

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES**

**UMR 7177**

# THÈSE

présentée par

**Matthieu LANG**

Soutenue le **29 Février 2012**

pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie Organique

Évaluation du pouvoir allergisant de mélanges complexes :  
étude de la réactivité de molécules sensibilisantes en  
mélanges envers des peptides nucléophiles.

**THÈSE dirigée par :**

**M. LEPOITTEVIN Jean-Pierre**

Professeur, Université de Strasbourg

**Mme GIMENEZ-ARNAU Elena**

Chargée de recherche, CNRS-Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**M. GUICHARD Gilles**

Directeur de recherche, CNRS-Université de Bordeaux

**M. CASANOVA Joseph**

Professeur, Université de Corse

---

**MEMBRES DU JURY :**

**M. GUICHARD Gilles**

Directeur de recherche, CNRS-Université de Bordeaux

**M. CASANOVA Joseph**

Professeur, Université de Corse

**Mme GROSDÉMANGE -BILLARD Catherine** Professeur, Université de Strasbourg

**M. BASKETTER David**

Docteur, DABMEB Consultancy Ltd

**Mme GIMENEZ-ARNAU Elena**

Chargée de recherche, CNRS-Université de Strasbourg

**M. LEPOITTEVIN Jean-Pierre**

Professeur, Université de Strasbourg



Je prends beaucoup plus de plaisir à m'instruire moi-même que non pas à mettre par écrit le peu que je sais.

R. Descartes

A ma famille, mes amis et tous ceux qui m'ont soutenus toutes ces années.



Je tiens à remercier le Laboratoire de Dermatochimie dans son ensemble pour m'avoir permis de finaliser ce travail de thèse.

Plus particulièrement Jean-Pierre pour ses connaissances, sa disponibilité tout au long de ces années passées au laboratoire.

Elena pour sa joie de vivre, son enthousiasme et pour nos longues discussions porte fermées dans son bureau.

Je remercie également Catherine Grosdemange-billard, Gilles Guichard, Joseph Casanova et David Basketter pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.

Un grand merci également à tous ceux sans qui ce travail n'aurait pas été possible :

Le service de RMN de l'Université de Strasbourg et tout particulièrement Jean-Daniel et Maurice pour leur disponibilité, leur gentillesse et leurs connaissances qui m'ont permis de réaliser une grande partie de ce travail.

Le service de Spectrométrie de Masse de la faculté de pharmacie pour le temps et l'énergie qu'ils m'ont consacrés.

Charlotte Mené-Benfeld pour les résultats des tests biologiques.

Le COLIPA pour son soutien financier.

Encore un grand merci à toute l'équipe des dermatochimistes que j'ai eu le plaisir de côtoyer durant ces années : Julien, Mustapha, Émilie, Julie, Camille, Joan, Éric ainsi que tous les stagiaires qui nous ont fait le plaisir de partager un moment avec nous.

Un merci particulier à Fabien pour tous les bons moments passés, toutes les discussions, les qpuqs, les apréros, les fous rires passés ensembles et à venir...

Un grand merci à celle, sans qui ce travail aurait bien pu se terminer beaucoup plus tôt, sans qui je ne serais certainement pas Docteur aujourd'hui. Merci Audrey pour ton soutien indéfectible, pour y avoir cru jusqu'au bout bien souvent plus que moi-même pour m'avoir montré la lueur dans l'obscurité qui m'entourais pour encore tant d'autre choses merci de tout mon cœur.

Je remercie également tous ceux qui ont partagé mon quotidien durant cette thèse je veux parler des amis tout particulièrement Bob, Stéphane, Geo, Audrey et tous les autres dont l'entourage m'a été très précieux et encourageant.

Merci également à ma famille qui ont participé à leur manière à cette réussite, à mes grands-mères Yvette et Colette, à ma mère Laurence, à mon père Bernard, à mon frère Geoffroy à mes oncles et tantes et à mes cousins. Merci à vous.







## Sommaire

Introduction générale .....	1
I. Introduction.....	3
II. L'allergie de contact .....	3
II.1. Structure de la peau .....	4
II.2. Les allergènes de contact .....	5
II.3. Mécanisme de l'allergie de contact .....	7
II.3.1. Phase de sensibilisation .....	7
II.3.2. Phase de révélation .....	10
II.4. Diagnostic et traitements.....	10
III. Prévention de l'allergie de contact .....	11
III.1. Détection des allergènes par les méthodes <i>in vivo</i> .....	11
III.2. Détection des allergènes par les méthodes <i>in vitro</i> .....	14
III.3. Détection des allergènes par les méthodes <i>in silico</i> .....	15
III.4. Détection des allergènes par les méthodes <i>in chemico</i> .....	17
IV. Description du sujet .....	18
IV.1. Le DPRA et ses évolutions .....	18
IV.2. Présentation du sujet .....	23
Bibliographie.....	27

## Chapitre 1 - Mélange MI/MCI :

### Synthèse et étude par RMN de la réactivité envers les peptides modèles.....33

#### I.Introduction..... 35

I.1. Les conservateurs : Généralités..... 35

I.2. Le Kathon® : un mélange de MI et de MCI ..... 36

I.3. Réactivité des isothiazolinones en tant que biocides ..... 38

#### II.Synthèse de la MI et de la MCI marquées au carbone 13 en C4 et précédentes études..... 40

II.1. Choix des positions de marquage..... 40

II.2. Synthèse de MI et de MCI marquées en C4 ..... 41

II.3. Précédentes études de réactivité..... 43

#### III.Réactivité du mélange MI/MCI ( $[^{13}\text{C}]-1/[^{13}\text{C}]-2$ ) vis-à-vis des peptides modèles et du glutathion. .... 45

III.1. Méthodologie..... 45

III.2. Réactivité du mélange  $[^{13}\text{C}]-1/[^{13}\text{C}]-2$  vis-à-vis du glutathion ..... 47

III.3. Réactivité du mélange  $[^{13}\text{C}]-1/[^{13}\text{C}]-2$  vis-à-vis du Pep-Cys ..... 53

III.4. Réactivité du mélange  $[^{13}\text{C}]-1/[^{13}\text{C}]-2$  vis-à-vis du Pep-Lys..... 58

#### IV.Conclusions ..... 62

#### Bibliographie.....65

## Chapitre 2 – Mélanges d'aldéhydes :

synthèse et étude de leur réactivité envers les peptides modèles.....69

I. Introduction..... 71

I.1. Les aldéhydes dans les fragrances et les produits cosmétiques..... 71

I.2. Les aldéhydes et l'allergie de contact ..... 73

I.2.1. Hydroxycitronellal : généralités ..... 75

I.2.2. Citral : généralités ..... 77

I.2.3. Aldéhyde cinnamique : généralités..... 78

I.3. Réactivité des aldéhydes vis-à-vis des acides aminés..... 79

II. Synthèse de l'hydroxycitronellal 30, du citral 31 et de l'aldéhyde cinnamique 32 marqués au  $^{13}\text{C}$  et études précédentes de réactivité..... 81

II.1. Choix des positions de marquage ..... 81

II.2. Synthèse de l'hydroxycitronellal marqué au  $^{13}\text{C}$  en position 1 et étude précédente de réactivité..... 82

II.3. Synthèse du citral marqué au  $^{13}\text{C}$  en position 1 et en position 3 et étude précédente de réactivité..... 84

II.4. Synthèse de l'aldéhyde cinnamique marqué au  $^{13}\text{C}$  en position 1 et en position 3 et étude précédente de réactivité..... 87

III. Études de la réactivité de mélanges d'aldéhydes ..... 90

III.1. Méthodologie ..... 90

III.2. Réactivité des mélanges d'aldéhydes vis-à-vis du glutathion..... 90

III.2.1. Réactivité du mélange hydroxycitronellal-citral ..... 90

III.2.2. Réactivité du mélange hydroxycitronellal-aldéhyde cinnamique..... 97

III.2.3. Réactivité du mélange citral-aldéhyde cinnamique..... 100

III.3. Réactivité des mélanges d'aldéhydes vis-à-vis du peptide cystéine.....	104
III.3.1. Réactivité du mélange hydroxycitronellal-citral .....	104
III.3.2. Réactivité du mélange hydroxycitronellal-aldéhyde cinnamique.....	108
III.3.3. Réactivité du mélange citral-aldéhyde cinnamique.....	113
III.4. Réactivité des mélanges d'aldéhydes vis-à-vis du peptide lysine.....	117
III.4.1. Réactivité du mélange hydroxycitronellal-citral .....	117
III.4.2. Réactivité du mélange hydroxycitronellal-aldéhyde cinnamique.....	123
III.4.3. Réactivité du mélange aldéhyde cinnamique-citral.....	128
 IV. Conclusions .....	 132
 Bibliographie.....	 137
 Chapitre 3 – Mélange atranol/chloroatranol :	
synthèse et étude de leur réactivité envers les peptides modèles.....	141
 I. Introduction.....	 143
I.1. Atranol et chloroatranol : des constituants de la mousse de chêne .....	143
I.2. Atranol et chloroatranol : des allergènes majeurs.....	145
 II. Synthèse marquée au carbone 13 d'atranol et de chloroatranol.....	 147
II.1. Choix de la position de marquage.....	147
II.2. Synthèse marquée au carbone 13 d'atranol et de chloroatranol.....	148
 III. Premières études de réactivité .....	 149
III.1. Études d'oxydation de l'atranol et du chloroatranol .....	149

III.2. Réactivité de l'atranol et du chloroatranol .....	
vis-à-vis du glutathion en milieu oxydant .....	151
IV. Études de la réactivité de l'atranol et du chloroatranol par spectrométrie de masse.....	154
IV.1. Synthèse d'atranol et de chloroatranol .....	154
IV.2. Méthodologie.....	155
IV.3. Études préliminaires portant sur l'oxydation en milieu enzymatique .....	156
IV.4. Réactivité vis-à-vis du glutathion .....	161
IV.5. Réactivité vis-à-vis du peptide cystéine .....	168
IV.6. Réactivité vis-à-vis du peptide lysine .....	171
V. Tests biologiques : études du pouvoir sensibilisant du mélange atranol/chloroatranol ..	176
VI. Conclusions .....	186
Bibliographie.....	189
Conclusion générale .....	193
Parties expérimentales.....	199
Matériels et méthodes.....	201
Synthèse de MI, [ <sup>13</sup> C]-1, et de MCI, [ <sup>13</sup> C]-2.....	205
Synthèse du [ <sup>13</sup> C]-hydroxycitronellal, [ <sup>13</sup> C]-30.....	213

Synthèses du 1-[ <sup>13</sup> C] et du 3-[ <sup>13</sup> C]-citral, 1-[ <sup>13</sup> C]-31 et 3-[ <sup>13</sup> C]-31.....	219
Synthèse du 1-[ <sup>13</sup> C]- et du 3-[ <sup>13</sup> C]-aldéhyde cinnamique, 1-[ <sup>13</sup> C]-32 et 3-[ <sup>13</sup> C]-32.....	227
Synthèse de l'atranol et du chloroatranol, 66 et 67.....	231
Synthèse du [ <sup>13</sup> C]-atranol et du [ <sup>13</sup> C]-chloroatranol, [ <sup>13</sup> C]-66 et [ <sup>13</sup> C]-67.....	236
Études de réactivité par RMN.....	241
Études de réactivité par spectrométrie de masse.....	259
Annexe 1 :	
Adduits observés lors des études de suivi de réactivité par RMN du carbone 13.....	265
Annexe 2 :	
Adduits observés lors des études de suivi de la réactivité par spectrométrie de masse.....	267







---

# INTRODUCTION GENERALE

---



## I. Introduction

L'allergie de contact est un problème majeur de santé publique et la réaction immunotoxique la plus importante chez l'homme. Une récente étude danoise a ainsi estimé à 20 % la population européenne atteinte par cette pathologie.<sup>1,2</sup> Elle est considérée comme étant, d'après la classification de Gell et Coombs, une hypersensibilité retardée de type IV à médiation cellulaire provoquée par la présence dans la peau d'une molécule xénobiotique (aussi appelée haptène). Il a pu être montré que plusieurs centaines de molécules sont capables d'induire une sensibilisation de contact. Ces molécules, naturelles ou synthétiques, sont présentes dans un grand nombre de produits d'usage courant allant des vêtements aux bijoux en passant par les produits cosmétiques.

L'expression de cette maladie consiste, d'un point de vue clinique, en une réaction inflammatoire de la peau caractérisée par un œdème (gonflement), un érythème (rougeur) et un prurit (démangeaison). Seuls des traitements symptomatiques existent pour contrer les effets de cette pathologie et la méthode la plus simple permettant d'éviter l'apparition de ces symptômes reste l'éviction totale de la source allergénique.

Tout au long des processus biologiques de la sensibilisation à une molécule exogène, la chimie joue un rôle très important. Les propriétés physico-chimiques des molécules auxquelles la peau est exposée se révèlent essentielles lors de plusieurs étapes clés du mécanisme provoquant l'allergie de contact.<sup>3</sup> Pour bien comprendre les mécanismes chimiques et immunologiques menant à une allergie cutanée, il est important de bien connaître l'organe dans lequel se déroulent ces mécanismes, c'est-à-dire la peau.

## II. L'allergie de contact

La peau constitue le site d'expression des réactions d'allergie de contact. Il s'agit d'un des organes du corps humain les plus soumis aux agressions extérieures, qu'elles soient

physiques (brûlures, coupures...), chimiques (contact avec des irritants...) ou dues à des microorganismes (bactéries, champignons...). Elle constitue donc la première barrière de défense de l'organisme.

## II.1. Structure de la peau

La peau se compose de trois couches successives ayant chacune leurs spécificités.

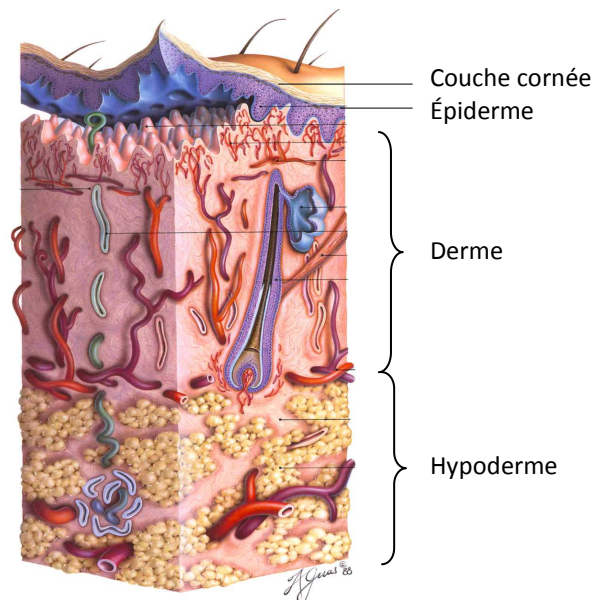


Figure 1 : Représentation schématique d'une coupe de peau.

L'épiderme est la couche la plus externe de la peau. Il est principalement constitué de kératinocytes qui sont des cellules issues de la couche la plus profonde de l'épiderme. Ces cellules, en migrant vers l'extérieur, s'aplatissent et meurent formant ainsi la couche cornée, la première couche protectrice de la peau.<sup>4</sup> Outre les kératinocytes, l'épiderme contient également des mélanocytes, qui en produisant de la mélanine, sont responsables du bronzage, ainsi que de cellules dendritiques qui font partie du système immunitaire.

Le derme, se situant juste en dessous de l'épiderme, est riche en collagène et en fibres élastiques assurant ainsi la résistance de la peau. Cette couche contient, contrairement à l'épiderme, un grand nombre de vaisseaux sanguins permettant sa nutrition.

L'hypoderme constitue la couche la plus profonde de la peau. Il est principalement constitué de cellules adipeuses permettant à la peau de se protéger des variations de température.

## **II.2. Les allergènes de contact**

Les allergènes de contact sont des substances xénobiotiques de faible poids moléculaire ayant des propriétés physico-chimiques leur permettant de franchir la couche cornée.

Ces substances sont trop petites pour être reconnues directement par le système immunitaire. Afin de déclencher une réponse immunitaire, elles doivent au préalable réagir avec une protéine cutanée, formant ainsi un complexe stable haptène-protéine qui ne sera alors plus reconnu comme faisant partie du soi.

La formation du complexe haptène-protéine ne peut s'effectuer que si l'haptène possède une ou plusieurs fonctions réactives lui permettant de modifier chimiquement les protéines cutanées. Il existe cependant des molécules allergisantes ne possédant aucune fonction chimiquement réactive pouvant expliquer la formation de cet antigène. Ces composés, précurseurs d'haptènes, peuvent être classés en deux catégories : les pré-haptènes, s'oxydant à l'air pour former un haptène véritable, et les pro-haptènes, nécessitant une étape de métabolisation pour mener à la formation d'un haptène réactif. Le tableau suivant montre des exemples d'haptènes ainsi que les fonctions chimiques réactives et les mécanismes de réaction avec les acides aminés nucléophiles les plus souvent observés (Figure 2).

Classe	Sites réactifs	Mécanisme de réaction/d'activation	Exemples
Haptènes	Carbonyle	Addition nucléophile	
	Carboxyle	Addition élimination	$R_2 = OR_3 ; NHR_3$ 
	Dérivé halogéné	Substitution nucléophile	 X = Cl ; Br ; I
	Dérivé halogéné aromatique	Substitution nucléophile aromatique	X = Cl ; Br ; I 
	Lactone-lactame	Addition élimination	 X = O ; NH
	Époxydes	Substitution nucléophile	
	Carbonyles $\alpha$ - $\beta$ -insaturés	Addition nucléophile	

Figure 2 : Tableau relatant les différents haptènes et leur réactivité fréquemment observée (Nu = acide aminé nucléophile).

Les acides aminés, contenus dans les protéines cutanées, les plus souvent décrits comme réactifs sont la cystéine, la lysine, l'histidine, la tyrosine, la méthionine et le tryptophane. Les modifications de ces acides aminés prennent généralement la forme de liaisons covalentes entre l'haptène et les résidus nucléophiles des protéines mais peuvent également, dans le cas du nickel par exemple, être dues à la formation de liaisons de coordination entre le métal et les acides aminés.

La Figure 3 relate des exemples de pré-haptènes et de pro-haptènes, de formation d'haptène véritables ainsi que des exemples de mécanismes observés entre ces molécules et les acides aminés nucléophiles.

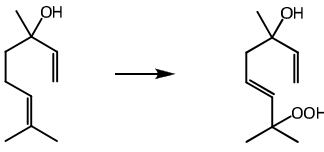
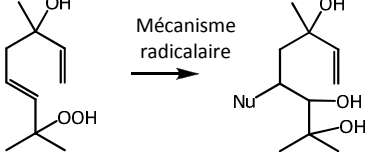
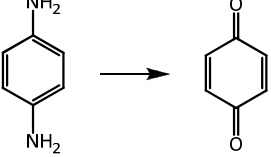
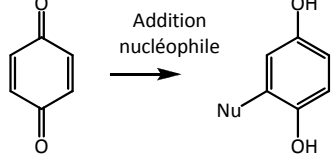
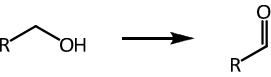
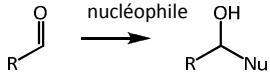
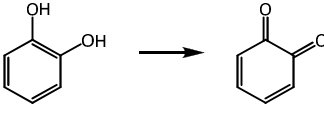
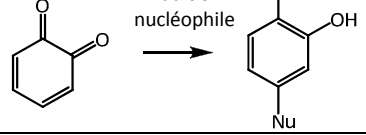
Classe	Conversion par oxydation	Exemples d'haptènes vrais identifiés	Exemples de réactivité observée
Pré-haptènes	Terpènes → hydroperoxyde		
	<i>para</i> -phénylènediamine → <i>para</i> -benzoquinone		
Pro-haptènes	Alcool → aldéhyde		
	Catéchols → <i>ortho</i> -quinones		

Figure 3 : Tableau relatant des exemples de pré-haptènes et de pro-haptènes et leur réactivité observée (Nu = acide aminé nucléophile).

### II.3. Mécanisme de l'allergie de contact

L'allergie de contact se déroule en deux phases distinctes qui sont la phase de sensibilisation et la phase de révélation.

#### II.3.1. Phase de sensibilisation

La phase de sensibilisation consiste en une cascade de mécanismes impliquant aussi bien les propriétés physico-chimiques des molécules exogènes que le système immunitaire.

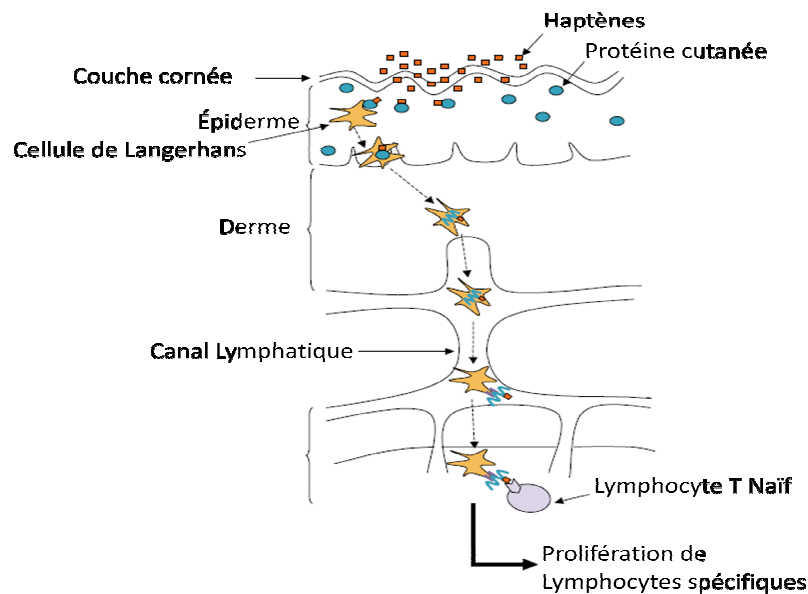


Figure 3 : Schéma représentant les différentes étapes menant à la sensibilisation à un composé chimique.

La première étape de la phase de sensibilisation consiste en la pénétration de l'allergène au travers de la couche cornée. Cette couche est de nature lipophile du fait du grand nombre de lipides qu'elle contient,<sup>4</sup> et seules les molécules de nature hydrophobe sont capables de la traverser. En effet, il a été montré que pour traverser cette barrière, ces molécules doivent posséder un coefficient de partage octanol/eau supérieur à 1.<sup>5</sup> De plus, seules les molécules de faible poids moléculaire sont capables de pénétrer cette couche et d'atteindre ainsi les couches plus profondes de l'épiderme.<sup>6</sup>

Une fois dans l'épiderme, l'haptène ne peut à lui seul activer le système immunitaire du fait de son faible poids moléculaire. Il doit réagir avec des protéines endogènes afin de constituer une entité antigénique. Trois voies ont été décrites pour le déroulement de cette seconde étape. Dans tous les cas, la réactivité de l'haptène vis-à-vis de résidus nucléophiles de protéines présentes dans l'épiderme est mise en cause.<sup>7</sup> La suite du mécanisme implique la prise en charge de ce complexe antigénique par des cellules dendritiques (CD) présentes dans l'épiderme.<sup>8</sup>

L'une de ces trois voies consiste en la formation d'une liaison covalente entre l'haptène et une protéine cutanée extracellulaire, formant ainsi un complexe haptène-protéine. Cette



protéine modifiée ne sera alors plus reconnue par le système immunitaire comme faisant partie du soi et sera alors prise en charge par les CD présentes dans l'épiderme. La seconde voie consiste en la réaction de l'haptène avec une protéine intracellulaire des CD. Enfin, la troisième voie impliquerait une réaction de l'haptène directement avec les protéines constituant le complexe majeur d'histocompatibilité à la surface des CD.

La prise en charge du complexe haptène-protéine par les CD est une étape nécessaire pour la suite du mécanisme de l'allergie. De récentes études semblent indiquer que cette prise en charge nécessite la collaboration de plusieurs populations de CD et s'articule autour de trois étapes clé.<sup>8</sup> Dans un premier temps, le complexe est reconnu comme faisant partie du non-soi par les CD présentes dans l'épiderme.<sup>9</sup> Ensuite, ce complexe est internalisé par ces cellules pour y être clivé en plusieurs peptides.<sup>10,11</sup> Enfin, l'antigène hapténisé, peptide portant la modification chimique induite par l'haptène, est externalisé à la surface de ces cellules en association avec le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH).<sup>12</sup>

Cette prise en charge du complexe haptène-protéine s'accompagne d'une migration des cellules dendritiques vers les ganglions lymphatiques proximaux drainant le derme.

Une fois dans les ganglions, la présentation de l'antigène hapténisé aux lymphocytes T naïfs va résulter en la différenciation de ces lymphocytes puis en leur prolifération. Les lymphocytes spécifiques à l'antigène hapténisé ainsi obtenus vont alors migrer des ganglions lymphatiques proximaux vers le sang et vers l'épiderme.<sup>12</sup>

Cette phase de sensibilisation dure chez l'homme entre 10 et 15 jours et n'a pas de conséquences du point de vue clinique. Ce sera lors d'un contact ultérieur avec l'allergène que les symptômes cliniques de l'allergie de contact proprement dits apparaîtront (érythème, œdème et prurit).

### II.3.2. Phase de révélation

L'apparition de la réaction allergique chez un patient sensibilisé se produit généralement entre 24 et 72 heures après un nouveau contact avec substance allergisante. Les mécanismes immunitaires impliqués lors de cette réaction sont similaires à ceux décrits lors de la phase de sensibilisation. En effet, l'haptène va tout d'abord pénétrer la couche cornée, se lier à une protéine cutanée puis être internalisé par une cellule dendritique. Celle-ci va alors cliver cette protéine modifiée et présenter à l'aide du CMH l'antigène hapténisé aux lymphocytes T.

Les lymphocytes T spécifiques à cet antigène, présents dans le derme et dans l'épiderme, vont alors le reconnaître et déclencher le processus inflammatoire responsable des lésions observées (érythème, œdème et prurit).

### II.4. Diagnostic et traitements

De nos jours, le diagnostic et le traitement d'une allergie de contact sont similaires à ceux déjà décrits dans les années 60. En effet, le « patch test » ou test épicutané est la meilleure façon de déterminer et de diagnostiquer une allergie cutanée à un certain composé chimique. Le principe de ce test est simple et se déroule en deux phases. Dans un premier temps, on applique sur le dos du patient suspecté d'allergie de contact plusieurs patchs contenant différents allergènes connus que l'on laisse pendant 48 heures. Enfin, on relève les réactions à ces patchs généralement à 24, 48 et 72 heures. Les zones du dos du patient ayant réagi correspondent aux molécules auxquelles le patient est allergique. Afin de faciliter ce travail, plusieurs batteries contenant les allergènes les plus souvent rencontrés dont la batterie standard européenne sont à la disposition des dermatologues et allergologues. Une fois les allergènes identifiés, malheureusement, seule une éviction totale évite au patient l'apparition des symptômes. Dans les cas où l'éviction est difficile ou impossible, les seuls traitements disponibles sont des anti-inflammatoires corticostéroïdiens permettant de traiter les symptômes de l'allergie de contact.

L'allergie de contact étant une maladie incurable, le seul moyen de diminuer son impact sur la société est de prévenir son apparition en diminuant l'exposition des consommateurs aux molécules connues pour la déclencher.

### III. Prévention de l'allergie de contact

L'allergie de contact étant une maladie contre laquelle aucun traitement n'existe, il est primordial de pouvoir identifier en amont du consommateur les molécules susceptibles de l'induire et ainsi de pouvoir diminuer, voire interdire, leur utilisation.

De nombreuses méthodes qualitatives et quantitatives ont été développées au cours des dernières années dans ce but. Elles permettent la détection et la classification des allergènes en fonction de leur pouvoir sensibilisant. Ces méthodes peuvent général se diviser en quatre catégories : *in vivo* ou animales, *in vitro* ou cellulaires, *in silico* ou statistiques et *in chemico* ou chimiques.

Dans cette section nous allons exposer un bref état des lieux de ces différentes méthodes de détection des sensibilisants.

#### III.1. Détection des allergènes par les méthodes *in vivo*

Plusieurs méthodes dites *in vivo*, sur l'animal, ont été développées au cours du temps afin de déterminer le pouvoir sensibilisant des molécules de consommation courante.

L'un des premiers tests à avoir été développé dans ce sens est le test de Buehler.<sup>13</sup> Ce test est basé sur la sensibilisation initiale d'un groupe de cobayes à une molécule par application cutanée répétée trois fois (jours 1, 7 et 14). Ensuite, une lecture s'effectue deux semaines

plus tard (jour 28), lors de l'élicitation de la réaction allergique potentielle par une nouvelle application cutanée de la substance testée. La présence d'érythème ou d'œdème, 24 ou 48 heures après la dernière application, chez plus de 15 % des cobayes, permet le classement de la molécule testée comme étant sensibilisante.

Par la suite, un autre test sur le cobaye, le Guinea Pig Maximization Test (GPMT), a été développé reposant sur le même principe que le test de Buehler.<sup>14</sup> À savoir, la sensibilisation d'une population de cobayes à une molécule, suivie d'une lecture lors de la phase d'élicitation. Lors de ce test, la substance testée est directement injectée de façon intradermique afin d'accélérer la phase de sensibilisation. La lecture se fait lors de l'élicitation par application cutanée de la substance 21 jours après l'injection. La présence d'érythème ou d'œdème, 24 ou 48 heures après la dernière application, chez plus de 30 % des cobayes, permet le classement de la molécule testée comme étant sensibilisante.

L'intérêt premier du GPMT par rapport au test de Buehler réside dans une lecture plus rapide des résultats (22 à 23 jours dans le GPMT contre 29 à 30 jours pour le test de Buehler). Cependant, le GPMT est une méthode dite invasive du fait de l'utilisation d'injection intradermique.

Dans les années 50, Russell et Burch ont énoncé, dans leur livre intitulé « The Principles of Humane Experimental Technique », une règle dite des « 3R » afin de Remplacer, Réduire et Raffiner l'expérimentation animale.<sup>15</sup> Cette volonté a conduit à de nombreuses lois visant à mieux encadrer l'utilisation d'animaux dans les sciences. C'est dans ce but qu'à été énoncée la directive européenne 86/609/CEE, datée du 24 novembre 1986, visant à « réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques, assurer à ces animaux des soins adéquats, empêcher qu'aucune douleur, souffrance, angoisse ou dommage durable inutiles ne leur soient infligés et veiller à ce que ces atteintes, lorsqu'elles sont inévitables, soient réduites au minimum ».<sup>16</sup> Le GPMT et le test de Buehler nécessitant un grand nombre d'animaux, un nouveau test sur la souris, le Local Lymph Node Assay (LLNA), a été mis au point.

Le LLNA a été développé par Kimber *et al.* dans les années 90, dans le but, entre autres, de minimiser le nombre animaux nécessaires afin de mener à terme la détection d'allergènes.<sup>17,18</sup> Ce test, validé par le « Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods » (ICCVAM) et par le « European Centre for the Validation of Alternative Methods » (ECVAM), permet non seulement la détection des allergènes mais aussi la quantification de leur pouvoir sensibilisant.<sup>19</sup> Le LLNA est basé sur la quantification de la prolifération lymphocytaire après exposition à un allergène. Tout d'abord, la molécule à tester est appliquée pendant trois jours sur les oreilles des souris. Au cinquième jour, de la thymidine tritiée est injectée par voie intraveineuse et cinq heures plus tard, les souris sont sacrifiées et la prolifération lymphocytaire est mesurée par  $\beta$ -scintillation. La concentration (en %) en allergène induisant une prolifération trois fois supérieure à celle du groupe contrôle ( $EC_3$ ) permet alors de classer les haptènes en différentes classes :<sup>20</sup>

- non sensibilisant ( $EC_3 > 50$ )
- sensibilisant faible ( $10 < EC_3 < 50$ )
- sensibilisant modéré ( $1 < EC_3 < 10$ )
- sensibilisant fort ( $0,1 < EC_3 < 1$ )
- sensibilisant extrême ( $EC_3 < 0,1$ )

Par rapport au GPMT, le LLNA permet une lecture rapide des résultats (5 jours pour le LLNA contre 22 à 23 jours pour le GPMT), une mise en place plus facile et une diminution du nombre d'animaux nécessaires.

Cependant, le 7<sup>ème</sup> amendement à la Directive Cosmétiques (76/768/EEC), qui régit en Europe l'évaluation et l'utilisation des ingrédients contenus dans les produits cosmétiques, demande de réduire, et même de supprimer, d'ici 2013, l'utilisation des animaux lors de l'évaluation toxicologique des molécules chimiques. De plus, la récente réglementation européenne REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical substances) demande l'évaluation toxicologique de près de 30000 substances chimiques. Dans ce contexte, il est primordial de développer des méthodes dites « alternatives » à

l'utilisation des animaux afin de détecter et d'évaluer le pouvoir sensibilisant des molécules chimiques.<sup>21</sup>

### III.2. Détection des allergènes par les méthodes *in vitro*

De nombreuses méthodes *in vitro* pour la détection et l'évaluation des allergènes ont été développées dans les années 2000. Deux d'entre elles, basées sur l'activation de cellules dendritiques, sont d'ors et déjà en phase de prévalidation par l'ECVAM. Il s'agit du human Cell Line Activation Test (h-CLAT) et du Myeloid U-937 Skin Sensitization Test (MUSST).<sup>22-24</sup> Une troisième méthode, le KeratinoSens<sup>®</sup> assay, sur le point d'être présentée à l'ECVAM, est basée l'utilisation de kératinocytes.

Le h-CLAT et le MUSST sont basés sur l'expression, par les cellules testées, d'un signal de danger spécifique à la présence d'un sensibilisant. Il s'agit dans ce cas de la surexpression de protéines de surface que sont le CD 54 et le CD 86.

Le h-CLAT, développé par Sakaguchi *et al.*, est basé sur l'observation de Yoshida *et al.* selon laquelle, les allergènes induisent une surexpression des protéines CD 54 et CD 86 à la surface des cellules THP-1 (substitut des cellules dendritiques).<sup>22,25</sup> Lors de ce test, les cellules THP-1 sont incubées avec la molécule testée pendant 24 heures, puis avec un anticorps fluorescent spécifique soit des protéines CD 54 soit des protéines CD 86. La fluorescence observée est alors comparée aux contrôles menant au résultat d'intensité de fluorescence relative (RFI). Si après avoir été incubées avec une molécule, les cellules THP-1 testées expriment les protéines CD 86 et CD 54 plus de 1,5 x plus que le contrôle (RFI>150 %), la molécule est considérée comme sensibilisante.

Le MUSST, développé par Python *et al.*, est basé sur le même principe que le h-CLAT.<sup>23</sup> Lors de ce test, les cellules U-937 sont incubées en présence de la molécule testée pendant 48 heures, puis avec un anticorps fluorescent spécifique des protéines CD 86. La fluorescence observée est alors comparée aux contrôles menant au résultat d'intensité de fluorescence

relative (RFI). Si après avoir été incubées avec une molécule, les cellules U-937 testées expriment les protéines CD 86 plus de 1,2 x plus que le contrôle (EC > 120 %), la molécule est considérée comme sensibilisante.

Le KeratinoSens® assay, est basé sur l'utilisation de kératinocytes humains modifiés.<sup>26</sup> Une modification génétique permet à ces cellules, en présence d'un sensibilisant, de synthétiser une enzyme, la luciférase.<sup>27</sup> La luciférase est une enzyme qui, en présence de son substrat, émet de la lumière. Lors de ce test, les cellules sont incubées pendant 48 heures en présence de la molécule testée et le substrat de la luciférase est incorporé au milieu. L'activité de la luciférase, mesurée par luminescence, est comparée aux contrôles. Une augmentation de 150 % de l'activité de la luciférase par rapport aux contrôles classe la molécule testée comme étant sensibilisante.

De nouvelles méthodes basées sur l'utilisation de peaux humaines reconstruites sont en cours de développement.<sup>28</sup> Récemment, Facy *et al.* ont étudié l'activation des cellules de Langherans lors de l'exposition de ces peaux reconstruites à quelques allergènes.<sup>29</sup> Lors de cette étude, les auteurs ont remarqué que l'utilisation de telles peaux pourraient être un moyen de déterminer le potentiel allergisant des sensibilisants. Cependant, cette méthode prometteuse nécessite encore des études plus poussées dans cette voie.

### **III.3. Détection des allergènes par les méthodes *in silico***

Les méthodes de prédictions informatiques pour la détection d'allergènes peuvent se diviser en trois catégories.<sup>30</sup> Les modèles « locaux » sont caractéristiques d'une classe de molécules ou d'un type de mécanisme d'action. Les modèles « globaux », eux, sont basés sur des données biologiques de sensibilisation et comprennent une large gamme de composés ainsi qu'un grand nombre de mécanismes d'action. Les systèmes « experts » sont construits sur des règles dérivant de données toxicologiques et aboutissent à la description de la réactivité supposée des molécules testées.

Un exemple de modèle local est le Relative Alkylation Index (RAI). Il est basé sur le principe selon lequel, le potentiel de sensibilisation est lié à la capacité d'une molécule à se lier à une protéine.<sup>31</sup> Dans ce modèle, les allergènes sont divisés en plusieurs classes selon leur réactivité (accepteur de Michael, électrophiles  $SN_2$ , ...). Pour chaque classe, une équation tenant compte de plusieurs paramètres permet de prédire le potentiel de sensibilisation de la molécule testée.<sup>32,33</sup> Par exemple, pour les composés formant des bases de Schiff avec les résidus aminés des protéines, l'équation proposée est la suivante :

$$pEC_3 = 0,32 \log(P) + 0,96 \sum \sigma^* - 0,31$$

où  $pEC_3 = -\log(EC_3)$ ,  $P$  = coefficient de partage octanol/eau et  $\sigma^*$  = constante de Taft reflétant l'effet inductif des substituants

Le Comprehensive Descriptors for Structural and Statistical Analysis (CODESSA) est un exemple de modèle global, reposant sur le même principe que le RAI, menant à une équation unique pour chaque composé testé. Cette équation tient compte de la surface de la molécule partiellement chargée positivement (Fractional Positively Charged Surface Area, FPSA)<sup>34</sup> et de la différence d'énergie entre la HOMO et la LUMO ( $E_{HOMO-LUMO}$ ) de la molécule testée.<sup>35</sup> L'équation utilisée pour la prédiction du potentiel de sensibilisation dans cette méthode est la suivante :

$$EC_3 = 9,16 FPSA_{ESP} + 4,29 E_{HOMO-LUMO} - 45,89$$

Enfin, le Deductive Estimation of Risk from Existing Knowledge (DEREK) est un modèle dit « expert ».<sup>36,37</sup> Ce système est basé sur la comparaison de la structure de la molécule soupçonnée à des motifs réactifs connus pour leurs propriétés biologiques. Si la molécule testée contient un ou plusieurs motifs « d'alerte », un profil des risques subséquents à son exposition est établi. Outre la réactivité de la molécule testée, ce système informatique tient compte de plusieurs autres paramètres comme la pénétration de la molécule dans la peau ou l'éventuelle réactivité de métabolites issus de la détoxification de cette molécule.<sup>30,38,39</sup>



### III.4. Détection des allergènes par les méthodes *in chemico*

Plusieurs tests visant à mimer la réactivité des allergènes vis-à-vis des protéines ont été développés. Ils reposent sur le principe selon lequel, plus une molécule est capable de réagir avec les acides aminés nucléophiles, plus son potentiel de sensibilisation sera élevé.<sup>40</sup>

Un test simple a été développé par Kato *et al.* en 2003. Le principe de ce test est basé sur la réactivité des molécules testées envers le glutathion, un peptide naturel très impliqué dans les processus de détoxications. Lors de ce test, le glutathion est incubé en présence de la molécule testée pendant une heure et le mélange est analysé par spectrométrie de masse. L'observation de pics correspondants à des adduits entre le glutathion et la molécule testée classe cette molécule comme étant sensibilisante.

En 2004, Gerberick *et al.* ont développé un test, basé sur l'utilisation au départ de quatre peptides, que sont le glutathion et trois peptides synthétiques de séquence AcRFAAXAA où X représentait soit une cystéine, soit une lysine ou une histidine.<sup>41</sup> Lors de ce test, les différents peptides sont incubés séparément avec la molécule testée pendant 24 heures et la déplétion des peptides est mesurée par rapport aux contrôles par HPLC-UV. Une déplétion de plus de 10 % de l'un de ces quatre peptides classe cette molécule comme étant un sensibilisant. Avec le temps, ce test a subi plusieurs améliorations qui seront décrites dans la section suivantes.

Un autre de ces tests a été développé par Aleksic *et al.* en 2009. Il est basé sur le suivi par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse de la réaction entre une molécule et plusieurs peptides.<sup>42</sup> Les peptides réactifs utilisés lors de ce test partagent une séquence commune AcFAAXAA où X représente le résidu nucléophile qui est soit une cystéine, une lysine, une arginine, une histidine ou une tyrosine. En plus de ces cinq peptides réactifs, trois autres de séquence AcFAAAAA, FAAAAA et AcFAGAGA ont été utilisés comme contrôles négatifs. Lors de ce test, les différents peptides réactifs ainsi que les contrôles sont incubés séparément avec la molécule testée pendant 24 heures puis la consommation des

peptides réactifs est mesurée par comparaison avec les contrôles. Les résultats issus de ce test ont permis de classer les molécules testées en fonction de leur pouvoir sensibilisant allant de non-sensibilisant à sensibilisant extrême.

## IV. Description du sujet

Ce sujet de thèse s'inscrit dans la continuité des travaux effectués par Gerberick *et al.* quant à l'amélioration du test de réactivité peptidique qu'est le Direct Peptide Reactivity Assay également appelé DPRA.

### IV.1. Le DPRA et ses évolutions

Comme indiqué dans la section précédente, le DPRA a été développé en 2004 par Gerberick *et al.*. Ce test, basé sur la réactivité peptidique des molécules testées, n'a cessé de s'affiner au cours du temps.

Sous sa première forme, cette méthode de détection de molécules sensibilisantes s'appuyait sur l'utilisation de quatre peptides, trois synthétiques de séquence AcRFAAXAA où X représente soit une cystéine, une lysine ou une histidine, et un naturel, le glutathion (Figure 4).<sup>41</sup>

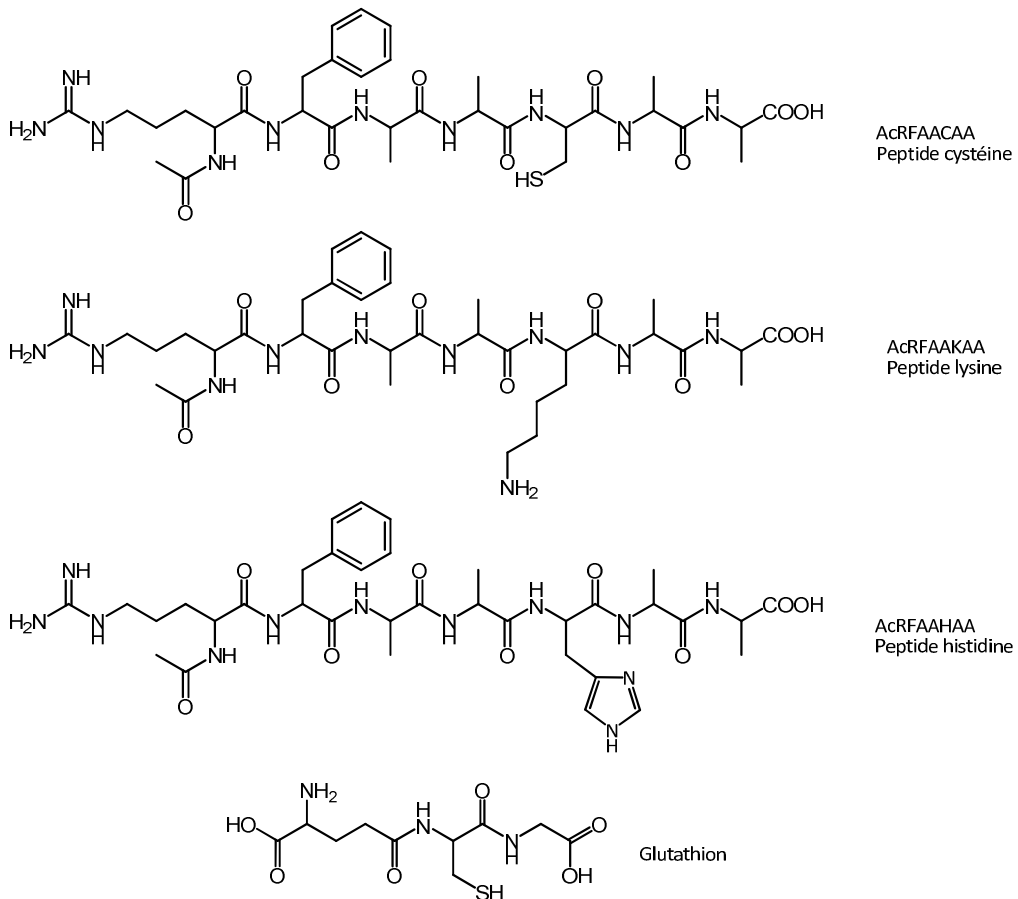


Figure 4 : Peptides utilisés lors des premières études du DPRA.

Il a très vite pu être observé que la réactivité du peptide histidine ne montrait pas de résultats concluants. En effet, les valeurs de déplétion pour ce peptide se sont montrées chaotiques et peu révélatrices du potentiel sensibilisant des molécules testées (Figure 5)

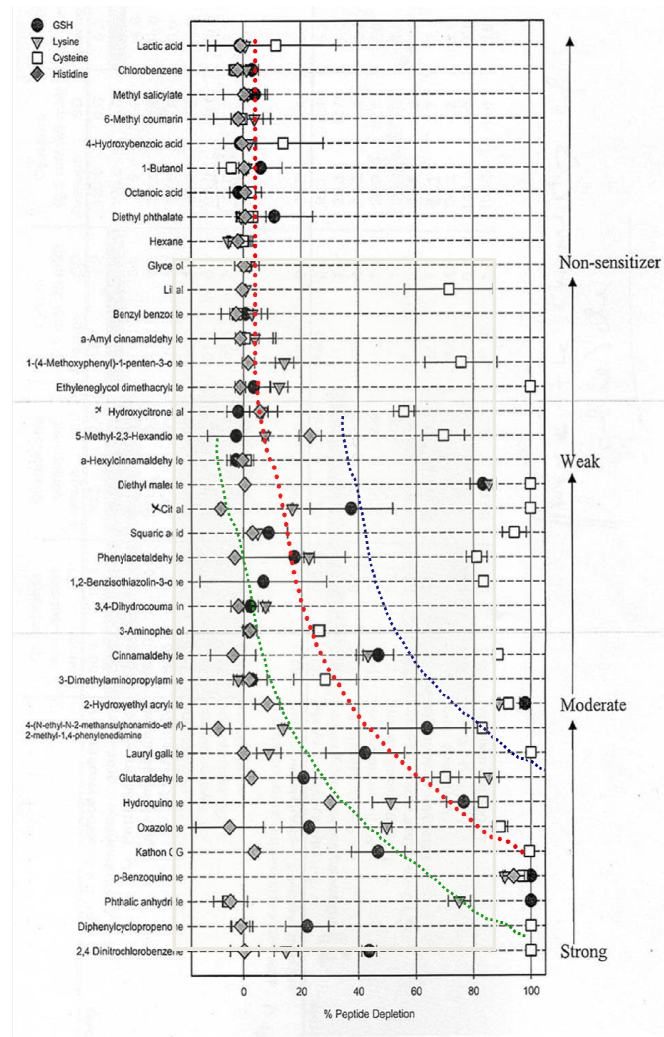


Figure 5 : Résultats obtenus lors de la première étude par Gerberick *et al.* de déplétion peptidique.

Mais, positivement cette étude avait également montré que la réactivité des molécules testées vis-à-vis des autres peptides augmentait globalement avec le potentiel sensibilisant de celles-ci. En effet, les molécules non sensibilisantes montraient une réactivité faible voire nulle avec les peptides cystéine, lysine et le glutathion alors qu'il existe une bonne corrélation entre le potentiel allergisant mesuré par le LLNA et la réactivité peptidique observée.

Plus tard, ces études se sont concentrées sur la réactivité du glutathion et des peptides cystéine et lysine vis-à-vis d'une batterie de molécules allant de non-sensibilisants à des sensibilisants fort.<sup>43</sup> Lors de cette étude, les résultats des déplétions peptidiques issus de plusieurs ratios peptide/molécule testée ont été soumis à des algorithmes statistiques afin

de déterminer un arbre décisionnel basé sur ces résultats. Le modèle issu de cette étude statistique est montré dans la Figure 6.

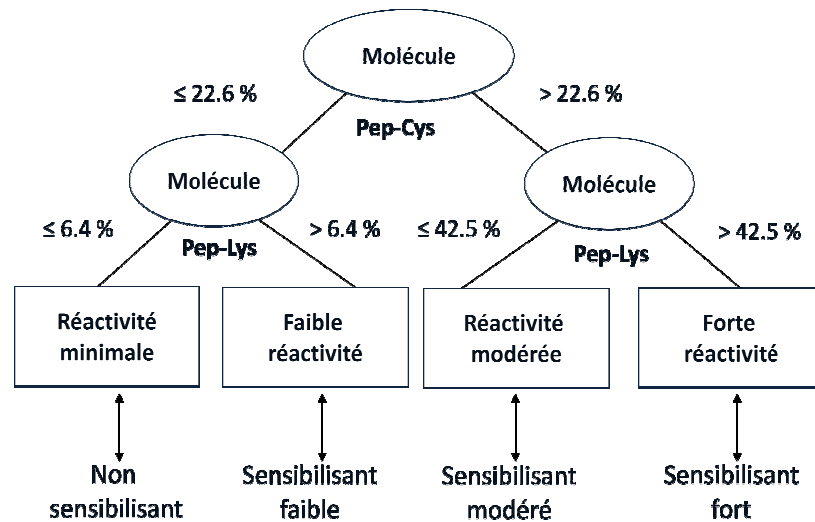


Figure 6 : Arbre décisionnel établi dans le cadre du DPRA permettant de classer les allergènes en fonction de leur réactivité avec les peptides cystéine et lysine.

Ce modèle, n'incluant que les peptides cystéine et lysine, a montré une très bonne corrélation entre les résultats obtenus par cette approche et le pouvoir sensibilisant des molécules testées déterminées par le LLNA.

Cependant, le DPRA, sous cette forme, a certaines limitations. Par exemple, la détection des pré- et des pro-haptènes par ce modèle n'est pas possible, ces molécules nécessitant une étape d'activation au préalable que ce test n'avait pas envisagé au départ.

En conséquence, beaucoup de travail a été réalisé afin de rendre le DPRA accessible à toutes les catégories de molécules. Concrètement, dans une récente étude, Gerberick *et al.* ont incorporé au test du DPRA une étape d'oxydation enzymatique mimant la métabolisation nécessaire aux pro-haptènes pour devenir réactifs.<sup>44</sup> Le DPRA devient alors le PPRA (Peroxydase Peptide Reactivity Assay)

L'enzyme utilisée dans le PPRA est la peroxydase de raifort. Les avantages liés à l'utilisation de cette enzyme sont qu'elle est stable sur une large gamme de pH, qu'elle est peu coûteuse et qu'elle est peu sélective.

