheimer's Research & Therapy*, **2014**, *6*, 37.
- [82] S. H. Omar, C. J. Scott, A. S. Hamlin, H. K. Obied, *Journal of Nutrition Biochemistry*, **2017**, *47*, 1-20.
- [83] S. H. Omar, *Biomedecine & Pharmacotherapy*, **2017**, *89*, 396-413.
- [84] D. Sawmiller, A. Habib, S. Li, D. Darlington, H. You, J. Tian, R. D. Shytle, A. Smith, B. Giunta, T. Mori, J. Tan, *Journal of Neuroimmunology*, **2016**, *299*, 98-106.
- [85] S. Taniguchi, N. Suzuki, M. Masuda, S. I. Hisanaga, T. Iwatsubo, M. Goedert, M. Hasegawa, *Journal of Biological Chemistry*, **2005**, *280*, 7614-7623.
- [86] H. J. Wobst, A. Sharma, M. I. Diamond, E. E. Wanker, J. Bieschke, *FEBS Letters*, **2015**, *589*, 77-83.
- [87] H. Il Oh, J. E. Hoff, G. S. Armstrong, L. A. Haff, *J. Agric. Food Chem.* **1980**, *28*, 394-398.
- [88] O. Cala, S. Fabre, N. Pinaud, E. J. Dufourc, E. Fouquet, M. Laguerre, I. Pianet, *Planta Med.*, **2011**, *77*, 1116-1122.
- [89] O. Cala, E. J. Dufourc, E. Fouquet, C. Manigand, M. Laguerre, I. Pianet, *Langmuir*, **2012**, *28*, 17410-17418.
- [90] M. Guéroux, *Thèse de l'Université de Bordeaux 1*, **2013**.
- [91] L. J. Ball, R. Khüne, J. Schneider-Mergener, H. Oschkinat. *Agew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2852-2869.
- [92] T. A. Geissman, N. N. Yoshimura, *Tetrahedron Lett.*, **1966**, *24*, 2669-2673.
- [93] J. A. Delcour, D. Ferreira, D. G. Roux, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1983**, 1711-1717.

- [94] K. Barathieu, *Thèse de l'Université Bordeaux I*, **2002**
- [95] A. P. Kozikowski, W. Tückmantel, Y. Hu, *J. Org. Chem.*, **2001**, *66*, 1287-1296.
- [96] K. Weinges, J. Perner, *Chem. Comm.*, **1967**, *7*, 351.
- [97] I. Tarascou, *Thèse de l'Université Bordeaux I*, **2005**.
- [98] B. R. Albuquerque, M.A Prieto, L. Barros, I. C. F. R. Ferreira, *Industrial Crops and Products*, **2017**, *99*, 150-162.
- [99] K. D. Sears, R. L. Casebier, H. L. Hergert, *J. Org. Chem.*, **1974**, *39*, 3244-3247
- [100] P. Kiatgrajai, J. D. Wellons, L. Gollob, J. D. White, *J. Org. Chem.*, **1982**, *47*, 2910-2912.
- [101] E. Haslam, *Phytochemistry*, **1980**, *19*, 2577-2582.
- [102] I. Tarascou, K. Barathieu, Y. André, I. Pianet, E. J. Dufourc, E. Fouquet, *Eur. J. Org. Chem.*, **2006**, 5367-5377.
- [103] J. A. Steenkamp, C. Hendrik, L. Mouton, D. Ferreira, *Tetrahedron*, **1991**, *47*, 6705-6716.
- [104] E. Kiehlmann, N. Lehto, D. Cherniwchan, *Can. J. Chem.*, **1988**, 2431-2439.
- [105] D. J. Maloney, S. Chen, S. H. Hecht, *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 1925-1927.
- [106] Buffnoir S., *Thèse de l'Université de Paris VI*, **1998**
- [107] M. Suda, M. Katoh, K. Toda, K. Matsumoto, K. Kawaguchi, S-i. Kawahara, Y. Hattori, H. Fujii, H. Makabe, *Bioorganic & Medicinal Letters*, **2013**, *23*, 4935-4939.
- [108] A. Saito, M. Emoto, A. Tanaka, Y. Doi, K. Shoji, Y. Mizushina, H. Ikawa, H. Yoshida, N. Matsuurag, N. Nakajima, *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 12043-12049.
- [109] A. K. Ganguli, T. R. Seshadri, F. A. Subramanian, P. Subramanian, *Proc. Indian Acad. Sci*, **1957**, *46*, 25-28.
- [110] P. J. Steynberg, R. J. J. Nel, H. van Rensburg, B. C. B. Bezuidenhoudt, D. Ferreira, *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 8153-8158.
- [111] W. Fujii, K. Toda, K. Matsumoto, K. Kawaguchi, S. I. Kawahara, Y. Hattori, H. Fujii, H. Makabe, *Tetrahedron Letters*, **2013**, *54*, 7186-7192.
- [112] K. Ohmori, N. Ushimaru, L. Suzuki, *PNAS*, **2004**, *101*, 12002-12007.
- [113] J. A. Steenkamp, D. Ferreira, D. G. Roux, *Tetrahedron Letters*, **1985**, *26*, 3045-3048.