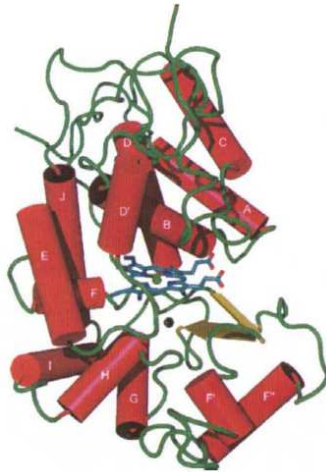


Figure 7 : Structure de la peroxydase de raifort déterminée par Gajhede *et al.*<sup>45</sup>

Son site actif contient une porphyrine de fer qui, par action de peroxyde d'hydrogène comme cofacteur, permet d'activer l'atome central de fer de cette enzyme et le faire transiter entre les états d'oxydation III et IV.<sup>46</sup>

Cette étude avait pour but de comparer la déplétion peptidique observée lors de l'activation des pré- ou des pro-haptènes soit par ce système enzymatique, soit par simple addition de peroxyde d'hydrogène. Les déplétions peptidiques observées dans le cas des pré-haptènes se sont montrées similaires dans les deux systèmes oxydants. Dans le cas des pro-haptènes, des déplétions peptidiques significatives ont pu être observées uniquement dans le système peroxydase de raifort/peroxyde d'hydrogène. Cette étude a montré que ce système d'oxydation couplé au DPRA permettait aussi bien de détecter les pré-haptènes que les pro-haptènes.

## IV.2. Présentation du sujet

Malgré les nombreux progrès effectués dans le développement de méthodes alternatives à l'utilisation d'animaux pour la détection des allergènes, l'évaluation du pouvoir sensibilisant de mélanges d'allergènes est aujourd'hui encore impossible. Ceci pose un grand problème car dans le cadre du 7<sup>ème</sup> amendement de la Directive Cosmétique et du projet REACH où tous les composants de produits cosmétiques devront être évalués du point de vue toxicologique, certains de ces produits sont en réalité des mélanges de composés chimiques comme les huiles essentielles. Les produits cosmétiques contiennent de nombreux ingrédients qui peuvent eux-mêmes présenter une composition complexe (extraits naturels, parfums, etc...). Comme la législation actuelle impose que tous les ingrédients utilisés dans les produits cosmétiques soient testés, il pourrait être intéressant d'adapter le DPRA à la prédiction du pouvoir sensibilisant de mélanges complexes. Cela permettrait de diminuer la quantité de tests à effectuer et de plus, les études de réactivité peptidique appliquées aux mélanges de composés chimiques allergisants, pourraient peut-être expliquer les effets de synergie parfois observés lors des réponses allergiques à ces composés.

Afin d'évaluer la compatibilité du DPRA avec l'utilisation de mélanges de substances allergisantes, nous avons étudié pendant ce travail de thèse la réactivité, vis-à-vis des deux peptides du DPRA et du glutathion, de différents allergènes connus, seuls ou en mélanges.

Pour ce faire, les composés étudiés ont été synthétisés marqués au carbone 13 au niveau du ou des sites réactifs. L'introduction du marquage au carbone 13 est nécessaire pour le suivi des réactions entre les haptènes et les peptides. En effet, la grande différence de poids moléculaire entre ces deux composés et les faibles concentrations nécessaires aux études ( $\sim 1$  mmol/L) imposent ce marquage pour le suivi par RMN des réactions.

La réactivité des composés seuls ou bien en mélanges, vis-à-vis des peptides, a été suivie par RMN monodimensionnelle du carbone 13 et analysée par RMN bidimensionnelle  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  de type Heteronuclear Single Quantum Correlation (HSQC) et Heteronuclear Multiple Bond

Correlation (HMBC). Dans le cas des expériences réalisées avec des mélanges, tous les composants étaient présents en quantité équimolaire afin de pouvoir examiner l'éventuelle compétition de réactivité entre les différents allergènes vis-à-vis des peptides.

Ce travail de thèse s'est découpé en trois étapes. Dans un premier temps, des études avec un mélange binaire d'allergènes ayant une différence significative de potentiel sensibilisant ont été effectuées. Celles-ci ont mis en jeu la *N*-méthylisothiazolinone (MI, allergène modéré) et la *N*-méthyl-5-chloroisothiazolinone (MCI, allergène fort), toutes deux composantes du Kathon® CG, conservateur fréquemment utilisé dans les produits cosmétiques. Leur synthèse marquée au carbone 13 ainsi que les études de réactivité effectuées seront décrites dans le chapitre I.

Dans un deuxième temps, afin de confirmer ou d'infirmer ces résultats, d'autres études mettant en jeu des allergènes ayant des potentiels sensibilisants plus proches ont été effectuées. Pour cela, des mélanges contenant de l'hydroxycitronellal (allergène faible) et/ou du citral (allergène modéré) et/ou de l'aldéhyde cinnamique (allergène modéré) ont été utilisés. Du fait de leurs propriétés odorantes, ces trois aldéhydes sont fréquemment utilisés dans la composition de fragrances. Leur synthèse marquée au carbone 13 ainsi que les études de réactivité effectuées seront décrites dans le chapitre II.

Dans la dernière partie de ce travail de thèse nous avons étendu ces études aux cas des pré- et des pro-haptènes. Nous avons travaillé sur l'atranol et le chloroatranol, identifiés comme étant les responsables majeurs de l'allergie de contact à l'absolue de mousse de chêne, extrait naturel utilisé en parfumerie. Des études du pouvoir sensibilisant de ces deux molécules ont également été entreprises. Leur synthèse ainsi que les différentes études concernant la réactivité ces deux molécules seront présentées dans le chapitre III.

Ces mélanges choisis ont l'avantage de couvrir un large panel de différence de potentiel de sensibilisation et de mécanisme de réactivité. En effet, les potentiels de sensibilisation des molécules choisies vont de fort (MCI) à faible (hydroxycitronellal) de plus, leurs mécanismes



d'actions, similaire dans chaque mélange, reflètent la complexité des réactivités observées chez les haptènes ou pro-haptènes.



## Bibliographie

1. K. Engkilde, J. P. Thyssen, T. Menné, J. D. Johansen.  
Association between cancer and contact allergy: a linkage study.  
BMJ Open, 2011.
2. A. T. Karlberg, M. A. Bergstrom, A. Borje, K. Luthman, J. L. Nilsson.  
Allergic contact dermatitis-formation, structural requirements, and reactivity of skin sensitizers.  
Chem Res Toxicol, 2008, 21 (1), 53-69.
3. D. Basketter, A. Dooms-Goossens, A.-T. Karlberg, J.-P. Lepoittevin.  
The chemistry of contact allergy: why is a molecule allergenic?  
Contact Dermatitis, 1995, 32 (2), 65-73.
4. K. C. Madison.  
Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis.  
J Invest Dermatol, 2003, 121, 231-241.
5. C. K. Smith Pease, D. A. Basketter, G. Y. Patlewicz.  
Contact allergy: the role of skin chemistry and metabolism.  
Clin Exp Dermatol, 2003, 28 (2), 177-183.
6. F. Berard, J. P. Marty, J. F. Nicolas.  
Allergen penetration through the skin.  
Eur J Dermatol, 2003, 13 (4), 324-330.
7. I. Kimber, D. A. Basketter, G. F. Gerberick, R. J. Dearman.  
Allergic contact dermatitis.  
Int Immunopharmacol, 2002, 2 (2-3), 201-211.
8. R. J. Tonicic, J. Lipozencic, I. Martinac, S. Greguric.  
Immunology of allergic contact dermatitis.  
Acta Dermatovenerol Croat, 2011, 19 (1), 51-68.
9. L. Antonio.  
Mechanisms of antigen uptake for presentation.  
Curr Opin Immunol, 1996, 8 (3), 348-354.
10. R. M. Steinman, K. Inaba, S. Turley, P. Pierre, I. Mellman.  
Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies.  
Hum Immunol, 1999, 60 (7), 562-567.

11. F. Authier, B. I. Posner, J. J. M. Bergeron.  
Endosomal proteolysis of internalized proteins.  
FEBS Letters, 1996, 389 (1), 55-60.
12. P. Saint-Mezard, A. Rosieres, M. Krasteva, F. Berard, B. Dubois, D. Kaiserlian, J. F. Nicolas.  
Allergic contact dermatitis.  
Eur J Dermatol, 2004, 14 (5), 284-295.
13. E. V. Buehler.  
Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig.  
Arch Dermatol, 1965, 91 (2), 171-175.
14. B. Magnusson, A. M. Kligman.  
The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test.  
J Invest Dermatol, 1969, 52, 268-276.
15. [http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane\\_exp/het-toc](http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc).
16. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31986L0609:fr:HTML>.
17. I. Kimber, C. Weisenberger.  
A murine local lymph node assay for the identification of contact allergens.  
Arch Toxicol, 1989, 63 (4), 274-282.
18. I. Kimber, D. A. Basketter.  
The murine local lymph node assay: A commentary on collaborative studies and new directions.  
Food Chem Toxicol, 1992, 30 (2), 165-169.
19. J. H. Dean, L. E. Twerdok, R. R. Tice, D. M. Sailstad, D. G. Hattan, W. S. Stokes.  
ICCVAM Evaluation of the Murine Local Lymph Node Assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel.  
Regul Toxicol Pharm, 2001, 34 (3), 258-273.
20. P. S. Kern, G. F. Gerberick, C. A. Ryan, I. Kimber, A. Aptula, D. A. Basketter.  
Local lymph node data for the evaluation of skin sensitization alternatives: a second compilation.  
Dermatitis, 2010, 21 (1), 8-32.
21. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32003L0015:FR:HTML>.

22. H. Sakaguchi, T. Ashikaga, M. Miyazawa, Y. Yoshida, Y. Ito, K. Yoneyama, M. Hirota, H. Itagaki, H. Toyoda, H. Suzuki.  
Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT) II. An inter-laboratory study of the h-CLAT.  
*Toxicol in Vitro*, 2006, 20 (5), 774-784.
23. F. Python, C. Goebel, P. Aeby.  
Assessment of the U937 cell line for the detection of contact allergens.  
*Toxicol Appl Pharm*, 2007, 220 (2), 113-124.
24. C. Bauch, S. N. Kolle, E. Fabian, C. Pachel, T. Ramirez, B. Wiench, C. J. Wruck, B. Ravenzwaay, R. Landsiedel.  
Intralaboratory validation of four in vitro assays for the prediction of the skin sensitizing potential of chemicals.  
*Toxicol in Vitro*, 2011, 25 (6), 1162-1168.
25. Y. Yoshida, H. Sakaguchi, Y. Ito, M. Okuda, H. Suzuki.  
Evaluation of the skin sensitization potential of chemicals using expression of co-stimulatory molecules, CD54 and CD86, on the naive THP-1 cell line.  
*Toxicol in Vitro*, 2003, 17 (2), 221-228.
26. A. Natsch, C. Bauch, L. Foertsch, F. Gerberick, K. Norman, A. Hilberer, H. Inglis, R. Landsiedel, S. Onken, H. Reuter, A. Schepky, R. Emter.  
The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers in vitro: Results of a ring-study in five laboratories.  
*Toxicol in Vitro*, 2011, 25 (3), 733-744.
27. R. Emter, G. Ellis, A. Natsch.  
Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro.  
*Toxicol Appl Pharm*, 2010, 245 (3), 281-290.
28. M. Régnier, A. Patwardhan, A. Scheynius, R. Schmidt.  
Reconstructed human epidermis composed of keratinocytes, melanocytes and Langerhans cells.  
*Med Biol Eng Comput*, 1998, 36 (6), 821-824.
29. V. Facy, V. Flouret, M. Régnier, R. Schmidt.  
Reactivity of Langerhans cells in human reconstructed epidermis to known allergens and UV radiation.  
*Toxicol in Vitro*, 2005, 19 (6), 787-795.
30. G. Patlewicz, A. O. Aptula, E. Uriarte, D. W. Roberts, P. S. Kern, G. F. Gerberick, I. Kimber, R. J. Dearman, C. A. Ryan, D. A. Basketter.  
An evaluation of selected global (Q) SARs/expert systems for the prediction of skin sensitisation potential.  
*Sar Qsar Environ Res*, 2007, 18 (5-6), 515-541.

31. D. W. Roberts, D. L. Williams.  
The derivation of quantitative correlations between skin sensitisation and physico-chemical parameters for alkylating agents, and their application to experimental data for sultones.  
*J Theor Biol*, 1982, 99 (4), 807-825.
32. A. O. Aptula, G. Patlewicz, D. W. Roberts.  
Skin sensitization: reaction mechanistic applicability domains for structure–activity relationships.  
*Chem Res Toxicol*, 2005, 18 (9), 1420-1426.
33. G. Patlewicz, D. W. Roberts, J. D. Walker.  
QSARs for the skin sensitization potential of aldehydes and related compounds.  
*QSAR Comb Sci*, 2003, 22 (2), 196-203.
34. D. T. Stanton, P. C. Jurs.  
Development and use of charged partial surface area structural descriptors in computer-assisted quantitative structure-property relationship studies.  
*Anal Chem*, 1990, 62 (21), 2323-2329.
35. M. D. Miller, D. M. Yourtee, A. G. Glaros, C. C. Chappelow, J. D. Eick, A. J. Holder.  
Quantum mechanical structure–activity relationship analyses for skin sensitization.  
*J Chem Inf Model*, 2005, 45 (4), 924-929.
36. D. M. Sanderson, C. G. Earnshaw.  
Computer prediction of possible toxic action from chemical structure; the DEREK system.  
*Hum Exp Toxicol*, 1991, 10 (4), 261-273.
37. J. E. Ridings, M. D. Barratt, R. Cary, C. G. Earnshaw, C. E. Eggington, M. K. Ellis, P. N. Judson, J. J. Langowski, C. A. Marchant, M. P. Payne, W. P. Watson, T. D. Yih.  
Computer prediction of possible toxic action from chemical structure: an update on the DEREK system.  
*Toxicology*, 1996, 106 (1-3), 267-279.
38. I. Gerner, M. D. Barratt, S. Zinke, K. Schlegel, E. Schlede.  
Development and prevalidation of a list of structure-activity relationship rules to be used in expert systems for prediction of the skin-sensitising properties of chemicals.  
*Alternatives to laboratory animals : ATLA*, 2004, 32 (5), 487-509.
39. K. Langton, G. Y. Patlewicz, A. Long, C. A. Marchant, D. A. Basketter.  
Structure–activity relationships for skin sensitization: recent improvements to Derek for Windows.  
*Contact Dermatitis*, 2006, 55 (6), 342-347.

40. G. Maxwell, M. Aleksic, A. Aptula, P. Carmichael, J. Fentem, N. Gilmour, C. MacKay, C. Pease, R. Pendlington, F. Reynolds, D. Scott, G. Warner, C. Westmoreland.  
Assuring consumer safety without animal testing: a feasibility case study for skin sensitisation.  
*Altern Lab Anim*, 2008, 36 (5), 557-568.
41. G. F. Gerberick, J. D. Vassallo, R. E. Bailey, J. G. Chaney, S. W. Morrall, J. P. Lepoittevin.  
Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens.  
*Toxicol Sci*, 2004, 81 (2), 332-343.
42. M. Aleksic, E. Thain, D. Roger, O. Saib, M. Davies, J. Li, A. Aptula, R. Zazzeroni.  
Reactivity profiling: covalent modification of single nucleophile peptides for skin sensitization risk assessment.  
*Toxicol. Sci.*, 2009, 108, 401-411.
43. G. F. Gerberick, J. D. Vassallo, L. M. Foertsch, B. B. Price, J. G. Chaney, J. P. Lepoittevin.  
Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: a classification tree model approach.  
*Toxicol Sci*, 2007, 97 (2), 417-427.
44. G. F. Gerberick, J. A. Troutman, L. M. Foertsch, J. D. Vassallo, M. Quijano, R. L. M. Dobson, C. Goebel, J. P. Lepoittevin.  
Investigation of peptide reactivity of pro-hapten skin sensitizers using a peroxidase-peroxide oxidation system.  
*Toxicol. Sci.*, 2009, 112, 164-174.
45. M. Gajhede, D. J. Schuller, A. Henriksen, A. T. Smith, T. L. Poulos.  
Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution.  
*Nat Struct Mol Biol*, 1997, 4 (12), 1032-1038.
46. E. Derat, S. Shaik.  
An efficient proton-coupled electron-transfer process during oxidation of ferulic acid by horseradish peroxidase: coming full cycle.  
*J Am Chem Soc*, 2006, 128 (42), 13940-13949.





---

# CHAPITRE 1

Mélange MI/MCI : synthèse et étude de leur réactivité  
envers les peptides modèles

---



## I. Introduction

### I.1. Les conservateurs : Généralités

Les conservateurs sont des substances bactéricides et/ou fongicides utilisées pour enrayer la prolifération microbienne dans de nombreux produits, allant des produits alimentaires aux produits cosmétiques. Le développement de microorganismes peut en effet dégrader la qualité du produit ou représenter un danger pour la santé. Ainsi des conservateurs, qui appartiennent à la famille des biocides, sont très souvent ajoutés aux préparations industrielles pouvant être affectées par des microorganismes. L'efficacité des conservateurs est déterminée par leur capacité à minimiser la contamination et la croissance des microorganismes dans la préparation.

Le conservateur « idéal » doit être, en conséquence, très actif d'un point de vue antimicrobien et/ou antifongique, efficace durant la durée de validité du produit, efficace sur une large plage de pH, inodore, incolore, inerte vis-à-vis des autres ingrédients du produit et enfin sans danger.<sup>1</sup>

Les conservateurs sont en général classés en différents groupes en fonction du mécanisme impliqué dans leur activité antimicrobienne :

- Agents altérant l'intégrité et la perméabilité de la membrane cellulaire
- Composés électrophiles réagissant avec les résidus nucléophiles des biomolécules
- Composés pouvant réagir par voie radicalaire (i.e. des peroxydes)

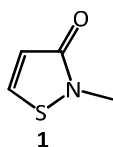
En Europe, l'annexe VI de la Directive Cosmétiques (76/768/CEE), qui établit des dispositions réglementaires assurant la sécurité des produits cosmétiques, contient une liste positive de 58 conservateurs aujourd'hui autorisés et utilisables selon certaines conditions de concentration et en fonction du produit concerné.<sup>2</sup> Des produits d'origine naturelle, comme l'huile essentielle d'arbre à thé<sup>3</sup> ou encore l'huile essentielle de citron,<sup>4</sup> sont aujourd'hui de

plus en plus étudiées pour leur propriétés biocides, mais ils ne peuvent pas être utilisés comme conservateurs au sens légal du terme.

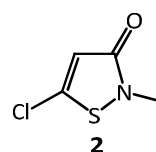
L'utilisation de conservateurs dans les produits finis peut induire des effets indésirables chez l'homme. Leur capacité à modifier le vivant les rend, à hautes doses, très souvent toxiques et c'est pourquoi de nouveaux conservateurs sont sans cesse développés et mis sur le marché. C'est dans cette optique qu'a été commercialisé dans les années 80 une nouvelle famille de conservateurs les Kathon<sup>®</sup>.<sup>5</sup>

### I.2. Le Kathon<sup>®</sup> : un mélange de MI et de MCI

La *N*-méthylisothiazolin-3-one **1** (MI) et la 5-chloro-*N*-méthylisothiazolin-3-one **2** (MCI) sont les deux principes actifs des Kathon<sup>®</sup> (Figure 1). Ce conservateur, commercialisé par Rohm & Haas avait été prévu pour remplacer les libérateurs de formaldéhyde bien connus pour leurs propriétés sensibilisantes. Aujourd'hui, le Kathon<sup>®</sup> est présent dans de nombreuses formulations allant des produits cosmétiques aux détergents industriels, en passant par les lingettes nettoyantes.<sup>6</sup>



*N*-méthylisothiazolin-3-one (MI)



5-chloro-*N*-méthylisothiazolin-3-one (MCI)

Figure 1 : Structures chimique de la MI et de la MCI, constituants actifs du Kathon<sup>®</sup>.

Les formulations du Kathon<sup>®</sup> sont diverses. Dans le cas du Kathon CG<sup>®</sup> (Cosmetic Grade) par exemple, utilisé dans les produits cosmétiques, le rapport MCI/MI est de 3/1. La différenciation entre les divers conservateurs contenant des isothiazolinones se fait généralement par les quantités de sels utilisés dans leur formulation, soit par exemple 23 %

de sels de magnésium pour le Kathon® CG et 1,4-2,7 % de sels de magnésium et 0,15-0,17 % de nitrate de cuivre pour le Kathon® CG II.<sup>6,7</sup>

Comme conservateur le Kathon® présente de nombreux avantages. Il est incolore, inodore, présente un large spectre d'activité biocide, est formulé en solution aqueuse, résiste à une large gamme de pH, est efficace à faible concentration et il est convenable du point de vue environnemental (biodégradable, non persistant). Cependant, dès les années 1980, le caractère allergisant de ce conservateur a été mis en évidence et rapporté dans la littérature.<sup>8</sup> Aujourd'hui, en Europe, selon une étude récente de l'ESSCA (European Surveillance System on Contact Allergies), 2,7% des personnes suspectées d'avoir déclenché une dermatite de contact ont répondu positivement à un test épicutané contenant le mélange MI/MCI.<sup>9</sup>

Les deux isothiazolinones, MI et MCI, ont été reconnues comme étant les responsables majeurs des cas de sensibilisation au Kathon CG®. La 5-chloro-*N*-méthylisothiazolin-3-one **2**, a été classée comme un sensibilisant fort et la *N*-méthylisothiazolin-3-one **1**, comme un sensibilisant modéré selon le LLNA.<sup>10</sup> Il est à noter qu'une troisième isothiazolinone, la 4,5-dichloro-*N*-méthylisothiazolin-3-one **3** (MDI), présente dans le Kathon CG® sous forme d'une impureté formée lors de la synthèse du biocide (50-100 ppm) s'est révélée être également un sensibilisant fort.<sup>11, 12</sup>

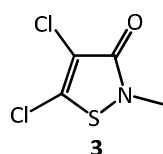


Figure 2 : Structure de la MDI, impureté du Kathon®.

Lors de sa mise sur le marché, l'utilisation de Kathon® CG dans les produits cosmétiques était limitée dans l'Union Européenne à une concentration de 30 ppm. Du fait des nombreux cas d'allergies à ce conservateur, la plupart des industriels utilisaient des concentrations encore inférieures. De nos jours, dans l'Union Européenne, la concentration en mélange MI/MCI est limitée à 15 ppm dans les produits cosmétiques. Cependant, la « Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association » recommande une concentration de 7,5 ppm maximum pour les

produits non-rincés comme les parfums ou les crèmes.<sup>13</sup> Néanmoins, un récent rapport du « Scientific Committee on Consumer Safety » à propos de MI/MCI a montré que la limite de concentration européenne actuelle ne permet pas d'éviter les réactions allergiques chez tous les patients et plus spécialement dans le cas d'utilisation de produits non-rincés.<sup>11, 14</sup>

L'allergie de contact au Kathon® a souvent été répertoriée comme étant majoritairement le résultat d'une sensibilisation à MCI. En effet, cette isothiazolinone est un allergène fort en comparaison à son homologue MI non-chloré qui est un allergène modéré. De plus, elle est présente dans le mélange à une concentration trois fois supérieure à celle de MI. C'est pourquoi aujourd'hui les industriels essaient de développer l'utilisation de MI uniquement en tant que conservateur. Déjà en 2004, le SCCNFP (The Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-food Products) avait émis une opinion selon laquelle l'utilisation de MI dans les produits cosmétiques jusqu'à une concentration de 100 ppm était considéré comme sans danger pour le consommateur.<sup>15</sup> Dès 2005, l'Union Européenne autorisa la commercialisation de produits cosmétiques et de produits ménagers contenant jusqu'à 100 ppm de MI. Cependant, selon une récente étude de Lundov et *al.*, cette dose, plus de 25 fois supérieure à celle du mélange MI/MCI, induit des réactions allergiques.<sup>16</sup>

### **I.3.Réactivité des isothiazolinones en tant que biocides**

Du fait de leur ample utilisation, les mécanismes d'action et la réactivité de ces isothiazolinones ont été étudiés.

Crow et Leonard ont été les premiers à s'intéresser aux propriétés chimiques intrinsèques des isothiazolinones menant à leurs propriétés biocides.<sup>17</sup> Par la suite, de nombreuses études ont permis de mettre en évidence l'existence d'un équilibre entre la forme cyclisée des isothiazolinones et celle résultant de l'ouverture du cycle par attaque nucléophile sur l'atome de soufre.<sup>18</sup>

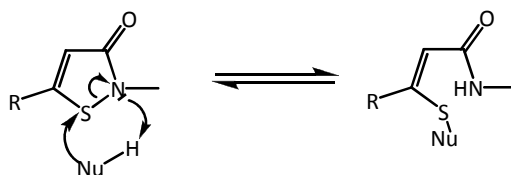
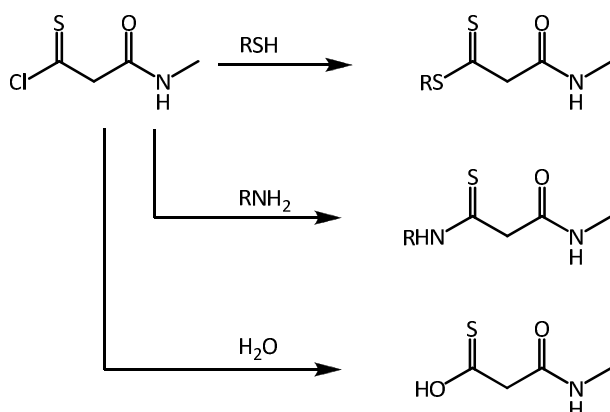
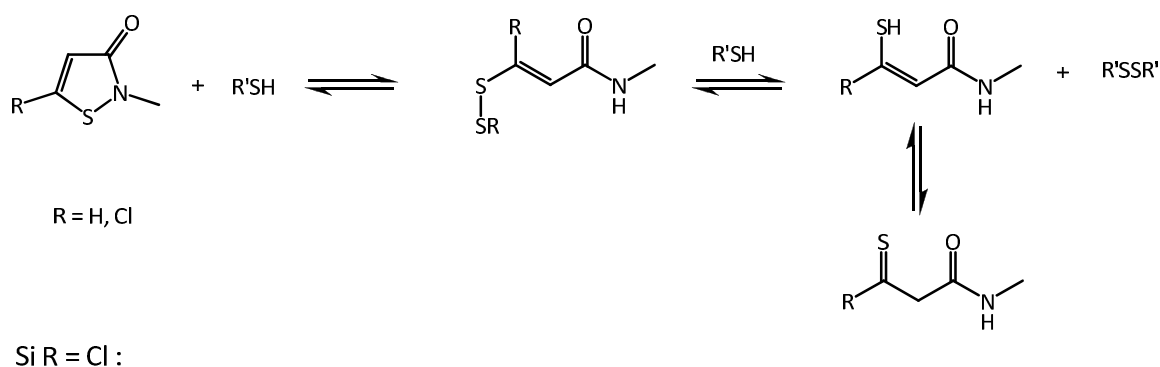


Figure 3 : Equilibre entre la forme cyclisée et la forme ouverte des isothiazolinones.

Déjà, dans les années 90, des mécanismes expliquant la réactivité des isothiazolinones avec les groupements thiols ont été proposés par Collier et *al.*. Les auteurs avaient proposé une suite de réactions de type électrophile-nucléophile pouvant expliquer la plus forte activité biocide de la MCI par rapport à celle de la MI (Figure 4).<sup>19</sup>

Figure 4 : Réactivité des isothiazolinones vis-à-vis des groupements thiols décrite par Collier et *al.* dans les années 90.<sup>19</sup>

Il s'agissait, en conséquence, des premières études montrant que la capacité des isothiazolinones à réagir avec les résidus nucléophiles des acides aminés pouvait expliquer leurs propriétés biocides. Beaucoup plus récemment, Williams a aussi montré qu'en

réagissant avec les résidus thiols des enzymes ou des protéines, MCI est capable de bloquer le fonctionnement de nombreuses enzymes nécessaires à la survie des microorganismes.<sup>20</sup> Enfin, il a été également montré que les produits résultant de la réactivité des isothiazolinones avec les groupements thiols pouvaient aisément subir des hydrolyses menant à différents acides (Figure 5). Ceux-ci avaient déjà été observés par Barman et Preston lors d'études sur la biodégradabilité du Kathon®.<sup>21</sup>

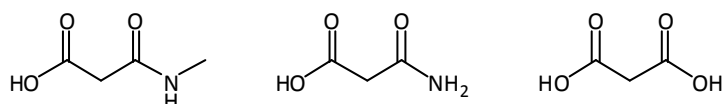


Figure 5 : Produits d'hydrolyse issus de la réactivité des isothiazolinones envers les groupements thiols.

## II. Synthèse de la MI et de la MCI marquées au carbone 13 en C4 et précédentes études

### II.1. Choix des positions de marquage

La nécessité pour le suivi des réactions avec les peptides par RMN d'introduire un marquage au carbone 13 sur le(s) site(s) réactif(s) de l'allergène implique de définir le carbone sur lequel il serait le plus avantageux d'introduire un marquage.

En étudiant les différentes positions potentiellement électrophiles de MI et de MCI, deux possibilités s'offrent à nous : un marquage sur la position 3 portant la fonction carbonyle, ou, un marquage sur la position 5 de Michael. Afin de suivre au mieux par RMN les modifications chimiques apportées à l'haptène par réaction avec les composés nucléophiles, il est généralement préférable de marquer au carbone 13 directement la ou les positions électrophiles réactives. Cependant, dans le cas de MCI les carbones électrophiles C3 et C5



sont quaternaires et Le marquage au carbone 13 sur ces positions ne donnerait pas beaucoup d'informations sur la structure des adduits obtenus par RMN et notamment par RMN hétéronucléaire bidimensionnelle  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ . En conséquence, nous avons finalement décidé d'introduire le marquage sur la position C4. En principe, le marquage sur cette position non-réactive n'offre pas directement d'informations sur les réactions potentielles qui seraient mises en jeu, mais est suffisamment proche des sites réactifs électrophiles pour qu'une modification chimique des positions 3 ou 5 influe directement sur le déplacement chimique du carbone C4 qui de plus, porte un hydrogène.

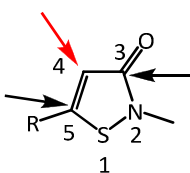
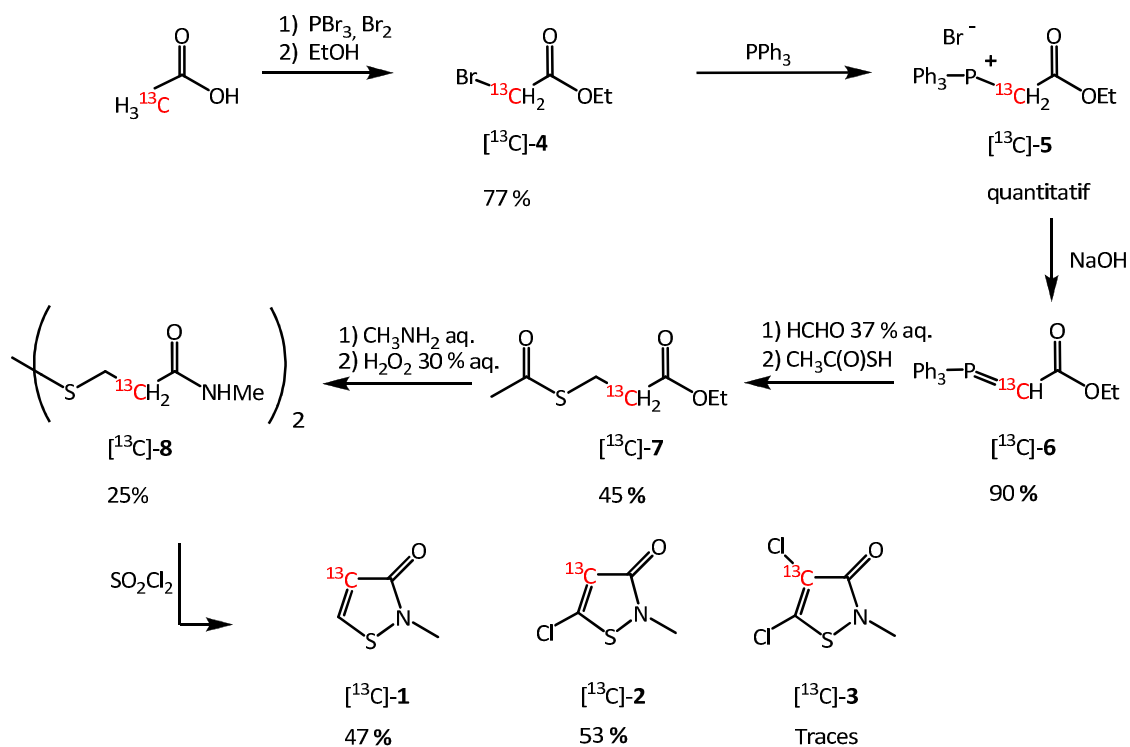


Figure 6 : Sites potentiels de marquage au  $^{13}\text{C}$  des isothiazolinones.

## II.2. Synthèse de MI et de MCI marquées en C4

Une synthèse avec introduction d'un marquage au carbone 13 au niveau du carbone C4 de MI et de MCI a été développée précédemment au laboratoire lors d'études visant à déterminer la réactivité de ces deux molécules séparément vis-à-vis de différents peptides modèles.<sup>22, 23</sup> Dans le cadre de ce travail de thèse, cette synthèse a été reproduite dans un premier temps en série non marquée, afin de se familiariser avec les différentes réactions mises en jeu, puis a été effectuée, dans un second temps, en série marquée. Ainsi, la Figure 7 montre la voie synthétique empruntée pour l'obtention de la 4- $^{13}\text{C}$ -N-méthylisothiazolin-3-one  $^{13}\text{C}$ -1 et de la 4- $^{13}\text{C}$ -5-chloro-N-méthylisothiazolin-3-one  $^{13}\text{C}$ -2.

Figure 7 : Synthèse des isothiazolinones  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$  et  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$ .

La première étape de cette synthèse consiste en une réaction d'Hell-Volhard-Zelinsky sur l'acide acétique marqué au carbone 13 sur la position 2, suivie d'une estérification en « un pot » pour former le 2- $[^{13}\text{C}]$ -bromoacétate d'éthyle  $[^{13}\text{C}]\text{-4}$  avec un rendement de 77%.<sup>24</sup> Ce composé est ensuite traité par de la triphénylphosphine dans de l'acétate d'éthyle pour former quantitativement le bromure de 1- $[^{13}\text{C}]$ -(2-éthoxy-2-oxoéthyl)triphénylphosphonium  $[^{13}\text{C}]\text{-5}$ . Après déprotonation de ce dernier en milieu basique, le 1- $[^{13}\text{C}]$ -(triphénylphosphoranylidène)acétate d'éthyle  $[^{13}\text{C}]\text{-6}$  est obtenu avec un rendement de 90%. Ce composé subit alors une réaction de Wittig en présence de formaldéhyde aqueux, puis l'acrylate d'éthyle formé est mis en réaction en « un pot » avec de l'acide thioacétique. Il en résulte la formation du 2- $[^{13}\text{C}]$ -3-(acétylthio)-propanoate d'éthyle  $[^{13}\text{C}]\text{-7}$ , obtenu avec un rendement de 30%. L'ajout de méthanamine sur  $[^{13}\text{C}]\text{-7}$  permet non seulement la conversion de la fonction ester en fonction amide mais également l'obtention d'une fonction thiol par coupure au niveau du groupement thioester. La présence ultérieure de peroxyde d'hydrogène dans le milieu permet l'oxydation de la fonction thiol et la formation d'une liaison disulfure. Le 2,2'- $[^{13}\text{C}]$ -3,3'-dithiobis-(*N*-méthylpropionamide)  $[^{13}\text{C}]\text{-8}$  est ainsi obtenu avec un rendement de 25%. La dernière étape de cette synthèse consiste en une fermeture

hétérocyclique oxydante de [ $^{13}\text{C}$ ]-**8** en présence de chlorure de sulfuryle. La proportion des différentes isothiazolinones obtenues ([ $^{13}\text{C}$ ]-**1**, [ $^{13}\text{C}$ ]-**2**, [ $^{13}\text{C}$ ]-**3**) dépend directement de la quantité d'agent de chloration utilisée ainsi que du temps de réaction. Il a été ainsi possible de contrôler ces conditions réactionnelles afin de n'obtenir que les isothiazolinones souhaitées [ $^{13}\text{C}$ ]-**1** et [ $^{13}\text{C}$ ]-**2** avec des rendements avoisinant 50 % pour chacune d'entre elles. Le rendement global de cette synthèse est de 2 % pour [ $^{13}\text{C}$ ]-**1** ainsi que pour [ $^{13}\text{C}$ ]-**2**.

### II.3. Précédentes études de réactivité

La réactivité des isothiazolinones MI et MCI vis-à-vis des peptides modèles i.e : Pep-Cys et Pep-Lys ainsi que du glutathion a été étudiée, dans le cadre du développement de méthodes dites « alternatives » pour la détection d'allergènes basées sur la réactivité peptidique par Mutschler et *al.*<sup>23</sup> Ainsi, les mécanismes principaux par lesquels les isothiazolinones MI et MCI interagissent avec ces peptides ont été élucidés. La Figure 8 récapitule les adduits formés par réaction des isothiazolinones avec les différents peptides étudiés.

Lors de ces études, deux types de conditions expérimentales avaient été utilisées. L'une en employant un excès d'haptène par rapport au peptide afin de représenter les conditions expérimentales du DPRA. La seconde utilisant un excès de peptide par rapport à l'haptène afin de mimer les conditions physiologiques. Il est à noter que les proportions relatives de ces différents adduits diffèrent selon les conditions de réaction (excès de nucléophile ou d'électrophile).

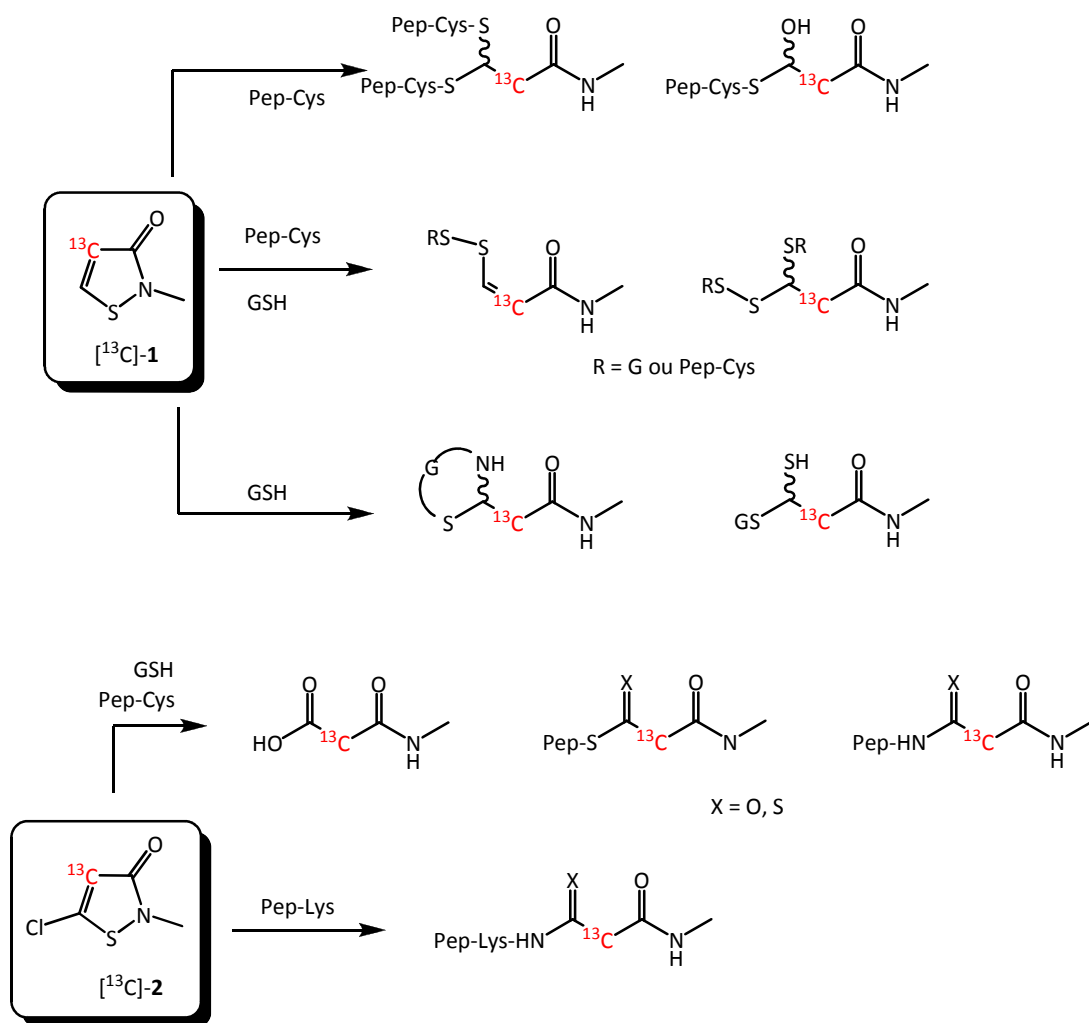


Figure 8 : Réactivité de  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$  et de  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$  vis-à-vis de Pep-Cys, de Pep-Lys et de GSH mise en évidence par Mutchler et al.<sup>23</sup>

### III. Réactivité du mélange MI/MCI ( $[^{13}\text{C}]$ -1/ $[^{13}\text{C}]$ -2) vis-à-vis des peptides modèles et du glutathion.

#### III.1. Méthodologie

Afin d'évaluer au mieux la différence de réactivité entre les deux isothiazolinones  $[^{13}\text{C}]$ -1 et  $[^{13}\text{C}]$ -2 lorsqu'elles sont présentes dans un mélange, nous avons travaillé avec un mélange de ces deux composés en proportions équimolaires. Le mélange a alors été mis en réaction avec un équivalent de glutathion ou de peptide modèle.

D'un point de vue pratique, les isothiazolinones ont été dissoutes dans 200  $\mu\text{L}$  d'acétonitrile deutéré, puis mises en réaction avec le peptide précédemment dissout dans 400  $\mu\text{L}$  d'eau dans le cas du glutathion, de tampon phosphate pH = 7,4 dans le cas du peptide cystéine ou de tampon acétate d'ammonium pH = 10,2 dans le cas du peptide lysine. Ensuite, la réactivité a été suivie par RMN monodimensionnelle du  $^{13}\text{C}$  puis, des expériences de RMN bidimensionnelles  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  ont permis d'établir les structures des composés/adduits formés. Les déplacements chimiques obtenus, ainsi que les corrélations hétéronucléaires observées lors de ces études, ont été comparés aux valeurs décrites dans la littérature et à celles établies par des logiciels de prédictions de RMN (ACDLabs et Chemoffice). L'élucidation des structures des composés/adduits formés nous a permis, par la suite, de suggérer des mécanismes de réaction pouvant expliquer de leur formation. De plus, nous avons procédé à l'analyse de la réactivité du point de vue de la cinétique. Ces études ont été réalisées à l'aide de la méthode dite des intensités relatives (Figure 9). Cette méthode est basée sur l'utilisation d'une référence interne, dans notre cas le *tertio*-butanol, dont le signal de RMN ne perturbe ni les signaux de RMN caractéristiques des molécules étudiées, ni ceux des composés/adduits formés. De plus, cette référence a l'avantage d'être inerte dans le milieu réactionnel.

Nous avons donc comparé l'intensité d'un signal de RMN caractérisant une molécule dont la quantité dans le milieu réactionnel peut varier et celle du signal de RMN d'une référence

interne qui devrait rester fixe dans les conditions d'étude. Cette méthode permet d'atténuer les fluctuations, dues aux expériences, des intensités observées. En faisant le rapport de l'intensité du signal de RMN de la molécule étudiée sur celle de la référence, une intensité relative est obtenue. Celle-ci, une fois ramenée à un pourcentage, reflète la quantité de cette molécule présente dans le milieu.

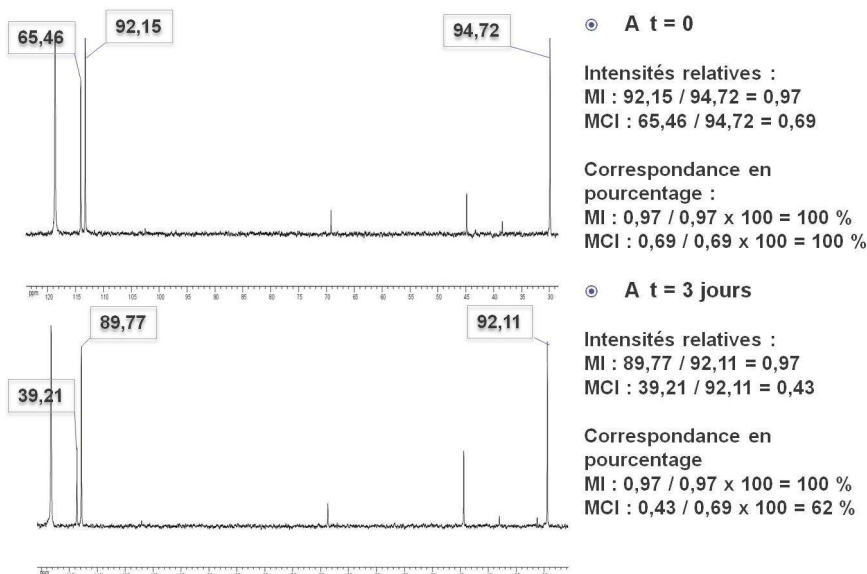


Figure 9 : Exemple de la méthode des intensités relatives dans le cas de l'étude de la réactivité d'un mélange MI/MCI en présence de Pep-Cys.

Dans l'exemple illustré Figure 9, les intensités de MI, de MCI et de la référence interne (*tertio*-butanol) sont, lors de la première expérience à ( $t = 0$ ), de 92,15, de 65,46 et de 94,72 respectivement. L'intensité relative de MI est donc de  $92,15 / 94,72 = 0,97$ , et celle de MCI est de  $65,46 / 94,72 = 0,69$ . Ces intensités relatives étant calculées à  $t = 0$  correspondent nécessairement à la quantité maximale de MI et de MCI. Pour des soucis de lisibilité des graphiques obtenus lors de ces différentes études cinétiques, ces intensités relatives sont ramenées à un pourcentage. Toujours dans le cas de cette première expérience, les pourcentages de MI et de MCI sont calculés de la manière suivante :  $0,97 / 0,97 \times 100 = 100 \%$  pour MI et  $0,69 / 0,69 \times 100 = 100 \%$  pour MCI. Lors des expériences suivantes, les intensités relatives seront calculées de la même façon, et les quantités seront calculées en pourcentages par rapport aux intensités relatives obtenues lors de la première expérience.

Ainsi, lors de la seconde expérience après trois jours de réaction, les intensités de MI, de MCI et de la référence interne sont de 89,77, de 39,21 et de 92,11 respectivement. Les intensités relatives sont en conséquence de 0,97 pour MI et de 0,43 pour MCI. Les pourcentages calculés par rapport aux quantités initiales sont donc de 100 % pour MI et de 63 % pour MCI. À la vue de cet exemple, il peut être remarqué que les intensités de MI et de la référence interne ont toutes les deux diminué lors de la seconde expérience contrairement à l'intensité relative de MI qui elle est restée la même. Cette méthode permet donc bien d'atténuer les fluctuations d'intensités dues aux expériences elles-mêmes.

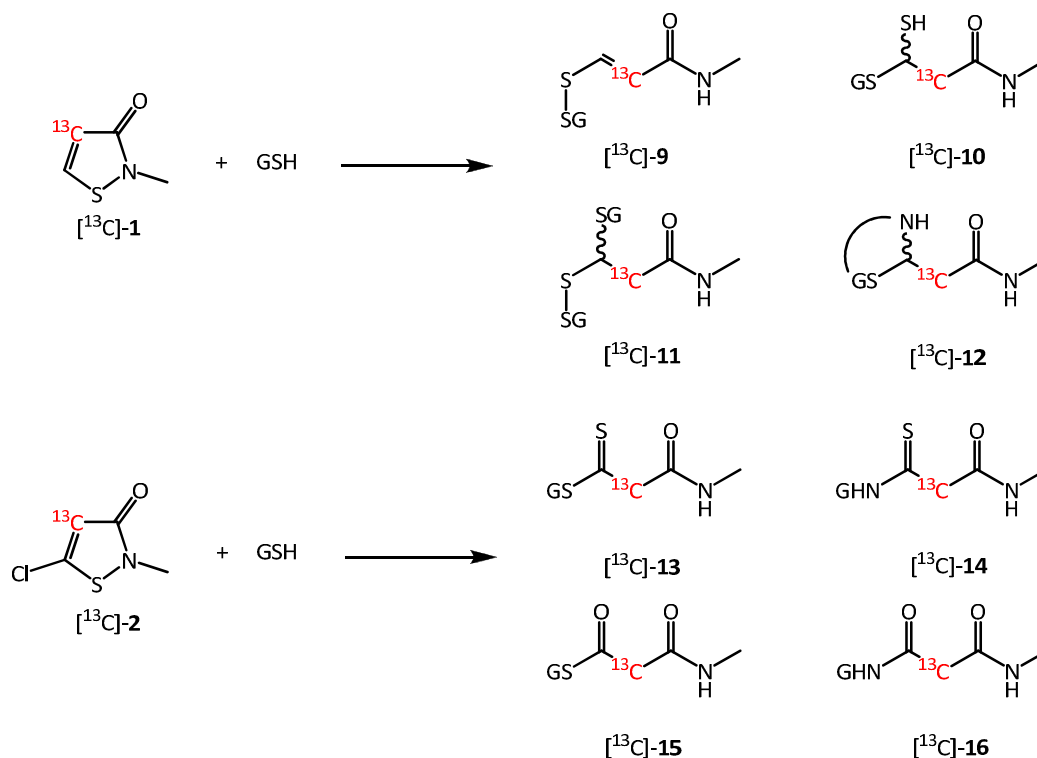
Il est également important de noter deux autres points concernant la méthodologie utilisée lors de ces études. Tout d'abord, la technique de la RMN ne permet pas toujours l'identification de certaines espèces ayant une durée de vie trop courte (il sera en effet peu probable, dans les conditions d'études, d'observer par exemple la formation d'un chlorure d'acyle qui s'hydrolysera en acide ou réagira rapidement avec un nucléophile présent). D'autre part, bien que les échantillons aient été préparés à temps  $t = 0$ , il se passera un certain temps entre la préparation de l'échantillon et l'enregistrement du premier spectre de RMN. Il est donc possible qu'au moment de l'enregistrement du premier spectre au temps que nous appelons  $t = 0$ , une certaine réactivité de la molécule étudiée soit déjà observée.

## III.2. Réactivité du mélange [ $^{13}\text{C}$ ]-1/[ $^{13}\text{C}$ ]-2 vis-à-vis du glutathion

### III.2.1. Aspects mécanistiques

Dans un premier temps, nous avons étudié la réactivité de chaque isothiazolinone individuellement vis-à-vis du glutathion en proportions équimolaires. Cette étude préliminaire a eu pour but de déterminer les déplacements chimiques caractéristiques des différents adduits susceptibles de se former. Ces déplacements chimiques ont été comparés à ceux observés lors des études conduites par Mutschler et *al.*<sup>23</sup> Les résultats obtenus sont

rapportés dans la Figure 10 et concordent avec ceux obtenus lors des études de précédentes.



Molécule	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	Molécule	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
$[^{13}\text{C}]\text{-1}$	112,8	$[^{13}\text{C}]\text{-2}$	113,6
$[^{13}\text{C}]\text{-9}$	117,7	$[^{13}\text{C}]\text{-13}$	57,2
$[^{13}\text{C}]\text{-10}$	45,2	$[^{13}\text{C}]\text{-14}$	48,5
$[^{13}\text{C}]\text{-11}$	40,9	$[^{13}\text{C}]\text{-15}$	50,1
$[^{13}\text{C}]\text{-12}$	40,5	$[^{13}\text{C}]\text{-16}$	41,2

Figure 10 : Réactivité individuelle de  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$  et de  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$  vis-à-vis du GSH : adduits formés et déplacements chimiques caractéristiques ( $\delta$ ).

Lorsque les études ont été réalisées avec le mélange  $[^{13}\text{C}]\text{-1}/[^{13}\text{C}]\text{-2}$ , Certains adduits observés dans les études conduites de façon individuelle ont été observés. Cependant, les expériences ayant été effectuées en proportions équimolaires de  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$ , de  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$  et de glutathion, seuls certains adduits de  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$  ont pu être détectés, la presque totalité du glutathion ayant été consommé par  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$ . Dans les conditions expérimentales utilisées lors de ces études, le déplacement chimique du carbone marqué de  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$  est de 112,8 ppm et celui de  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$  est de 113,6 ppm.



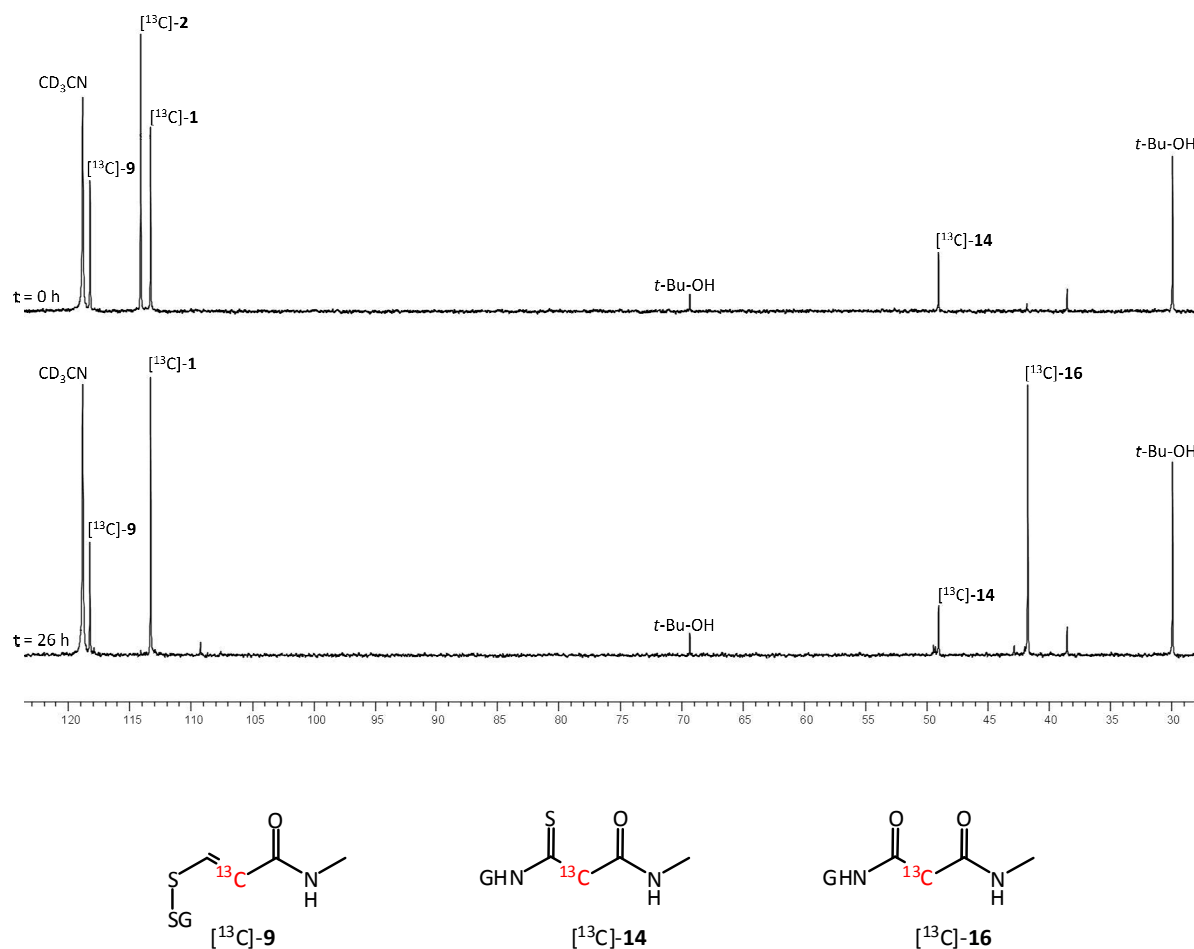


Figure 11 : Spectres de RMN de la réaction  $[^{13}\text{C}]\text{-1}/[^{13}\text{C}]\text{-2}/\text{GSH}$  à 0 et à 26 heures et structures des adduits observés.

Dès la première expérience de RMN, en plus des deux signaux attendus à 112,8 ppm et à 113,6 ppm, deux signaux, à 117,7 ppm et à 48,5 ppm, correspondant respectivement à un adduit de chaque isothiazolinone avec le glutathion ont été observés.  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$  réagit rapidement avec le glutathion pour former un adduit  $[^{13}\text{C}]\text{-9}$  de type acrylamide, issu de l'ouverture de cycle de  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$  par l'attaque nucléophile du groupement thiol du glutathion sur l'atome de soufre de  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$ .  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$  forme, dans ces conditions, un adduit  $[^{13}\text{C}]\text{-14}$  de type thioamide. Au bout de 26 heures, le signal du carbone marqué de  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$  à 113,6 ppm a totalement disparu et un nouveau signal à 41,2 ppm apparaît. Il correspond à la formation d'un adduit de type amide  $[^{13}\text{C}]\text{-16}$  provenant de l'hydrolyse du thioamide  $[^{13}\text{C}]\text{-14}$ .

Ces adduits observés sont en accord complet avec les mécanismes de réaction proposés par Mutschler et *al.*<sup>23</sup> Dans le cas de  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$ , les adduits  $[^{13}\text{C}]\text{-14}$  et  $[^{13}\text{C}]\text{-16}$  ont été décrits

comme étant des produits de réaction issus de l'attaque nucléophile de l'amine libre du glutathion sur le chlorure de thioacyle  $[^{13}\text{C}]\text{-18}$ , lui-même issu de l'ouverture du cycle de  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$  par le groupement thiol de ce peptide.

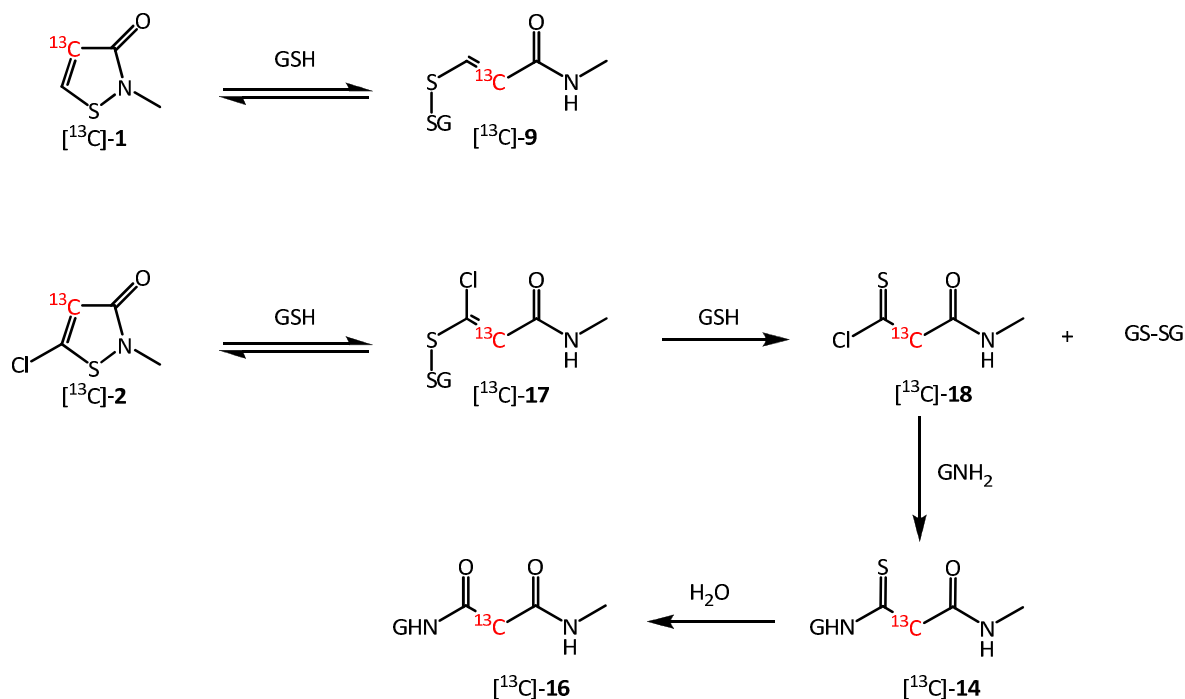


Figure 12 : Mécanismes proposés pour la formation d'adduits issus de la réaction  $[^{13}\text{C}]\text{-1}/[^{13}\text{C}]\text{-2}/\text{GSH}$ .

Le fait que MI soit moins réactif que MCI vis-à-vis de ce peptide pourrait s'expliquer par la différence de réactivité entre  $[^{13}\text{C}]\text{-9}$  et  $[^{13}\text{C}]\text{-17}$ . En effet, seul  $[^{13}\text{C}]\text{-17}$  peut engendrer le chlorure d'acyle  $[^{13}\text{C}]\text{-18}$  qui mènera à la formation des adduits observés  $[^{13}\text{C}]\text{-14}$  et  $[^{13}\text{C}]\text{-16}$ .

Il a pu être constaté qu'après 26 heures de réaction  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$  a totalement réagit avec le glutathion, alors qu'après ce temps la quantité de  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$  présente en solution reste encore considérable. En conséquence, il nous a semblé intéressant de compléter ces résultats par une étude de la cinétique des réactions mises en jeu.

### III.2.2. Aspects cinétiques

Pour le suivi de la cinétique de cette réaction, une expérience de RMN du  $^{13}\text{C}$  a été effectuée toutes les deux heures sur une durée totale de 64 heures. Une courbe a alors été tracée représentant les intensités relatives des deux isothiazolinones  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$  et  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$  en fonction du temps de réaction.

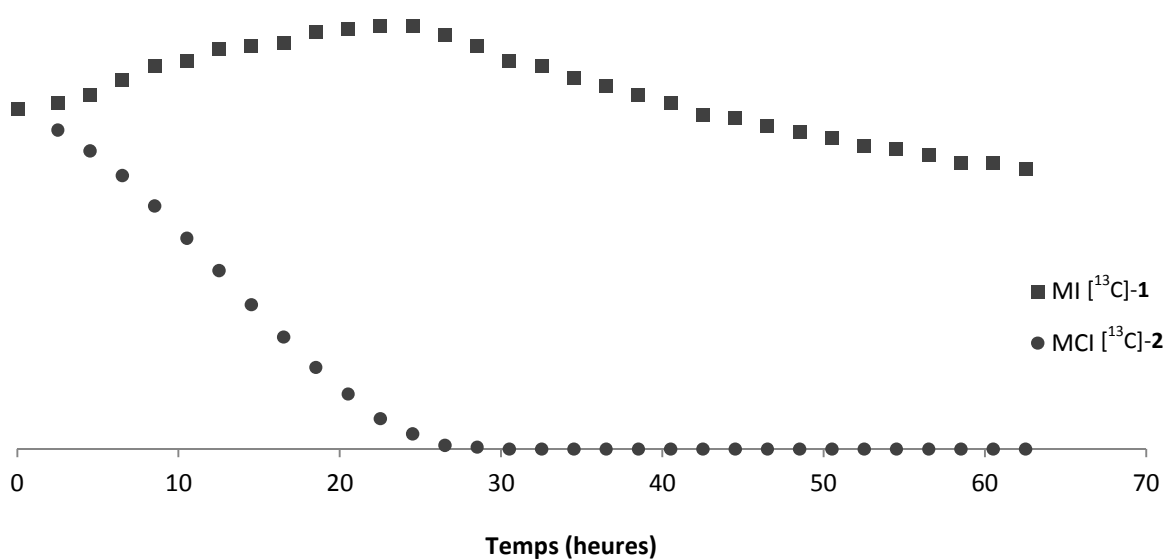


Figure 13 : Courbe représentant la variation de l'intensité relative des signaux de  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$  et de  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$  par rapport à la référence interne lors de la réaction  $[^{13}\text{C}]\text{-1}/[^{13}\text{C}]\text{-2}/\text{GSH}$ .

Il est intéressant de remarquer que l'intensité relative de  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$  augmente sensiblement au cours du temps jusqu'à atteindre 20 % approximativement de plus que l'intensité initiale ce qui indique que lors du premier enregistrement une partie de  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$  avait déjà réagi. Ceci s'explique par la première étape de réaction des isothiazolinones envers les groupements thiols qui consiste en l'ouverture de cycle menant aux composés  $[^{13}\text{C}]\text{-9}$  pour  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$  et  $[^{13}\text{C}]\text{-17}$  pour  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$  (Figure 12). La formation de ces composés est soumise à un équilibre pouvant être déplacé par la consommation de glutathion par l'une ou l'autre des espèces. Lorsque  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$  et  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$  sont ensemble dans un mélange, la formation rapide d'adduits stables entre  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$  et le glutathion implique en effet un déplacement de l'équilibre existant entre  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$  et le peptide vers la fermeture de cycle, ce qui peut expliquer l'augmentation

d'intensité observée au cours du temps pour  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$ . Ceci confirme qu'une partie de  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$  était déjà sous forme ouverte lors du premier enregistrement RMN.

Afin de résoudre ce problème et d'ainsi permettre une meilleure compréhension de cette étude cinétique, les intensités de la forme ouverte et de la forme cyclisée de  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$  ont été additionnées afin de déterminer une intensité relative reflétant au plus juste la disparition de  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$  au profit de la formation d'adduits stables. Cette somme des intensités peut être justifiée par le fait que la nature ( $\text{sp}^2$ ) ainsi que l'environnement chimique des carbones marqués des molécules  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$  et  $[^{13}\text{C}]\text{-9}$  sont très proches et il semblerait alors raisonnable de pouvoir négliger la différence entre leurs temps de relaxation. Une fois cette approximation faite, la nouvelle intensité relative, convertie en pourcentage, correspond à la quantité totale de  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$  disponible pour former des adduits stables avec le glutathion. La nouvelle courbe obtenue après cette correction et représentant les pourcentages de  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$  et de  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$  présents en solution en fonction du temps de réaction avec le glutathion est montrée dans la Figure 14.

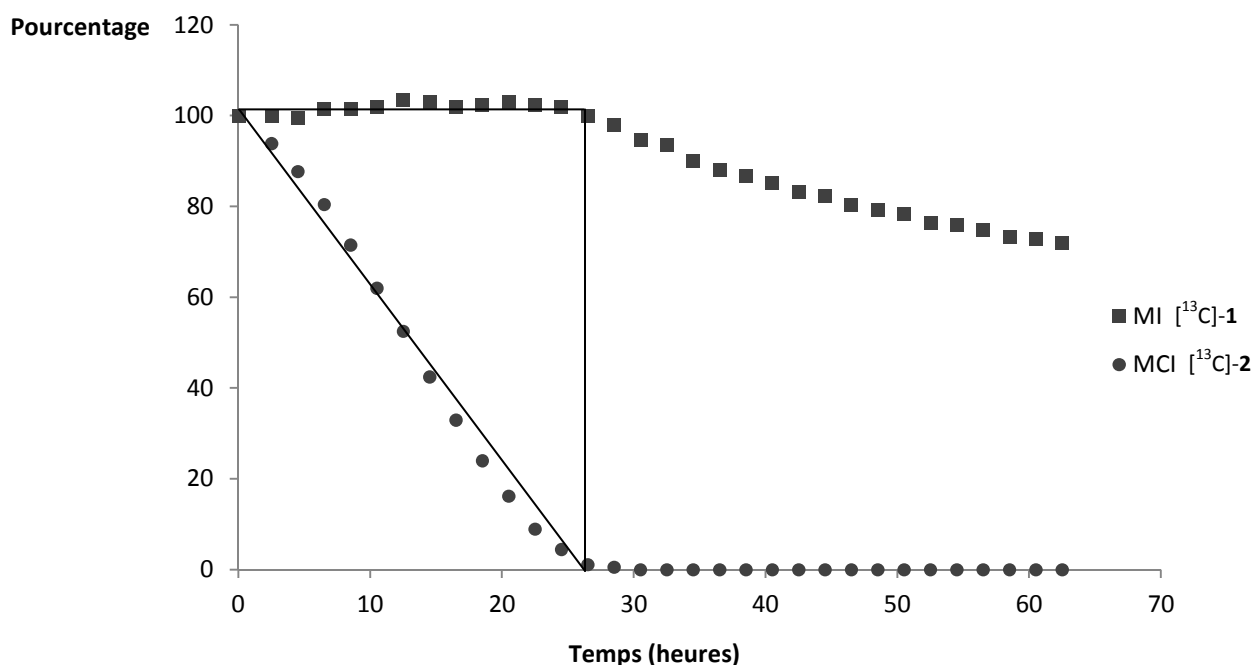


Figure 14 : Courbe représentant l'évolution avec le temps de la concentration de  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$  et de  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$  lors de la réaction  $[^{13}\text{C}]\text{-1}/[^{13}\text{C}]\text{-2}/\text{GSH}$ , après correction des intensités relatives correspondant à  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$ .

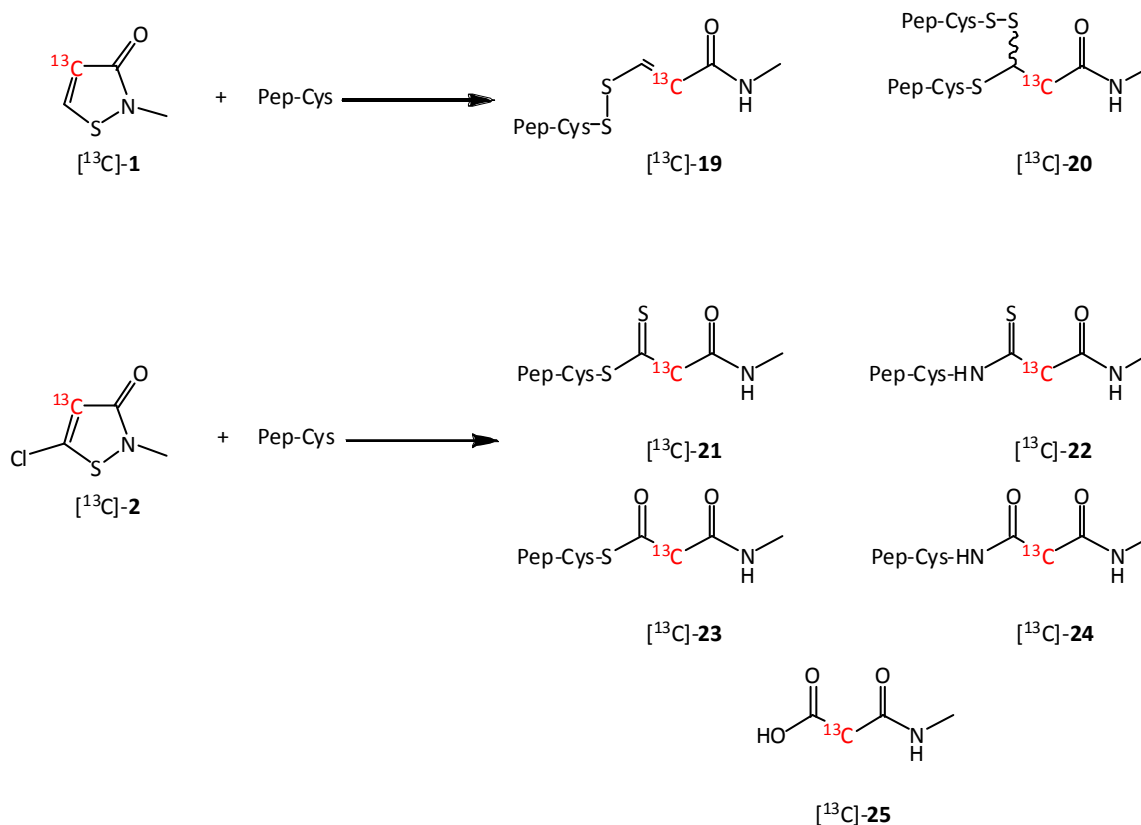
Cette courbe montre deux zones distinctes. Dans un premier temps, entre 0 et 26 heures, la réactivité du mélange  $[^{13}\text{C}]\text{-1}/[^{13}\text{C}]\text{-2}$  vis-à-vis du glutathion est principalement due à la présence de  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$ . En effet, il est intéressant de noter que dans cet intervalle de temps, seule la  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$  est consommée alors que la réactivité de  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$  semble ne pas suivre d'évolution notable avec le temps. Le mélange  $[^{13}\text{C}]\text{-1}/[^{13}\text{C}]\text{-2}$  semble en conséquence se comporter, dans ces conditions expérimentales, et dans cet intervalle de temps comme si  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$  était seule en solution avec le glutathion. Au bout de 26 heures, lorsque la totalité de  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$  a réagit, la quantité de  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$  présente dans le milieu commence lentement à décroître. Cependant, il n'a pas été possible de déterminer l'origine de cette consommation, car aucun nouveau signal de RMN n'est apparu dans les spectres durant cet intervalle de temps.

Enfin, il est intéressant de noter qu'au bout du temps de lecture du DPRA (24 H), les quantités de MI et de MCI dans le milieu sont approximativement de 100 % et de 5 % respectivement.

### III.3. Réactivité du mélange $[^{13}\text{C}]\text{-1}/[^{13}\text{C}]\text{-2}$ vis-à-vis du Pep-Cys

#### III.3.1. Aspects mécanistiques

L'étude de la réactivité individuelle des deux isothiazolinones avec le peptide cystéine (Pep-Cys) en quantité équimolaire a montré la formation de plusieurs adduits. Ces adduits et leurs déplacements chimiques caractéristiques du carbone 13 sont répertoriés dans la Figure 15.



Molécule	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	Molécule	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
$[^{13}\text{C}]\text{-1}$	112,8	$[^{13}\text{C}]\text{-2}$	113,6
$[^{13}\text{C}]\text{-19}$	120,5	$[^{13}\text{C}]\text{-21}$	57,7
$[^{13}\text{C}]\text{-20}$	42,5	$[^{13}\text{C}]\text{-22}$	53,7
		$[^{13}\text{C}]\text{-23}$	50,4
		$[^{13}\text{C}]\text{-24}$	41,5
		$[^{13}\text{C}]\text{-25}$	44,4

Figure 15 : Réactivité individuelle de  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$  et de  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$  vis-à-vis du Pep-Cys : adduits formés et déplacements chimiques caractéristiques ( $\delta$ ).

Lors de l'étude de la réactivité du mélange  $[^{13}\text{C}]\text{-1}/[^{13}\text{C}]\text{-2}$  avec le peptide cystéine (1 équivalent), les expériences de RMN mono et bidimensionnelles ont montré la formation d'un produit unique. Le déplacement chimique à 44,4 ppm correspond à l'acide  $[^{13}\text{C}]\text{-25}$ , également observé lors de la mise en réaction de  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$  avec le même peptide. D'autre part, aucun adduit issu de  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$  n'a été observé lors de ces expériences.

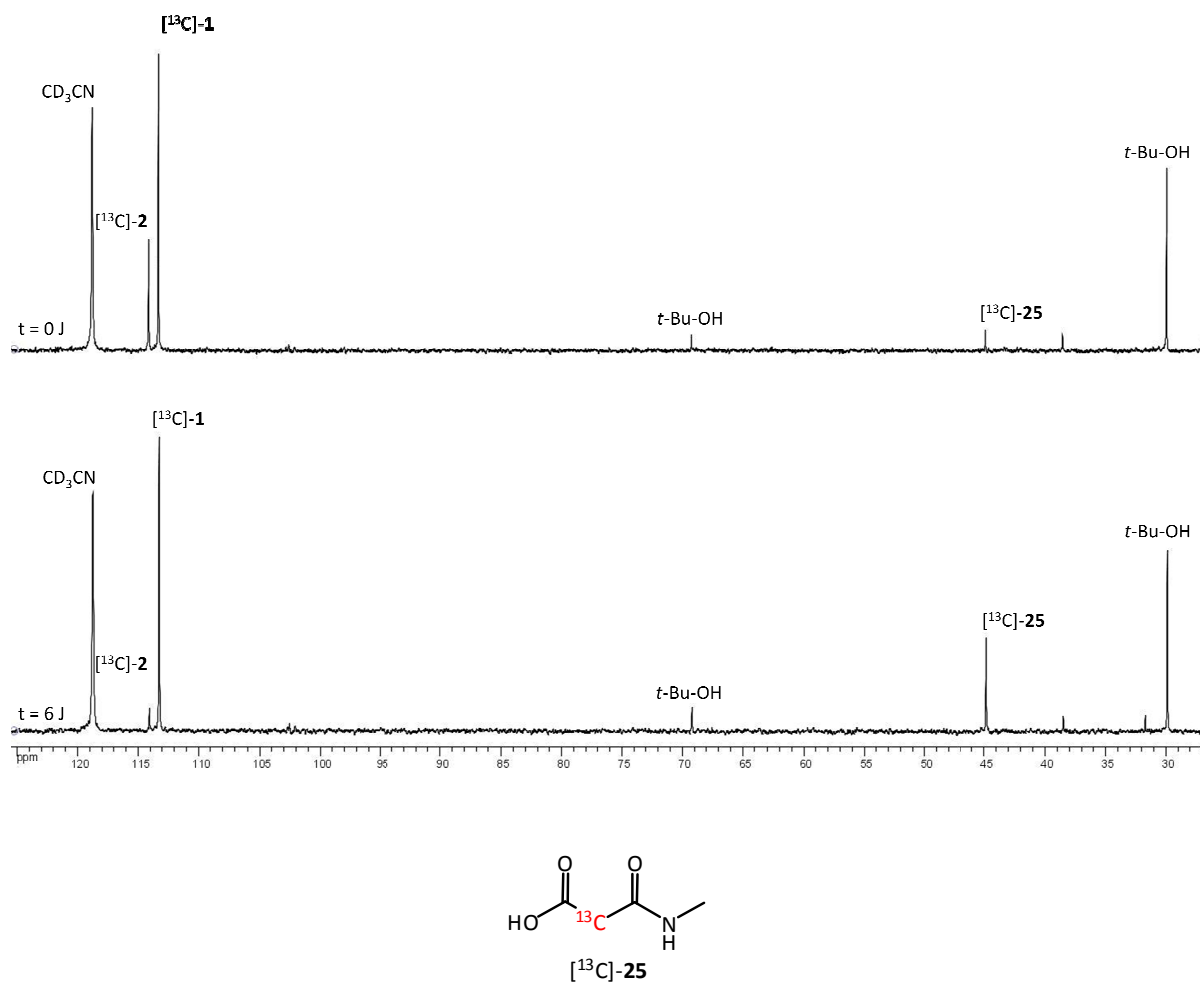


Figure 16 : Spectres de RMN de la réaction  $[^{13}\text{C}]\text{-1}/[^{13}\text{C}]\text{-2}/\text{Pep-Cys}$  à 0 et à 6 jours et structure du seul produit de réaction observé.

Le mécanisme par lequel  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$  réagit avec le peptide cystéine est comparable à celui observé lors des études de la réactivité de cette isothiazolinone avec le glutathion (Figure 17).

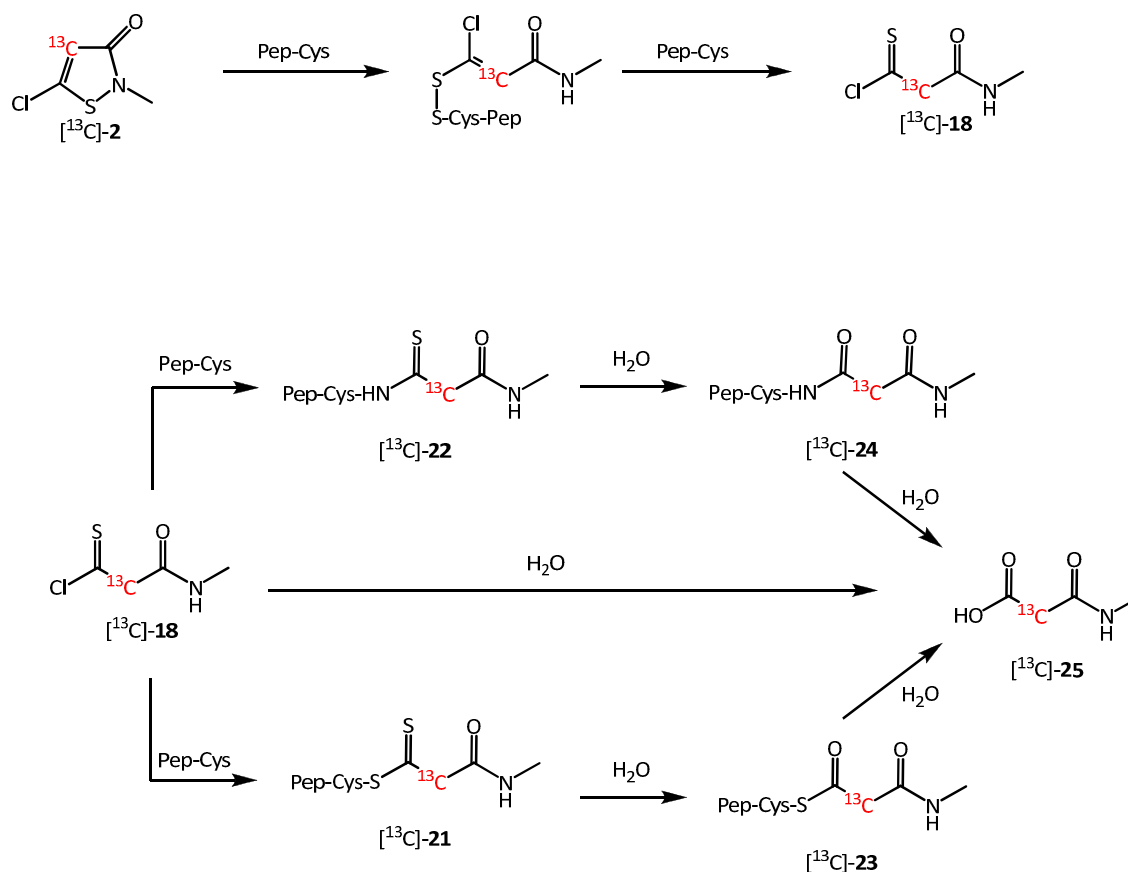


Figure 17 : Mécanismes proposés pour la formation d'adduits issus de la réaction  $[^{13}\text{C}]\text{-2/Pep-Cys}$ .

La formation du chlorure de thioacyle  $[^{13}\text{C}]\text{-18}$  provient de l'ouverture de cycle de  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$  suite à l'attaque nucléophile du groupement thiol du peptide sur l'atome de soufre. Ce chlorure de thioacyle  $[^{13}\text{C}]\text{-18}$  peut mener aux adduits  $[^{13}\text{C}]\text{-21}$  et  $[^{13}\text{C}]\text{-22}$  par attaque nucléophile du groupement libre thiol ou amine du peptide cystéine respectivement. Ces deux composés vont mener ensuite par des hydrolyses successives à la formation du seul composé observé lors de cette étude, l'acide  $[^{13}\text{C}]\text{-25}$ . Cependant, cet acide peut également se former par hydrolyse directe du composé  $[^{13}\text{C}]\text{-18}$ . Selon le mécanisme, l'apparition du signal de RMN caractéristique de  $[^{13}\text{C}]\text{-25}$  à 44,4 ppm implique nécessairement la formation préalable des adduits  $[^{13}\text{C}]\text{-21}$  et/ou  $[^{13}\text{C}]\text{-22}$ . Dans les conditions expérimentales où nous avons mené ces études,  $[^{13}\text{C}]\text{-21}$  et  $[^{13}\text{C}]\text{-22}$  n'ont pas été observés dans les spectres de RMN. En effet, il a été montré dans des études précédentes que ces adduits ne sont observés que dans le cas où le peptide se trouve en large excès (10 équivalents) dans le milieu réactionnel.<sup>23</sup>



### III.3.2. Aspects cinétiques

La Figure 18 représente les pourcentages de  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$  et de  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$  présents dans le milieu réactionnel en fonction du temps lors de la réaction du mélange avec le peptide cystéine.

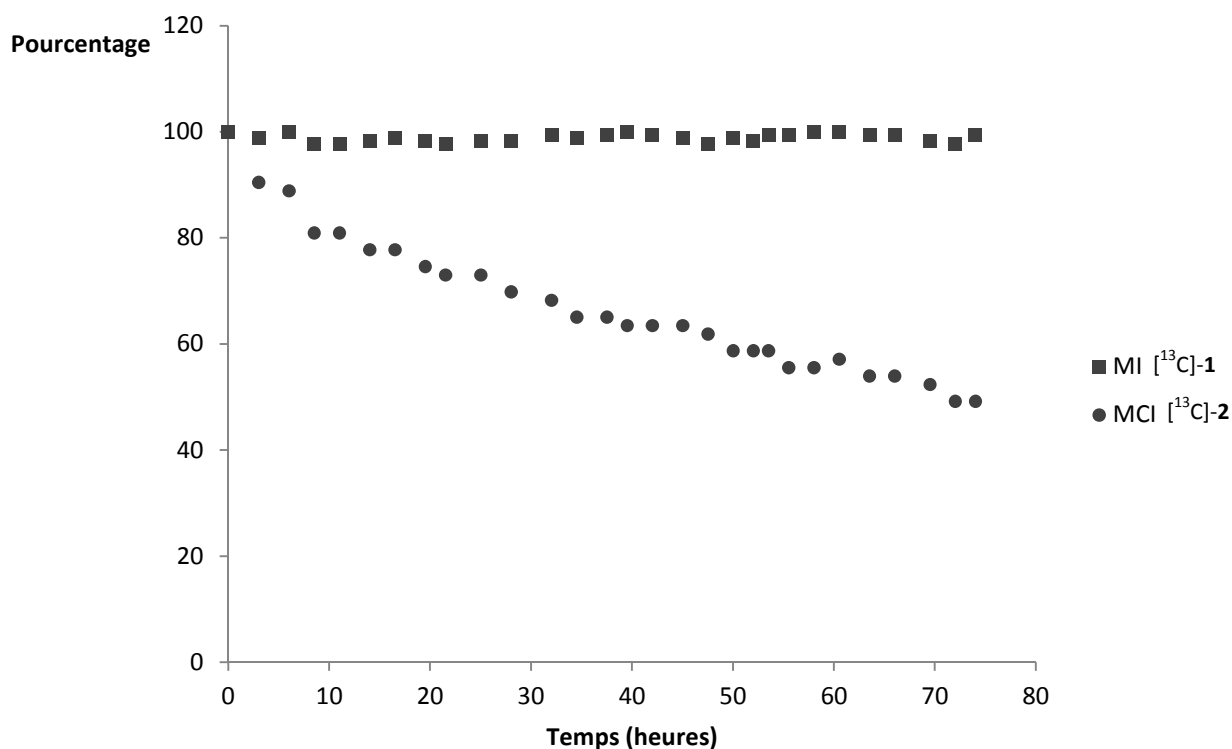


Figure 18 : Courbe représentant l'évolution avec le temps de la concentration de  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$  et de  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$  lors de la réaction  $[^{13}\text{C}]\text{-1}/[^{13}\text{C}]\text{-2}/\text{Pep-Cys}$ .

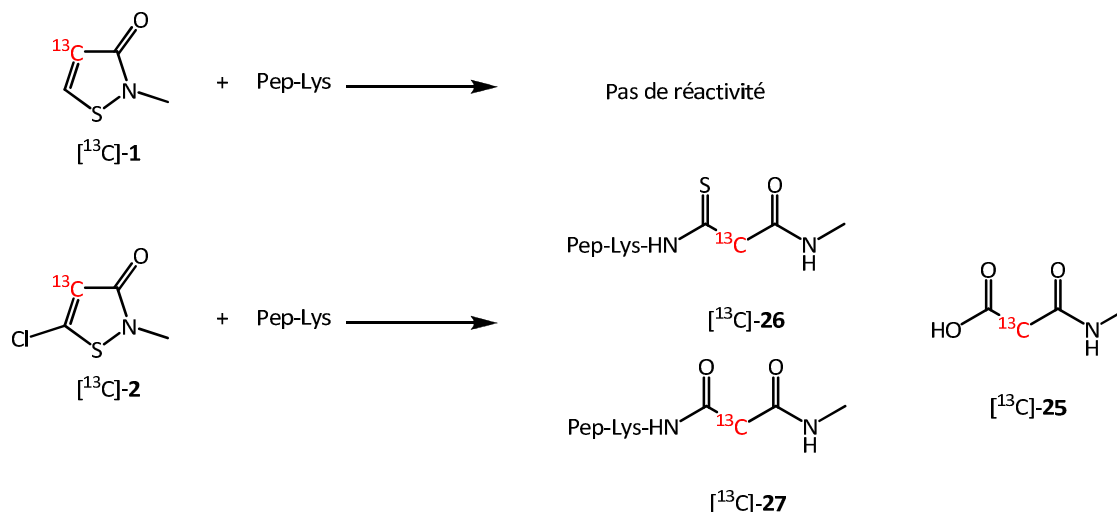
Cette courbe montre une consommation de  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$  d'approximativement 50 % par le peptide cystéine après 76 heures de réaction. Elle montre, également, la non-réactivité de  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$  avec ce même peptide. Le signal caractéristique de RMN du  $^{13}\text{C}$  de  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$  reste toujours aussi intense même après 76 heures de réaction. L'absence de réactivité de  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$  avec ce peptide indique que celui-ci est préférentiellement consommé par  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$ . Le mélange  $[^{13}\text{C}]\text{-1}/[^{13}\text{C}]\text{-2}$  se comporte en conséquence comme si  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$  était le seul produit réactif présent.

Enfin, il est intéressant de noter qu'au bout du temps de lecture du DPRA (24 H), les quantités de MI et de MCI dans le milieu sont approximativement de 98 % et de 73 % respectivement.

### III.4. Réactivité du mélange [ $^{13}\text{C}$ ]-1/[ $^{13}\text{C}$ ]-2 vis-à-vis du Pep-Lys

#### III.4.1. Aspects mécanistiques

Les études préliminaires de la réactivité individuelle de chaque isothiazolinone avec le peptide lysine (Pep-Lys) en quantité équimolaire n'ont montré une certaine réactivité et une formation d'adduits qu'avec [ $^{13}\text{C}$ ]-2. En effet, il a déjà été montré que [ $^{13}\text{C}$ ]-1 réagit préférentiellement avec les résidus thiols des acides aminés et pas avec les résidus amines. Les adduits provenant de la réactivité de [ $^{13}\text{C}$ ]-2 avec ce peptide sont répertoriés dans la Figure 19 avec leurs déplacements chimiques de RMN du carbone 13 caractéristiques.



Molécule	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
[ $^{13}\text{C}$ ]-2	113,6
[ $^{13}\text{C}$ ]-26	51,5
[ $^{13}\text{C}$ ]-27	49,5
[ $^{13}\text{C}$ ]-25	42,1

Figure 19 : Réactivité individuelle de [ $^{13}\text{C}$ ]-2 vis-à-vis du Pep-Lys : adduits formés et déplacements chimiques caractéristiques ( $\delta$ ).

Lorsque le mélange  $[^{13}\text{C}]\text{-1}/[^{13}\text{C}]\text{-2}$  a été mis en réaction avec le peptide lysine (1 équivalent), le suivi par RMN de la réaction a montré la disparition complète du signal de  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$  à 113,6 ppm au bout de 45 heures au profit de l'apparition de deux signaux à 51,5 ppm et à 49,5 ppm, correspondant aux adduits  $[^{13}\text{C}]\text{-26}$  et  $[^{13}\text{C}]\text{-27}$  respectivement (Figure 20). Il a été également montré la formation de l'acide  $[^{13}\text{C}]\text{-25}$ , décrit précédemment lors des études de réactivité avec le peptide cystéine.  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$ , connue pour ne réagir qu'avec les résidus thiols des acides aminés, ne réagit pas avec ce peptide.

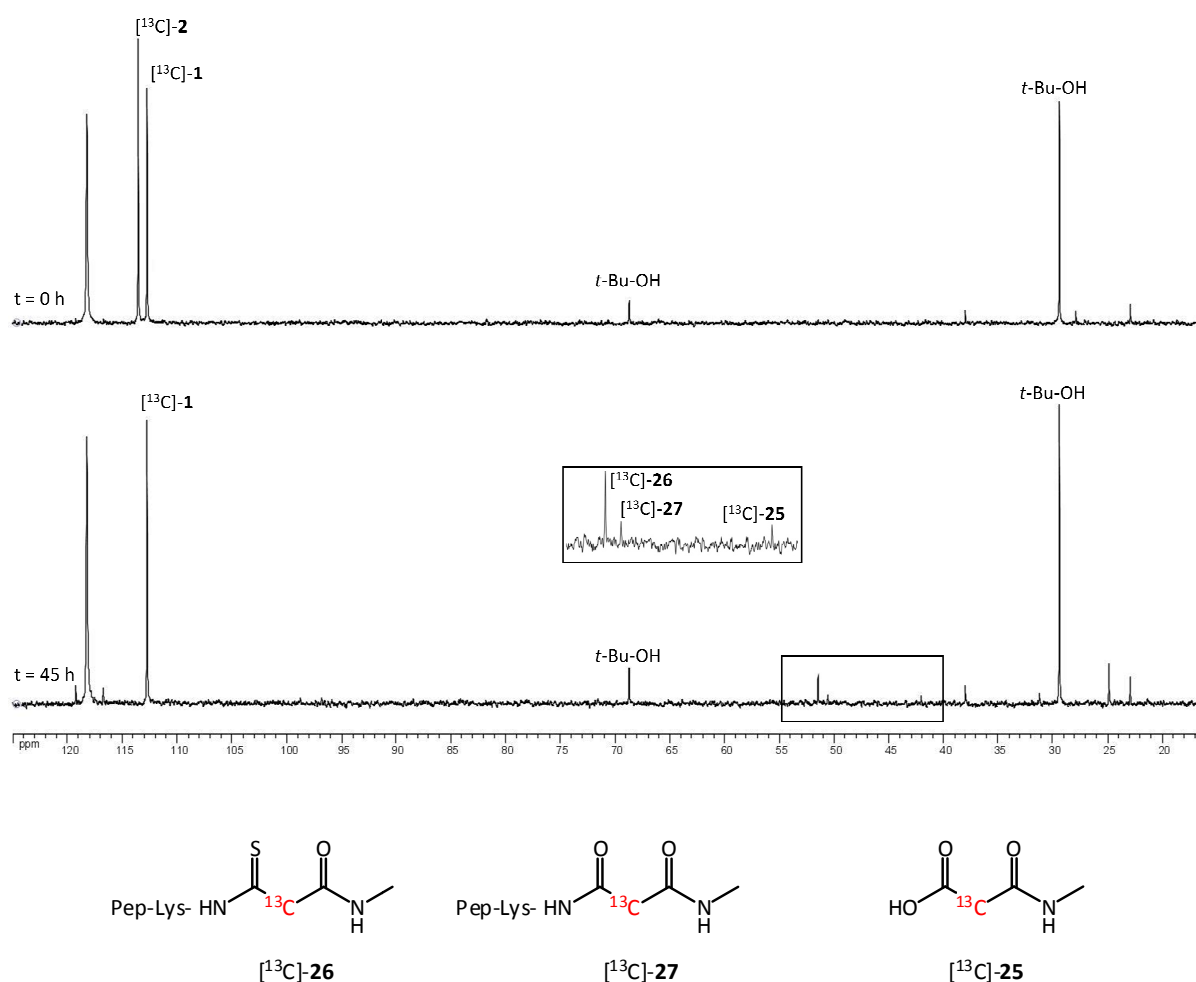


Figure 20 : Spectres de RMN de la réaction  $[^{13}\text{C}]\text{-1}/[^{13}\text{C}]\text{-2}/\text{Pep-Lys}$  à 0 et à 45 heures et structures des adduits observés.

Le mécanisme précis de réaction par lequel les adduits observés lors de la réaction de  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$  avec le peptide lysine reste méconnu. Un mécanisme a été proposé par Mutschler et *al.*<sup>23</sup> et diffère de ceux décrits lors de la réaction avec le glutathion ou avec le peptide cystéine (Figure 21).

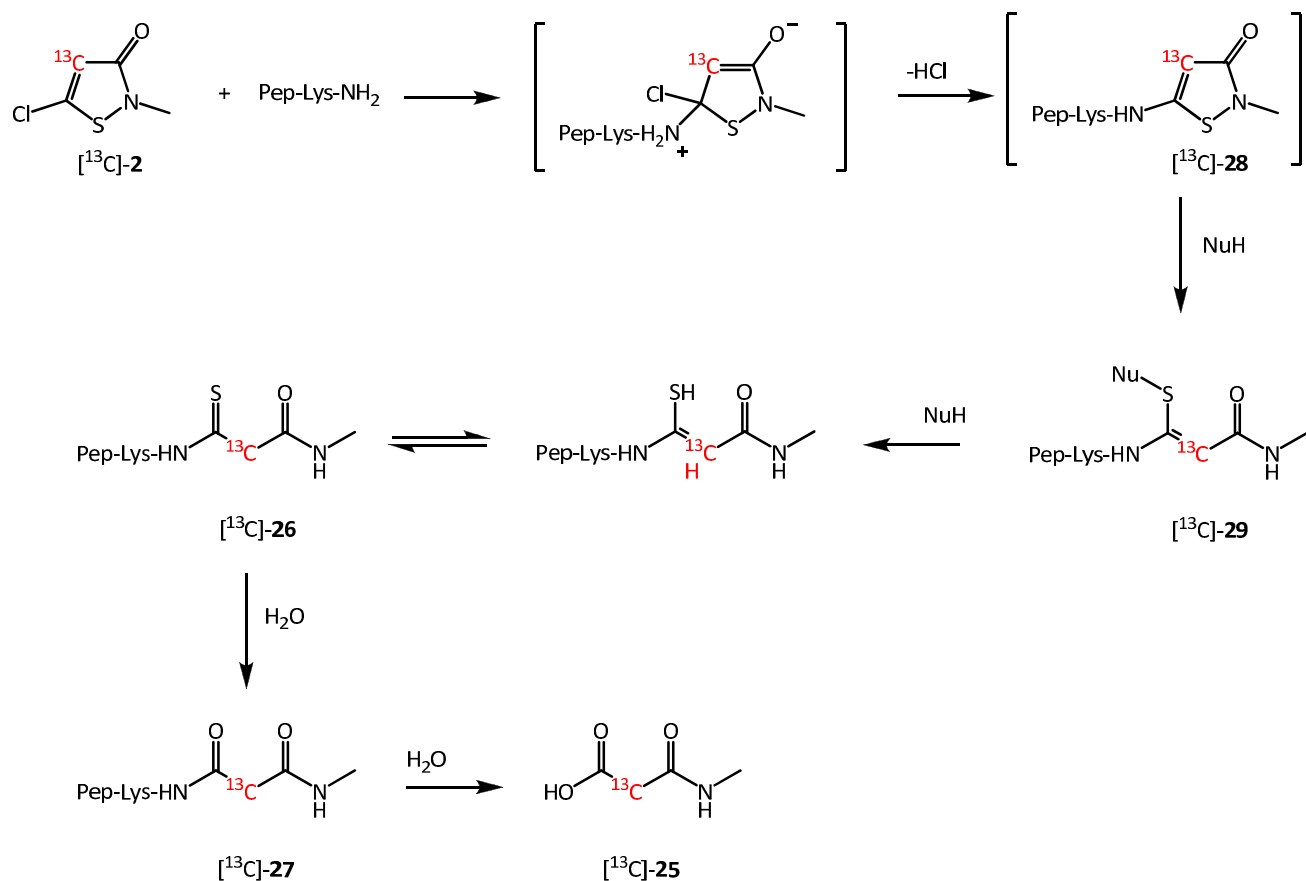


Figure 21 : Mécanisme proposé pour la formation d'adduits dans le mélange entre  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$  et le Pep-Lys.

Dans ce mécanisme proposé pour le peptide lysine l'ouverture du cycle de  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$  se ferait par l'attaque d'un nucléophile présent dans le milieu réactionnel sur l'atome de soufre de l'isothiazolinone  $[^{13}\text{C}]\text{-28}$ , elle-même issue de l'attaque nucléophile du groupement amine du peptide lysine sur la position C5 de  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$ . L'adduit  $[^{13}\text{C}]\text{-29}$  obtenu pourrait alors subir d'autres attaques nucléophiles donnant lieu à l'adduit de type thioamide  $[^{13}\text{C}]\text{-26}$ . Ce thioamide s'hydrolyserait ensuite pour former l'amide correspondant  $[^{13}\text{C}]\text{-27}$  se dégradant également dans ces conditions pour former l'acide  $[^{13}\text{C}]\text{-25}$ . La formation d'une isothiazolinone de type  $[^{13}\text{C}]\text{-28}$  a pu être observée lors d'une étude précédente menée par Alvarez et *al.* entre  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$  et l'imidazole. La formation de cet adduit confirme que le chemin réactionnel emprunté lors de la réaction entre  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$  et les résidus amines des protéines est bien celui décrit dans la Figure 21. Cependant le mécanisme d'ouverture de cycle de cette isothiazolinone  $[^{13}\text{C}]\text{-28}$  nécessitant l'intervention d'un nucléophile reste incertain.

### III.4.2. Aspects cinétiques

La Figure 22 représente les pourcentages de  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$  et de  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$  présents dans le milieu réactionnel en fonction du temps lors de la réaction du mélange  $[^{13}\text{C}]\text{-1}/[^{13}\text{C}]\text{-2}$  avec le peptide lysine.