- [114] V. Arnaudinaud, B. Nay, A. Nuhrich, G. Deffieux, J. M. Mérillon, J. P. Monti, J. Vercauteren, *Tetrahedron Letters*, **2001**, 42, 1279-1281.
- [115] Y. Oizumi, Y. Mohri, M. Hirota, H. Makabe, *J. Org. Chem.*, **2010**, 75, 4884-4886.
- [116] K. i. Oyama, M. Kumano, M. Ito, K. Yoshida, T. Kondo, *Tetrahedron Letters*, **2008**, 49, 3176-3180.
- [117] A. Saito, N. Nakajima, A. Tanaka, M. Ubukata, *Tetrahedron*, **2002**, 58, 7829-7837.
- [118] K. Krohn, I. Ahmed, M. John, M. C. Letzel, D. Kuck, *Eur. J. Org. Chem.*, **2010**, 2544-2554.
- [119] E. G. Dennis, D. W. Jeffery, M. R. Johnston, M. V. Perkins, P. A. Smith, *Tetrahedron*, **2012**, 68, 340-348.
- [120] K. L. Hans, L. Hundt, D. G. Roux, *J. C. S Perkin I*, **1981**, 1227-1234.
- [121] H. Kawamoto, F. Nakatsubo, K. Murakami, *J. Wood. Chem. Technol.*, **1990**, 10, 59-74.
- [122] S. Fabre, M. Guéroux, E. Nunes, M. Szlosek-Pinaud, I. Pianet, E. Fouquet, *Tetrahedron*, **2015**, 71, 3045-3051.
- [123] A. S. K. Hashmi, G. J. Hutchings, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 7896-7963.
- [124] M. Georgy, V. Boucard, O. Debleds, C. Dal Zotto, J. M. Campagne, *Tetrahedron*, **2009**, 65, 1758-1766.
- [125] H. Sajiki, A. Kume, K. Hattori, H. Nagase, K. Hitora, *Tetrahedron Letters*, **2002**, 43, 7251-7254.
- [126] H. Sajiki, A. Kume, K. Hattori, H. Nagase, K. Hitora, *Tetrahedron Letters*, **2002**, 43, 7247-7250.
- [127] Y. Monguchi, A. Kume, K. Hattori, T. Maegawa, H. Sajiki, *Tetrahedron*, **2006**, 62, 7926-7933.
- [128] S. Yoneda, H. Kawamoto, F. Nakatsubo, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1997**, 1025-1030.
- [129] W. Tückmantel, A. P. Kozikowski, L. J. Romanczyk, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 12073-12081.
- [130] J. F. Quinn, D. A. Razzano, K. C. Golden, B. T. Gregg, *Tetrahedron Letters*, **2008**, 49, 6137-6140.
- [131] N. Saint-Cricq de Gaulejac, C. Provost, N. Vivas, *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 425-431.
- [132] T. Esatbeyoglu, V. Wray, P. Winterhalter, *J. Agric. Food Chem.*, **2010**, 58, 7820-7830.