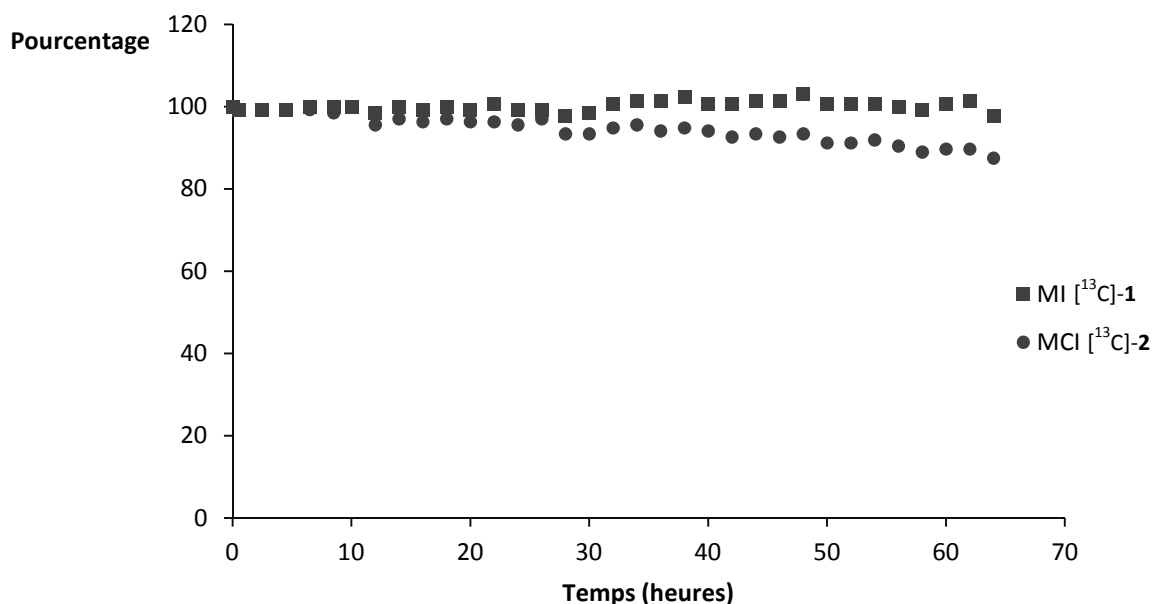


Figure 22 : Courbe représentant l'évolution avec le temps de la concentration de  $[^{13}\text{C}]\text{-1}$  et de  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$  lors de la réaction  $[^{13}\text{C}]\text{-1}/[^{13}\text{C}]\text{-2}/\text{Pep-Lys}$ .

Au cours du temps, seule une très légère diminution du signal correspondant  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$  a été observée. Ceci est en accord complet avec les résultats obtenus lors des études de la réactivité d'un point de vue mécanistique. En effet, dans les conditions réactionnelles utilisées pour ces études, seule  $[^{13}\text{C}]\text{-2}$  peut former des adduits stables avec le peptide lysine.

Enfin, il est intéressant de noter qu'au bout du temps de lecture du DPRA (24 H), les quantités de MI et de MCI dans le milieu sont approximativement de 100 % et de 94 % respectivement.

## IV. Conclusions

Il a été montré dans ce chapitre que la réactivité de MI dans le mélange avec MCI envers le glutathion consistait en l'établissement très rapide d'un équilibre entre un adduit de ces deux molécules et la forme cyclisée de cette isothiazolinone. D'un autre côté il a également été montré dans cette section que MCI formait des adduits très stables avec ce peptide. Cette réactivité est à l'origine du déplacement de l'équilibre entre MI et son adduit rendant quasi invisible la réactivité de cette dernière avec le glutathion. L'étude de la réactivité de ce mélange implique alors une perte d'information quant à la réactivité de MI mais reste très précise quant à celle de MCI. En effet, il a pu être observé que la totalité de MCI avait été consommée au bout de 26 heures ce qui correspond aux observations faites lors de l'étude de cette molécule seule.

Dans le cas de l'étude de la réactivité de ce mélange vis-à-vis du peptide cystéine, il a été montré que MI ne réagissait pas avec ce peptide dans les conditions expérimentales utilisées. En revanche, le suivi de cette réaction a montré la formation d'un seul composé issu de la réactivité de MCI avec le peptide cystéine. Dans ce cas, la réactivité du mélange correspond exactement à celle de MCI.

L'étude du mélange d'isothiazolinones menée en présence de peptide lysine a montré la consommation de MCI uniquement. En effet, MI est connue pour ne réagir qu'avec les résidus thiolés des acides aminés. Dans ce cas, comme dans le précédent, la réactivité du mélange est identique à celle de MCI.

Le but de ces études était de donner des bases quant à la détection et/ou l'évaluation des allergènes présents dans des mélanges. Le cas étudié dans ce chapitre était le plus simple, en effet, la grande différence de réactivité et de potentiel sensibilisant des deux isothiazolinones étudiées permet d'émettre des suppositions plus ou moins instinctives quant au comportement souhaité du DPRA face à un tel mélange. Il paraîtrait indispensable pour la sécurité du consommateur qu'un mélange d'allergène modéré-allergène fort soit

déecté par ce test comme étant un allergène fort. Les résultats obtenus lors des études menées avec les peptides utilisés lors du DPRA (peptide cystéine et peptide lysine) nous ont montré que la réactivité du mélange était identique à celle de l'allergène le plus fort présent dans le milieu c'est-à-dire MCI. Lors d'un test de DPRA, les quantités de peptides utilisées sont 10 fois plus faible dans le cas du peptide cystéine et 50 fois plus faibles dans le cas du peptide lysine. Cette différence de conditions ne nous permet pas d'établir une corrélation directe entre les résultats obtenus lors de ces études et ceux observés lors d'un éventuel test de DPRA sur ces deux molécules. Cependant, il paraît raisonnable de supposer que le comportement global de ces deux isothiazolinones vis-à-vis des deux peptides dans les conditions du test reste inchangé autant du point de vue cinétique que mécanistique. Ainsi, bien que les déplétions observées lors des différents tests de DPRA sur ces molécules seules indiquent une réactivité similaire vis-à-vis du peptide cystéine (96 % pour MCI et 97 % pour MI), notre étude a montré que ce peptide réagissait préférentiellement avec MCI, la déplétion alors lue lors d'un éventuel test du mélange serait alors similaire à celle de cette isothiazolinone. Dans le cas du peptide lysine, les choses sont beaucoup plus simples. En effet, seul MCI réagit avec ce peptide dans le cadre du DPRA ainsi que dans le cadre de notre étude. Ce résultat indique donc que dans le cas d'un test DPRA sur le mélange MI/MCI, la déplétion lue serait uniquement due à la présence de l'allergène le plus fort et serait semblable à celle obtenue dans le cas du test de cette molécule seule.

Ainsi, les résultats obtenus dans cette partie laissent supposer que le DPRA permettrait de classer le mélange MI/MCI comme étant un allergène fort.

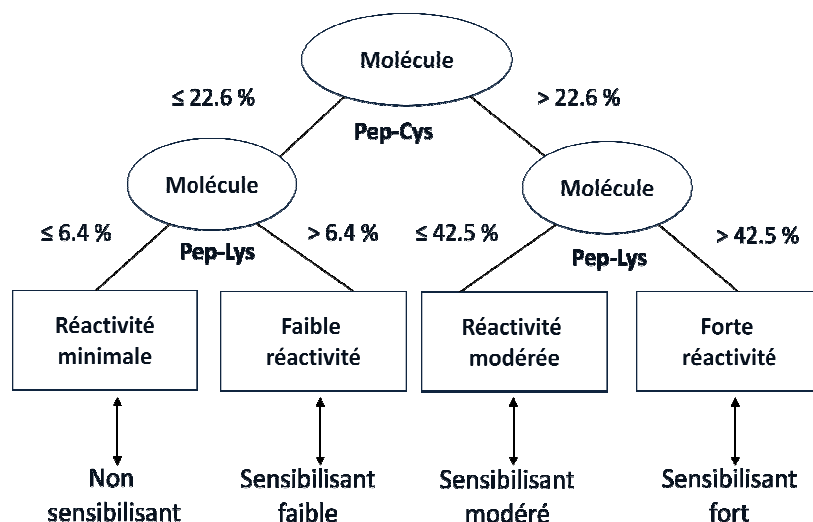


Figure 23 : Arbre décisionnel établi dans le cadre du DPRA permettant de classer les allergènes en fonction de leur réactivité avec les peptides cystéine et lysine.

D'un autre côté, l'arbre décisionnel (Figure 23) établi dans le cadre du DPRA nous indique que les allergènes forts (comme MCI) ont tendance à réagir fortement avec les deux peptides alors que les allergènes modérés (comme MI) ont tendance à réagir plus fortement avec le peptide cystéine qu'avec le peptide lysine. De fait, en couplant ceci avec les observations portant sur les différences de vitesse de réaction avec les peptides entre MCI et MI, il paraît raisonnable de penser que d'autres mélanges d'allergènes modérés-allergènes forts se comporteraient de façon similaire au mélange d'isothiazolinones étudié. Il serait alors intéressant de confirmer ou d'infirmer cette supposition en reproduisant ces expériences avec d'autres mélanges d'allergènes modérés-allergènes fort.



## Bibliographie

1. A. Giménez-Arnau.  
Les biocides : anges ou démons? De l'activité antimicrobienne aux effets indésirables.  
Progrès en dermato-allergologie Tome 16, Editions John Libbey Eurotext, Montroye, France, 2010, 101-122.
2. <http://ec.europa.eu/consumers/cosmetics/cosing/index.cfm?fuseaction=search.resultsPDF&type=>
3. C. F. Carson, K. A. Hammer, T. V. Riley.  
Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties.  
Clin Microbiol Rev, 2006, 19 (1), 50-62.
4. L. Espina, M. Somolinos, S. Lorán, P. Conchello, D. García, R. Pagán.  
Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes.  
Food Control, 2011, 22 (6), 896-902.
5. S. N. Lewis, G. A. Miller, A. B. Law.  
3-Isothiazolones as biocides.  
United States patent 23761488, 1978.
6. [http://www.dow.com/assets/attachments/business/pcare/kathon\\_for\\_personal\\_care/kathon\\_cg/tds/kathon\\_cg.pdf](http://www.dow.com/assets/attachments/business/pcare/kathon_for_personal_care/kathon_cg/tds/kathon_cg.pdf).
7. [http://www.dow.com/products/product\\_detail.page?display-mode=highlight&product=1010123](http://www.dow.com/products/product_detail.page?display-mode=highlight&product=1010123).
8. P. K. Chan, R. C. Baldwin, R. D. Parsons, J. N. Moss, R. Stiratelli, J. M. Smith, A. W. Hayes.  
Kathon biocide: manifestation of delayed contact dermatitis in guinea pigs is dependent on the concentration for induction and challenge.  
J Invest Dermatol, 1983, 81 (5), 409-411.
9. W. Uter, C. Ramsch, W. Aberer, F. Ayala, A. Balato, A. Beliauskiene, A. B. Fortina, A. Bircher, J. Brasch, M. M. Chowdhury, P. J. Coenraads, M. L. Schuttelaar, S. Cooper, M. T. Corradin, P. Elsner, J. S. English, M. Fartasch, V. Mahler, P. J. Frosch, T. Fuchs, D. J. Gawkrödger, A. M. Giménez-Arnau, C. M. Green, H. L. Horne, R. Jolanki, C. M. King, B. Krecisz, M. Kiec-Swierczynska, A. D. Ormerod, D. I. Orton, A. Peserico, T. Rantanen, T. Rustemeyer, J. E. Sansom, D. Simon, B. N. Statham, M. Wilkinson, A. Schnuch.  
The European baseline series in 10 European Countries, 2005/2006-results of the European Surveillance System on Contact Allergies (ESSCA).  
Contact Dermatitis, 2009, 61 (1), 31-38.

10. G. F. Gerberick, C. A. Ryan, P. S. Kern, H. Schlatter, R. J. Dearman, I. Kimber, G. Y. Patlewicz, D. A. Basketter.  
Compilation of historical local lymph node data for evaluation of skin sensitization alternative methods.  
*Dermatitis*, 2005, 16 (4), 157-202.
11. Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS),  
Opinion on the mixture of 5-chloro-2-methylisothiazolin-3(2H)-one and 2-methylisothiazolin-3(2H)-one N°56,  
Adopted on the 8<sup>th</sup> December 2009.
12. M. Bruze, I. Dahlquist, B. Gruvberger.  
Contact Allergy to Dichlorinated Methylisothiazolinone.  
*Contact Dermatitis*, 1989, 20 (3), 219-220.
13. J. P. Thyssen, J. D. Johansen, T. Menne.  
Contact allergy epidemics and their controls.  
*Contact Dermatitis*, 2007, 56 (4), 185-195.
14. J. P. Thyssen, K. Engkilde, M. D. Lundov, B. C. Carlsen, T. Menne, J. D. Johansen.  
Temporal trends of preservative allergy in Denmark (1985-2008).  
*Contact Dermatitis*, 2010, 62 (2), 102-108.
15. The Scientific Committee on Cosmetic Products and Non Food Products (SCCNFP),  
Opinion concerning Methylisothiazolinone,  
0805. 2004.
16. M. D. Lundov, J. P. Thyssen, C. Zachariae, J. D. Johansen.  
Prevalence and cause of methylisothiazolinone contact allergy.  
*Contact Dermatitis*, 2010, 63 (3), 164-167.
17. W. D. Crow, N. J. Leonard.  
Synthesis of 3-isothiazolones.  
*Tetrahedron Lett.*, 1964, 5 (23), 1477-1480.
18. S. Sivaramakrishnan, K. Keerthi, K. S. Gates.  
A chemical model for redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) activity.  
*J Am Chem Soc*, 2005, 127 (31), 10830-10831.
19. P. J. Collier, A. Ramsey, R. D. Waigh, K. T. Douglas, P. Austin, P. Gilbert.  
Chemical reactivity of some isothiazolone biocides.  
*J Appl Bacteriol*, 1990, 69 (4), 578-584.
20. T. M. Williams.  
The mechanism of action of isothiazolone biocides.  
*Power Plant Chem*, 2007, 9, 14-22.

21. B. N. Barman, H. G. Preston.  
The effects of pH on the degradation of isothiazolone biocides.  
Tribology International, 1992, 25 (4), 281-287.
22. R. Alvarez-Sanchez, D. Basketter, C. Pease, J. P. Lepoittevin.  
Studies of chemical selectivity of hapten, reactivity, and skin sensitization potency. 3.  
Synthesis and studies on the reactivity toward model nucleophiles of the C-13-  
Labeled skin sensitizers, 5-chloro-2-methylisothiazol-3-one (MCI) and 2-  
methylisothiazol-3-one (MI).  
Chem Res Tox, 2003, 16 (5), 627-636.
23. J. Mutschler, E. Giménez-Arnau, L. Foertsch, G. F. Gerberick, J. P. Lepoittevin.  
Mechanistic assessment of peptide reactivity assay to predict skin allergens with  
Kathon<sup>®</sup> CG isothiazolinones.  
Toxicol In Vitro, 2009, 23 (3), 439-446.
24. F. J. H. M. Jansen, M. Kwestro, D. Schmitt, J. Lugtenburg.  
Synthesis and characterization of all-E (12,12'-13C2)-, (13,13'-13C2)-, (14,14'-13C2)-,  
(15,15'-13C2)- and (20,20'-13C2)astaxanthin.  
Recl. Trav. Chim. Pays-Bas, 1994, 113, 552-562.



---

## CHAPITRE 2

Mélanges d'aldéhydes : synthèse et étude de leur  
réactivité envers les peptides modèles

---



## I. Introduction

### I.1. Les aldéhydes dans les fragrances et les produits cosmétiques

L'utilisation de parfums a suivi l'humanité depuis l'antiquité. Elle était initialement réservée à l'adoration des dieux. Ce n'est que bien plus tard que les hommes eux-mêmes commencèrent à se parfumer. Les matières premières étant rares et chères, cet outil de séduction était réservé aux hautes classes sociales. Cependant, à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, les progrès en chimie organique permirent l'utilisation de molécules odorantes de synthèse dans la formulation de parfums, ce qui permit la baisse des coûts de production et donc l'accès à la population générale.

La première utilisation d'une molécule synthétique odorante, la coumarine, date de 1884. Les premiers aldéhydes synthétiques, quant à eux, ont fait leur apparition en parfumerie en 1889. C'est Aimé Guerlain qui le premier incorpore de la vanilline d'origine synthétique dans la formulation de l'un de ses parfums. La chimie des molécules odorantes, qui jusque lors consistait principalement en l'obtention par voie chimique de molécules naturelles, connu un tournant en 1912 avec l'apparition sur le marché d'un parfum contenant pour la première fois une molécule odorante d'origine totalement synthétique, le 2-méthylundécanal. Cependant, la composition la plus mémorable reste celle d'Ernest Beaux, qui en 1921 pour la maison Chanel, associe notamment dans son N°5, trois aldéhydes aliphatiques, le décanal, l'undécanal et le dodécanal. La particularité de ce parfum réside, entre autres, dans le fait que ces trois molécules prises séparément ont une odeur peu agréable à l'opposé de la coumarine et de la vanilline utilisées jusqu'à lors.<sup>1</sup>

Depuis, les chimistes ont sans cesse fourni aux parfumeurs de nouvelles molécules afin d'élargir la palette d'odeurs à leur disposition. Ils ont également réussi, dans certains cas, à augmenter l'intensité odorante de molécules naturelles. C'est le cas par exemple de l'éthylvanilline et de la méthylionone, qui sont réputées pour être plus odorantes que leurs homologues naturels. De plus, grâce aux avancées des méthodes d'analyses et d'identifications, il a été également possible de reproduire des huiles essentielles et autres produits naturels par des mélanges complexes de molécules d'origine synthétique.<sup>2</sup>

De nos jours, les parfums font partie du quotidien et se retrouvent dans de nombreux produits de consommation. Dans la grande majorité de ces produits, la presque totalité des molécules odorantes utilisées sont d'origine synthétique. Les produits odorants d'origine naturelle, quant à eux, se retrouvent toujours dans la parfumerie de luxe.<sup>3,4</sup>

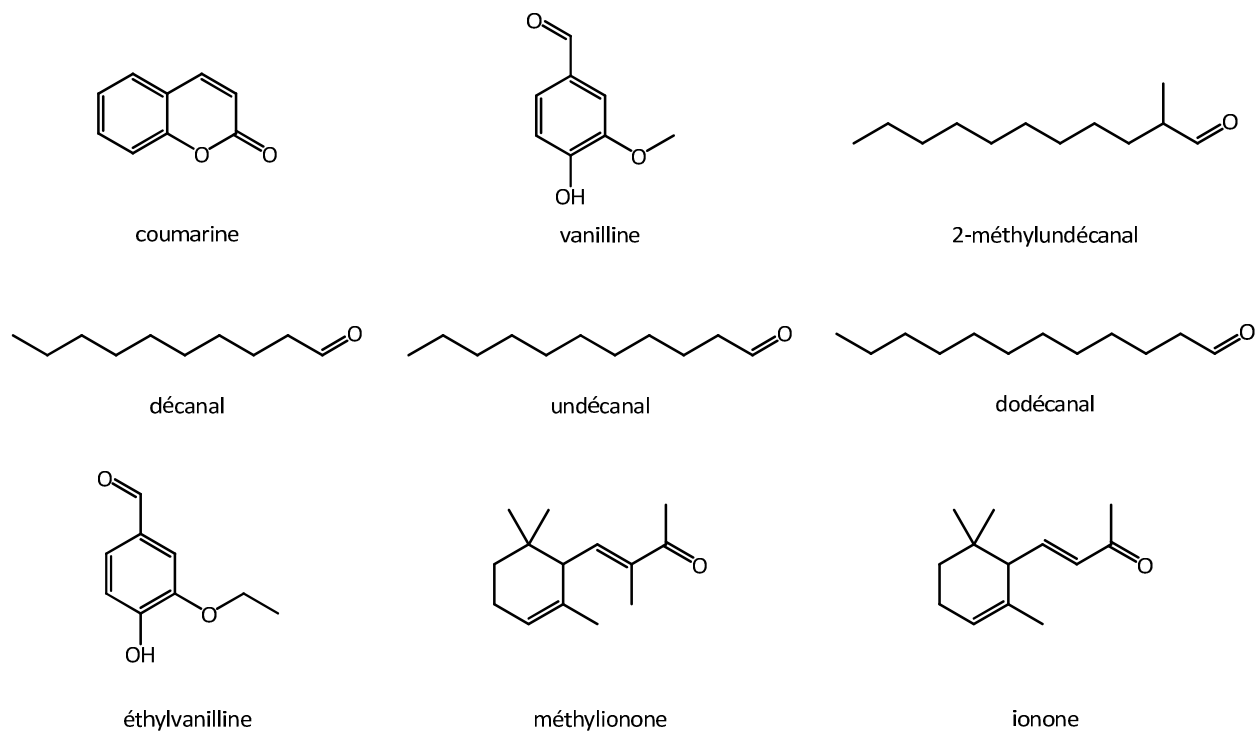


Figure 1 : Structures des premières molécules odorantes d'origine synthétique utilisées en parfumerie.

Les aldéhydes sont des composés réputés pour leurs propriétés odorantes. En effet, de nombreux exemples se retrouvent dans la nature comme la vanilline, le *p*-anisaldéhyde, l'aldéhyde cinnamique et le citral, extraits respectivement de la vanille, de l'anis, de la cannelle ou de la citronnelle (Figure 2). Ces composés sont, en conséquence, souvent utilisés dans la composition de fragrances.



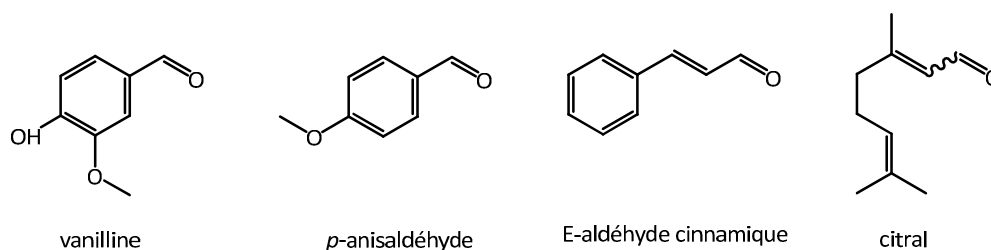


Figure 2 : Structures d'aldéhydes fréquemment utilisés comme fragrances ou arômes.

Si les aldéhydes sont le plus fréquemment utilisés pour leurs propriétés olfactives, certains d'entre eux sont également employés dans l'industrie cosmétique en tant que conservateurs. C'est le cas du formaldéhyde ou du glutaraldéhyde qui, grâce à leurs propriétés biocides, se retrouvent dans la formulation de produits d'utilisation quotidienne.<sup>5</sup>

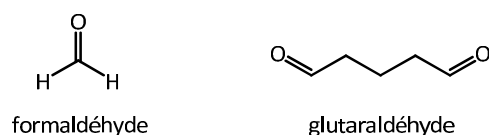


Figure 3 : Structures du formaldéhyde et du glutaraldéhyde.

De nombreux cas cliniques de sensibilisation rapportés dans la littérature indiquent que beaucoup de ces aldéhydes utilisés dans les produits cosmétiques sont allergisants.

## 1.2. Les aldéhydes et l'allergie de contact

Les allergies de contact aux parfums sont souvent dues aux aldéhydes contenus dans des mélanges ou à des composés « précurseurs d'aldéhydes ».<sup>6</sup> Un « précurseur d'aldéhyde » est une molécule pouvant mener à la formation d'un aldéhyde par voie métabolique par exemple. Ainsi, une allergie de contact à l'aldéhyde cinnamique peut se déclencher également par application de son alcool précurseur, l'alcool cinnamique. En effet, l'alcool cinnamique peut, par action d'alcool déshydrogénase, être converti *in vivo* en aldéhyde cinnamique (Figure 4).<sup>7</sup>

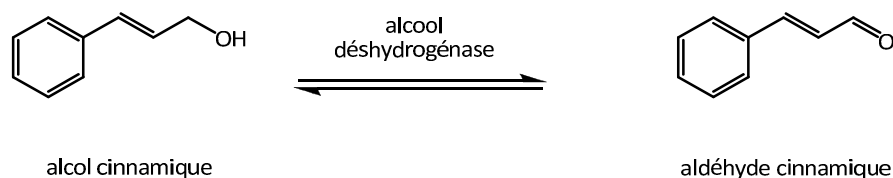


Figure 4 : Obtention de l'aldéhyde cinnamique à partir de l'alcool cinnamique par action d'alcool déshydrogénase.

Aujourd'hui, le principal outil servant au diagnostic d'une allergie de contact aux fragrances reste le test épicutané à l'aide du Fragrance Mix I (FM I) et du Fragrance Mix II (FM II), mis au point par Larsen et Frosch, respectivement.<sup>8, 9</sup> Le FM I et le FM II sont des mélanges contenant les composés les plus souvent incriminés dans les cas d'allergie de contact aux fragrances. Le FM I est constitué de sept composés que sont l'alcool cinnamique, l'aldéhyde cinnamique, l'aldéhyde  $\alpha$ -amylcinnamique, l'eugénol, l'isoeugénol, le géraniol et l'hydroxycitronellal, et d'un extrait naturel, la mousse de chêne. De son côté, le FM II est constitué d'aldéhyde  $\alpha$ -hexylcinnamique, de citral, de citronellol, de coumarine, de farnésol et de 4-(4-hydroxy-4-méthylpentyl)-1-cyclohex-3-ènedicarboxaldéhyde (Lyréal®).

Les composants constituant les différents Fragrance Mix étaient responsables de 11,3 % de la totalité des allergies de contact déclarées en Europe entre 2005 et 2006.<sup>10</sup> La fréquence de réponses positives indique, en effet, que la majorité des allergies de contact aux parfums sont dues aux constituants de ces deux tests épicutanés. Parmi ces constituants, trois aldéhydes responsables majeurs de réponses positives ont été choisis afin de mener à terme les études de réactivité de composés dans un mélange vis-à-vis de peptides modèles. Il s'agit de l'hydroxycitronellal, du citral et de l'aldéhyde cinnamique, qui seront à présent numérotés **30**, **31** et **32** respectivement.

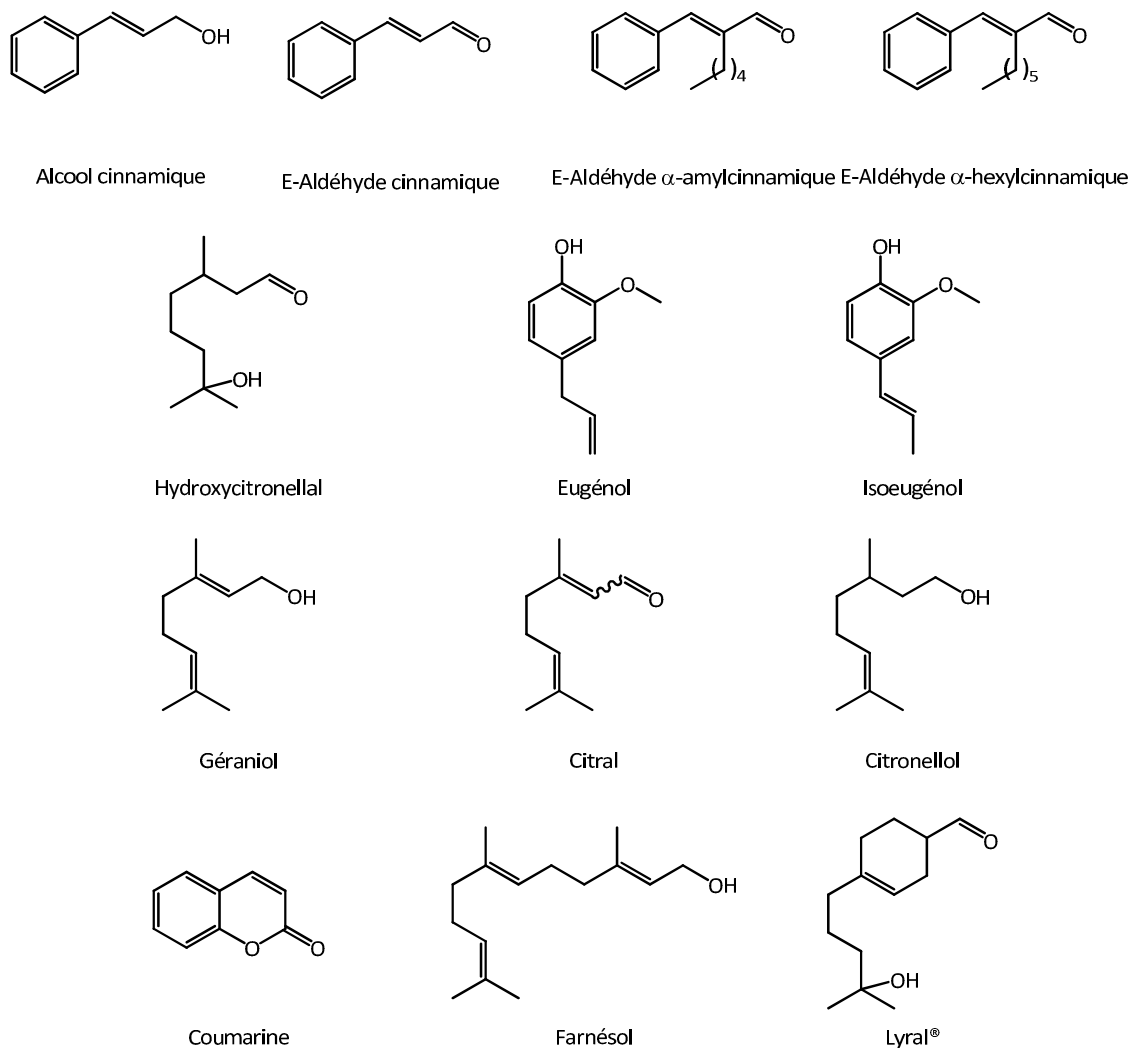


Figure 5 : Molécules composant les différents Fragrance Mix.

### I.2.1. Hydroxycitronellal : généralités

L'hydroxycitronellal **30** est un aldéhyde d'origine synthétique qui a été utilisé en parfumerie pour la première fois en 1912 pour son odeur rappelant le lilas. La première synthèse de cette molécule a été attribuée à Chuit & Naef en 1906.<sup>11</sup> Cependant, on doit l'une des premières synthèses publiées de l'hydroxycitronellal à Verley, en 1928.<sup>12</sup> Depuis, de nombreux procédés industriels pour la production de cette molécule ont vu le jour.<sup>13, 14</sup> De nos jours, la production d'hydroxycitronellal atteint 1000 tonnes/an.<sup>15</sup> Dans la Figure 6 est présentée une des principales voies d'obtention de l'hydroxycitronellal.

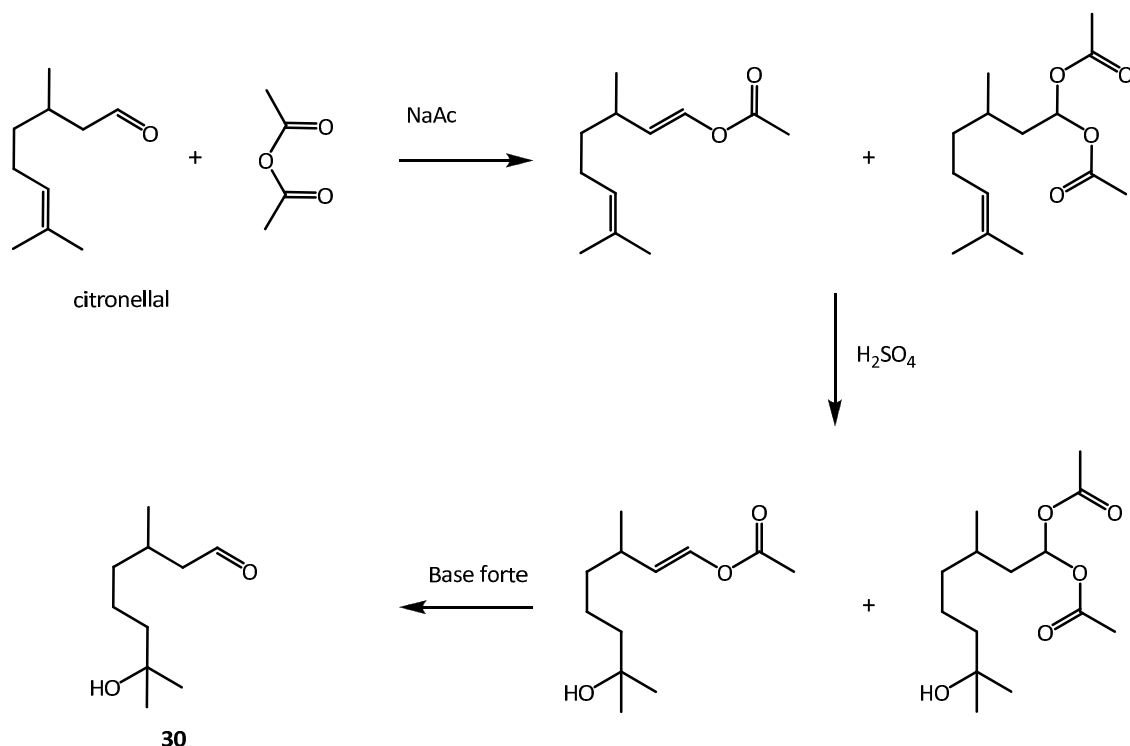


Figure 6 : Synthèse industrielle d'hydroxycitronellal.<sup>14</sup>

Cette synthèse en trois étapes s'articule autour d'une hydratation de la fonction alcène du citronellal pour former avec de bons rendements l'hydroxycitronellal souhaité. Une protection préalable de la fonction aldéhyde du citronellal à l'aide d'anhydride acétique en présence d'acétate de sodium permet de former un mélange d'énolester et de diester dont les proportions dépendent de la quantité d'anhydride acétique utilisée. Ce mélange subit alors une hydratation en présence d'acide sulfurique concentré pour former un mélange d'hydroxy énol ester et d'hydroxy diester. La saponification de ces deux produits en présence de base forte mène à la formation d'un seul produit, l'hydroxycitronellal **30**.

La présence d'hydroxycitronellal dans de nombreux produits d'usage courant fait de cette molécule l'aldéhyde ayant la plus grande prévalence d'allergie parmi tous les constituants du FM et du FM II. Selon une étude conduite par Schnuch *et al.*<sup>16</sup> sur 2 063 patients entre 2003 et 2004, 1,3 % des patients testés se sont avérés être allergiques à l'hydroxycitronellal. En conséquence, l'Union Européenne a restreint la concentration d'hydroxycitronellal dans les produits finis à un maximum de 1 %.<sup>17</sup>

### I.2.2. Citral : généralités

Le citral **31** est en réalité un mélange (2/3 ; 1/3) de deux diastéréoisomères Z et E, le géraniol et le néral (Figure 7). C'est un aldéhyde d'origine naturelle, principal constituant de nombreuses huiles essentielles comme l'huile de citronnelle, de citron ou encore de mandarine.<sup>18</sup>

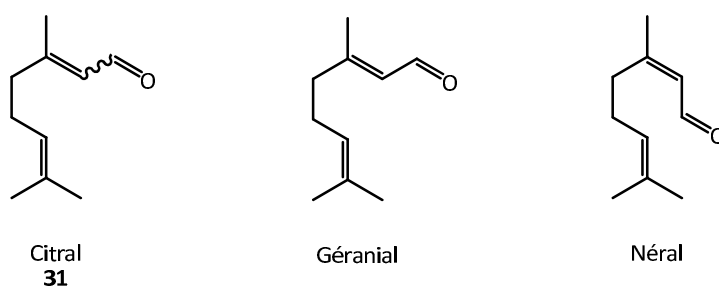
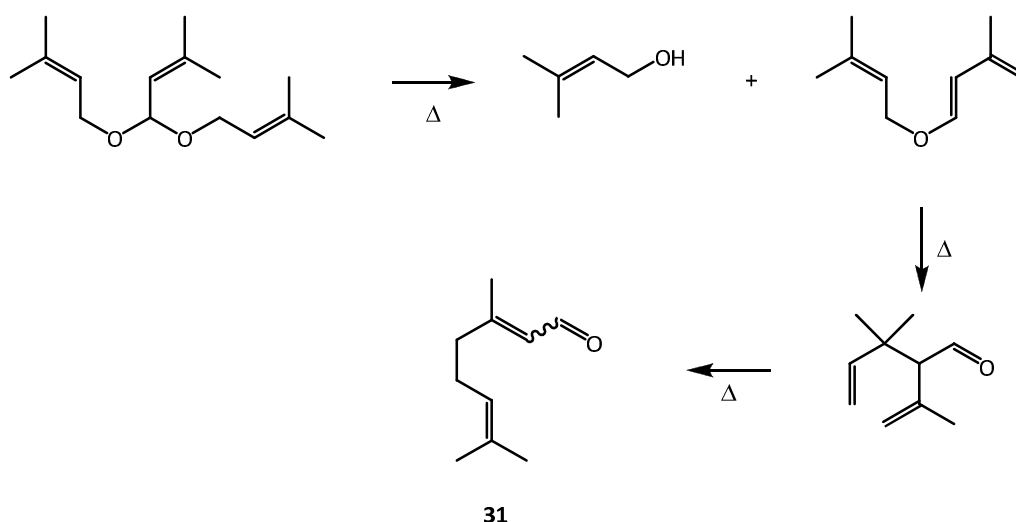


Figure 7 : Structures du géraniol et du néral, isomères *cis* et *trans* du citral.

Le citral est très utilisé dans l'industrie des fragrances, mais il est également un précurseur important pour la synthèse industrielle d'autres molécules odorantes comme le menthol ou l'hydroxycitronellal.<sup>19</sup> Du fait de la grande diversité d'utilisation du citral, la production de cette molécule en 2004 par BASF était de 40 000 tonnes/an, dont 2 600 directement pour l'industrie cosmétique.<sup>20</sup> La voie de synthèse présentée dans la Figure 8 mène au citral **31** avec un rendement global de 85 à 90 %, et est utilisée de nos jours dans l'industrie afin de pourvoir la grande demande en ce produit.<sup>21</sup> La première des trois étapes de cette synthèse réside en un clivage thermique du 3-méthylbut-2-énal diprényle acétal en 3-méthylbut-2-énol et en 3-méthylbut-1,3-diénoxy-3-méthylbut-2-ène. Ce dernier conduit par un réarrangement thermique de Claisen au 2-isopropényl-3,3-diméthylpent-4-énal. Cet aldéhyde mène au citral **31** par réarrangement thermique de Cope.

Figure 8 : Synthèse industrielle du citral.<sup>21</sup>

Le citral, étant très apprécié pour sa puissante odeur de citron, se retrouve dans un grand nombre de formulations cosmétiques mais également dans beaucoup d'autres produits contenant du parfum. De nombreux cas d'allergies cutanées à cette molécule ayant été rapportés, son utilisation aujourd'hui est en conséquence restreinte. En Europe, la concentration de citral ne doit pas dépasser 1 % dans les produits finis.<sup>16, 17</sup> Malgré ces restrictions, selon une étude récente de Schnuch *et al.*,<sup>16</sup> 0,6 % des dermatites de contact rapportées entre 2003 et 2004 sont dues à la présence de cette molécule dans divers produits du quotidien.

### I.2.3. Aldéhyde cinnamique : généralités

L'aldéhyde cinnamique **32** est le principal constituant de l'huile essentielle de cannelle, mais il est également présent dans l'huile essentielle de camphre. La première voie de synthèse de l'aldéhyde cinnamique est attribuée à Chiozza en 1856.<sup>1</sup> De nombreux brevets pour la production industrielle de l'aldéhyde cinnamique sont ensuite apparus. Le premier d'entre eux date de 1897 et est attribué à Ach.<sup>22</sup> Cette synthèse, à partir de benzaldéhyde et d'aldéhyde acétique en présence de base forte, reste à ce jour la méthode la plus utilisée et

la moins onéreuse pour la production d'aldéhyde cinnamique.<sup>23</sup> La production d'aldéhyde cinnamique atteignait 975 tonnes/an en 1990 et ne cesse d'augmenter.

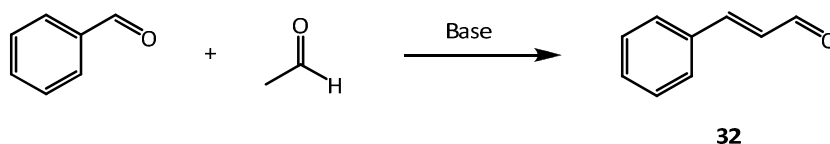


Figure 9 : Synthèse industrielle de l'aldéhyde cinnamique.

L'utilisation de l'aldéhyde cinnamique, ainsi que de ses dérivés (i.e. alcool cinnamique, acide cinnamique), dans la parfumerie et dans les cosmétiques en général, rend ces molécules très présentes au quotidien. Du point de vue de la prévalence, selon l'étude de Schnuch *et al.*,<sup>16</sup> 1% des dermatites de contact dépistées entre 2003 et 2004 étaient dues à une sensibilisation à l'aldéhyde cinnamique. En conséquence, l'Union Européenne a restreint sa concentration à un maximum de 1 % dans les produits finis.<sup>17</sup>

### I.3. Réactivité des aldéhydes vis-à-vis des acides aminés

De nombreuses études sur la réactivité d'aldéhydes électrophiles vis-à-vis d'acides aminés nucléophiles ont été menées lors des dernières années. Ces études portent principalement sur la réactivité intracellulaire des aldéhydes issus de la peroxydation des lipides due au stress oxydant.<sup>24</sup> Il a été montré, entre autres, que les aldéhydes pouvaient subir des attaques nucléophiles de certains résidus des protéines intracellulaires, i.e. l'arginine, la cystéine, l'histidine, la méthionine ou encore la lysine.<sup>25</sup>

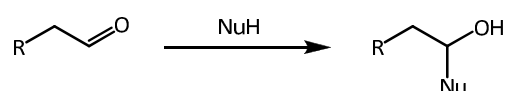


Figure 10 : Structure générale des produits d'attaque nucléophile sur des aldéhydes.

D'un autre coté, il a été montré par Schmolka et Spoerri que la cystéine pouvait réagir avec les aldéhydes pour former des thiazolidines par deux attaques nucléophiles successives au niveau de la fonction carbonyle (Figure 11).<sup>26</sup>

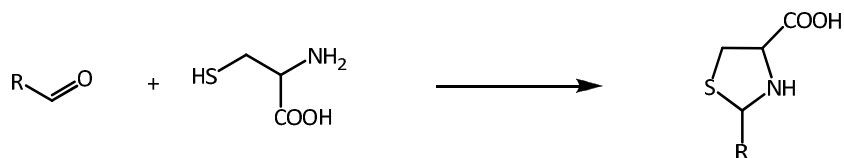


Figure 11 : Formation de thiazolidines à partir d'aldéhydes et de cystéine.

Dans le cas de l'attaque nucléophile d'un résidu protéinique de type amine primaire, la réaction décrite dans la Figure 10 peut se poursuivre pour former une base de Schiff comme le montre la Figure 12.

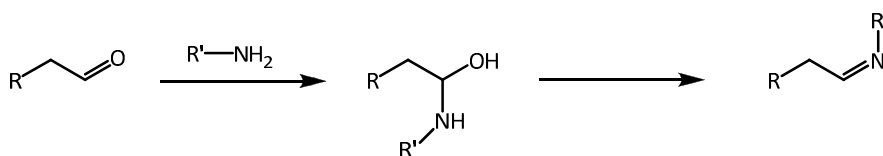


Figure 12 : Formation d'une base de Schiff entre une amine primaire et un aldéhyde.

Dans le cas des aldéhydes  $\alpha,\beta$ -insaturés, l'addition nucléophile sur la position de Michael et celle sur le groupement carbonyle sont en compétition.<sup>27</sup> De plus, dans le cas de la cystéine, il a été montré par Starkenmann *et al.* que cet acide aminé pouvait former un cycle à sept chaîons autour de l'aldéhyde en effectuant une attaque nucléophile par son groupement thiol sur la position de Michael suivie d'une seconde attaque nucléophile par son groupement amine sur le carbonyle (Figure 13).<sup>28</sup>

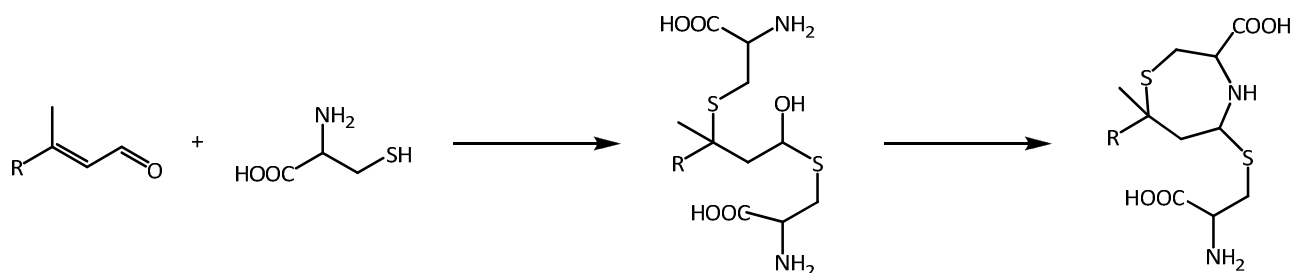


Figure 13 : Réactivité d'aldéhydes  $\alpha,\beta$ -insaturés vis-à-vis de la cystéine.



## II. Synthèse de l'hydroxycitronellal **30**, du citral **31** et de l'aldéhyde cinnamique **32** marqués au $^{13}\text{C}$ et études précédentes de réactivité

### II.1. Choix des positions de marquage

Dans le cas de l'hydroxycitronellal **30**, du citral **31** et de l'aldéhyde cinnamique **32**, le choix de la position de marquage est manifeste. Dans le cas des aldéhydes saturés, un seul centre électrophile est à considérer, celui du groupement carbonyle. En revanche, dans le cas des aldéhydes  $\alpha,\beta$ -insaturés, deux centres sont potentiellement électrophiles, le groupement carbonyle mais aussi la position dite de Michael sur la double liaison conjuguée. En effet, les études décrites dans la section précédente ont montré que les acides aminés nucléophiles réagissent avec les aldéhydes soit au niveau du groupement carbonyle soit, dans le cas des aldéhydes  $\alpha,\beta$ -insaturés, sur la position dite de Michael. En conséquence, dans le cas de l'hydroxycitronellal **30** le marquage a été introduit au niveau du carbonyle, et dans le cas du citral **31** et de l'aldéhyde cinnamique **32**, deux molécules marquées ont été synthétisées, l'une portant le carbone marqué au niveau du groupement carbonyle et l'autre sur la position de Michael (Figure 14).

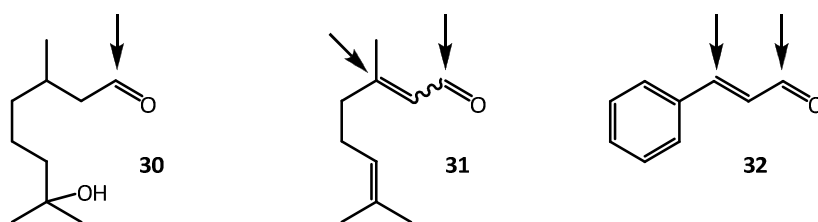


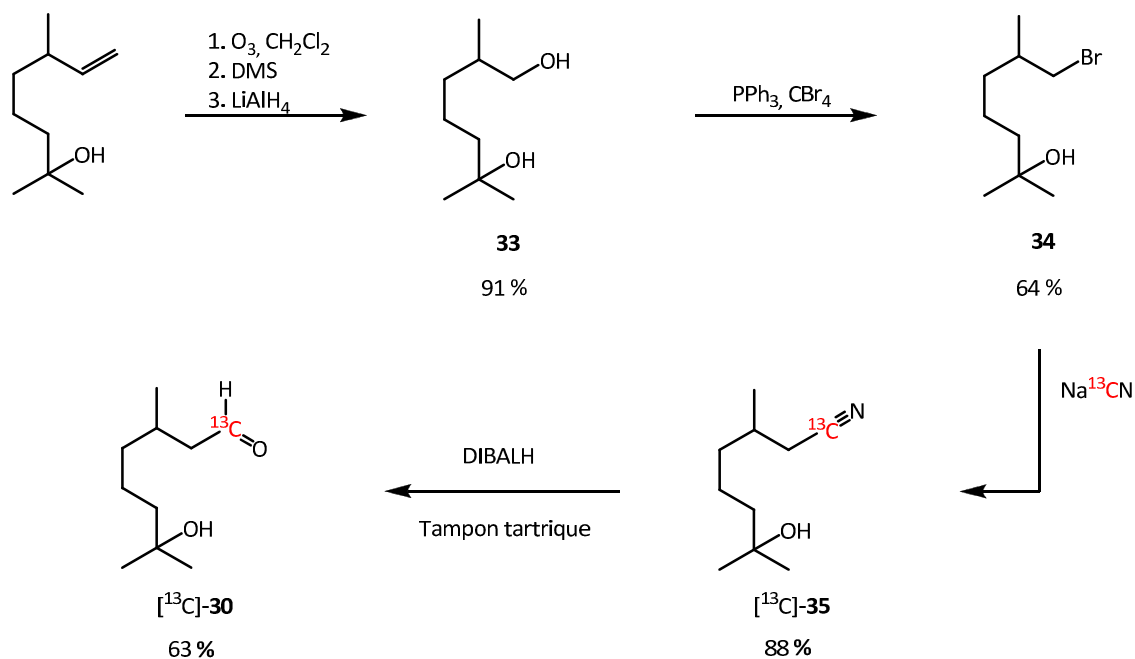
Figure 14 : Positions de marquage au  $^{13}\text{C}$  de l'hydroxycitronellal **30**, du citral **31** et de l'aldéhyde cinnamique **32**.

Des synthèses avec l'introduction d'un marquage au carbone  $^{13}\text{C}$  au niveau des sites électrophiles de ces trois aldéhydes ont été développées précédemment au laboratoire lors d'études visant à déterminer la réactivité de ces molécules séparément vis-à-vis de peptides

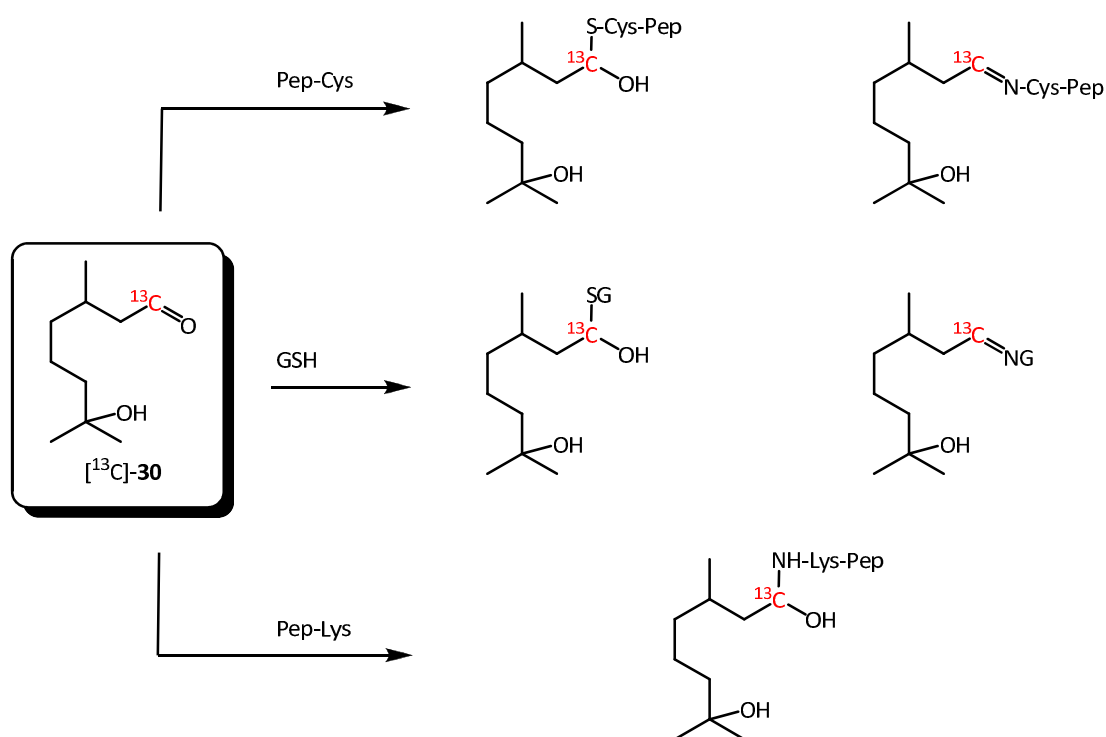
modèles.<sup>29,30</sup> Dans le cadre de ce travail de thèse, ces synthèses ont été dans un premier temps reproduites en série non-marquée afin de se familiariser avec les réactions mises en jeu, puis réalisées en série marquée comme décrit ci-après.