- [133] T. Esatbeyoglu, P. Winterhalter, *J. Agric. Food Chem.*, **2010**, *58*, 5147–5143.
- [134] S. Fabre, *Thèse de l'Université Bordeaux I*, **2009**.
- [135] G. Watanabe, K. Ohmori, K. Suzuki, *Chem. Commun.*, **2013**, *49*, 5210-5212.
- [136] F. L. Lambert, W. D. Ellis, R. J. Parry, *Notes*, **1964**, *30*, 304-306.
- [137] G. K. S. Prakash, T. Mathew, D. Hoole, P. M. Esteves, Q. Wang, G. Rasul, G. A. Olah, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 15770-15776.
- [138] K. Mori, Y. Ichikawa, M. Kobayashi, Y. Shibata, M. Yamanaka, T. Akiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 3964-3970.
- [139] S. Maddox, C. J. Nalbandian, D. E. Smith, J. L. Gustafson, *Organic Letters*, **2015**, *17*, 1042-1045.
- [140] Y. Zhang, K. Shibatomi, H. Yamamoto, *Synlett*, **2005**, *18*, 2837-3842.
- [141] L. Fielding, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **2007**, *51*, 219-242.
- [142] N. J. Baxter, T. H. Lilley, E. Haslam, M. P. Williamson, *Biochemistry*, **1997**, *36*, 5566-5577.
- [143] A. J. Charlton, N. J. Baxter, M. L. Khan, A. J. G. Moir, E. Haslam, A. P. Davies, M. P. Williamson, *J. Agric. Food. Chem.*, **2002**, *50*, 1593-1601.
- [144] K. Wüthrich, *nature structural biology*, **2001**, *8*, 923-925.
- [145] S. Schwarzingler, G. J.A. Kroon, T. R. Foss, P. E. Wright, H. J. Dyson, *Journal of Biomolecular NMR*, **2000**, *18*, 43–48.
- [146] D. S. Wishart, C. G. Bigam, A. Holm, R. S. Hodges, B. D. Sykes, *Journal of Biomolecular NMR*, **1995**, *5*, 67-81.
- [147] C. Smet, A. Leroy, A. Sillen, J-M. Wieruszkeski, I. Landrieu, G. Lippens, *ChemBioChem.*, **2004**, *5*, 1639-1646.
- [148] A. Sillen, J-M. Wieruszkeski, A. Leroy, A. B. Younes, I. Landrieu, G. Lippens, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 10138-10139.
- [149] B. Meyer, T. Peters, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *42*, 864-890.
- [150] A. Furukama, T. Konuma, S. Yanaka, K. Sugase, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **2016**, 47-57.
- [151] N. Sibille, A. Sillen, A. Leroy, J-M. Wieruszkeski, B. Mulloy, I. Landrieu, G. Lippens, *Biochemistry*, **2006**, *45*, 12560-12572.

- [152] H. Qi, F-X Cantrelle, H. Benhelli-Mokrani, C. Smet-Nocca, L. Buée, G. Lippens, E. Bonnefoy, M-C. Galas, I. Landrieu, *Biochemistry*, **2005**, *54*, 1225-1533.
- [153] T. K. Singhaa, P. Gulatia, A. Mohanty, Y. Pal Khasac, R. K. Kapoora, S. Kumara, *Process Biochemistry*, **2017**, *55*, 17–31.
- [154] J. A Lyons, A. Shahsavari, P. Aasted Paulsen, B. Panyella Pedersen, Poul Nissen, *Current Opinion in Structural Biology*, **2016**, *38*, 137–144.
- [155] G. Lippens, J-M. Wieruszeski, A. Leroy, C. Smet, A. Sillen, L. Buée, I. Landrieu, *ChemBioChem*, **2004**, *5*, 73-78.
- [156] M. D. Mukrasch, S. Bibow, J. Korukottu, S. Jeganathan, J. Biernat, C. Griesinger, E. Mandelkow, M. Zweckstetter, *PLoS Biology*, **2009**, *7*, 399-414.
- [157] M. E. King, N. Ghoshal, J. S. Wall, L. I. Binder, H. Ksiezak-Reding, *American Journal of Pathology*, **2001**, *158*, 1481-1490.
- [158] C. A Rankin, Q. Sun, T. C. Gamblin, *Molecular Neurodegeneration*, **2007**, *2*, 12.
- [159] N. Sergeant, A. Bretteville, M. Hamdane, M-L. Caillet-Boudin, P. Grognet, S. Bombois, D. Blum, A. Delacourte, F. Pasquier, E. Vanmechelen, S. Schraen-Maschke, L. Buée, *Experts. Rev. Proteomics*, **2008**, *5*, 207-224.
- [160] T. Ma, *Journal of Alzheimer's Disease*, **2014**, *39*, 707–710.
- [161] C. J. Phiel, C. A. Wilson, V. M.-Y. Lee, P. S. Klein, *Nature*, **2003**, *423*, 435-439.
- [162] R. V. Bhat, S. L. Budd Haeberlein, J. Avila, *Journal of Neurochemistry*, **2004**, *89*, 1313–1317.
- [163] J. J. Lucas, F. Hernandez, P. Gomez-Ramos, M. A. Moran, R. Hen, J. Avila, *The EMBO Journal*, **2001**, *20*, 27-39.
- [164] F. Hernandez, J. J. Lucas, J. Avila, *Journal of Alzheimer's Disease*, **2013**, *33*, 141–144.
- [165] J. A. Endicott, M. E.M. Noble, L. N. Johnson, *Annu. Rev. Biochem.*, **2012**, *81*, 587–613.
- [166] H. Bisswanger, *Perspectives in Science*, **2014**, *1*, 41–55.
- [167] A. Leroy, I. Landrieu, I. Huvent, D. Legrand, B. Codeville, J-M. Wieruszeski, G. Lippens, *J. Biol. Chem*, **2010**, *285*, 33435-33444.
- [168] F. Liu, Z. Liang, J. Shi, D. Yin, E. El-Akkad, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, C. X. Gong, *FEBS Letters*, **2006**, *580*, 6269-6274.
- [169] H. Ksiezak-Reding, H. Kyoung Po, B. Feinstein, G. M. Pasinetti, *Biochimica and Biophysica Acta*, **2003**, *1639*, 159-168.