## II.2. Synthèse de l'hydroxycitronellal marqué au $^{13}\text{C}$ en position 1 et étude précédente de réactivité

La synthèse de l'hydroxycitronellal marqué au carbone 13 en position 1 débute par l'ozonolyse de dihydromyrcénol en présence de diméthyl sulfure, suivie d'une réduction en présence de tétrahydroaluminate de lithium et pour former le 2,6-diméthylheptan-1,6-diol **33** avec 91 % de rendement. Une substitution de l'alcool primaire du composé **33** par un atome de brome à l'aide de tétrabromure de carbone en présence de triphénylphosphine permet la formation du 1-bromo-2,6-diméthylheptan-6-ol **34** avec un rendement de 64 %. L'introduction du marquage au carbone 13 s'effectue par substitution nucléophile de l'atome de brome du composé **34** par un anion cyanure marqué au carbone 13 formant ainsi le 3,7-diméthyl-7-hydroxyoctanenitrile [ $^{13}\text{C}$ ]-**35** avec un rendement de 88 %. Après réduction à l'aide d'hydrure de diisobutylaluminium et hydrolyse du composé [ $^{13}\text{C}$ ]-**35**, l'hydroxycitronellal marqué au carbone 13 en position 1 [ $^{13}\text{C}$ ]-**30** est obtenu avec un rendement de 63 %. Le rendement global de cette synthèse est de 27 %.


 Figure 15 : Synthèse de l'hydroxycitronellal marqué au  $^{13}C$ .

L'étude de la réactivité de  $[^{13}C]$ -30 vis-à-vis des peptides modèles en excès effectuée par Mutschler, a montré la formation de plusieurs adduits. Ces adduits sont répertoriés dans la Figure 16.


 Figure 16 : Adduits observés par Mutschler entre  $[^{13}C]$ -30 et GSH, Pep-Cys et Pep-Lys.<sup>29</sup>

### II.3. Synthèse du citral marqué au $^{13}\text{C}$ en position 1 et en position 3 et étude précédente de réactivité

La synthèse marquée au carbone 13 en position 1 du citral s'articule autour de deux étapes. La première réside en l'obtention du 1- $^{13}\text{C}$ -3,7-diméthyl-octa-2,6-diène nitrile 1- $^{13}\text{C}$ -**37** par réaction de type Horner-Wadworth-Emmons, la seconde en la réduction de ce composé suivie d'une hydrolyse pour former le citral 1- $^{13}\text{C}$ -**31**.

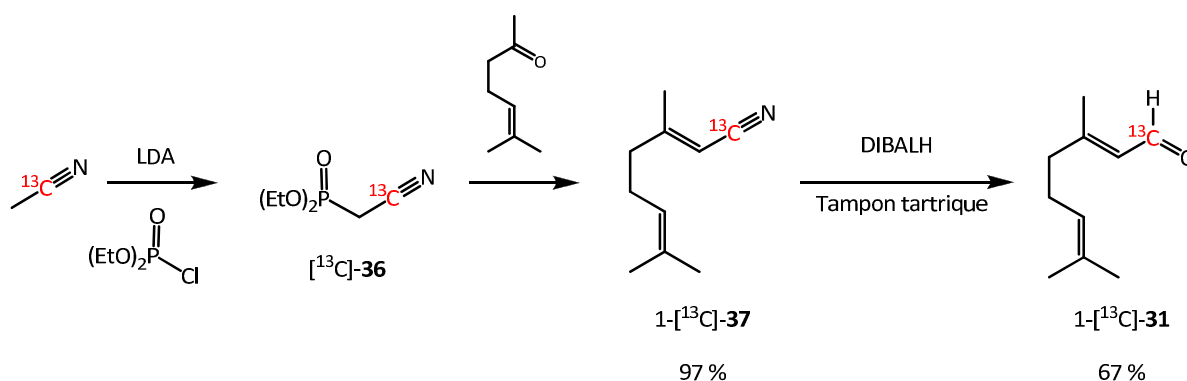


Figure 17 : Synthèse du citral marqué au  $^{13}\text{C}$  en position 1.

La première étape de cette synthèse consiste en la formation du 1- $^{13}\text{C}$ -cyanométhylphosphonate de diéthyle  $^{13}\text{C}$ -**36** par réaction du 1- $^{13}\text{C}$ -acétonitrile avec du chlorophosphonate de diéthyle en présence de diisopropylamidure de lithium. Ce phosphonate est alors mis en réaction en « un pot » avec de la 6-méthyl-5-heptèn-2-one pour former le 1- $^{13}\text{C}$ -3,7-diméthyl-octa-2,6-diène nitrile 1- $^{13}\text{C}$ -**37** avec un rendement de 97 %. Le composé 1- $^{13}\text{C}$ -**37** est alors réduit puis hydrolysé pour former le citral 1- $^{13}\text{C}$ -**31** avec un rendement de 67 %.

La synthèse du citral marqué en position 3 s'articule également autour de la formation du 3,7-diméthyl-octa-2,6-diène nitrile **37**, cette fois marqué au carbone 13 en position 3.

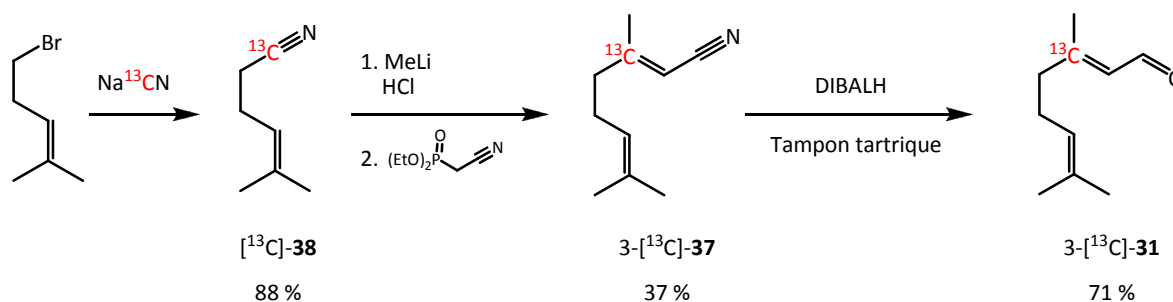


Figure 18 : Synthèse du citral marqué au  $^{13}\text{C}$  en position 3.

La première étape de cette synthèse consiste en la formation du 1- $[^{13}\text{C}]$ -5-méthylhex-4-ènenitrile  $[^{13}\text{C}]\text{-38}$  par substitution nucléophile entre du cyanure de sodium marqué au carbone 13 et du 5-bromo-2-méthylpent-2-ène. Le composé  $[^{13}\text{C}]\text{-38}$  a ainsi pu être obtenu avec un rendement de 88 %. Après réaction de cette molécule avec du méthyllitium puis hydrolyse en milieu acide, la 2- $[^{13}\text{C}]$ -6-méthyl-5-heptèn-2-one est obtenue et une oléfination de type Horner-Wadworth-Emmons a été effectuée sur le brut réactionnel pour mener au 3- $[^{13}\text{C}]$ -3,7-diméthyl-octa-2,6-diènenitrile 3- $[^{13}\text{C}]\text{-37}$  avec un rendement de 37 %. Après réduction de ce composé par de l'hydrure de diisobutylaluminium suivie d'une hydrolyse, le citral 3- $[^{13}\text{C}]\text{-31}$  a été obtenu avec un rendement de 71 %.

Les rendements globaux pour les synthèses du citral marqué au carbone 13 en position 1 et en position 3 sont de 65 % et de 23 % respectivement.

Une étude de la réactivité du citral 1- $[^{13}\text{C}]\text{-31}$  et 3- $[^{13}\text{C}]\text{-31}$  vis-à-vis du glutathion, du peptide cystéine ainsi que du peptide lysine a été entreprise par Mutschler *et al.*<sup>29</sup> Les adduits formés entre le citral marqué au carbone 13 en position 1 et les différents peptides sont répertoriés dans la Figure 19.

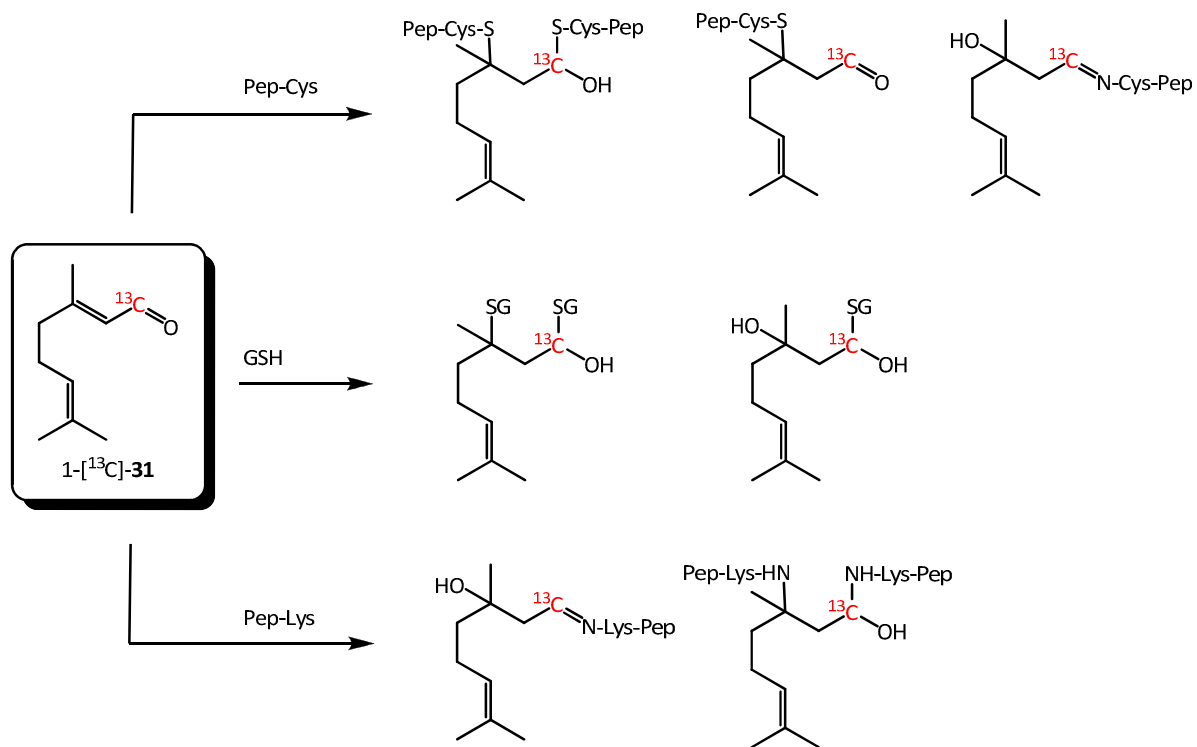


Figure 19 : Adduits observés par Mutschler entre 1-[<sup>13</sup>C]-31 et GSH, Pep-Cys et Pep-Lys.<sup>29</sup>

La Figure 20 montre les adduits observés lors de l'étude de la réactivité du citral marqué en position 3.<sup>29</sup>

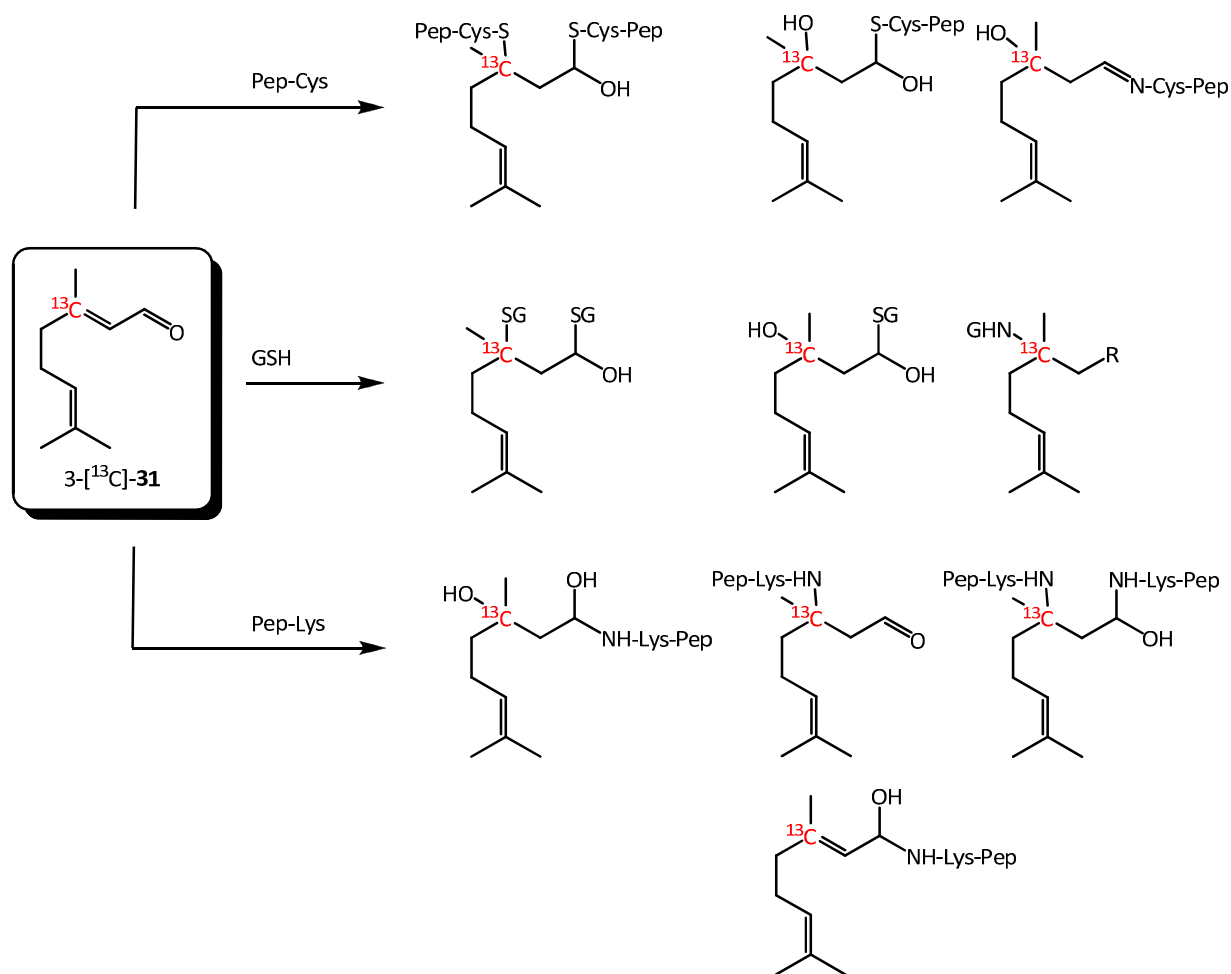


Figure 20 : Adduits observés par Mutschler entre 3-[<sup>13</sup>C]-31 et GSH, Pep-Cys et Pep-Lys.<sup>29</sup>

#### II.4. Synthèse de l'aldéhyde cinnamique marqué au <sup>13</sup>C en position 1 et en position 3 et étude précédente de réactivité

La synthèse de l'aldéhyde cinnamique marqué en position 1 est montrée dans la Figure 21. La première étape de cette synthèse consiste en une réaction de Horner-Wadworth-Emmons entre le phosphonate [<sup>13</sup>C]-36 et le benzaldéhyde. Le brut réactionnel est utilisé tel quel pour la suite de la synthèse. Une réduction à l'aide d'hydrure de diisobutylaluminium suivie d'une hydrolyse permet d'obtenir l'aldéhyde cinnamique marqué en position 1 avec un rendement global de 52 % sur les deux étapes.

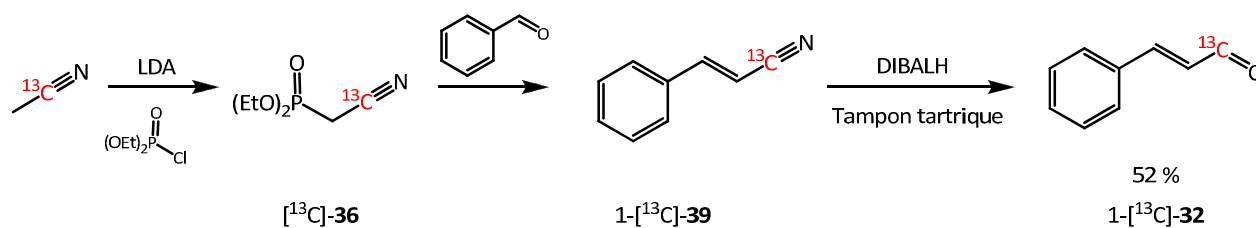


Figure 21 : Synthèse de l'aldéhyde cinnamique marqué au <sup>13</sup>C en position 1.

La synthèse de l'aldéhyde cinnamique marqué en position 3 diffère très peu de celle vue précédemment. En effet, seule la molécule permettant l'introduction du carbone 13 change. Ici, c'est le benzaldéhyde marqué au carbone 13 en position 1 qui permet l'obtention du marquage en position 3 sur l'aldéhyde cinnamique. Le rendement global de cette synthèse est de 44 % sur deux étapes.

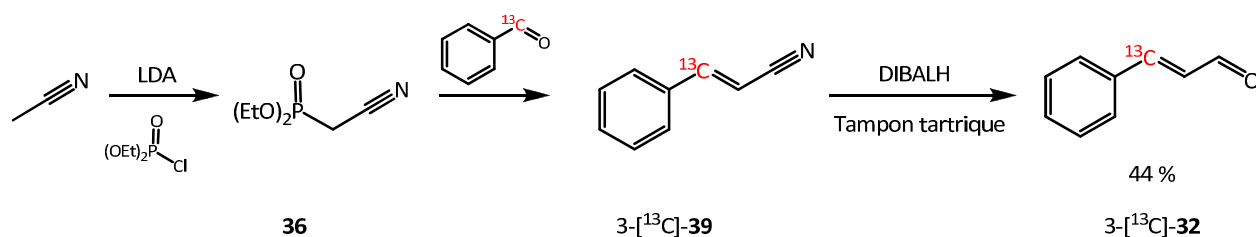


Figure 22 : Synthèse de l'aldéhyde cinnamique marqué au <sup>13</sup>C en position 3.

Les adduits observés par Mutschler lors de l'étude de la réactivité de l'aldéhyde cinnamique marqué au carbone 13 en position 1 vis-à-vis des peptides modèles sont répertoriés dans la Figure 23.<sup>29</sup>



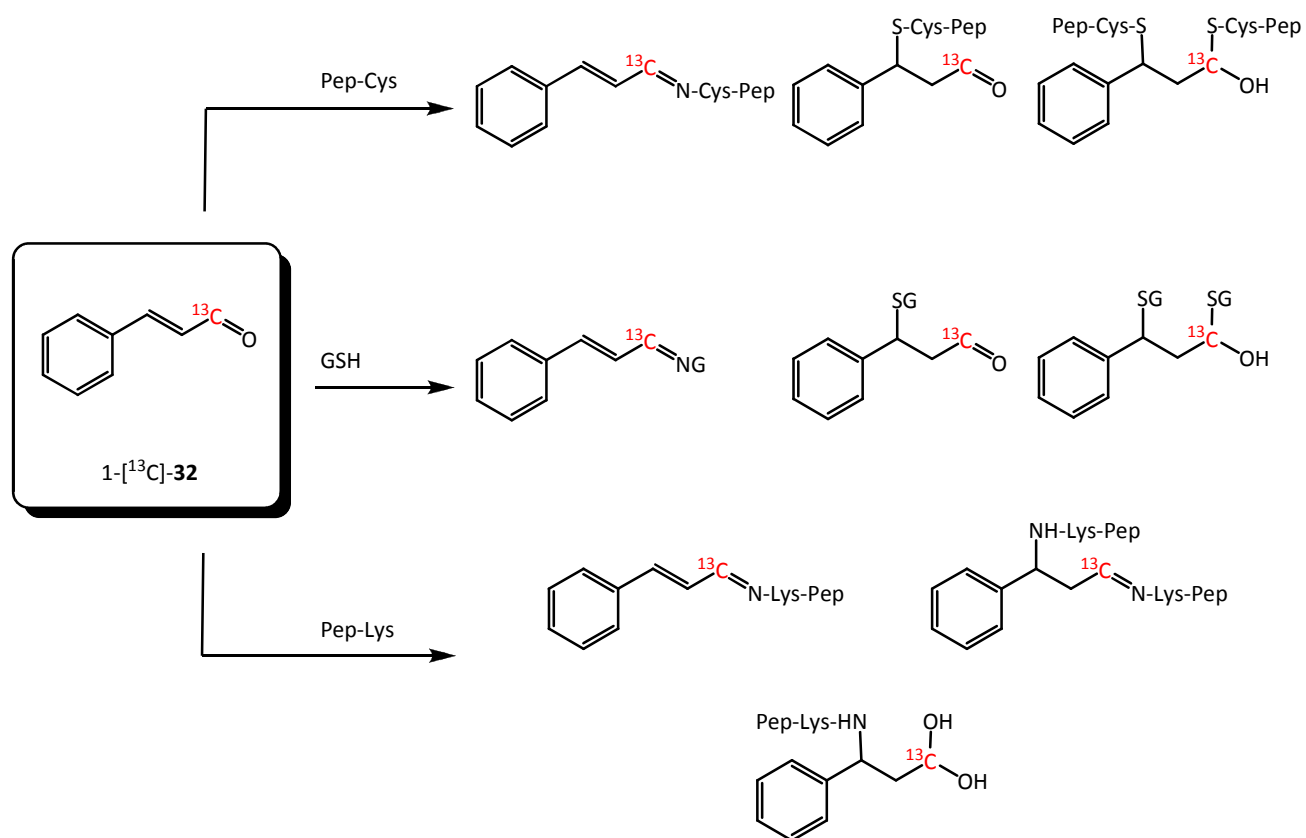


Figure 23 : Adduits observés par Mutschler entre 1-[<sup>13</sup>C]-32 et GSH, Pep-Cys et Pep-Lys.<sup>29</sup>

La Figure 24 montre les adduits observés, lors de l'étude de Mutschler, entre l'aldéhyde cinnamique marqué au carbone 13 en position 3 et les peptides modèles.<sup>29</sup>

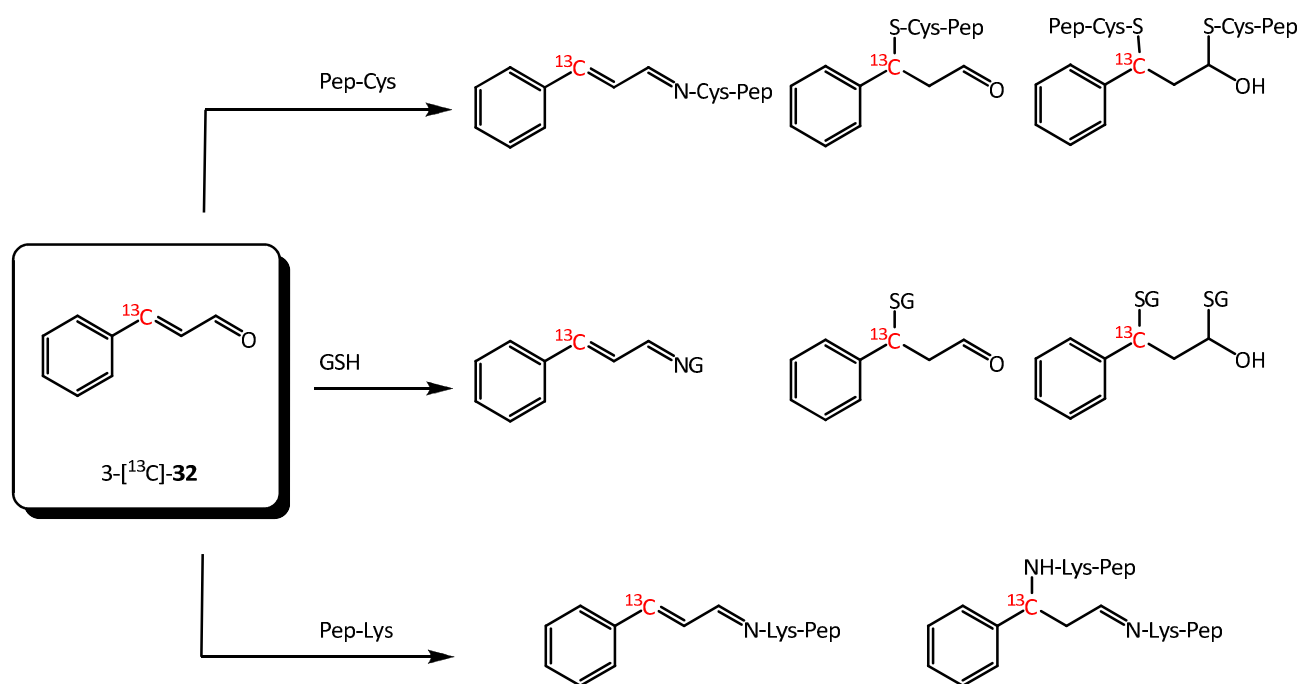


Figure 24 : Adduits observés par Mutschler entre 3-[<sup>13</sup>C]-32 et GSH, Pep-Cys et Pep-Lys.<sup>29</sup>

### III. Études de la réactivité de mélanges d'aldéhydes

#### III.1. Méthodologie

La méthodologie utilisée lors de ces études est similaire à celle décrite dans le chapitre 1 lors de l'étude du mélange MI/MCI. En effet, dans un premier temps, les études mécanistiques ont été réalisées en utilisant les mêmes conditions expérimentales à savoir, un mélange équimolaire d'aldéhydes a été mis en réaction avec une même quantité de peptide.

Les mélanges étudiés ici sont les différentes possibilités de mélanges binaires entre le citral, l'hydroxycitronellal et l'aldéhyde cinnamique. Plus précisément, trois mélanges ont été envisagés :

- hydroxycitronellal-citral : [<sup>13</sup>C]-**30**/1-[<sup>13</sup>C]-**31** et [<sup>13</sup>C]-**30**/3-[<sup>13</sup>C]-**31**
- hydroxycitronellal-aldéhyde cinnamique : [<sup>13</sup>C]-**30**/1-[<sup>13</sup>C]-**32** et [<sup>13</sup>C]-**30**/3-[<sup>13</sup>C]-**32**
- citral-aldéhyde cinnamique : 1-[<sup>13</sup>C]-**31**/1-[<sup>13</sup>C]-**32** et 3-[<sup>13</sup>C]-**31**/3-[<sup>13</sup>C]-**32**

#### III.2. Réactivité des mélanges d'aldéhydes vis-à-vis du glutathion

##### III.2.1. Réactivité du mélange hydroxycitronellal-citral

###### Aspects mécanistiques

Dans un premier temps, une étude de la réactivité de chaque aldéhyde vis-à-vis du glutathion a été menée séparément. Cette étude préliminaire a eu pour but de déterminer les déplacements chimiques de RMN caractéristiques des différents adduits susceptibles de se former lors de l'étude ultérieure de la réactivité du mélange. Ces déplacements chimiques ont tout d'abord été comparés à ceux observés lors des études conduites par Mutschler et

par Merkel *et al.*<sup>29,31</sup> Les résultats obtenus sont résumés dans la Figure 25 et concordent généralement bien avec ceux obtenus lors des études précédentes.

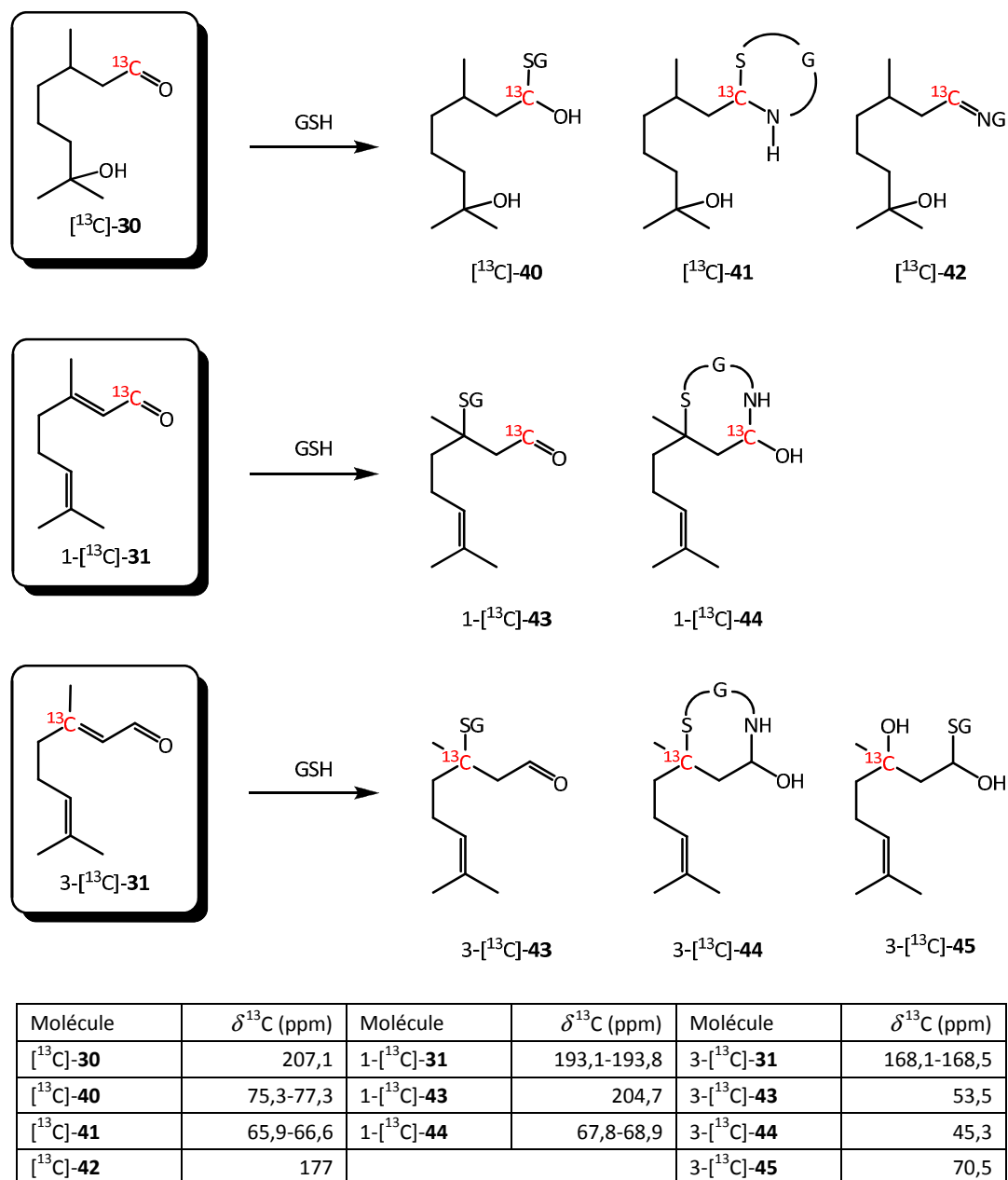


Figure 25 : Réactivité individuelle de [<sup>13</sup>C]-30 et de [<sup>13</sup>C]-31 vis-à-vis du GSH : adduits formés et déplacements chimiques caractéristiques ( $\delta$ ).

Dans le cas de l'hydroxycitronellal, trois adduits [<sup>13</sup>C]-40, [<sup>13</sup>C]-41 et [<sup>13</sup>C]-42 se forment par réaction avec le glutathion, en accord avec les études conduites auparavant. Dans le cas du citral, la formation des adduits [<sup>13</sup>C]-43 et [<sup>13</sup>C]-44 est observée que l'on suive la réactivité du citral marqué en position 1 ou en position 3 comme décrit auparavant. Dans le cas de nos

études nous avons également observé la formation de l'adduit 3- $^{13}\text{C}$ -**45** non décrit par Merckel *et al.*<sup>31</sup> Dans leurs conditions expérimentales utilisant un large excès de peptide ils avaient mis en évidence la formation de l'adduit **46**. Dans nos conditions expérimentales utilisant une quantité équimolaire de substrats, il est normal que la formation de **46** n'ait pas été détectée.

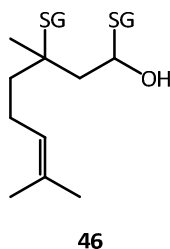


Figure 26 : Adduit observé entre le citral et le GSH par Merckel *et al.*<sup>31</sup>

En plus de la formation des trois adduits  $^{13}\text{C}$ -**40**,  $^{13}\text{C}$ -**41** et  $^{13}\text{C}$ -**42**, issus de la réactivité de  $^{13}\text{C}$ -**30**, l'étude mécanistique lorsque les deux aldéhydes, l'hydroxycitronellal et le citral, se trouvent dans un mélange équimolaire en présence de glutathion a montré l'apparition d'un signal de RMN à 89,4 ppm correspondant à un autre composé,  $^{13}\text{C}$ -**47**, qui est la forme hydratée de l'hydroxycitronellal.

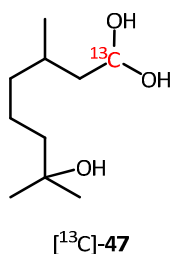


Figure 27 : Structure du composé  $^{13}\text{C}$ -**47**.

La Figure 28 montre le suivi par RMN du carbone 13 de la réactivité entre le mélange  $^{13}\text{C}$ -**30**/1- $^{13}\text{C}$ -**31** et le glutathion.

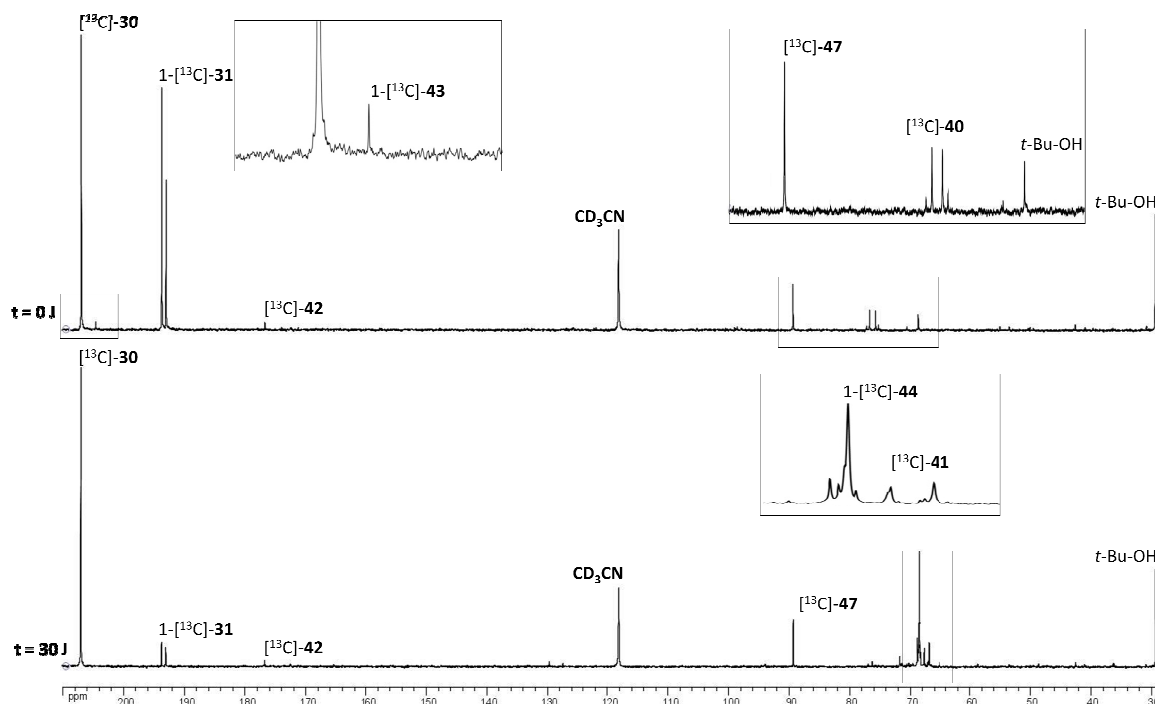


Figure 28 : Spectres de RMN du  $^{13}\text{C}$  de la réaction  $[^{13}\text{C}]\text{-30}/1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-31}/\text{GSH}$  à 0 et à 30 jours.

Lors de l'étude de la réactivité du mélange, l'hydroxycitronellal mène à la formation de trois adduits. Les signaux de l'adduit de type hémithioacétal  $[^{13}\text{C}]\text{-40}$  à 75,3-77,3 ppm, observé lors de la première expérience de RMN, résulte en l'addition nucléophile du groupement thiol du glutathion sur le carbonyle de l'hydroxycitronellal. Lors du suivi par RMN de cette réaction, le signal caractéristique de ce composé disparaît au profit de deux nouveaux signaux à 65,9-66,6 ppm correspondant à l'adduit cyclisé  $[^{13}\text{C}]\text{-41}$ . Ce composé provient d'une attaque ultérieure du groupement amine de ce même peptide sur ce même carbone. La Figure 29 montre le mécanisme réactionnel menant à la formation de ces deux adduits. En plus de ces deux adduits, un signal faible à 177 ppm à pu être observé durant cette étude mécanistique. Ce signal correspond à la formation de l'adduit  $[^{13}\text{C}]\text{-42}$  de type base de Schiff entre le glutathion et l'hydroxycitronellal.

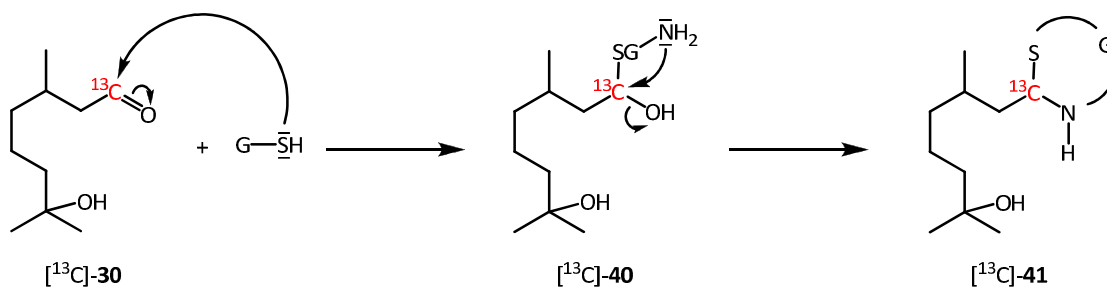


Figure 29 : Mécanisme réactionnel entre  $[^{13}\text{C}]\text{-30}$  et le GSH menant à la formation des adduits  $[^{13}\text{C}]\text{-40}$  et  $[^{13}\text{C}]\text{-41}$ .

Le citral 1- $[^{13}\text{C}]\text{-31}$ , quant à lui, mène dans ces conditions à la formation de deux adduits avec le glutathion. Dès la première expérience de RMN, un signal à 204,7 ppm correspondant à l'adduit 1- $[^{13}\text{C}]\text{-43}$  et résultant de l'attaque du groupement thiol du glutathion en position de Michael du citral est observé. Par la suite, ce signal disparaît au profit de nouveaux signaux entre 67,8 et 68,9 ppm caractéristiques de l'adduit 1- $[^{13}\text{C}]\text{-44}$  issu de l'attaque intramoléculaire du groupement amine du glutathion sur la position 1 de l'adduit 1- $[^{13}\text{C}]\text{-43}$ . La formation d'adduits cycliques similaires à 1- $[^{13}\text{C}]\text{-44}$  entre le citral et la cystéine ont déjà été décrits par Starkenmann *et al.*<sup>28</sup> La Figure 30 montre le mécanisme réactionnel menant à la formation de ces deux adduits.

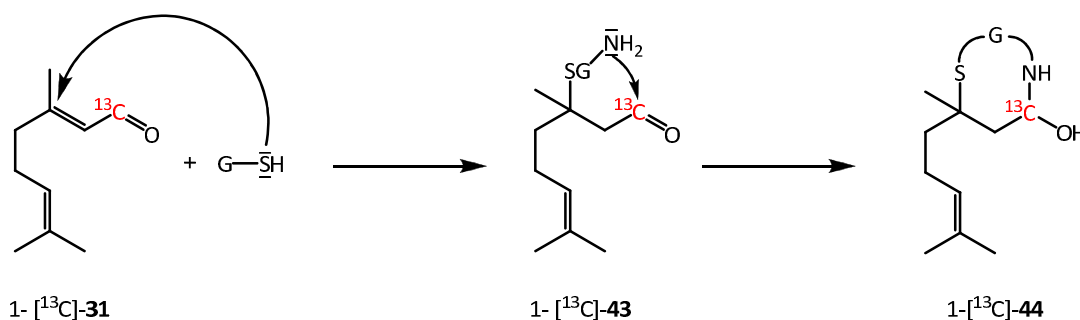


Figure 30 : Mécanisme réactionnel entre 1- $[^{13}\text{C}]\text{-31}$  et le GSH menant à la formation des adduits 1- $[^{13}\text{C}]\text{-43}$  et 1- $[^{13}\text{C}]\text{-44}$ .

La Figure 31 montre le suivi de la réactivité entre le mélange  $[^{13}\text{C}]\text{-30}/3\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-31}$  et le glutathion.

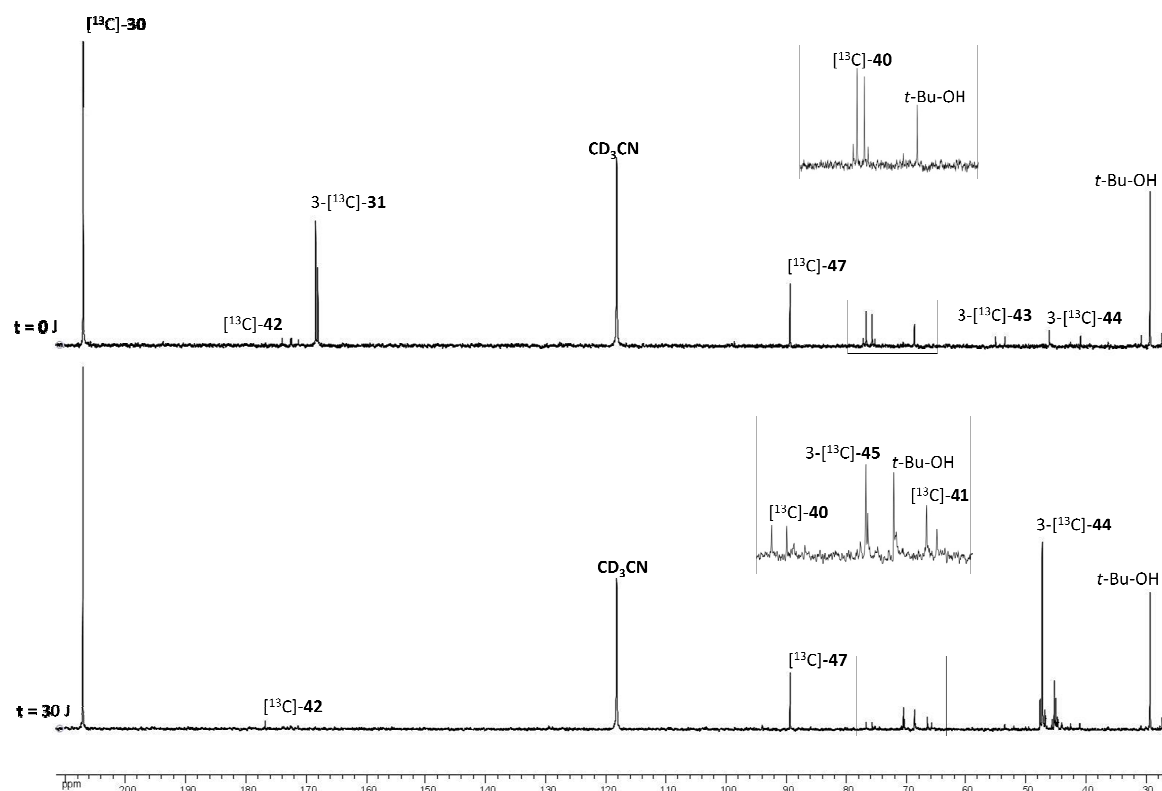


Figure 31 : Spectres de RMN du  $^{13}\text{C}$  de la réaction  $[^{13}\text{C}]\text{-30}/3\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-31}/\text{GSH}$  à 0 et à 30 jours.

Les mêmes observations peuvent être faites lors de l'étude de la réactivité du mélange d'aldéhydes  $[^{13}\text{C}]\text{-30}/3\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-31}$  envers le glutathion que lors de l'étude précédente. De plus, cette étude nous a permis de confirmer les résultats obtenus précédemment. En effet, les adduits formés par l'hydroxycitronellal sont dans les deux cas identiques. De plus, le marquage au carbone 13 en position 3 du citral a permis de confirmer les structures des adduits observés entre cet aldéhyde et le glutathion, et également d'identifier un adduit  $3\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-45}$  issu d'une attaque nucléophile du groupement thiol du glutathion au niveau de la fonction carbonyle du citral.

### Aspects cinétiques

Deux courbes représentant les intégrations relatives des signaux de RMN du carbone 13 caractéristiques des composants du mélange  $[^{13}\text{C}]\text{-30}/1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-31}$  d'une part, et  $[^{13}\text{C}]\text{-30}/3\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-31}$  d'autre part, ont été tracées en fonction du temps de réaction. Les deux courbes

apportant les mêmes informations sur la cinétique de la réaction entre le mélange hydroxycitronellal/citral et le glutathion, seule une courbe sera discutée dans cette partie.

La Figure 32 représente les pourcentages d'hydroxycitronellal et de citral marqué en position 1 présents dans le milieu réactionnel en fonction du temps lors de la réaction entre le mélange  $[^{13}\text{C}]\text{-30}/1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-31}$  et le glutathion.

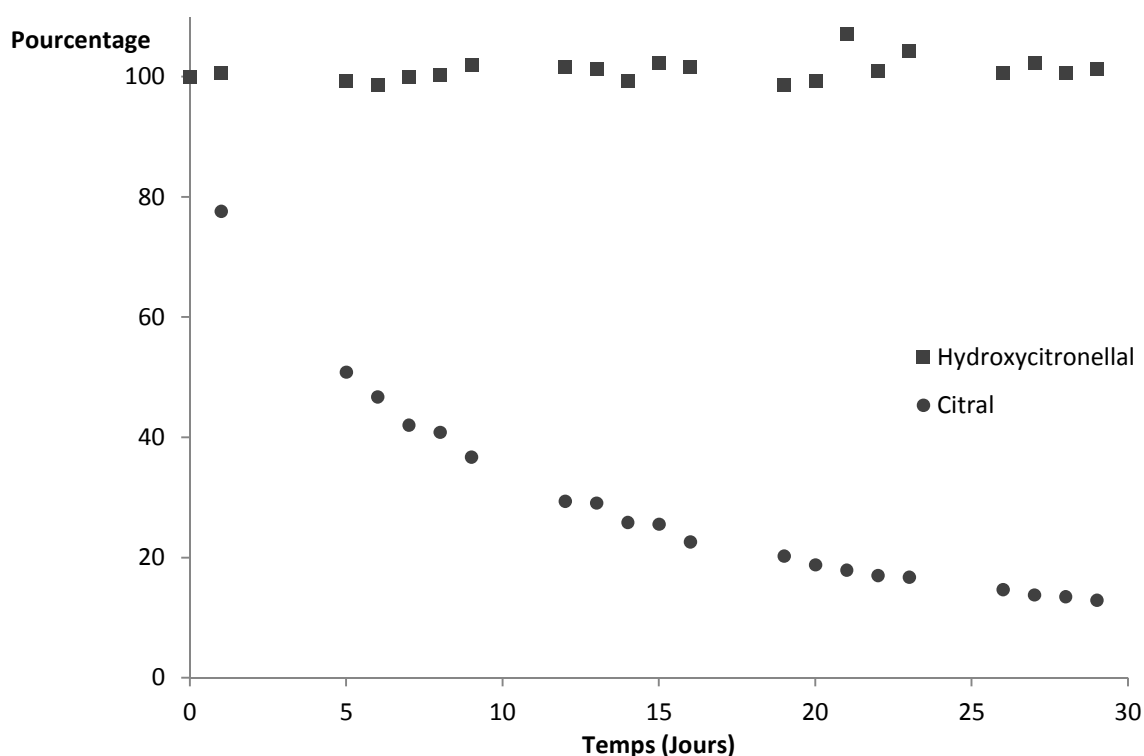


Figure 32 : Courbe représentant l'évolution en fonction du temps de la concentration de  $[^{13}\text{C}]\text{-30}$  et de  $1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-31}$  lors de la réaction entre le mélange et le GSH.

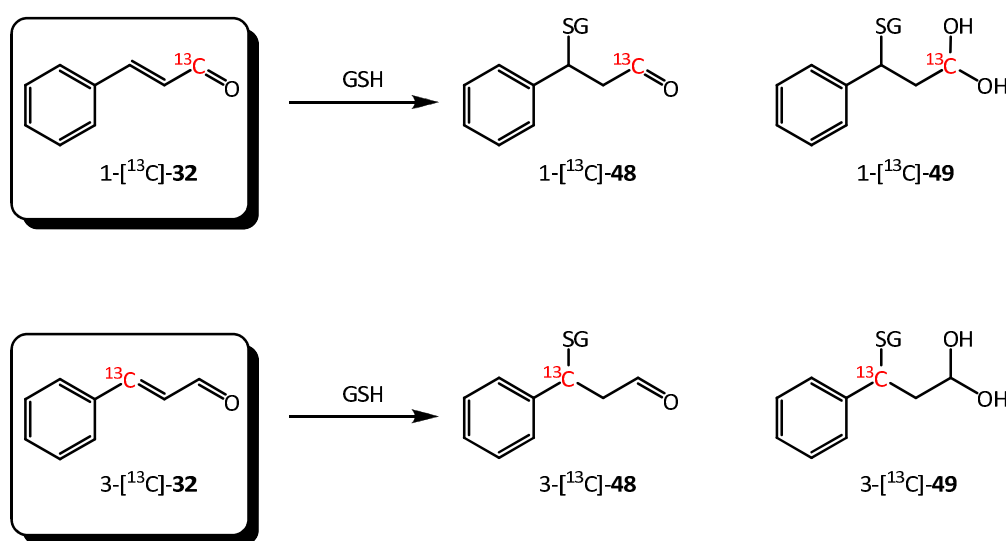
Cette courbe nous renseigne sur la réactivité de  $1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-31}$  avec le glutathion mais indique également la non réactivité de  $[^{13}\text{C}]\text{-30}$  avec ce même peptide. En effet, le signal caractéristique de l'hydroxycitronellal reste inchangé après 30 jours de suivi cinétique de la réaction bien que l'on observe l'apparition de certains adduits lors de l'étude mécanistique. La faible réactivité entre  $[^{13}\text{C}]\text{-30}$  et le glutathion montre que ce peptide est préférentiellement consommé par  $1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-31}$ . Le mélange se comporte, en conséquence, à la vue de la grande différence de réactivité entre  $[^{13}\text{C}]\text{-30}$  et  $1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-31}$ , comme si le citral était le seul produit réactif présent.



### III.2.2. Réactivité du mélange hydroxycitronellal-aldéhyde cinnamique

#### Aspects mécanistiques

La réactivité de l'hydroxycitronellal vis-à-vis du glutathion ayant été discutée dans la section précédente, seule une étude préliminaire de la réactivité de l'aldéhyde cinnamique seul en solution vis-à-vis du glutathion a été entreprise. Les adduits observés ainsi que leurs déplacements chimiques caractéristiques sont répertoriés dans la Figure 33.



Molécule	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	Molécule	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1-[ <sup>13</sup> C]-32	197,5	3-[ <sup>13</sup> C]-32	155,0
1-[ <sup>13</sup> C]-48	203,2	3-[ <sup>13</sup> C]-48	41,8-42,2
1-[ <sup>13</sup> C]-49	88,2	3-[ <sup>13</sup> C]-49	44,6-45,2

Figure 33 : Réactivité de [<sup>13</sup>C]-32 vis-à-vis du GSH : adduits formés et déplacements chimiques caractéristiques ( $\delta$ ).

Cette étude préliminaire a montré la formation des deux mêmes adduits entre le glutathion et l'aldéhyde cinnamique en utilisant les deux positions de marquage. Ces adduits, issus d'une attaque nucléophile du groupement thiol du glutathion au niveau de la position dite de Michael de l'aldéhyde cinnamique, concordent avec ceux décrits dans la littérature.

La Figure 34 montre le suivi par RMN de la réactivité entre le mélange [<sup>13</sup>C]-30/1-[<sup>13</sup>C]-32 et le glutathion, ainsi que l'apparition/disparition des signaux de RMN du carbone 13 caractéristiques des adduits observés lors de cette étude.

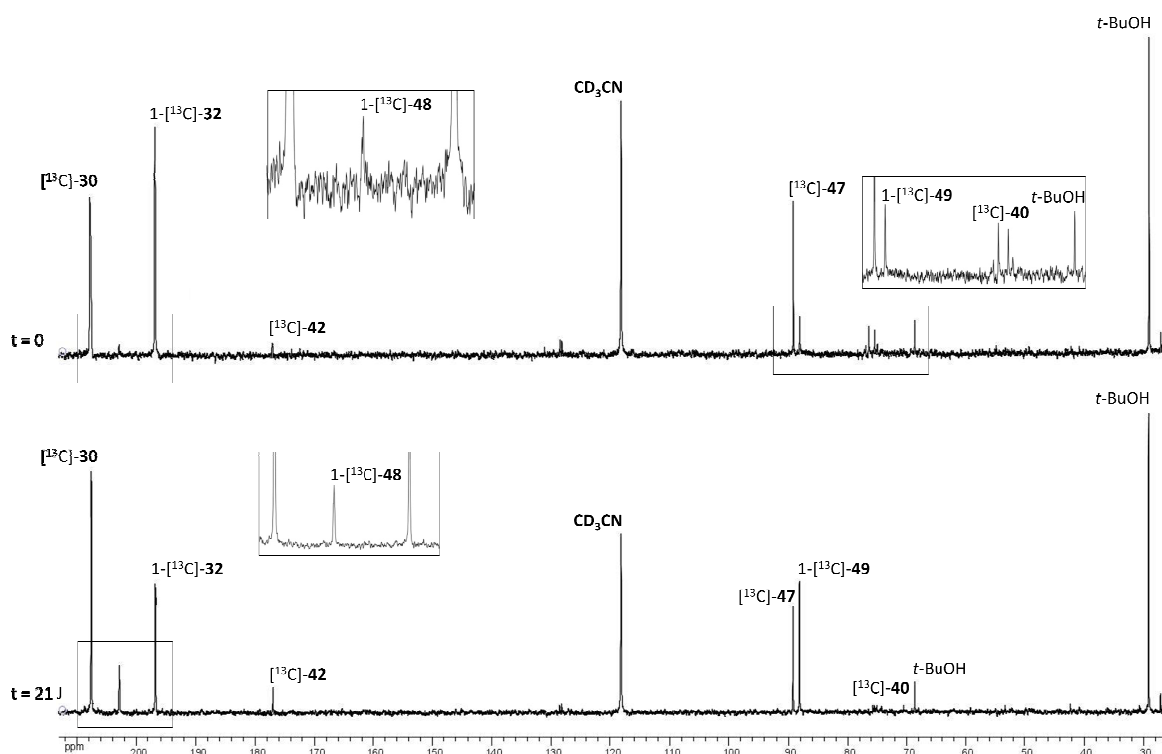


Figure 34 : Spectres de RMN du  $^{13}\text{C}$  de la réaction  $[^{13}\text{C}]\text{-30}/1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-32}/\text{GSH}$  à 0 et à 21 jours.

L'étude de la réactivité de ce mélange a montré la formation des deux mêmes adduits  $[^{13}\text{C}]\text{-40}$  et  $[^{13}\text{C}]\text{-42}$  entre le glutathion et l'hydroxycitronellal aussi observés lors de l'étude de la réaction  $[^{13}\text{C}]\text{-30}/1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-31}/\text{GSH}$ . Deux autres signaux de RMN à 203,2 ppm et à 88,2 ppm correspondant respectivement aux adduits  $1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-48}$  et  $1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-49}$  ont été observés. L'adduit  $1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-48}$  est issu de l'attaque nucléophile du groupement thiol du glutathion sur la position de Michael de l'aldéhyde cinnamique. Cet adduit est en équilibre dans le milieu réactionnel avec sa forme hydratée  $1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-49}$ . Le mécanisme de formation de ces composés est montré dans la Figure 35.

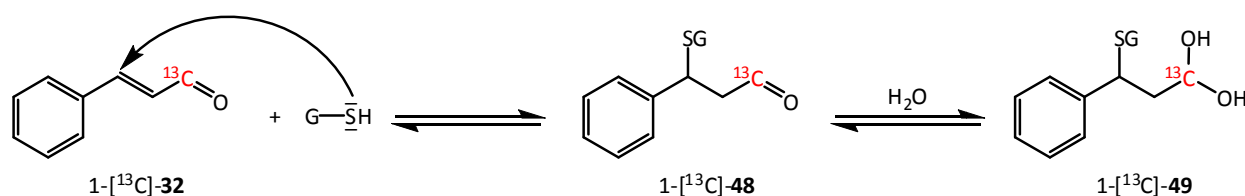


Figure 35 : Mécanisme réactionnel entre  $1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-32}$  et le GSH menant à la formation des adduits  $1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-48}$  et  $1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-49}$ .

La Figure 36 montre le suivi par RMN du carbone 13 de la réaction  $[^{13}\text{C}]\text{-30}/3\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-32}$  et le glutathion ainsi que les signaux caractéristiques des adduits formés lors de cette étude.

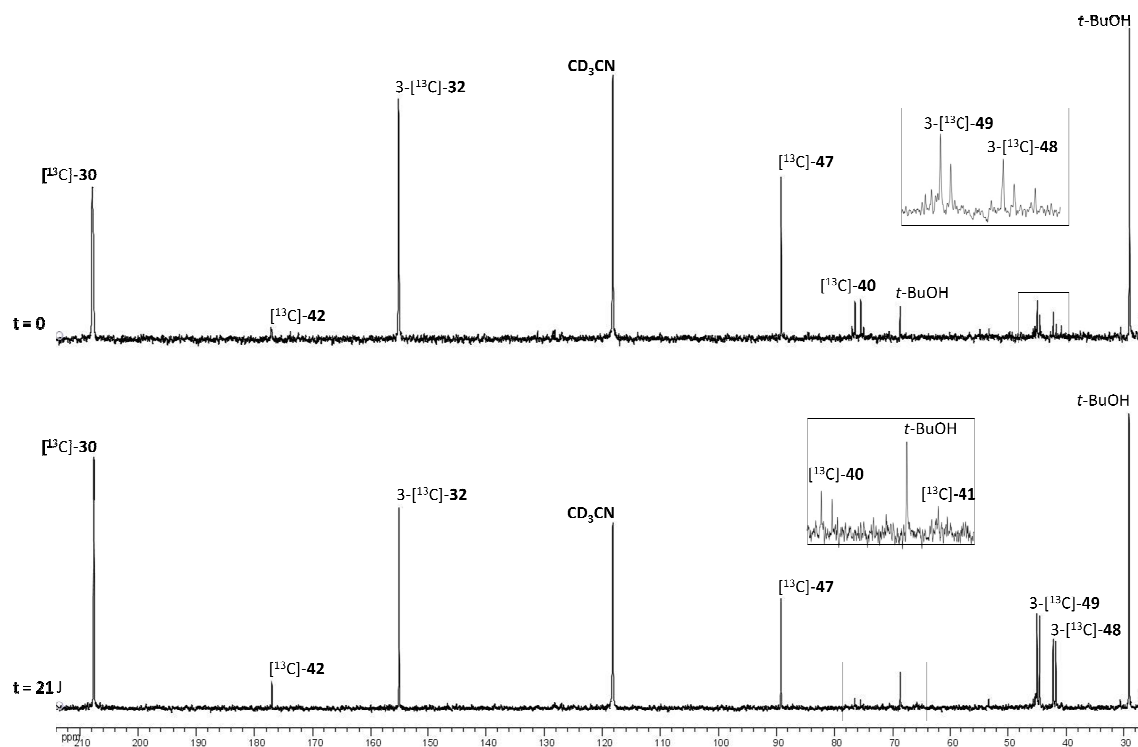


Figure 36 : Spectres de RMN de  $^{13}\text{C}$  de la réaction  $[^{13}\text{C}]\text{-30}/3\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-32}/\text{GSH}$  à 0 et à 21 jours.

L'étude de la réactivité du mélange  $[^{13}\text{C}]\text{-30}/3\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-32}$  vis-à-vis du glutathion a montré la formation des mêmes adduits entre l'hydroxycitronellal et ce peptide. De plus, le marquage au carbone 13 en position 3 de l'aldéhyde cinnamique lors de cette réaction a permis de confirmer la formation des adduits  $[^{13}\text{C}]\text{-48}$  et  $[^{13}\text{C}]\text{-49}$ . En effet, les corrélations hétéronucléaires  $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$  observées dans ce cas correspondent bien à celles obtenues lors de l'étude de cette réaction avec un marquage au carbone 13 en position 1 de l'aldéhyde cinnamique.

### Aspects cinétiques

La Figure 37 montre les quantités d'hydroxycitronellal et d'aldéhyde cinnamique présentes dans le milieu réactionnel au cours du temps.

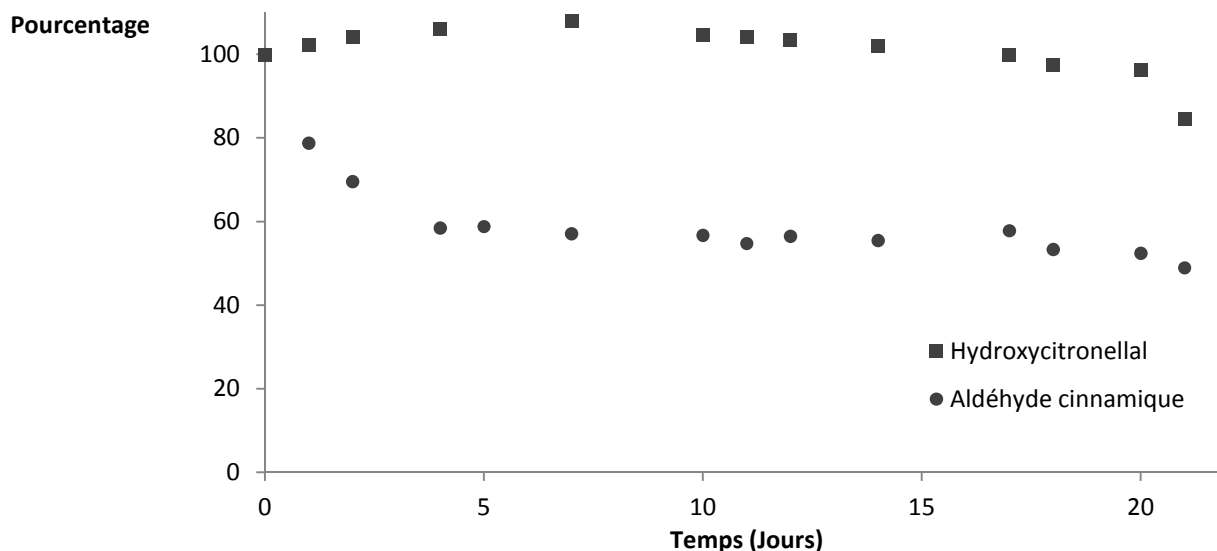


Figure 37 : Courbe représentant l'évolution en fonction du temps de la concentration de  $[^{13}\text{C}]\text{-30}$  et de  $1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-32}$  lors de la réaction entre le mélange et le GSH.

Cette courbe montre que l'hydroxycitronellal semble peu réagir avec le glutathion alors que l'aldéhyde cinnamique réagit très rapidement avec ce même peptide. Cependant, cette courbe montre également que la quantité présente d'aldéhyde cinnamique dans le milieu se stabilise dès le quatrième jour de réaction autour de 60 % sans subir de plus amples variations par la suite. Ce comportement indique la présence d'un équilibre entre l'adduit  $1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-48}$  et l'aldéhyde cinnamique. En effet, cet adduit est issu d'une addition dite de Michael et il est bien connu que ce type de réaction est réversible.

### III.2.3. Réactivité du mélange citral-aldéhyde cinnamique

#### Aspects mécanistiques

La réactivité individuelle de ces deux aldéhydes vis-à-vis du glutathion ayant été discutée dans les sections III.2.1 dans le cas du citral et III.2.2 dans le cas de l'aldéhyde cinnamique, seule la réactivité du mélange sera discutée dans cette section. Deux études ont été menées, l'une en s'intéressant à la réactivité du mélange citral/aldéhyde cinnamique portant tous les

deux un marquage au carbone 13 en position 1, et une autre avec ces mêmes molécules portant cette fois un marquage au carbone 13 en position 3.

La Figure 38 montre le suivi par RMN du carbone 13 de la réactivité entre le mélange 1-[<sup>13</sup>C]-**31**/1-[<sup>13</sup>C]-**32** et le glutathion.

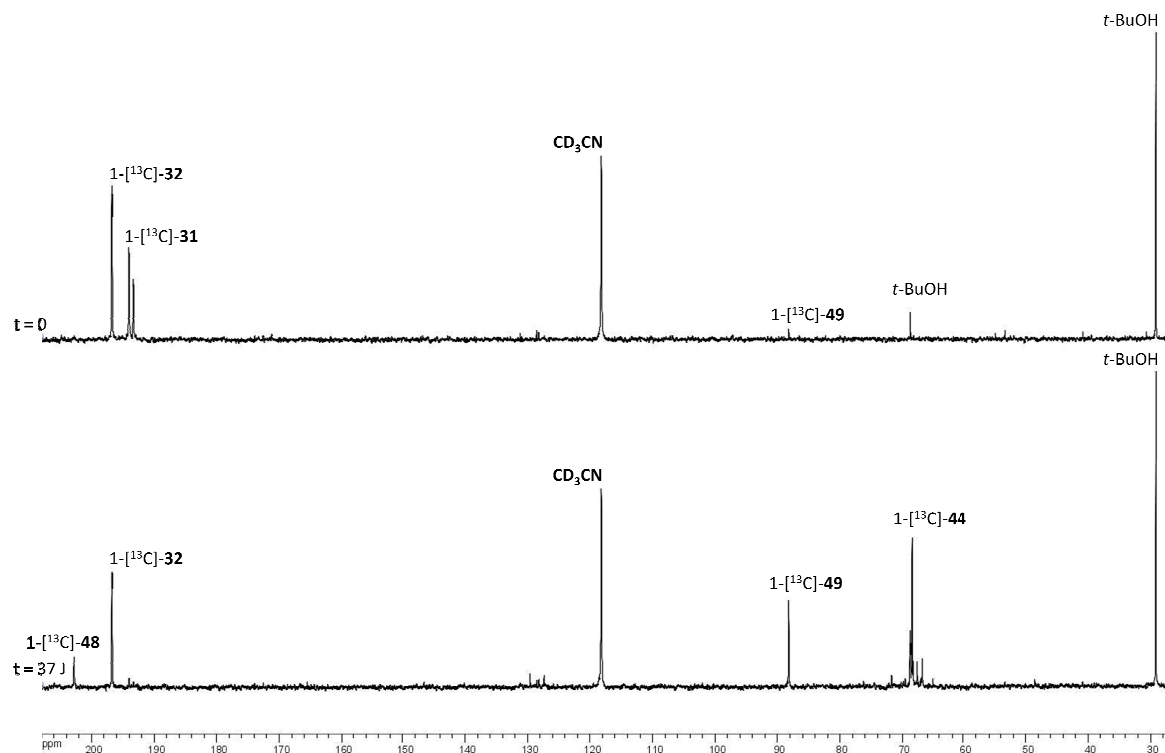


Figure 38 : Spectres de RMN du <sup>13</sup>C de la réaction 1-[<sup>13</sup>C]-**31**/1-[<sup>13</sup>C]-**32**/GSH à 0 et à 37 jours.

Les adduits observés lors de cette étude sont, pour le citral et pour l'aldéhyde cinnamique, similaires à ceux identifiés précédemment. En effet, les signaux à 203,2 ppm, 88,2 ppm et entre 67,8 ppm et 68,6 ppm sont caractéristiques des adduits 1-[<sup>13</sup>C]-**48**, 1-[<sup>13</sup>C]-**49** et 1-[<sup>13</sup>C]-**44** respectivement. La formation de ces composés est en accord complet avec les mécanismes proposés dans les sections précédentes (Figures 30 et 35). Il est également intéressant de noter que le citral a totalement réagi avec ce peptide au bout de 37 jours.

La Figure 39 montre l'étude de la réactivité du mélange de ces deux aldéhydes marqués au carbone 13 en position 3 vis-à-vis du glutathion.

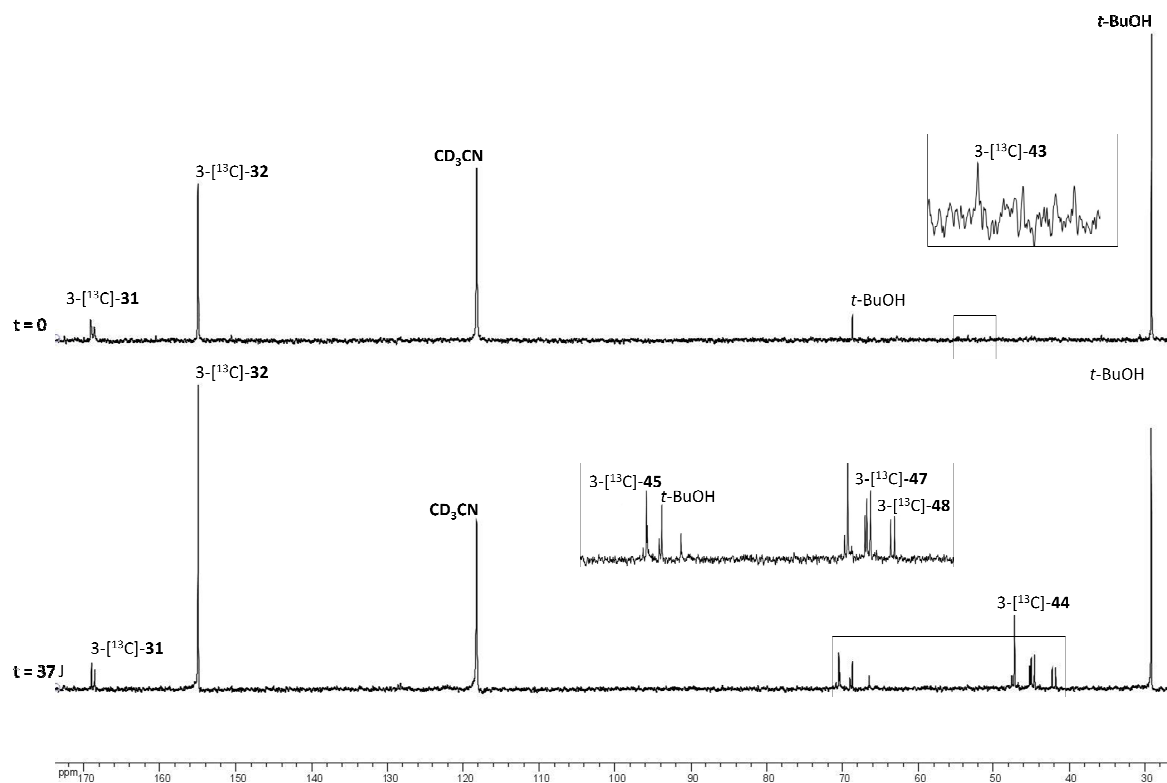


Figure 39 : Spectres de RMN du  $^{13}\text{C}$  de la réaction 3- $^{13}\text{C}$ -31/3- $^{13}\text{C}$ -32/GSH à 0 et à 37 jours.

Cette étude confirme les résultats obtenus précédemment. En effet, les déplacements chimiques du carbone 13 ainsi que les corrélations hétéronucléaires  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  observées ici correspondent bien aux adduits 3- $^{13}\text{C}$ -48, 3- $^{13}\text{C}$ -49 et 3- $^{13}\text{C}$ -45. De plus, l'adduit 3- $^{13}\text{C}$ -43 menant au composé 3- $^{13}\text{C}$ -44 est également observé lors du suivi mécanistique de cette réaction.

### Aspects cinétiques

La Figure 40 représente les quantités de citral et d'aldéhyde cinnamique présentes dans le milieu durant la réaction 1- $^{13}\text{C}$ -31/1- $^{13}\text{C}$ -32/GSH.

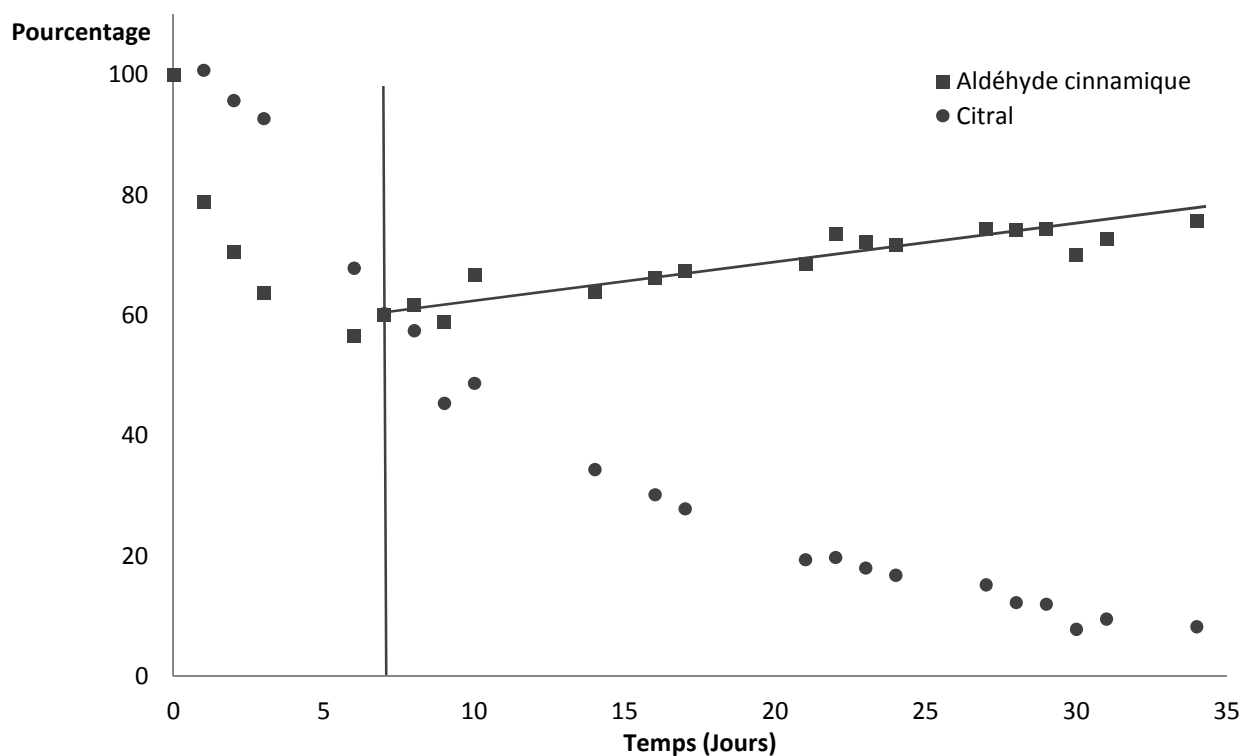


Figure 40 : Courbe représentant l'évolution en fonction du temps de la concentration de 1-[<sup>13</sup>C]-**31** et de 1-[<sup>13</sup>C]-**32** lors de la réaction entre le mélange et le GSH.

Cette courbe, représentant la consommation de citral et d'aldéhyde cinnamique par le glutathion en fonction du temps, montre deux zones distinctes. Dans un premier temps, entre  $t = 0$  et  $t = 7$  jours, l'aldéhyde cinnamique réagit plus rapidement que le citral. Cependant, la quantité de 1-[<sup>13</sup>C]-**32** présent dans le milieu se stabilise rapidement aux alentours de 60 %. Ensuite, après ce délai, la quantité résultante de citral, dont la diminution était plus régulière, continue à être consommée par le glutathion.

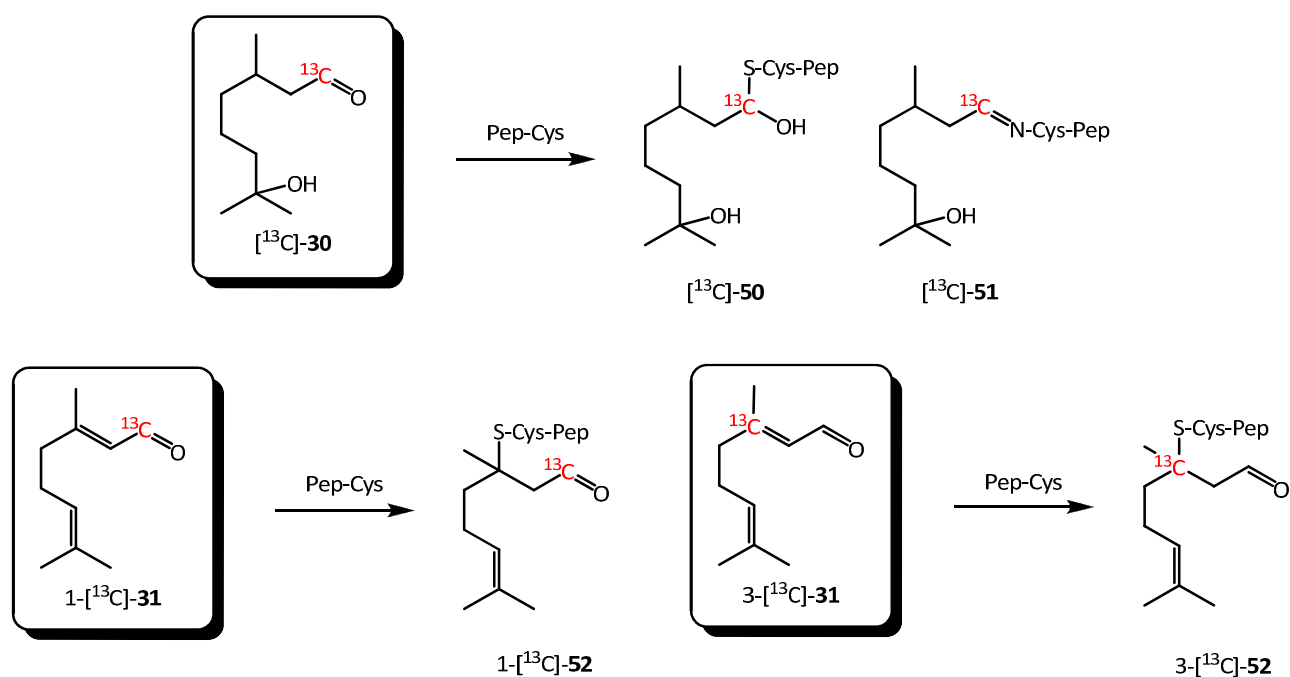
Il est intéressant de noter ici que les consommations d'aldéhyde cinnamique et de citral lors de cette étude sont similaires à celles observées lors des études cinétiques en présence d'hydroxycitronellal. En effet, dans les deux cas, la quantité d'aldéhyde cinnamique diminue rapidement dans les premiers jours pour se stabiliser à 60 % de la quantité initiale dès le quatrième jour après quoi, du fait de la consommation du peptide par le citral, cette quantité augmente sensiblement avec le temps. De plus, l'évolution de la quantité de citral présente dans le milieu évolue également de la même façon qu'il soit en mélange avec l'hydroxycitronellal ou avec l'aldéhyde cinnamique.

### III.3. Réactivité des mélanges d'aldéhydes vis-à-vis du peptide cystéine

#### III.3.1. Réactivité du mélange hydroxycitronellal-citral

##### Aspects mécanistiques

Des études préliminaires portant sur la réactivité de l'hydroxycitronellal d'une part, et celle du citral d'autre part, vis-à-vis du peptide cystéine ont été menées afin d'identifier les différents adduits susceptibles de se former lors de l'étude de la réactivité du mélange de ces deux aldéhydes. Les adduits observés ainsi que leurs déplacements chimiques du carbone 13 caractéristiques sont répertoriés dans la Figure 41.



Molécule	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	Molécule	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	Molécule	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
[ $^{13}\text{C}$ ]-30	207,1	1-[ $^{13}\text{C}$ ]-31	193,1-193,8	3-[ $^{13}\text{C}$ ]-31	168,1-168,5
[ $^{13}\text{C}$ ]-50	76,3	1-[ $^{13}\text{C}$ ]-52	204,4	3-[ $^{13}\text{C}$ ]-52	46,7
[ $^{13}\text{C}$ ]-51	161				

Figure 41 : Réactivité individuelle de [ $^{13}\text{C}$ ]-30 et de [ $^{13}\text{C}$ ]-31 vis-à-vis du Pep-Cys : adduits formés et déplacements chimiques caractéristiques ( $\delta$ ).



Les adduits formés lors de ces études correspondent à ceux décrits dans la littérature et sont analogues à ceux identifiés dans les sections précédentes concernant la réactivité avec le glutathion. En effet, ils résultent pour la plus part d'une attaque nucléophile du groupement thiol du peptide cystéine soit sur la position de Michael dans le cas du citral, soit sur la fonction carbonyle dans le cas de l'hydroxycitronellal. Aussi, en présence du peptide cystéine, un autre adduit, de type imine a pu être identifié. Il s'agit du composé  $^{13}\text{C}$ -**51**, issu d'une attaque nucléophile du groupement amine de l'arginine du peptide cystéine sur la fonction de Michael de l'hydroxycitronellal.

La Figure 42 montre le suivi par RMN du carbone 13 de la réactivité entre le mélange  $^{13}\text{C}$ -**30**/1- $^{13}\text{C}$ -**31** et le peptide cystéine.

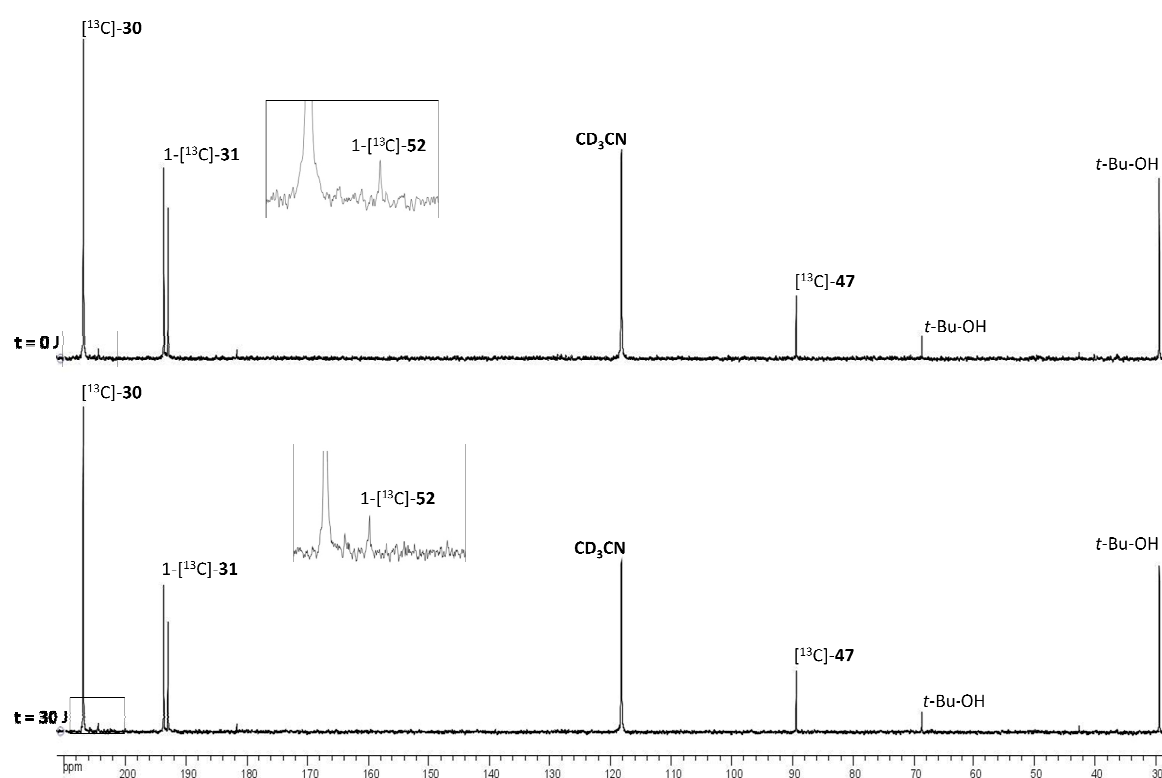


Figure 42 : Spectres de RMN du  $^{13}\text{C}$  de la réaction  $^{13}\text{C}$ -**30**/1- $^{13}\text{C}$ -**31**/Pep-Cys à 0 et à 30 jours.

Hormis les signaux caractéristiques des aldéhydes  $^{13}\text{C}$ -**30** et 1- $^{13}\text{C}$ -**31**, deux autres signaux apparaissent à 204,4 ppm et à 89,5 ppm. Ils correspondent respectivement à l'adduit 1- $^{13}\text{C}$ -**52**, provenant de l'attaque nucléophile du groupement thiol du peptide cystéine sur la position de Michael de 1- $^{13}\text{C}$ -**31**, et à la forme hydratée de l'hydroxycitronellal  $^{13}\text{C}$ -**47**. Aucune évolution de la réaction n'a pu être observée par la suite. La Figure 43 montre le mécanisme de formation de l'adduit 1- $^{13}\text{C}$ -**52**.

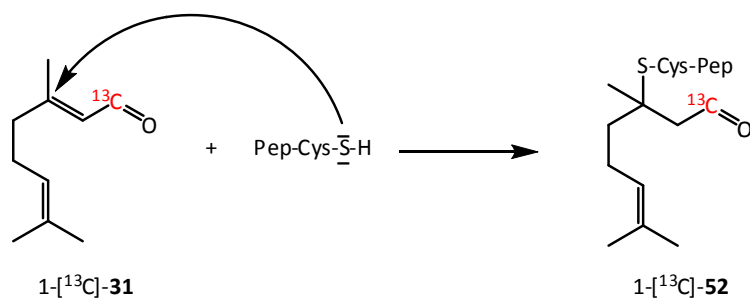


Figure 43 : Mécanisme réactionnel entre  $1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-31}$  et Pep-Cys menant à la formation de l'adduit  $1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-52}$ .

La Figure 44 montre le suivi de la réactivité entre le mélange  $[^{13}\text{C}]\text{-30}/3\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-31}$  et le peptide cystéine.

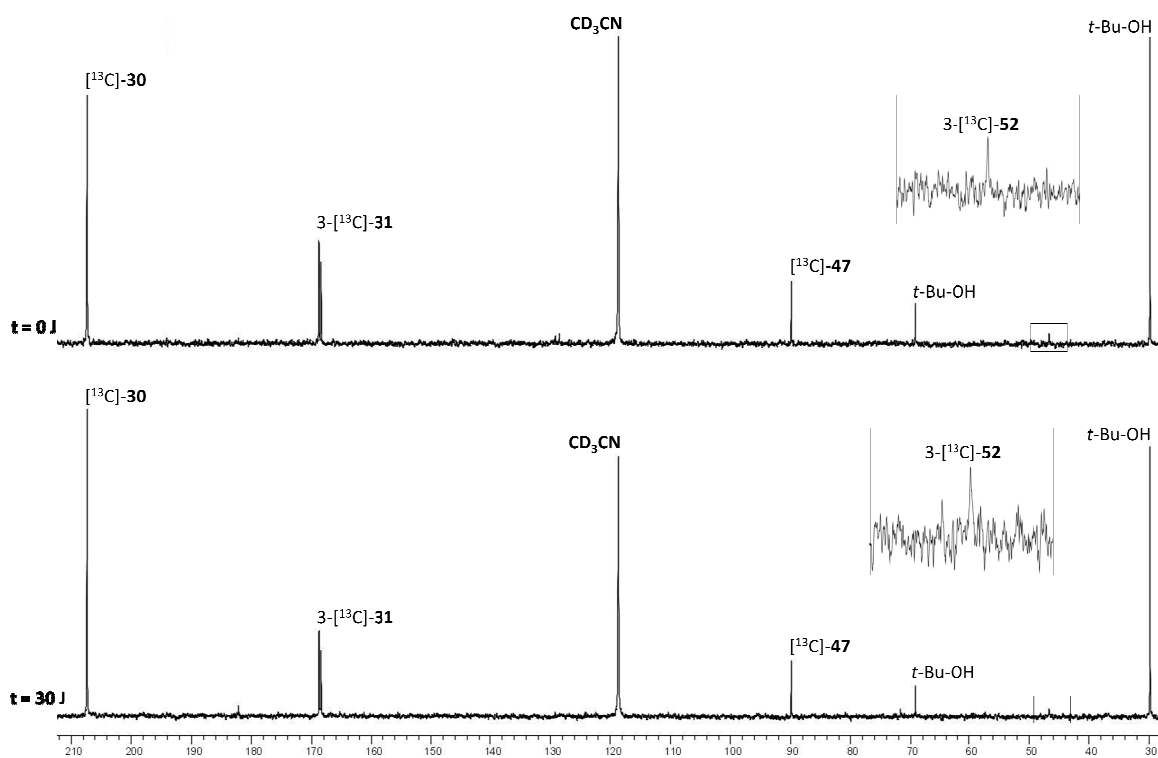


Figure 44 : Spectres de RMN de la réaction  $[^{13}\text{C}]\text{-30}/3\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-31}/\text{Pep-Cys}$  à 0 et à 30 jours.

Le suivi par RMN de cette réaction confirme les résultats obtenus précédemment. En effet, à nouveau, un seul adduit issu de la réactivité du citral envers le peptide cystéine,  $[^{13}\text{C}]\text{-52}$ , a pu être observé. Aussi, dans ces conditions, l'hydroxycitronellal ne mène à la formation que d'un composé,  $[^{13}\text{C}]\text{-47}$ , la forme hydratée de cet aldéhyde.

## Aspects cinétiques

La Figure 45 montre l'évolution des quantités de 1- $^{13}\text{C}$ -**31** et de  $^{13}\text{C}$ -**30** au cours de la réaction entre le mélange de ces deux molécules et le peptide cystéine.

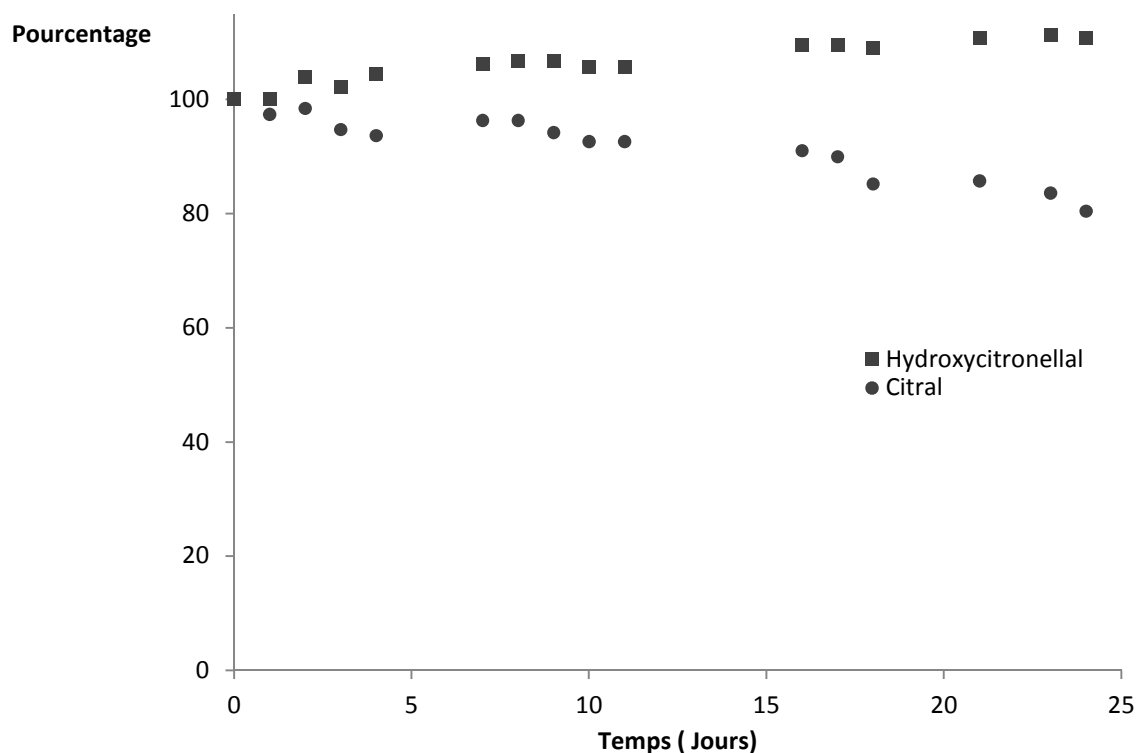


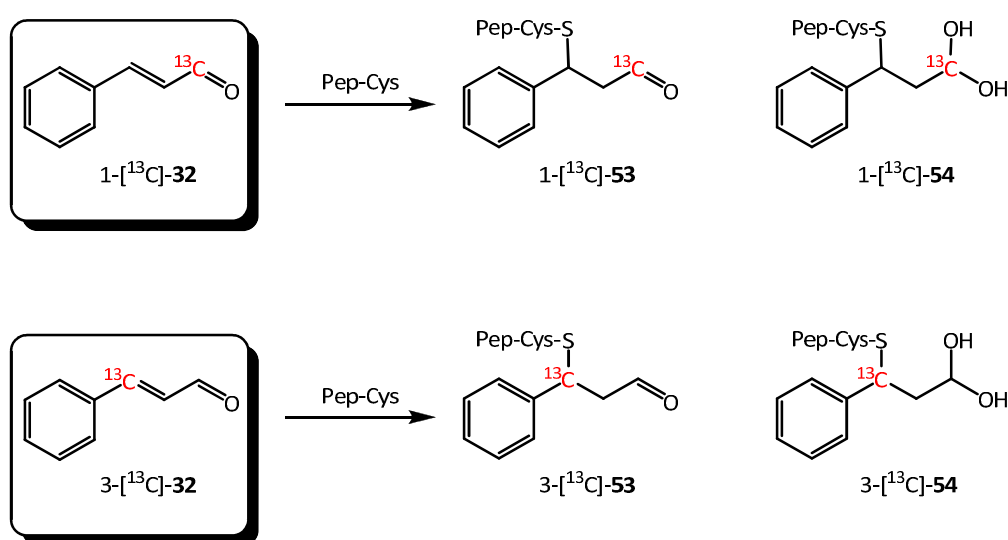
Figure 45 : Courbe représentant l'évolution en fonction du temps de la concentration de  $^{13}\text{C}$ -**30** et 1- $^{13}\text{C}$ -**31** lors de la réaction entre le mélange et le Pep-Cys.

Cette courbe confirme bien les résultats observés lors de l'étude mécanistique de cette réaction. En effet, seule la quantité présente dans le milieu réactionnel de 1- $^{13}\text{C}$ -**31** diminue avec le temps, la concentration en  $^{13}\text{C}$ -**30** restant constante tout au long de cette étude. Le peptide cystéine semble réagir préférentiellement avec 1- $^{13}\text{C}$ -**31**. Il pourrait être considéré que le mélange se comporte d'un point de vue réactionnel comme si le citral était seul en solution.

### III.3.2. Réactivité du mélange hydroxycitronellal-aldéhyde cinnamique

#### Aspects mécanistiques

Une étude préliminaire portant sur la réactivité de l'aldéhyde cinnamique vis-à-vis du peptide cystéine a été entreprise. Les adduits alors observés ainsi que leurs déplacements chimiques du carbone 13 caractéristiques sont répertoriés dans la Figure 46.



Molécule	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	Molécule	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1- $^{13}\text{C}$ -32	197,5	3- $^{13}\text{C}$ -32	155
1- $^{13}\text{C}$ -53	202,7	3- $^{13}\text{C}$ -53	41,9
1- $^{13}\text{C}$ -54	88,2	3- $^{13}\text{C}$ -54	44,6-44,7

Figure 46 : Réactivité de  $^{13}\text{C}$ -32 vis-à-vis du Pep-Cys : adduits formés et déplacements chimiques caractéristiques ( $\delta$ ).

Lors de cette étude préliminaire, la formation d'un seul adduit  $^{13}\text{C}$ -53 a été observé par réaction entre l'aldéhyde cinnamique et le peptide cystéine. Les déplacements chimiques du carbone 13 caractéristiques de cet adduit sont 202,7 ppm pour le groupement carbonyle (1- $^{13}\text{C}$ -53) et 41,9 ppm pour le carbone en position 3 portant le peptide cystéine (3- $^{13}\text{C}$ -53). La forme hydratée de cet adduit a également pu être observée.

La Figure 47 montre le suivi par RMN du carbone 13 de la réaction entre le mélange  $[^{13}\text{C}]$ -**30**/1- $[^{13}\text{C}]$ -**32** et le peptide cystéine.

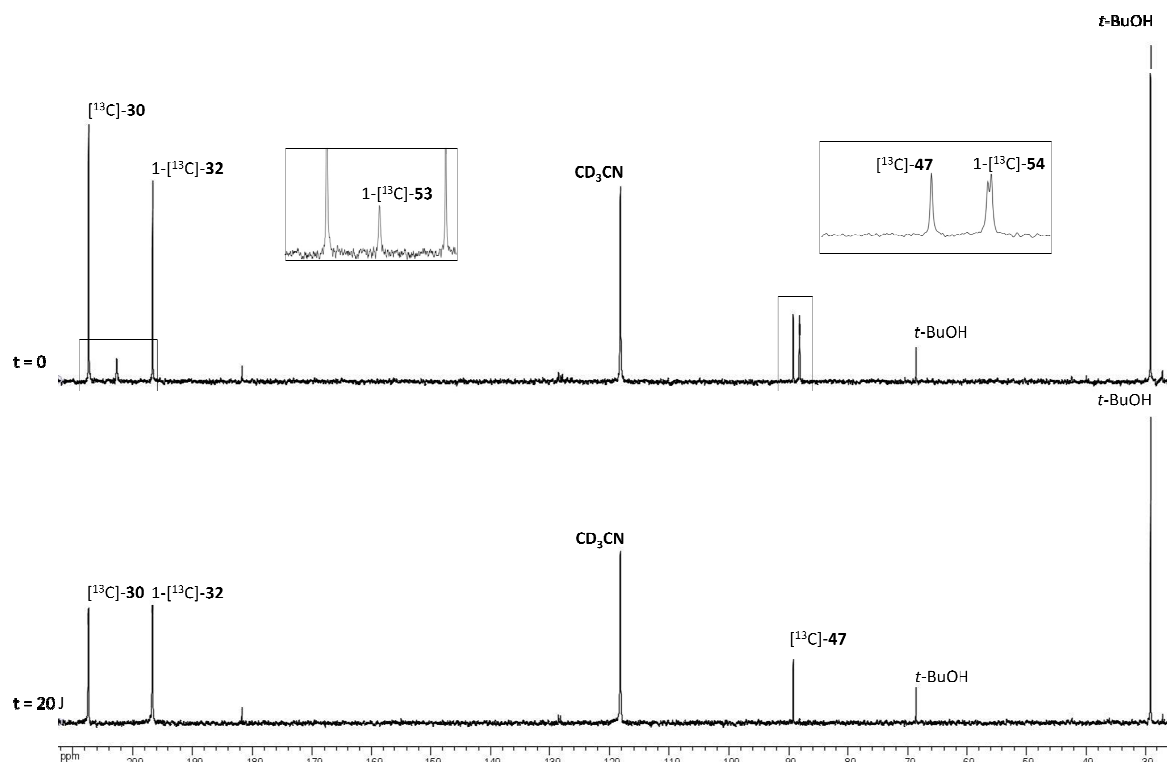


Figure 47 : Spectres de RMN du  $^{13}\text{C}$  de la réaction  $[^{13}\text{C}]$ -**30**/1- $[^{13}\text{C}]$ -**32**/Pep-Cys à 0 et à 20 jours.

Cette étude montre l'apparition de l'adduit 1- $[^{13}\text{C}]$ -**53** ainsi que sa forme hydratée 1- $[^{13}\text{C}]$ -**54** dès la première expérience de RMN. Cependant, tout au long du suivi de cette réaction aucun adduit provenant de la réactivité de l'hydroxycitronellal n'a pu être observé. L'adduit 1- $[^{13}\text{C}]$ -**53** est issu de l'attaque nucléophile du groupement thiol du peptide cystéine sur la position de Michael de l'aldéhyde cinnamique. Cet adduit est soumis à un équilibre en milieu aqueux avec sa forme hydratée 1- $[^{13}\text{C}]$ -**54** (Figure 48).

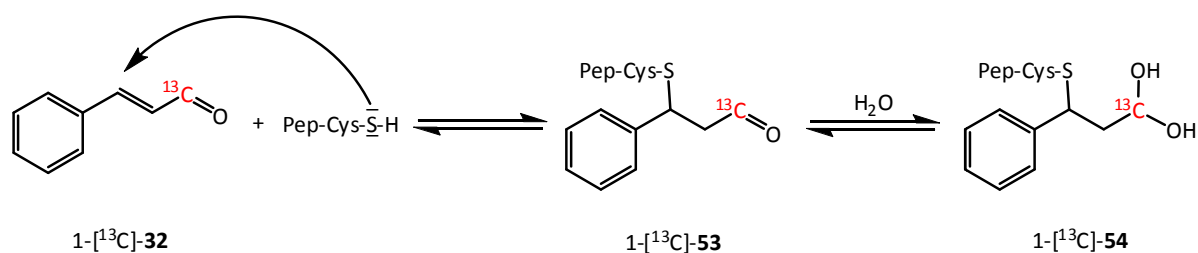


Figure 48 : Mécanisme réactionnel entre 1- $[^{13}\text{C}]$ -**32** et Pep-Cys menant à la formation des adduits 1- $[^{13}\text{C}]$ -**53** et 1- $[^{13}\text{C}]$ -**54**.