- [170] M. Schwalbe, J. Biernat, S. Bibow, V. Ozenne, M. R. Jensen, H. Kadavath, M. Blackledge, E. Mandelkow, M. Zweckstetter, *Biochemistry*, **2013**, *52*, 9068-9079.
- [171] D. McLachlin, B. Chait, *Current Opinion in Chemical Biology*, **2001**, *5*, 591-602.
- [172] L. Parker, A. Engel-Hall, K. Drew, G. Steinhardt, D. L. Helseth, D. Jabon, T. McMurry, D. S. Angulo, S. J. Kron, *Journal of Mass Spectrometry*, **2008**, *43*, 518-527.
- [173] H-P. Ho, P. Rathod, M. Louis, C. K. Tada, S. Rahaman, K. J. Mark, J. Leng, D. Dana, S. Kumar, M. Lichterfeld, E. J. Chang, *Rapid Commun. Mass. Spectrom.*, **2014**, *28*, 2681-2689.
- [174] J. W. Connell, G. M. Gibb, J. C. Betts, W. P. Blackstock, J-M. Gallo, S. Lovestone, M. Hutton, B. H. Anderton, *FEBS Letters*, **2001**, *493*, 40-44.
- [175] S. Jana, T. Kumar Chaudhuri, J. K. Deb, *BIOCHEMISTRY (Moscow)*, **2006**, *71*, 1230-1237.
- [176] F. Albericio, *Current Opinion in Chemical Biology*, **2004**, *8*, 211-221.
- [177] H. Hojo, *Current Opinion in Chemical Biology*, **2014**, *26*, 16-23.
- [178] T. I. Al-Warhi, H. M. A. Al-Hazimi, A. El-Faham, *Journal of Saudi Chemical Society*, **2012**, *16*, 97-116.
- [179] Y. Karamanos, F. Gosselet, M-P. Dehouck, R. Cecchelli, *Archives of Medical Research*, **2014**, *45*, 730-737.
- [180] S. Aday, R. Cecchelli, D. Hallier-Vanuxeem, M. P. Dehouck, L. Ferreira, *Trends in Biotechnology*, **2016**, *34*, 382-393.
- [181] H. C. Helms, N. J. Abbott, M. Burek, R. Cecchelli, P-O. Couraud, M. A. Deli, C. Förster, H. J. Galla, I. A. Romero, E. V. Shusta, M. J. Stebbins, E. Vandenhaute, B. Weksler, B. Brodin, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, **2016**, *36*, 862-890.
- [182] E. Vandenhaute, E. Sevin, D. Hallier-Vanuxeem, M.-P. Dehouck, R. Cecchelli, *Drug Discovery Today*, **2012**, *17*, 285-290.
- [183] E. A. Jähne D. E. Eigenmann M. Culot, R. Cecchelli, F. R. Walter, M. A. Deli, R. Tremmel, G. Fricker, M. Smiesko, M. Hamburger, M. Oufir, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2014**, *98*, 235-246.
- [184] A. M. Courtis, S. A. Santos, Y. Guan, J. A. Hendricks, B. Ghosh, D. M. Szantai-Kis, S. A. Reis, J. V. Shah, R. Mazitschek, *Bioconjugate Chem*, **2014**, *25*, 1043-1051.
- [185] D. Wang, J. Fan, X. Gao, B. Wang, S. Sun, X. Peng, *J. Org. Chem*, **2009**, *74*, 7675-7683.
- [186] S. I. Ziegler, *Nuclear Physics A*, **2005**, *752*, 679-687.