Les signaux caractéristiques de ces deux composés adduits 1- $^{13}\text{C}$ -**53** et 1- $^{13}\text{C}$ -**54** disparaissent au bout de 20 jours de réaction. Il est possible à la vue de cette étude que l'aldéhyde cinnamique forme très rapidement avec le peptide cystéine un adduit instable qui pourrait se dissocier au cours du temps au profit des deux composés précurseurs. Il a en effet été montré par Esterbauer *et al.*<sup>32</sup> qu'un équilibre s'établit entre les aldéhydes  $\alpha,\beta$ -insaturés et leurs adduits avec le glutathion. Il a également été montré que le temps de demi-vie de ces adduits varie énormément en fonction des aldéhydes étudiés. Il est alors probable que l'aldéhyde 1- $^{13}\text{C}$ -**32** réagisse très rapidement avec le peptide cystéine pour former l'adduit 1- $^{13}\text{C}$ -**53** et que celui-ci, du fait de sa faible stabilité dans les conditions de l'étude, se dissocie en aldéhyde cinnamique d'une part et en peptide cystéine d'autre part.

La Figure 49 montre le suivi de la réaction entre le mélange  $^{13}\text{C}$ -**30**/ $^{13}\text{C}$ -**32** et le peptide cystéine.

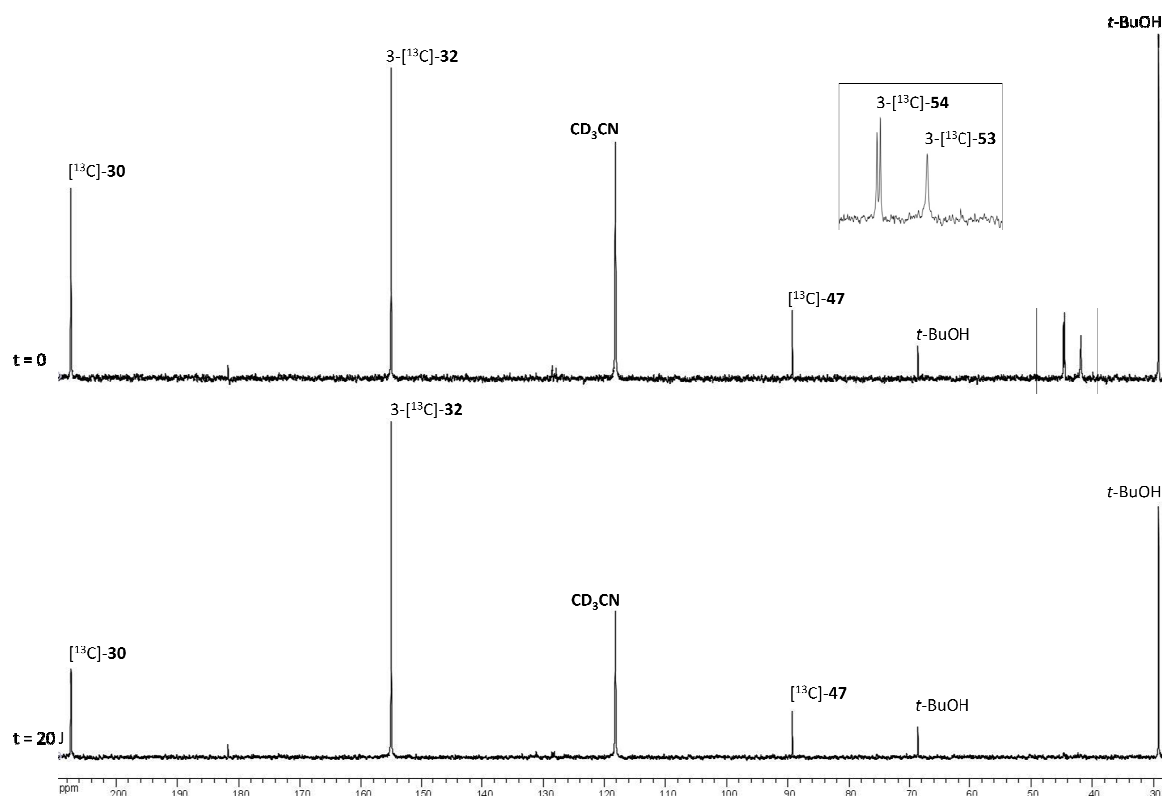


Figure 49 : Spectres de RMN du  $^{13}\text{C}$  de la réaction  $^{13}\text{C}$ -**30**/ $^{13}\text{C}$ -**32**/Pep-Cys à 0 et à 20 jours.

Ces expériences ont corroboré les observations faites lors de l'étude de la réactivité du mélange  $^{13}\text{C}$ -**30**/ $^{13}\text{C}$ -**32** vis-à-vis du peptide cystéine. En effet, les mêmes adduits  $^{13}\text{C}$ -

**53** et  $[^{13}\text{C}]$ -**54** ainsi que le produit d'hydrolyse de  $[^{13}\text{C}]$ -**30** sont formés dans les deux cas. De plus, les signaux caractéristiques de 3- $[^{13}\text{C}]$ -**53** et de 3- $[^{13}\text{C}]$ -**54** disparaissent également au bout de 20 jours de réaction.

Afin de mieux comprendre le pourquoi d'une telle disparition, une étude cinétique de la réaction  $[^{13}\text{C}]$ -**30**/ $[^{13}\text{C}]$ -**32**/Pep-Cys a été entreprise.

### Aspects cinétiques

La Figure 50 montre l'évolution des quantités de 1- $[^{13}\text{C}]$ -**32** et de  $[^{13}\text{C}]$ -**30** au cours de la réaction entre le mélange de ces deux molécules et le peptide cystéine.

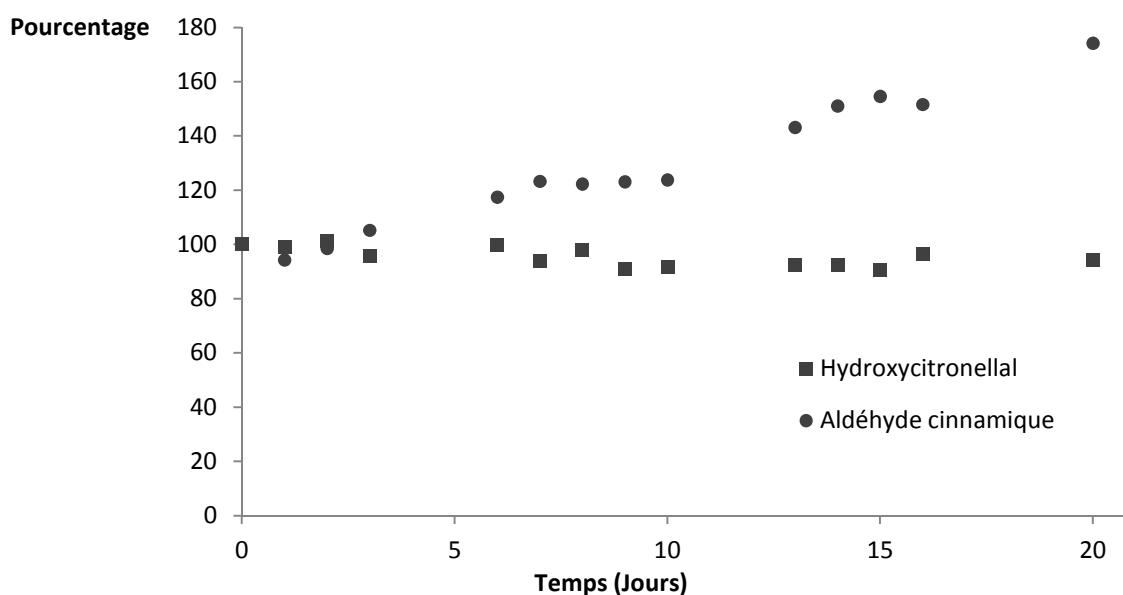


Figure 50 : Courbe représentant l'évolution en fonction du temps de la concentration de  $[^{13}\text{C}]$ -**30** et de 1- $[^{13}\text{C}]$ -**32** lors de la réaction entre le mélange et le Pep-Cys.

Cette courbe représentant l'évolution de la quantité présente dans le milieu réactionnel de  $[^{13}\text{C}]$ -**30** et de 1- $[^{13}\text{C}]$ -**32** en fonction du temps lors de la réaction entre le mélange de ces deux molécules avec le peptide cystéine, montre une forte augmentation de l'intensité du signal RMN du carbone 13 caractéristique de l'aldéhyde cinnamique au cours du suivi cinétique de la réaction. Cette augmentation est certainement due à une dissociation des

adduits observée précédemment. En effet, l'expérience dite « t = 0 » reflétant réellement la quantité des composés étudiés durant la première heure de la réaction, il se peut que le maximum de réactivité entre l'aldéhyde cinnamique et le peptide cystéine ait été déjà atteint et que l'on assiste durant le reste de l'étude à la dissociation des adduits observés au début de l'étude mécanistique.

Afin de compléter ces résultats et de mieux comprendre les phénomènes mis en jeu au début de cette réaction, une nouvelle étude cinétique a du être effectuée en enregistrant cette fois un spectre de RMN du carbone 13 du mélange réactionnel non plus tous les jours comme précédemment mais toutes les deux heures pendant trois jours (Figure 51).

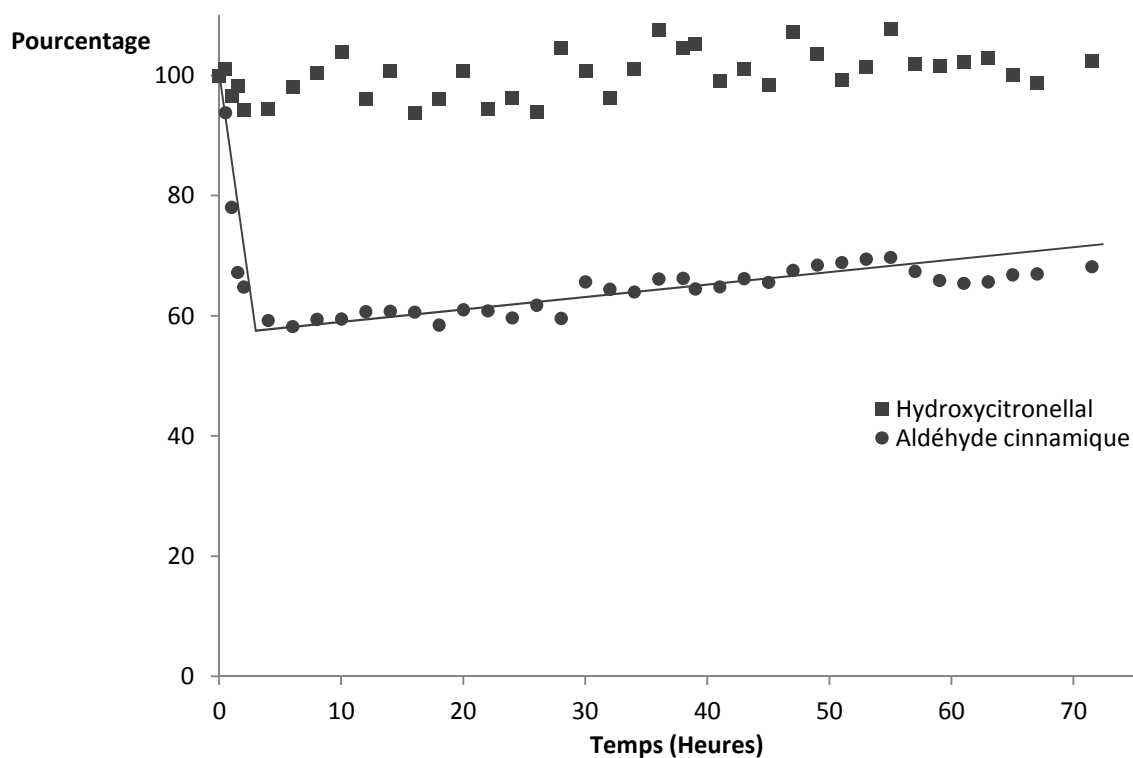


Figure 51 : Courbe représentant l'évolution pendant 3 jours de la concentration de  $^{13}\text{C}$ -**30** et de  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -**32** lors de la réaction entre le mélange et le Pep-Cys. Mesures réalisées toutes les deux heures.

Ces expériences ont montré que, en effet,  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -**32** réagit très rapidement avec le peptide cystéine dans les premières heures de l'étude. Une fois l'équilibre atteint, la concentration dans le milieu en  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -**32** commence à augmenter lentement avec le temps ce qui rejoint les observations faites précédemment. La dissociation des adduits entre l'aldéhyde cinnamique et le peptide cystéine est certainement due à une dimérisation du peptide



déplaçant l'équilibre vers la formation d'aldéhyde cinnamique. De plus, cette expérience permet également de déterminer les quantités de  $1\text{-}^{13}\text{C}\text{-32}$  et de  $^{13}\text{C}\text{-30}$  dans le milieu après 24 heures (temps de lecture du DPRA) de réaction avec le peptide cystéine. Celles-ci sont de 60 % environ pour  $1\text{-}^{13}\text{C}\text{-32}$  et de 95 % pour  $^{13}\text{C}\text{-30}$ .

### III.3.3. Réactivité du mélange citral-aldéhyde cinnamique

#### Aspects mécanistiques

Les études préliminaires de la réactivité de ces deux molécules séparément vis-à-vis du peptide cystéine ayant déjà été discutées dans les sections précédentes (III.3.1 et III.3.2), l'étude de la réactivité du mélange  $1\text{-}^{13}\text{C}\text{-31}/1\text{-}^{13}\text{C}\text{-32}$  à été entreprise directement. La Figure 52 montre le suivi par RMN de la réactivité de ce mélange envers le peptide cystéine.

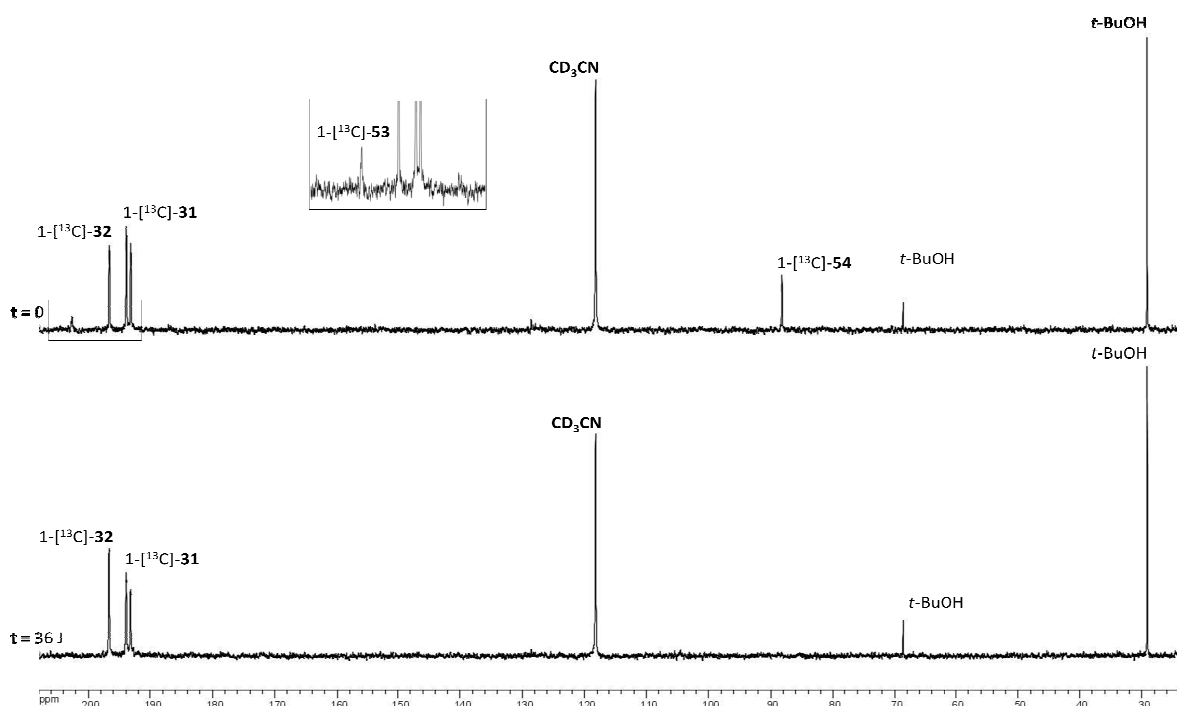


Figure 52 : Spectres de RMN du  $^{13}\text{C}$  de la réaction  $1\text{-}^{13}\text{C}\text{-31}/1\text{-}^{13}\text{C}\text{-32}/\text{Pep-Cys}$  à 0 et à 36 jours.

L'étude de ces spectres montre la formation des adduits  $1\text{-}^{13}\text{C}\text{-53}$  et  $1\text{-}^{13}\text{C}\text{-54}$  dès la première expérience, puis la disparition de leurs signaux caractéristiques avec le temps. Après 36 jours de réaction, le signal caractéristique de  $1\text{-}^{13}\text{C}\text{-31}$  semble s'être affaibli sans

qu'aucun nouveau signal n'apparaisse sur les spectres de RMN. La raison de la disparition des signaux caractéristiques des adduits 1- $^{13}\text{C}$ -**53** et 1- $^{13}\text{C}$ -**54** avec le temps est la même que celle évoquée précédemment lors de l'étude du mélange  $^{13}\text{C}$ -**30**/1- $^{13}\text{C}$ -**32**. En effet, les conditions expérimentales de ces deux expériences étant similaires il est tout à fait logique que les observations faites se recourent. De plus, les mécanismes menant à la formation des adduits observés lors de cette étude ont également été discutés.

Aussi, nous avons suivi la même réaction en utilisant les composés portant un carbone marqué en position 3.

La Figure 53 montre le suivi par RMN de la réactivité du mélange 3- $^{13}\text{C}$ -**31**/3- $^{13}\text{C}$ -**32** envers le peptide cystéine.

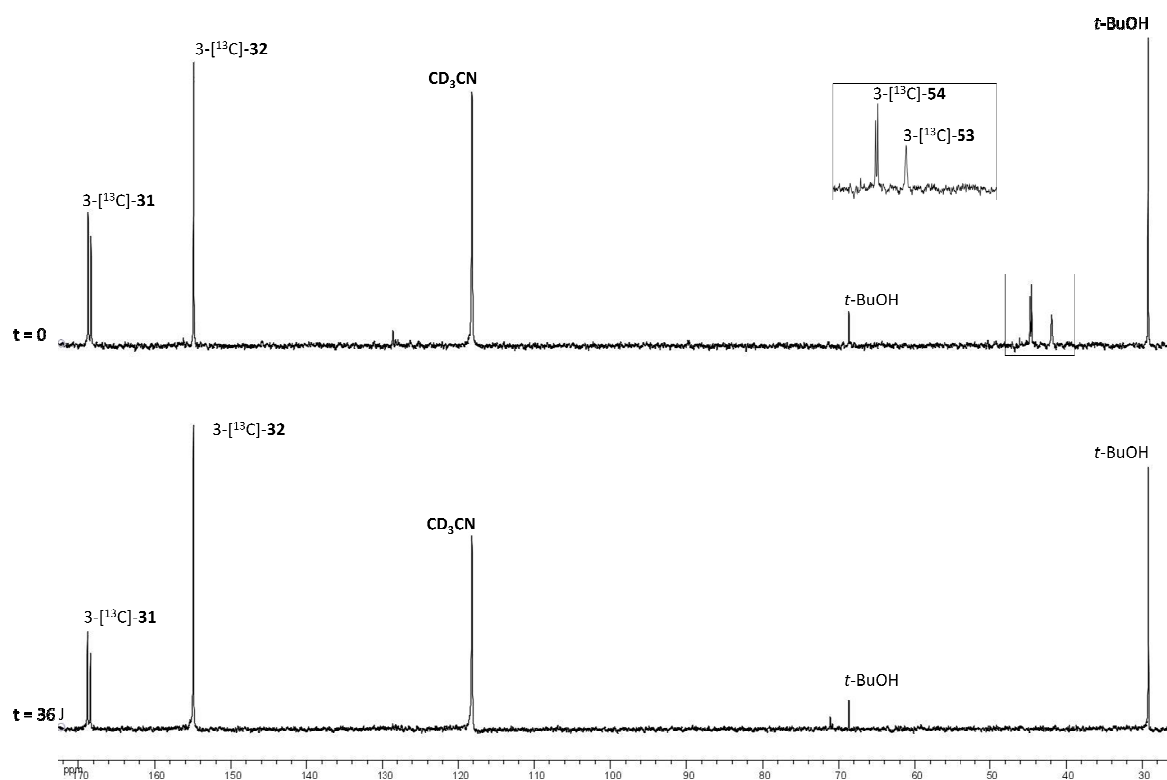


Figure 53 : Spectres de RMN du  $^{13}\text{C}$  de la réaction 3- $^{13}\text{C}$ -**31**/3- $^{13}\text{C}$ -**32**/Pep-Cys à 0 et à 36 jours.

Lors de cette étude, les mêmes observations peuvent être faites que lors de l'étude du mélange de ces molécules marquées au carbone 13 en position 1. En effet, les mêmes

adduits 3- $^{13}\text{C}$ -**53** et 3- $^{13}\text{C}$ -**54** ont été observés lors des premiers spectres de RMN, puis disparaissent lentement au cours du temps.

### Aspects cinétiques

La Figure 54 montre l'évolution des quantités de 1- $^{13}\text{C}$ -**31** et de 1- $^{13}\text{C}$ -**32** au cours de la réaction entre le mélange de ces deux molécules et le peptide cystéine.

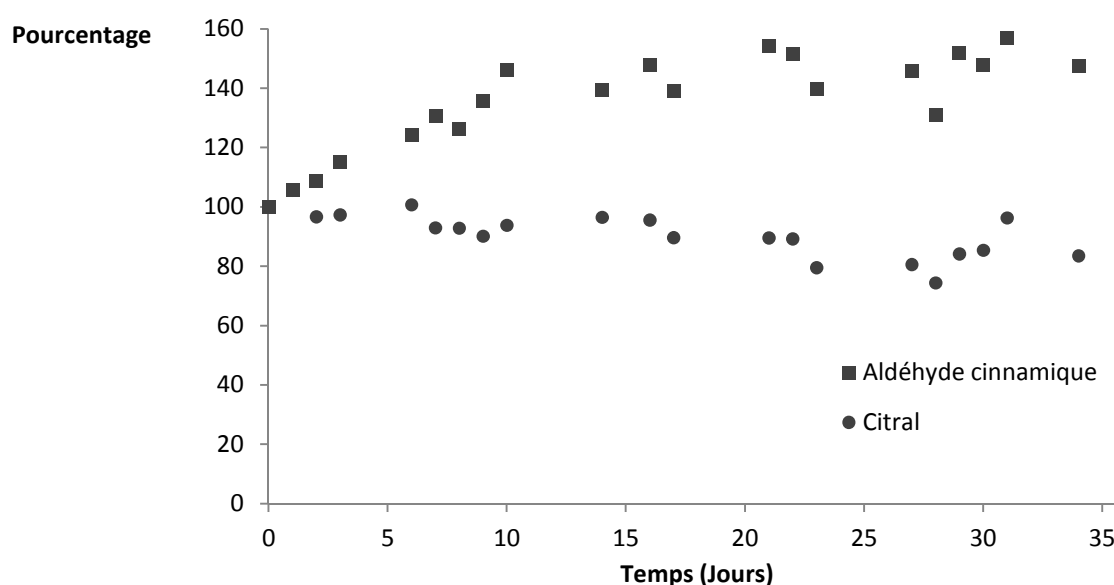


Figure 54 : Courbe représentant l'évolution en fonction du temps de la concentration de 1- $^{13}\text{C}$ -**31** et de 1- $^{13}\text{C}$ -**32** lors de la réaction entre le mélange et le Pep-Cys.

Cette courbe montrant l'évolution de la concentration de 1- $^{13}\text{C}$ -**31** et de 1- $^{13}\text{C}$ -**32** au cours du temps a le même aspect que celle concernant le mélange  $^{13}\text{C}$ -**30**/1- $^{13}\text{C}$ -**32**. En effet, aussi dans ce cas-ci, la concentration en aldéhyde cinnamique augmente sensiblement, ceci étant certainement dû à l'équilibre évoqué dans la section précédente entre l'aldéhyde cinnamique et son adduit avec le peptide cystéine. Cependant, il est également intéressant de noter que la concentration en 1- $^{13}\text{C}$ -**31** diminue lentement avec le temps, ce qui indique que les adduits formés entre le citral et le peptide cystéine semblent être thermodynamiquement plus stables que ceux formés avec l'aldéhyde cinnamique.

Une nouvelle étude a également été entreprise en suivant la cinétique de cette réaction non plus jour après jour mais toutes les 30 minutes pendant deux jours. La Figure 55 montre la courbe ainsi obtenue.

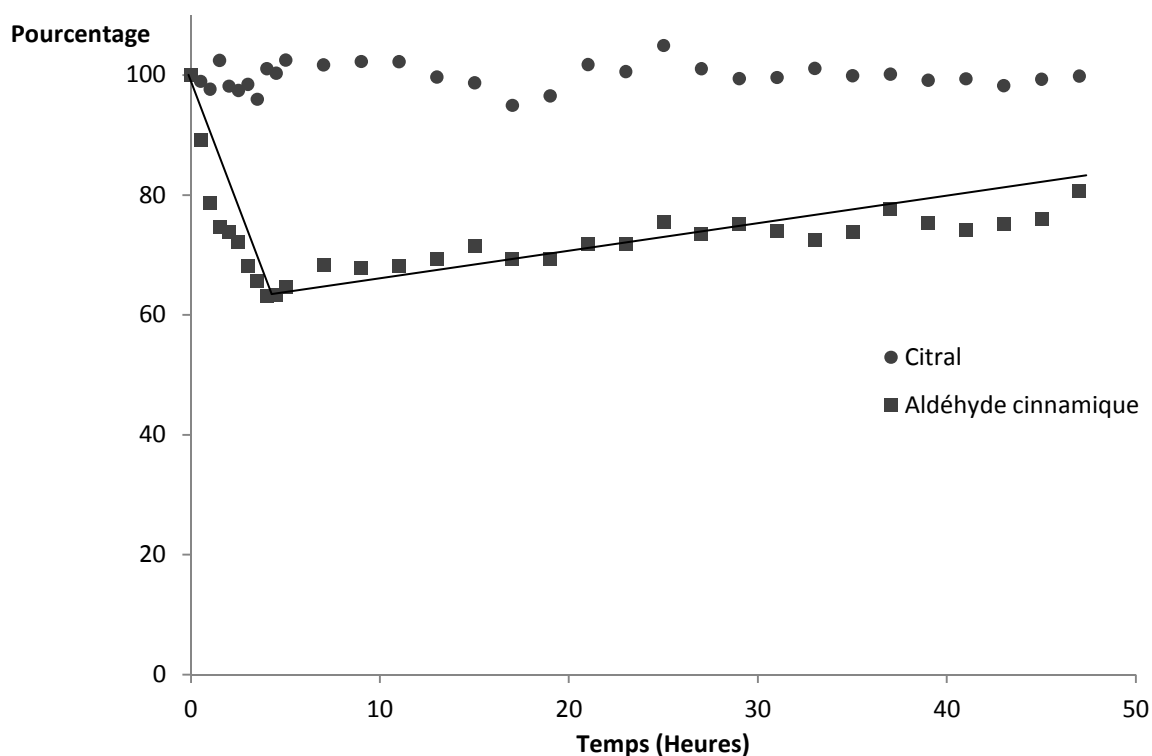


Figure 55 : Courbe représentant l'évolution pendant deux jours de la concentration de 1- $^{13}\text{C}$ -**31** et de 1- $^{13}\text{C}$ -**32** lors de la réaction entre le mélange et le Pep-Cys. Mesures réalisées toutes les 30 minutes.

Cette courbe montre le même profil que celle dans le cas de l'étude précédente. En effet, en quelques heures 1- $^{13}\text{C}$ -**32** atteint un maximum de réactivité avec le peptide alors que 1- $^{13}\text{C}$ -**31** semble ne pas réagir pour ensuite diminuer lentement (Cf Figure 54). De plus, cette expérience permet également de déterminer les quantités de 1- $^{13}\text{C}$ -**32** et de 1- $^{13}\text{C}$ -**31** dans le milieu après 24 heures (temps de lecture du DPRA) de réaction avec le peptide cystéine. Celles-ci sont de 70 % environ pour 1- $^{13}\text{C}$ -**32** et de 100 % pour 1- $^{13}\text{C}$ -**31**.

### III.4. Réactivité des mélanges d'aldéhydes vis-à-vis du peptide lysine

#### III.4.1. Réactivité du mélange hydroxycitronellal-citral

##### Aspects mécanistiques

Des études préliminaires de la réactivité de ces deux aldéhydes envers le peptide lysine ont été menées individuellement. Les adduits observés ainsi que leurs déplacements chimiques du carbone 13 caractéristiques ont été répertoriés dans la Figure 56.

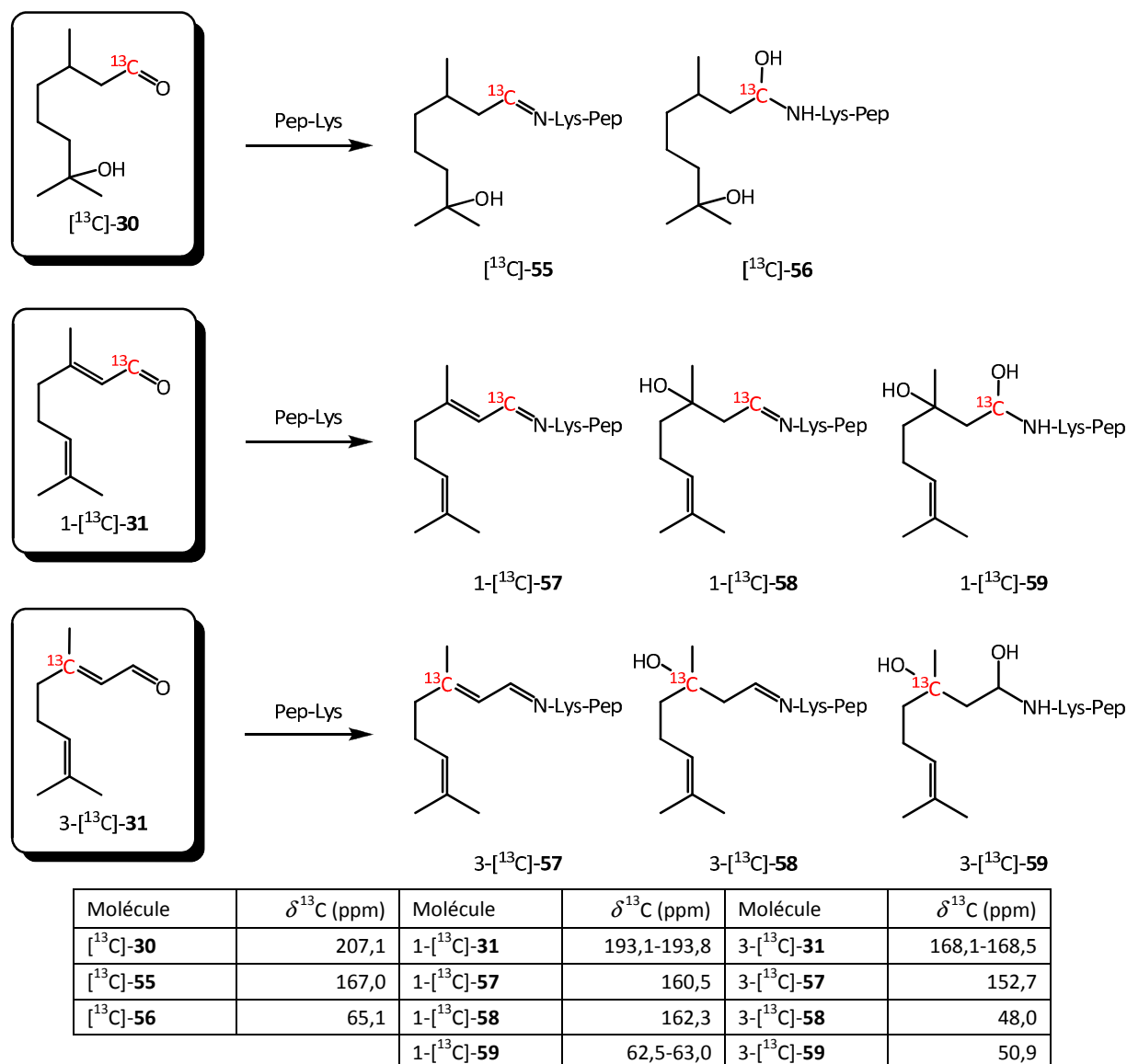


Figure 56 : Réactivité individuelle de [ $^{13}\text{C}$ ]-30 et de [ $^{13}\text{C}$ ]-31 vis-à-vis du Pep-Lys : adduits formés et déplacements chimiques caractéristiques ( $\delta$ ).

Ces études préliminaires ont montré la formation de trois adduits entre le citral et le peptide lysine ainsi que de deux avec l'hydroxycitronellal. La formation de ces adduits concorde avec ceux décrits dans la littérature.

La Figure 57 montre le suivi par RMN du carbone 13 de la réaction entre le mélange  $[^{13}\text{C}]\text{-30}/1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-31}$  et le peptide lysine.

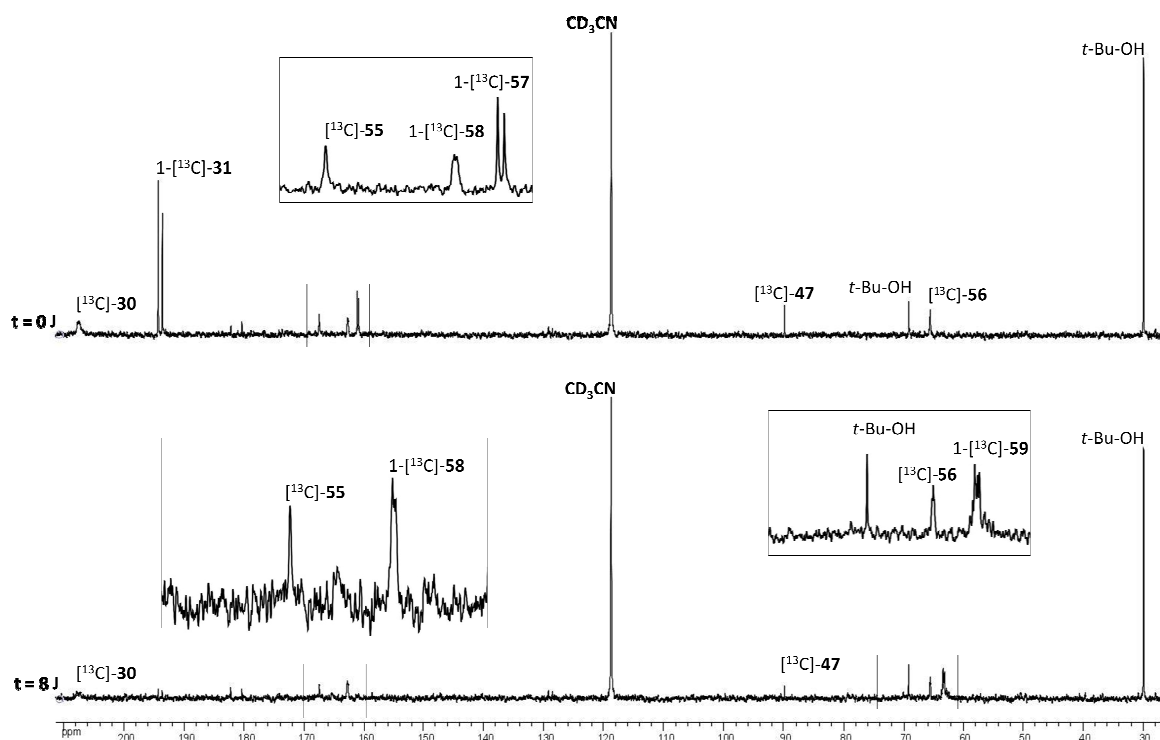


Figure 57 : Spectres de RMN du  $^{13}\text{C}$  de la réaction  $[^{13}\text{C}]\text{-30}/1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-31}/\text{Pep-Lys}$  à 0 et à 8 jours.

Lors de cette étude, le signal de RMN du carbone 13 caractéristique de  $[^{13}\text{C}]\text{-30}$  est très mal résolu. Ceci est certainement dû à l'utilisation de tampon acétate d'ammonium lors des études avec le peptide lysine. En effet, on remarque ce même phénomène dans toutes les études contenant cet aldéhyde et le peptide lysine.

Dès la première expérience de RMN on observe la formation des deux adduits  $[^{13}\text{C}]\text{-55}$  et  $[^{13}\text{C}]\text{-56}$  issus de la réactivité de l'hydroxycitronellal envers le peptide lysine, ainsi que la forme hydratée de cet aldéhyde  $[^{13}\text{C}]\text{-47}$ . Les signaux caractéristiques de ces adduits ainsi

que de  $[^{13}\text{C}]\text{-30}$  ne semblent plus évoluer après cette première expérience. D'un autre côté, ces spectres de RMN ont montré la formation de deux adduits  $1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-57}$  et  $1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-58}$  entre le citral et le peptide lysine déjà lors des premières expériences de RMN réalisées, le signal caractéristique de  $1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-59}$  n'apparaissant qu'après trois jours de réaction. Ces spectres montrent également la disparition complète du signal caractéristique de  $1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-31}$  au bout de huit jours de réaction avec le peptide lysine.

La Figure 58 montre les mécanismes réactionnels entre  $[^{13}\text{C}]\text{-30}$  et le peptide lysine menant à la formation des adduits observés.

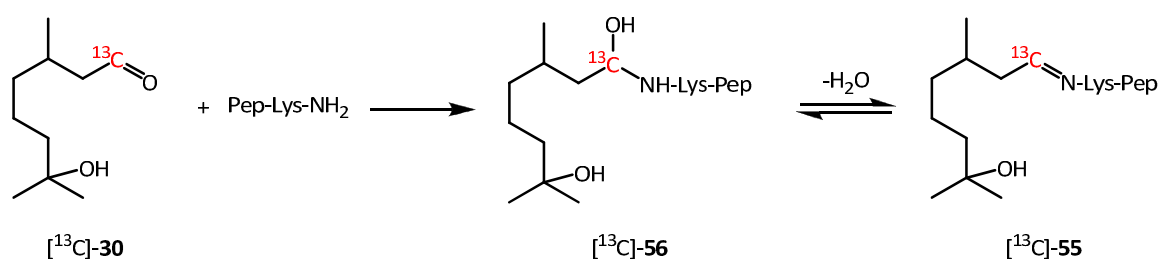


Figure 58 : Mécanisme réactionnel entre  $[^{13}\text{C}]\text{-30}$  et Pep-Lys menant à la formation des adduits  $[^{13}\text{C}]\text{-55}$  et  $[^{13}\text{C}]\text{-56}$ .

La Figure 59 montre les mécanismes réactionnels entre  $1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-31}$  et le peptide lysine menant à la formation des adduits observés.

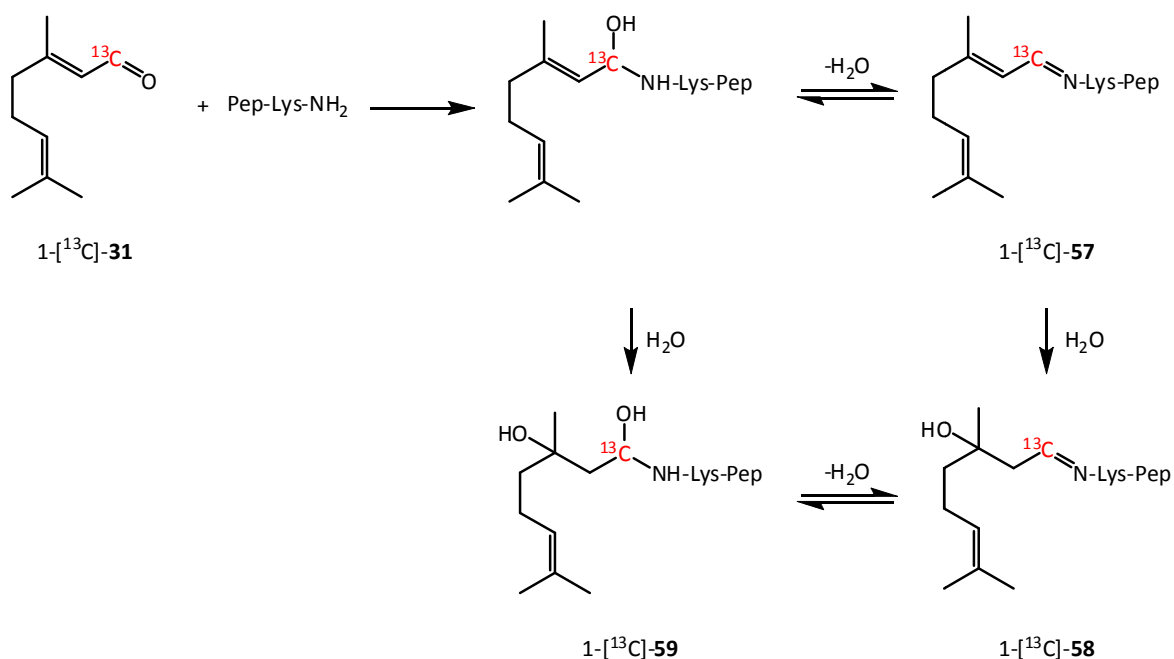


Figure 59 : Mécanismes réactionnels entre 1- $^{13}\text{C}$ -31 et Pep-Lys menant à la formation des adduits  $^{13}\text{C}$ -57,  $^{13}\text{C}$ -58 et  $^{13}\text{C}$ -59.

La Figure 60 montre le suivi par RMN du carbone 13 de la réaction entre le mélange  $^{13}\text{C}$ -30/3- $^{13}\text{C}$ -31 et le peptide lysine.

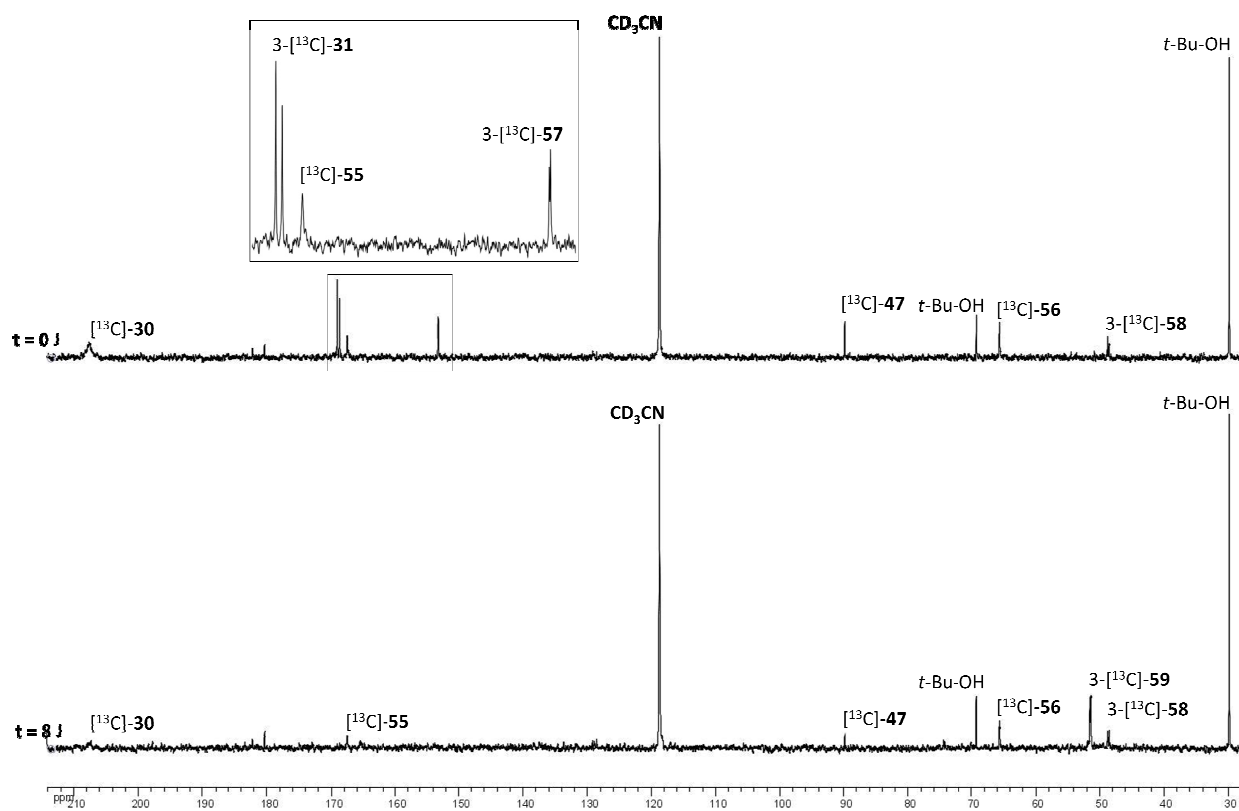


Figure 60 : Spectres de RMN du  $^{13}\text{C}$  de la réaction  $^{13}\text{C}$ -30/3- $^{13}\text{C}$ -31/Pep-Lys à 0 et à 8 jours.



Cette étude confirme bien les observations faites précédemment. En effet, les adduits observés sont pour les deux aldéhydes identiques à ceux identifiés dans la section précédente. Dès la première expérience de RMN les adduits  $^{13}\text{C}$ -**55** et  $^{13}\text{C}$ -**56**, issus de la réactivité de l'hydroxycitronellal vis-à-vis de ce peptide ainsi que la forme hydraté de cet aldéhyde ont été observés. Deux autres signaux sont également apparus lors de l'enregistrement de ce premier spectre. Les déplacements chimiques de ces signaux correspondent aux adduits 3- $^{13}\text{C}$ -**57** et 3- $^{13}\text{C}$ -**58**. Lors des expériences ultérieures, un nouveau signal apparaît à 50,9 ppm et correspond à la formation de l'adduit 3- $^{13}\text{C}$ -**59**.

### Aspects cinétiques

La Figure 61 montre l'évolution des quantités présentes dans le milieu réactionnel de  $^{13}\text{C}$ -**30** et de 1- $^{13}\text{C}$ -**31** au cours de la réaction entre le mélange de ces deux molécules et le peptide lysine.

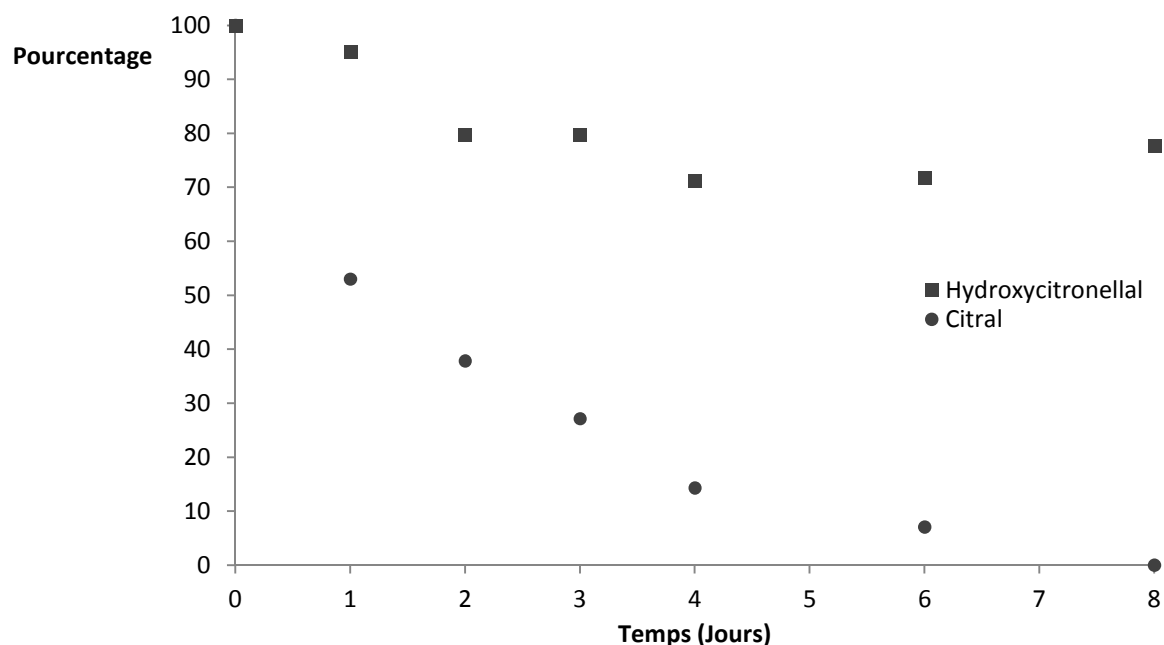


Figure 61 : Courbe représentant l'évolution en fonction du temps de la concentration de  $^{13}\text{C}$ -**30** et de 1- $^{13}\text{C}$ -**31** lors de la réaction entre le mélange et le Pep-Lys.

Cette courbe montre la disparition totale de 1- $^{13}\text{C}$ -**31** au bout de huit jours de réaction avec le peptide lysine et la faible consommation de  $^{13}\text{C}$ -**30**. Cette faible consommation observée est due à la formation des adduits  $^{13}\text{C}$ -**55** et  $^{13}\text{C}$ -**56** mais également à la mauvaise résolution du signal de RMN de  $^{13}\text{C}$ -**30**. La disparition complète de 1- $^{13}\text{C}$ -**31** montre que le peptide réagit préférentiellement avec cet aldéhyde. D'une manière plus globale, la réactivité du mélange est due principalement à la présence de 1- $^{13}\text{C}$ -**31** dans le milieu.

Afin d'avoir un aperçu de la cinétique de la réaction dans les premières heures, une nouvelle étude cinétique a été effectuée en enregistrant un spectre de RMN toutes les heures pendant 30 heures.