- [187] W. E. Klunk, H. Engler, A. Nordberg, Y. Wang, G. Blomqvist, D. P. Holt, M. Bergström, I. Savitcheva, G-F. Huang, S. Estrada, B. Ausén, M. L. Debnath, J. Barletta, J. C. Price, J. Sandell, B. J. Lopresti, A. Wall, P. Koivisto, G. Antoni, C. A. Mathis, B. Långström, *Annals of Neurology*, **2004**, *55*, 306-319.
- [188] V. L. Villemagne, M. T. Fodero-Tavoletti, C. L. Masters, C. C. Rowe, *Lancet. Neurol.*, **2015**, *14*, 114–124.
- [189] T. Bordenave, *Thèse de l'Université de Bordeaux 1*, **2012**.
- [190] L. Mu, A. Hhne, P. A. Schubiger, S. M. Ametamey, K. Graham, J. E. Cyr, L. Dinkelborg, T. Stellfeld, A. Srinivasan, U. Voigtmann, U. Klar, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 4922–4925.
- [191] D. James, J.-M. Escudier, E. Amigues, J. Schulz, C. Vitry, T. Bordenave, M. Szlosek-Pinaud, Eric Fouquet, *Tetrahedron Letters*, **2010**, *51*, 1230–1232.
- [192] R. D. Alharthy, C. J. Hayes, *Tetrahedron Letters*, **2010**, *51*, 1193-1195.
- [193] S. M. Sternson, J. C. Wong, C. M. Grozinger, S. L. Schreiber., *Org. Lett.* **2001**, *3*, 4239-4242.
- [194] Y. Yoshida, Y. Sakakura, N. Aso, S. Okada, Y. Tanabe, *Tetrahedron*, **1999**, *55*, 2183-2192.
- [195] S. A. Weissman, D. Zewge, *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 7833-7863.
- [196] K. Okano, K.-i. Okuyama, T. Fukuyama, H. Tokuyama, *Synlett*, **2008**, *13*, 1977-1980.
- [197] K. S. Kanyiva, Y. Kuninobu, M. Kanai, *Org. Lett.*, **2014**, *16*, 1968-1971.
- [198] A. Faria, D. Pestana, D. Teixeira, J. Azevedo, V. De Freitas, N. Mateus, C. Calhau, *Cellular & Molecular Biology Letters*, **2010**, *15*, 234-241.
- [199] M. Suganuma, S. Okabe, M. Oniyama, Y. Tada, H. Ito, H. Fujiki, *Carcinogenesis*, **1998**, *19*, 1771-1776.

## **Titre : Maladie d'Alzheimer et Polyphénols : effet des tanins sur la phosphorylation de la protéine Tau**

### **Résumé :**

L'hyperphosphorylation de la protéine Tau, à l'origine de la formation de dégénérescences neurofibrillaires et de la mort cellulaire observée, chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, est causée par un déséquilibre entre l'activité des kinases et des phosphatases. Cette modification post traductionnelle touche de nombreux sites dans la Région Riche en Proline (RRP) de Tau. Or, des études RMN, réalisées au sein du laboratoire, ont montré que les polyphénols sont capables d'interagir avec des fragments de la protéine issues de la RRP avec des affinités de l'ordre de grandeur de celles décrites pour les kinases. Dans ce contexte, il a été envisagé de synthétiser une bibliothèque de polyphénols et de mettre au point une réaction de phosphorylation sur des peptides modèles afin d'étudier, par spectrométrie de masse, la capacité de ces composés à protéger Tau contre l'attaque des kinases.

**Mots clés :** Maladie d'Alzheimer, phosphorylation, Tau, Région Riche en Proline, kinases, polyphénols, RMN, Spectrométrie de Masse.

---

## **Title : Alzheimer disease and polyphenols : tannins effect on phosphorylation of Tau protein.**

### **Abstract :**

Hyperphosphorylation of Tau protein, which leads to their abnormal aggregation into neurofibrillary tangles and to neuronal loss observed in patients with Alzheimer disease, is regulated by a disequilibrium between kinases and phosphatases activities. This post translational modification affects several residues, in particular in the Proline Rich Region of Tau (PRR). But, NMR studies, realized in our laboratory, have shown that polyphenols are able to interact with peptide Tau models issued from the PRR and the affinity are in the same range that those described for the kinases. In this context, we have envisaged to synthesize several polyphenols and to develop a phosphorylation reaction of peptide models in order to study, by mass spectrometry, the ability of these compounds to protect Tau against kinase attack.

**Keywords :** Alzheimer disease, phosphorylation, Tau, Proline Rich Region, kinases, polyphenols, NMR, Mass spectrometry.

---

### **Unité de recherche**

[ISM, UMR n° 5255, Bâtiment A12, 351 Cours de la Libération, 33405, Talence]