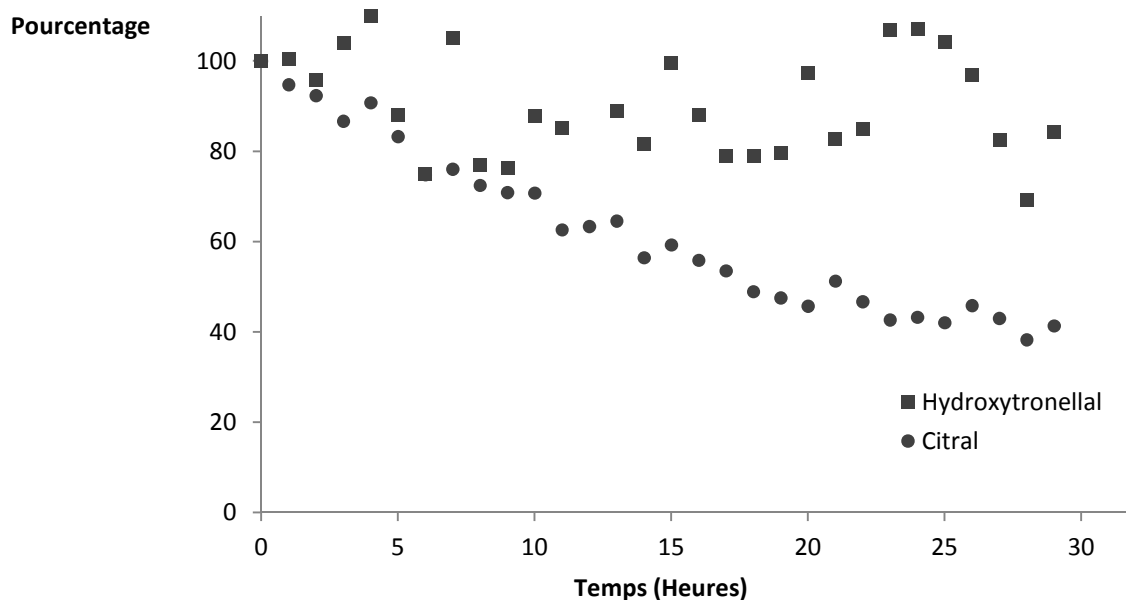


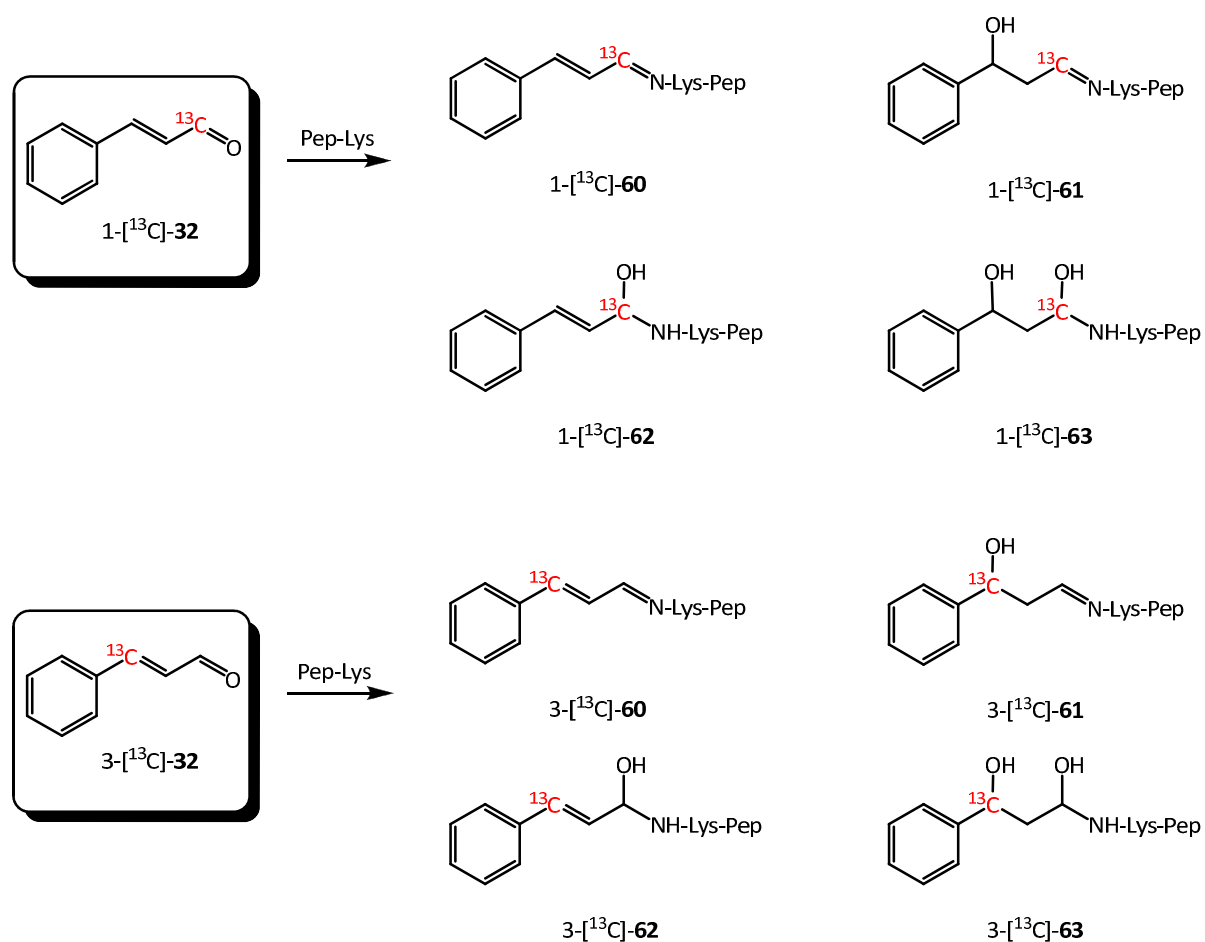
Figure 62 : Courbe représentant l'évolution pendant 30 heures de la concentration de  $^{13}\text{C}$ -**30** et de 1- $^{13}\text{C}$ -**31** lors de la réaction entre le mélange et le Pep-Lys. Mesures réalisées toutes les 30 minutes.

Cette courbe montre la même évolution que celle montrée dans la Figure 61 et permet également la lecture des quantités de  $^{13}\text{C}$ -**30** et de 1- $^{13}\text{C}$ -**31** présentes après 24 heures de réaction avec le peptide. Ces concentrations sont d'environ 100 % et 40 % respectivement. Il est intéressant de noter la distribution « chaotique » de points représentant les quantités de  $^{13}\text{C}$ -**30**. Elle est due à la très mauvaise résolution du signal de RMN du carbone 13 caractéristique de cette molécule.

### III.4.2. Réactivité du mélange hydroxycitronellal-aldéhyde cinnamique

#### Aspects mécanistiques

Une étude préliminaire de la réactivité de l'aldéhyde cinnamique vis-à-vis du peptide lysine a été entreprise. Les adduits formés ainsi que leurs déplacements chimiques du carbone 13 caractéristiques sont répertoriés dans la Figure 63.



Molécule	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	Molécule	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1-[ <sup>13</sup> C]-32	196,7	3-[ <sup>13</sup> C]-32	154,9
1-[ <sup>13</sup> C]-60	164,0	3-[ <sup>13</sup> C]-60	142,6
1-[ <sup>13</sup> C]-61	158,4	3-[ <sup>13</sup> C]-61	51,1
1-[ <sup>13</sup> C]-62	68,4	3-[ <sup>13</sup> C]-62	144,1
1-[ <sup>13</sup> C]-63	72,0	3-[ <sup>13</sup> C]-63	56,9

Figure 63 : Réactivité individuelle de [<sup>13</sup>C]-32 vis-à-vis du Pep-Lys : adduits formés et déplacements chimiques caractéristiques ( $\delta$ ).

Nous avons observé la formation de plusieurs adduits entre l'aldéhyde cinnamique et le peptide lysine, dont deux bases de Schiff,  $[^{13}\text{C}]\text{-60}$  et  $[^{13}\text{C}]\text{-61}$ , ainsi que les formes hydratées de celles-ci,  $[^{13}\text{C}]\text{-62}$  et  $[^{13}\text{C}]\text{-63}$ .

La Figure 64 montre le suivi par RMN du carbone 13 de la réaction entre le mélange  $[^{13}\text{C}]\text{-30}/1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-32}$  et le peptide lysine.

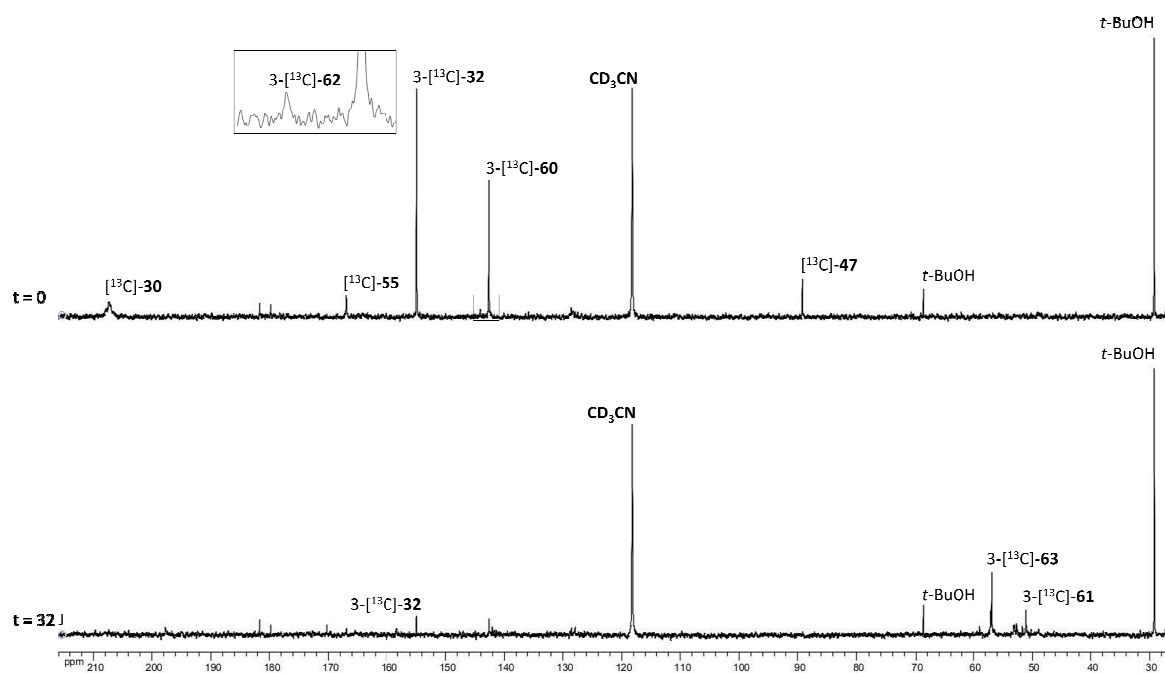


Figure 64 : Spectres de RMN du  $^{13}\text{C}$  de la réaction  $[^{13}\text{C}]\text{-30}/1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-32}/\text{Pep-Lys}$  à 0 et à 32 jours.

Dès la première expérience de RMN, en plus des signaux caractéristiques de  $[^{13}\text{C}]\text{-30}$  et de  $1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-32}$ , trois autres signaux apparaissent. Ils correspondent aux adduits de type base de Schiff des deux aldéhydes mis en réaction avec le peptide lysine,  $[^{13}\text{C}]\text{-55}$  dans le cas de l'hydroxycitronellal et  $1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-60}$  dans le cas de l'aldéhyde cinnamique, et à la forme hydratée de  $[^{13}\text{C}]\text{-30}$ . Lors des expériences suivantes, le signal à 164,0 ppm caractéristique de l'adduit  $1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-60}$  disparaît au profit de trois autres signaux à 158,4 ppm, 72,0 ppm et 68,4 ppm correspondant aux adduits  $1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-61}$ ,  $1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-63}$  et  $1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-62}$  respectivement. En plus de ces trois adduits, on observe la formation de la forme hydratée de l'adduit  $[^{13}\text{C}]\text{-55}$ .

Le mécanisme de formation des adduits issus de la réactivité de  $[^{13}\text{C}]\text{-30}$  vis-à-vis du peptide lysine ayant été discuté dans la section précédente, la Figure 65 montre le mécanisme

réactionnel expliquant la formation des adduits 1- $^{13}\text{C}$ -60, 1- $^{13}\text{C}$ -61, 1- $^{13}\text{C}$ -62 et 1- $^{13}\text{C}$ -63.

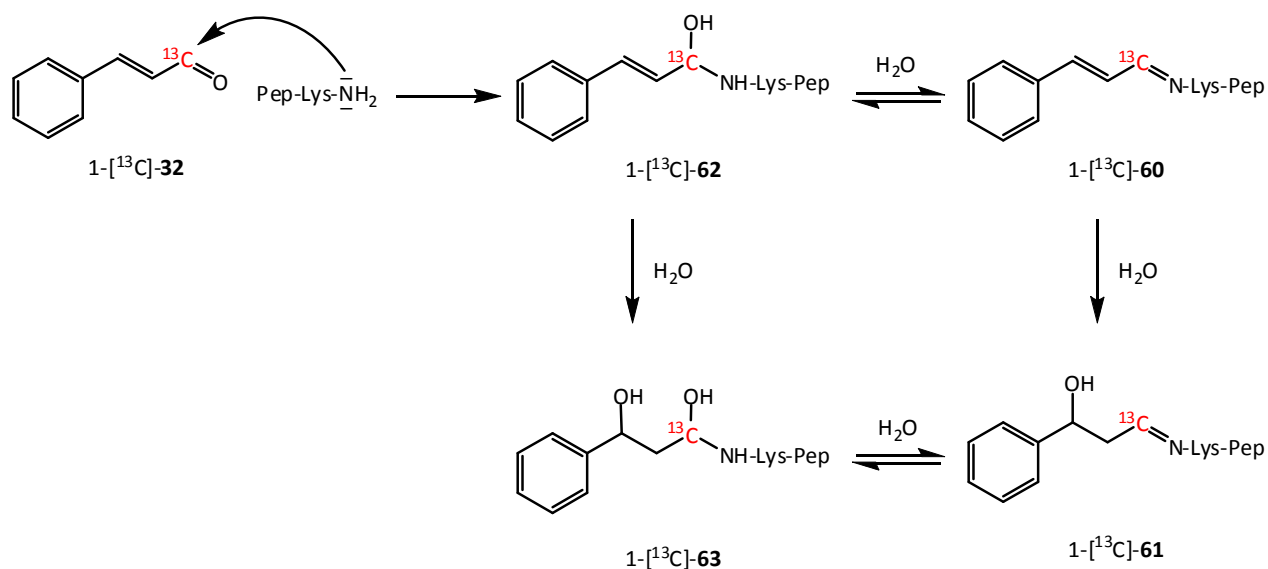


Figure 65 : Mécanisme réactionnel entre 1- $^{13}\text{C}$ -32 et Pep-Lys menant à la formation des adduits 1- $^{13}\text{C}$ -60, 1- $^{13}\text{C}$ -61, 1- $^{13}\text{C}$ -62 et 1- $^{13}\text{C}$ -63.

La Figure 66 montre le suivi par RMN du carbone 13 de la réaction entre le mélange  $^{13}\text{C}$ -30/3- $^{13}\text{C}$ -32 et le peptide lysine.

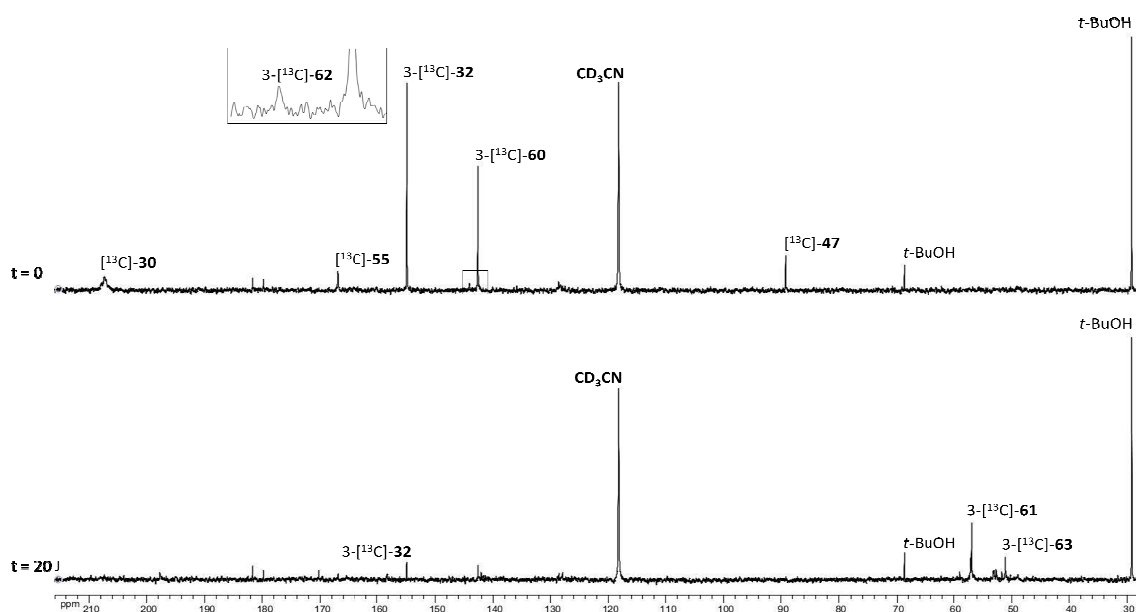


Figure 66 : Spectres de RMN de la réaction  $^{13}\text{C}$ -30/3- $^{13}\text{C}$ -32/Pep-Lys à 0 et à 32 jours.

Ces expériences ont confirmé la formation des adduits observés précédemment entre  $[^{13}\text{C}]$ -**30**/1- $[^{13}\text{C}]$ -**32** et le peptide lysine. En effet, les déplacements chimiques des signaux observés lors de l'étude de la réactivité du mélange  $[^{13}\text{C}]$ -**30**/3- $[^{13}\text{C}]$ -**32** vis-à-vis du peptide lysine correspondent à la formation des adduits 3- $[^{13}\text{C}]$ -**60**, 3- $[^{13}\text{C}]$ -**61**, 3- $[^{13}\text{C}]$ -**62** et 3- $[^{13}\text{C}]$ -**63** issus de la réactivité de 3- $[^{13}\text{C}]$ -**32**, ainsi que  $[^{13}\text{C}]$ -**55** et  $[^{13}\text{C}]$ -**56** issus de la réactivité de l'hydroxycitronellal.

### Aspects cinétiques

La Figure 67 montre l'évolution des quantités présentes dans le milieu réactionnel de  $[^{13}\text{C}]$ -**30** et de 1- $[^{13}\text{C}]$ -**32** au cours de la réaction entre le mélange de ces deux molécules et le peptide lysine.

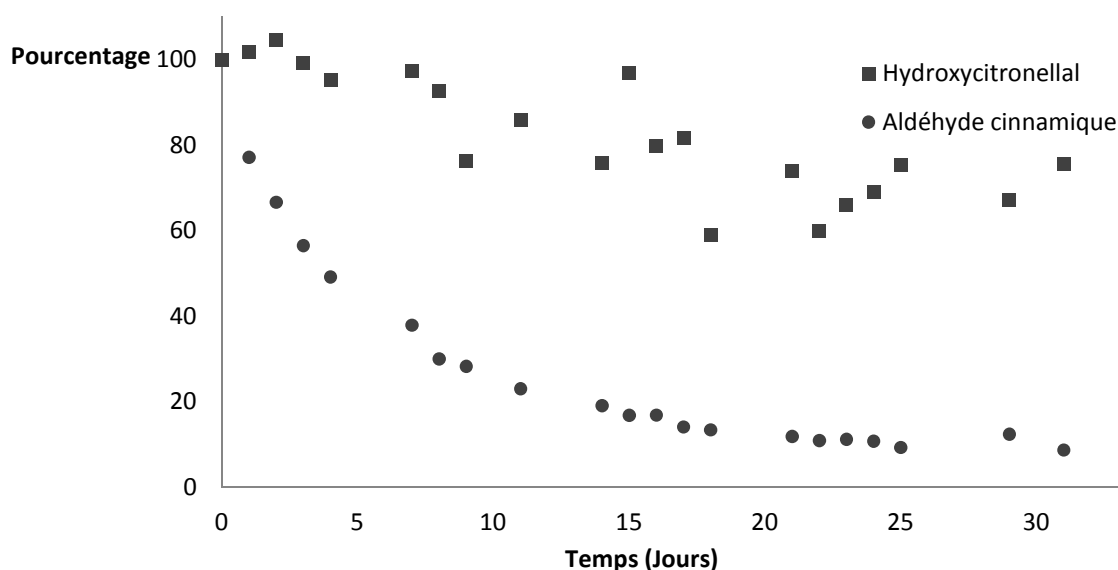


Figure 67 : Courbe représentant l'évolution en fonction du temps de la concentration de  $[^{13}\text{C}]$ -**30** et de 1- $[^{13}\text{C}]$ -**32** lors de la réaction entre le mélange et le Pep-Lys.

Cette courbe montre une distribution « chaotique » de points pour les quantités de  $[^{13}\text{C}]$ -**30**. Cette distribution ne reflète pas la réalité de la réactivité de  $[^{13}\text{C}]$ -**30** avec le peptide lysine, mais vient du fait que le signal de RMN caractéristique de cette molécule est très mal

résolu dans les conditions expérimentales utilisées. D'un autre côté, nous observons une consommation quasi complète de 1-[<sup>13</sup>C]-**32** au bout de 32 jours.

Afin d'obtenir les quantités présentes des deux allergènes dans le mélange au bout de 24 heures de réaction avec le peptide lysine, une nouvelle étude cinétique a été entreprise en enregistrant un spectre de RMN du mélange toutes les heures pendant 30 heures. La Figure 68 montre la courbe ainsi obtenue.

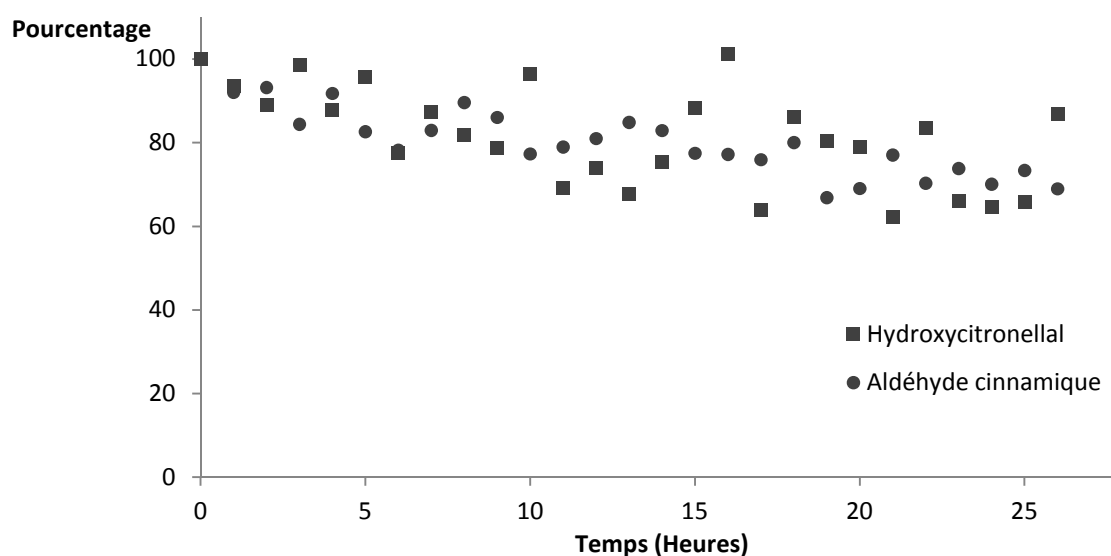


Figure 68 : Courbe représentant l'évolution pendant 30 heures de la concentration de [<sup>13</sup>C]-**30** et de 1-[<sup>13</sup>C]-**32** lors de la réaction entre le mélange et le Pep-Lys. Mesures réalisées toutes les 30 minutes.

Cette courbe, représentant les quantités de [<sup>13</sup>C]-**30** et de 1-[<sup>13</sup>C]-**32** présentes en solution dans les premières heures de la réaction entre le mélange et le peptide lysine, semble montrer la même tendance que la Figure 67. Mise à part la distribution « chaotique » des points représentant les quantités de [<sup>13</sup>C]-**30**, une diminution lente de la quantité de 1-[<sup>13</sup>C]-**32** a pu être observée. De plus, cette courbe permet une lecture des quantités présentes de ces deux aldéhydes au bout de 24 heures (temps de lecture du DPRA). Ces quantités sont de 70 % pour [<sup>13</sup>C]-**30** et de 65 % pour 1-[<sup>13</sup>C]-**32**. Cependant la valeur lue de la quantité de [<sup>13</sup>C]-**30** n'est pas fiable. En effet, le signal de RMN du carbone 13 caractéristique de cette molécule est dans ces conditions très mal défini.

### III.4.3. Réactivité du mélange aldéhyde cinnamique-citral

#### Aspects mécanistiques

Les études préliminaires de la réactivité de ces deux molécules vis-à-vis du peptide lysine ayant déjà été discutées dans les sections précédentes (III.4.1 et III.4.2), l'étude de la réactivité du mélange 1- $^{13}\text{C}$ -**31**/1- $^{13}\text{C}$ -**32** à été entreprise directement. La Figure 69 montre le suivi par RMN de la réactivité de ce mélange envers le peptide lysine.

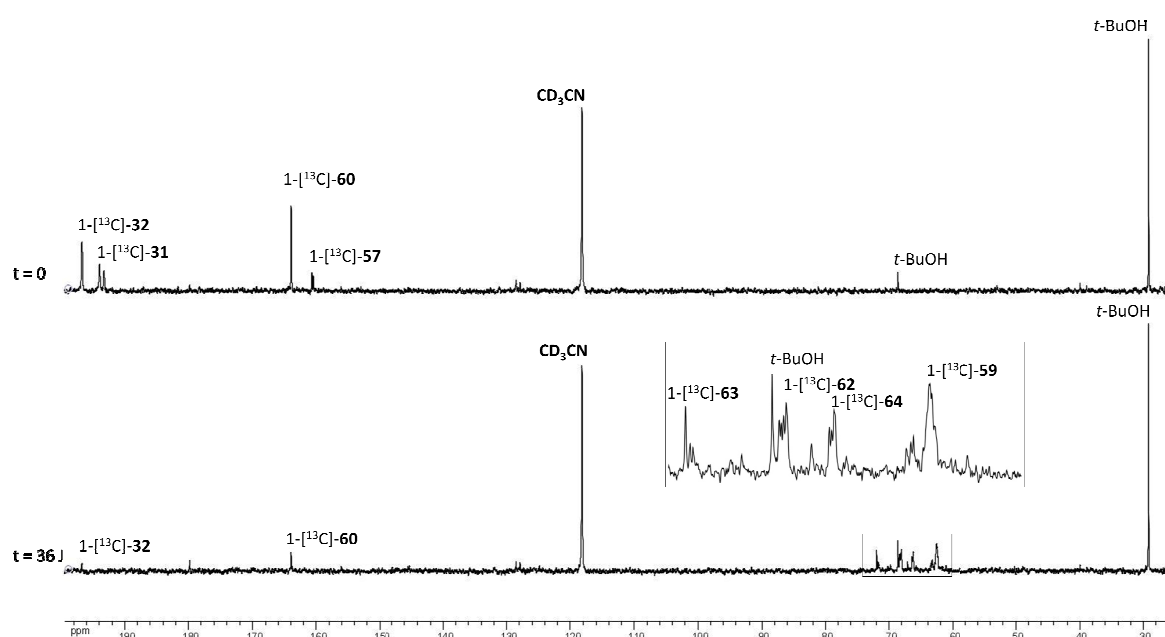
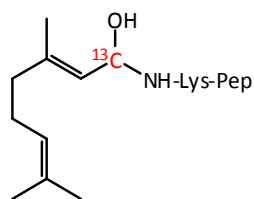


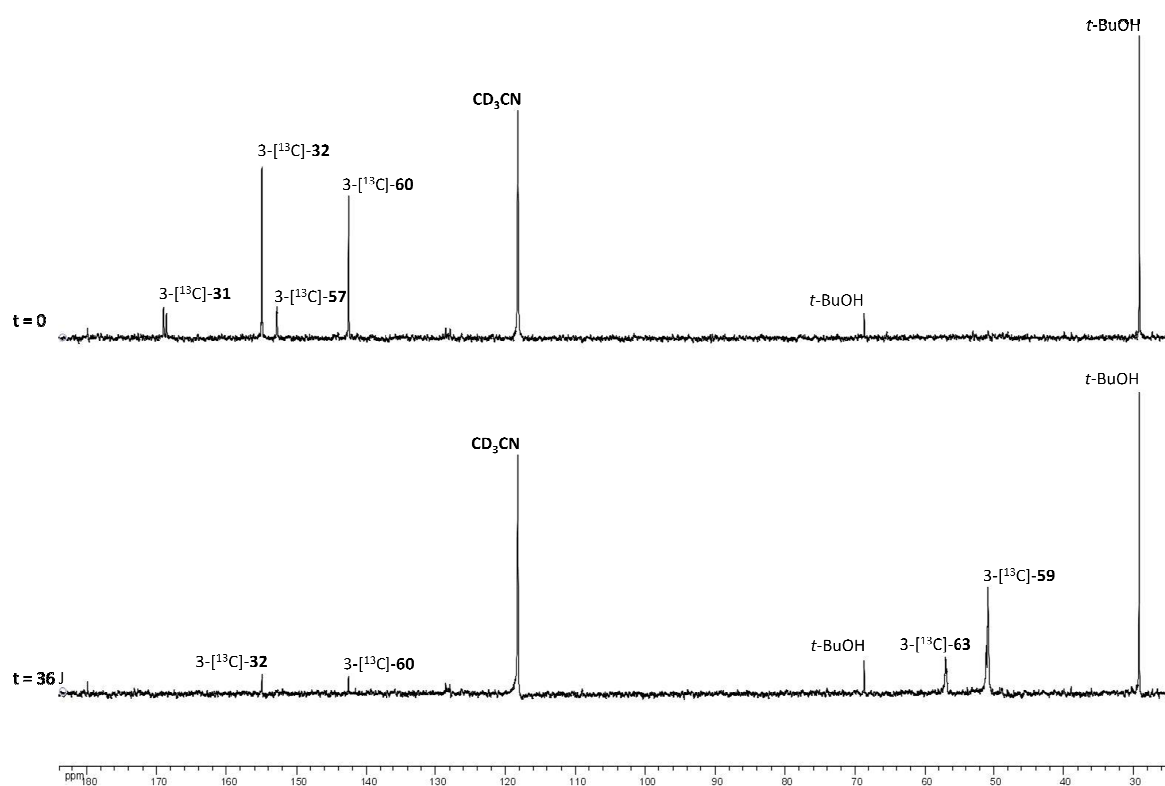
Figure 69 : Spectres de RMN du  $^{13}\text{C}$  de la réaction 1- $^{13}\text{C}$ -**31**/1- $^{13}\text{C}$ -**32**/Pep-Lys à 0 et à 36 jours.

Cette étude a montré la formation des mêmes adduits que lors de la réaction de ces molécules en mélange avec  $^{13}\text{C}$ -**30**. En effet, les déplacements chimiques observés lors des enregistrements de ces spectres de RMN correspondent aux adduits 1- $^{13}\text{C}$ -**57**, 1- $^{13}\text{C}$ -**59**, 1- $^{13}\text{C}$ -**60**, 1- $^{13}\text{C}$ -**62** et 1- $^{13}\text{C}$ -**63** précédemment observés. En plus de ces quatre adduits, nous observons lors de cette étude mécanistique l'apparition d'un signal à 66,3-66,5 ppm attribué à 1- $^{13}\text{C}$ -**64**, la forme hydratée de la base de Schiff 1- $^{13}\text{C}$ -**57**.



1-[<sup>13</sup>C]-64Figure 70 : Structure de l'adduit 1-[<sup>13</sup>C]-64.

La Figure 71 montre le suivi par RMN du carbone 13 de la réaction entre le mélange 3-[<sup>13</sup>C]-31/3-[<sup>13</sup>C]-32 et le peptide lysine.

Figure 71 : Spectres de RMN du <sup>13</sup>C de la réaction 3-[<sup>13</sup>C]-31/3-[<sup>13</sup>C]-32/Pep-Lys à 0 et à 36 jours.

Le suivi par RMN de cette réaction entre les aldéhydes marqués en position 3 et le peptide lysine mène aux mêmes conclusions que l'étude précédente. En effet, on retrouve les déplacements chimiques caractéristiques des adduits 3-[<sup>13</sup>C]-57, 3-[<sup>13</sup>C]-59, 3-[<sup>13</sup>C]-60 et 3-[<sup>13</sup>C]-63.

## Aspects cinétiques

La Figure 72 montre l'évolution des quantités de 1-[<sup>13</sup>C]-**31** et de 1-[<sup>13</sup>C]-**32** au cours de la réaction entre le mélange de ces deux molécules et le peptide lysine.

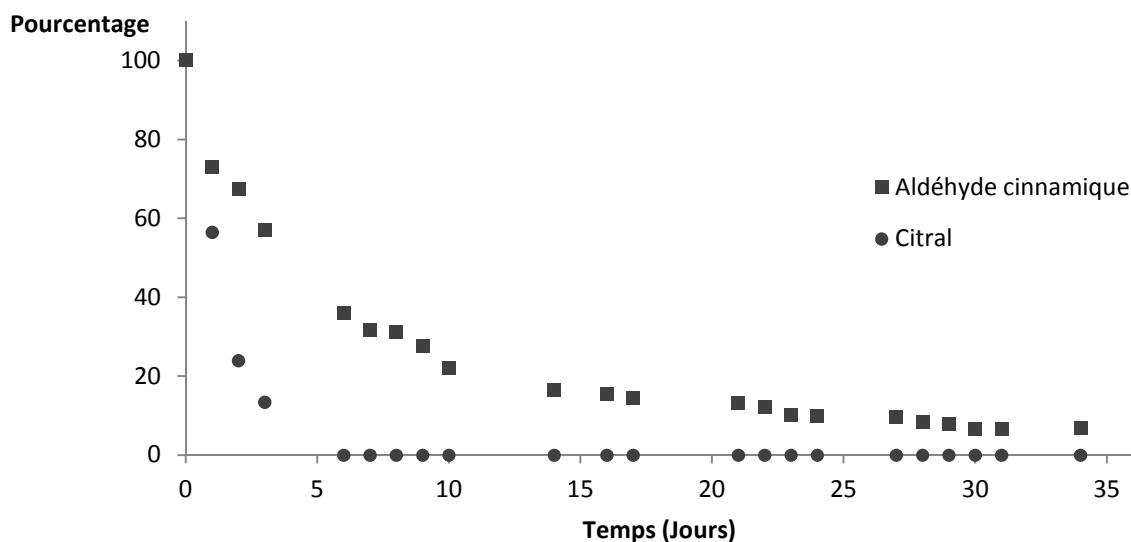


Figure 72 : Courbe représentant l'évolution en fonction du temps de la concentration de 1-[<sup>13</sup>C]-**31** et de 1-[<sup>13</sup>C]-**32** lors de la réaction entre le mélange et le Pep-Lys.

Cette courbe montre une disparition totale du signal de 1-[<sup>13</sup>C]-**31** au bout de 6 jours de réaction avec le peptide lysine, ainsi qu'une diminution progressive de la quantité de 1-[<sup>13</sup>C]-**32** tout au long de cette étude cinétique. Il est intéressant de noter que ces résultats sont similaires à ceux observés lors des études cinétiques de la réactivité des mélanges de ces deux aldéhydes avec l'hydroxycitronellal en présence de peptide lysine. De plus, cette courbe montre également une disparition totale des deux allergènes présents au bout de 35 jours. Cette consommation ne reflète pas seulement la réactivité du citral et de l'aldéhyde cinnamique vis-à-vis du peptide lysine. En effet, la quantité de peptide présent lors de cette étude ne permettant pas une telle consommation, celle-ci doit être due à la présence dans le milieu du tampon acétate d'ammonium. Ce tampon implique la présence d'ammoniaque dans le milieu de l'expérience qui peut tout comme le peptide lysine former avec les

aldéhydes des bases de Schiff ce qui explique les résultats obtenus lors de cette étude cinétique.

Afin d'obtenir les quantités présentes des deux allergènes au bout de 24 heures de réaction avec le peptide lysine, une nouvelle étude cinétique a été entreprise en enregistrant un spectre de RMN du mélange toutes 30 minutes pendant 35 heures. La Figure 73 montre la courbe ainsi obtenue.

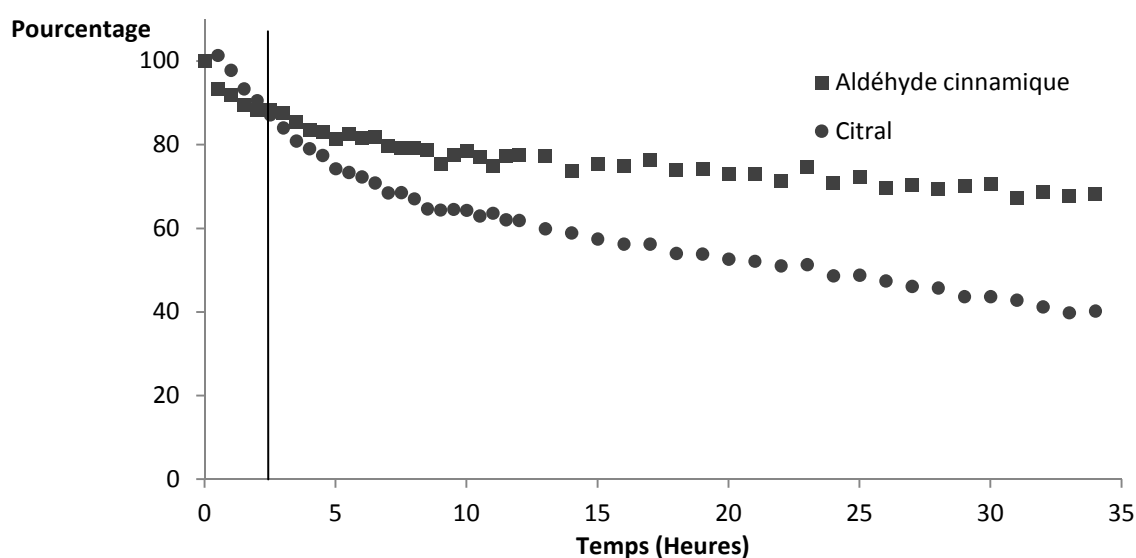


Figure 73 : Courbe représentant l'évolution pendant 35 heures de la concentration de 1-<sup>13</sup>C-**31** et de 1-<sup>13</sup>C-**32** lors de la réaction entre le mélange et le Pep-Lys. Mesures réalisées toutes les 30 minutes.

Cette courbe montre deux zones distinctes. Dans les toutes premières heures de la réaction, la consommation de 1-<sup>13</sup>C-**32** est plus rapide que celle de 1-<sup>13</sup>C-**31**. Ceci peut être du au fait que la formation de l'adduit 1-<sup>13</sup>C-**60** est favorisée dans ces conditions par rapport à celle de l'adduit 1-<sup>13</sup>C-**57**. En effet, on n'observe à la première expérience de RMN qu'un signal autre que ceux des aldéhydes de départ, celui de l'adduit 1-<sup>13</sup>C-**60**. Cependant, la suite de la courbe montre que la vitesse de consommation de 1-<sup>13</sup>C-**32** diminue alors que celle de 1-<sup>13</sup>C-**31** semble rester constante. Par le fait, les quantités présentes des deux aldéhydes au bout de 24 heures de réaction sont de 49 % pour 1-<sup>13</sup>C-**31** et de 70 % pour 1-<sup>13</sup>C-**32**.

## IV. Conclusions

Les mélanges étudiés dans ce chapitre peuvent se découper en deux classes. La première comprend des mélanges d'allergènes faibles-allergènes modérés (hydroxycitronellal-citral et hydroxycitronellal-aldéhyde cinnamique), la seconde un mélange d'allergène de potentiels sensibilisants très proches (citral-aldéhyde cinnamique).

Les études portant sur la réactivité des mélanges d'allergènes faibles-allergènes modérés mènent aux mêmes observations que lors de l'étude précédente portant sur le mélange MI/MCI.

Il a pu être montré lors de ces études que la réactivité de tels mélanges d'allergènes vis-à-vis du glutathion correspondait soit à celle du citral soit à celle de l'aldéhyde cinnamique. En effet, que ce soit d'un point de vue mécanistique ou cinétique, les observations faites dans les deux cas se recoupent. Il apparaît que l'hydroxycitronellal semble ne pas réagir avec le peptide dans le temps de l'étude. D'un autre côté, la réactivité de l'allergène le plus fort semble correspondre à celle observée lorsqu'il est seul en solution avec le peptide. La réactivité des mélanges d'allergènes modérés-allergènes faible avec le glutathion correspond donc à celle de l'allergène modéré présent.

Dans le cas des études de ces mélanges en présence de peptide cystéine, les observations faites semblent également montrer que la réactivité du mélange correspond à celle de l'allergène le plus fort présent. En effet, dans ces deux cas, l'hydroxycitronellal semble tant d'un point de vue cinétique que mécanistique ne pas réagir avec le peptide. De plus, les seuls adduits observés lors de ces études sont issus soit de la réactivité du citral soit de celle de l'aldéhyde cinnamique. En conséquence, la réactivité du mélange avec le peptide cystéine est dans le cas de ces études identique à celle de l'allergène le plus fort en solution.

Les études de ces mélanges menées en présence de peptide lysine ont montré une faible réactivité de l'hydroxycitronellal et une forte réactivité des autres aldéhydes présents. En effet, il a pu être observé que dans ces deux cas, la totalité de l'allergène le plus fort avait été consommée dans le temps de l'étude. Ainsi comme dans les cas décrits précédemment, la réactivité du mélange est semblable à celle de l'allergène le plus fort présent.

Dans le cas du mélange de type « allergène modéré-allergène modéré », la réactivité observée, dans le cas du glutathion et du peptide cystéine, semble correspondre de la même façon à celle de l'allergène le plus fort présent selon les potentiels de sensibilisation déterminés par le LLNA (3,1 pour l'aldéhyde cinnamique et 5,1 pour le citral).<sup>33</sup> Les structures des deux aldéhydes étant très proches, on peut remarquer que d'un point de vue mécanistique, la présence du groupement méthyle en position de Michael du citral défavorise l'addition des peptides thiolés au niveau de cette position. En effet, dans le cas de ce mélange, l'aldéhyde cinnamique s'est montré le plus réactif dans le temps de lecture du DPRA.

D'un autre côté, dans le cas de l'étude de la réactivité de ce mélange avec le peptide lysine, bien que l'aldéhyde cinnamique ait montré une réactivité forte dans le début de la réaction, le citral a été le premier à être totalement consommé par ce peptide. En effet, une disparition complète de cet aldéhyde a pu être observée au bout d'une semaine de réaction contre plus d'un mois pour l'aldéhyde cinnamique. D'un point de vue mécanistique, les adduits observés lors de cette étude sont tous issus de la réactivité des fonctions aldéhydes de ces molécules (formation de bases de Schiff). En comparant cette réactivité avec celle observée dans le cas des peptides thiolés, on remarque que la présence du groupement méthyle au niveau de la position de Michael du citral n'a plus d'influence sur la réactivité de ce dernier permettant ainsi au citral de réagir plus rapidement que l'aldéhyde cinnamique avec le groupement amine du peptide lysine. L'inversion de la tendance observée par rapport aux valeurs de déplétions peptidiques obtenues par le DPRA lors du test de chacune de ces molécules avec le peptide lysine (16,9 % pour le citral et 43,2 % pour l'aldéhyde cinnamique) est certainement due à cette différence de cinétique de formation de bases de schiff entre le citral et l'aldéhyde cinnamique. En effet, dans notre cas, c'est le citral qui réagit le plus avec le peptide dans le temps de lecture du DPRA. De plus, la faible différence de réactivité entre ces deux molécules indique dans ce cas un effet de synergie. En effet, on ne peut réduire la réactivité de ce mélange à celle d'une seule molécule à l'inverse des autres cas déjà étudiés.

Pour la sécurité du consommateur, un mélange d'allergènes faible-allergènes modérés devrait être détecté par le DPRA comme étant un allergène modéré. Les études menées dans le cas de ces mélanges ont montré que la réactivité observée lors d'un éventuel test de DPRA serait certainement due à l'allergène le plus fort présent. En suivant le même raisonnement que lors du chapitre traitant des isothiazolinones, il est raisonnable de supposer que le DPRA classerait ce mélange comme étant un allergène modéré. De plus cette étude a mis en jeu non plus un mais deux mélanges équivalents ce qui montre que les observations sur la différence de réactivité des allergènes ayant des potentiels de sensibilisations distincts sont reproductibles.

Dans le cas du mélange d'allergènes modérés, il paraît indispensable que le DPRA le classe au moins comme étant un allergène modéré. Les études de réactivité conduites à propos de ce mélange ont montré que dans le cas du peptide cystéine, l'aldéhyde cinnamique était l'allergène le plus représenté aussi bien au niveau des adduits formés que de la cinétique de la réaction. En effet, dans ce cas, le citral ne semble pas réagir avec le peptide cystéine. En conséquence, en présence de peptide cystéine, la réactivité du mélange se confond avec celle de l'aldéhyde cinnamique. De telles observations laissent à penser que dans le cas d'un test d'un mélange de ces molécules par le DPRA, les déplétions du peptide cystéines lues seraient semblables à celle de l'aldéhyde cinnamique. D'un autre côté, dans le cas de l'étude de ce mélange en présence de peptide lysine, les réactivités des deux aldéhydes ont été exprimées de manières équivalentes. Ceci semble indiquer que lors d'un test DPRA de ce mélange, la déplétion du peptide lysine observée sera due aux deux molécules présentes et ainsi, l'évaluation sera certainement surévaluée.

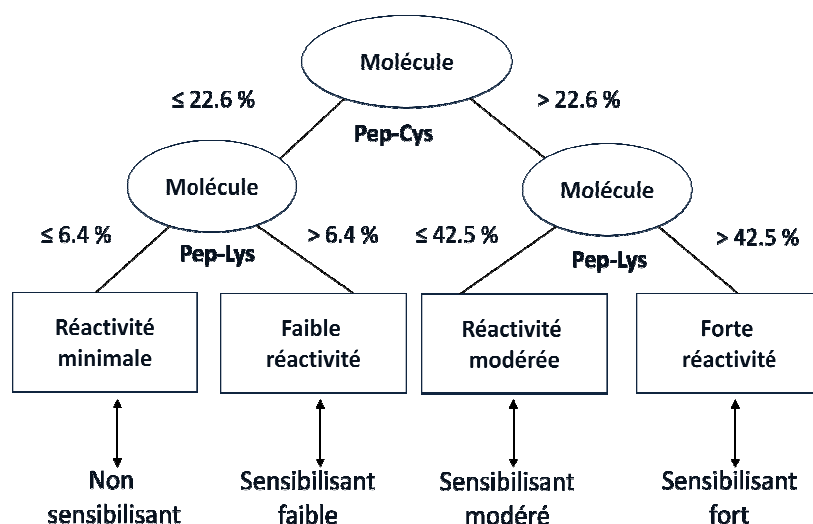


Figure 74 : Arbre décisionnel établi dans le cadre du DPRA permettant de classer les allergènes en fonction de leur réactivité avec les peptides cystéine et lysine.

L'arbre décisionnel (Figure 74) établi dans le cadre du DPRA indique qu'une forte réactivité vis-à-vis des deux peptides implique la présence d'un allergène fort. Dans le cas du mélange d'allergènes modérés, il a été montré que la réactivité envers le peptide cystéine serait certainement équivalente à celle d'un allergène modéré (>22,6 %) d'une part et que celle vis-à-vis du peptide lysine, étant due à l'aldéhyde cinnamique ainsi qu'au citral, serait certainement surexprimée d'autre part. À cause de cette éventuelle surévaluation de la réactivité du mélange, la déplétion du peptide lysine risque de dépasser 42,5 % ce qui classerait le mélange DPRA comme étant un allergène fort. En effet les déplétions de ce peptide par le citral et par l'aldéhyde cinnamique étant de 16,9 % et de 43,2 % respectivement, il paraît raisonnable de supposer à la vue des observations faites, que la déplétion du mélange de ces deux molécules soit suffisante pour classer ce mélange comme étant un allergène fort. Néanmoins, il est préférable du point de vue du consommateur que le DPRA surclasse certains mélanges plutôt que l'inverse.

## Bibliographie

1. P. de Nicolai.  
A smelling trip into the past: the influence of synthetic materials on the history of perfumery.  
*Chem Biodivers*, 2008, 5 (6), 1137-1146.
2. N. Shah.  
Essential oils and their reconstitution.  
*Fafai J*, 2009, 11, 17-25.
3. G. Frater, J. A. Bajgrowicz, P. Kraft.  
Fragrance chemistry.  
*Tetrahedron*, 1998, 54 (27), 7633-7703.
4. C. Chapuis, D. Jacoby.  
Catalysis in the preparation of fragrances and flavours.  
*Appl Catal A*, 2001, 221 (1-2), 93-117.
5. E. G. M. Power.  
Aldehydes as biocides.  
*Prog Med Chem*, 1997, 34, 149-201.
6. A. Goossens, J. P. Lepoittevin.  
Contact allergy to cosmetics and their perfume components: new clinical, chemical and diagnostic aspects.  
*Rev Fr Allergol*, 2003, 43 (5), 294-300.
7. C. K. Smith, C. A. Moore, E. N. Elahi, A. T. Smart, S. A. Hotchkiss.  
Human skin absorption and metabolism of the contact allergens cinnamic aldehyde and cinnamic alcohol.  
*Toxicol Appl Pharmacol*, 2000, 168 (3), 189-199.
8. W. G. Larsen.  
Perfume dermatitis : a study of 20 patients.  
*Arch Dermatol*, 1977, 113 (5), 623-626.
9. P. J. Frosch, C. Pirker, S. C. Rastogi, K. E. Andersen, M. Bruze, C. Svedman, A. Goossens, I. R. White, W. Uter, E. Giménez-Arnau, J. P. Lepoittevin, T. Menné, J. D. Johansen.  
Patch testing with a new fragrance mix detects additional patients sensitive to perfumes and missed by the current fragrance mix.  
*Contact Dermatitis*, 2005, 52 (4), 207-215.



10. W. Uter, C. Ramsch, W. Aberer, F. Ayala, A. Balato, A. Beliauskiene, A. B. Fortina, A. Bircher, J. Brasch, M. M. Chowdhury, P. J. Coenraads, M. L. Schuttelaar, S. Cooper, M. T. Corradin, P. Elsner, J. S. English, M. Fartasch, V. Mahler, P. J. Frosch, T. Fuchs, D. J. Gawkrödger, A. M. Giménez-Arnau, C. M. Green, H. L. Horne, R. Jolanki, C. M. King, B. Krecisz, M. Kiec-Swierczynska, A. D. Ormerod, D. I. Orton, A. Peserico, T. Rantanen, T. Rustemeyer, J. E. Sansom, D. Simon, B. N. Statham, M. Wilkinson, A. Schnuch.  
The European baseline series in 10 European Countries, 2005/2006-Results of the European Surveillance System on Contact Allergies (ESSCA).  
Contact Dermatitis, 2009, 61 (1), 31-38.
11. Chuit&Naef.  
Procédé de préparation d'un corps nouveau, le citral hydrolysé, applicable à la parfumerie et à la préparation de produits pouvant servir également dans la parfumerie.  
Brevet d'invention n°364481, 1906.
12. A. Verley.  
Citronellal and rhodinal.  
Bull Soc Chim Fr, 1928, 43, 845-854.
13. M. Vilkas, G. Senechal.  
Preparation of hydroxycitronellal.  
United States Patent 3852360, 1971.
14. P. S. Gradeff, C. Bertrand.  
Process for preparing hydroxycitronellal by saponification of the hydroxy ester.  
United States Patent 3869517, 1972.
15. National Economic Development & Labour Council Study conducted by Triumph Venture Capital (Pty) Limited  
Part two : Aroma Chemicals Derived from Efluent from the Paper and Pulp Industry.  
2004.  
<http://www.nedlac.org.za/media/5937/turpentine.pdf>.
16. A. Schnuch, W. Uter, J. Geier, H. Lessmann, P. J. Frosch.  
Sensitization to 26 fragrances to be labelled according to current European regulation : Results of the IVDK and review of the literature.  
Contact Dermatitis, 2007, 57 (1), 1-10.
17. [http://ec.europa.eu/consumers/cosmetics/cosing/index.cfm?fuseaction=search.results&annex\\_v2=III&search](http://ec.europa.eu/consumers/cosmetics/cosing/index.cfm?fuseaction=search.results&annex_v2=III&search).
18. F. Tiemann.  
On the naturally occurring citral and the composition of the lemongrass oil.  
Ber Dtsch Chem Ges, 1899, 32, 830-835.

19. E. Bergner, K. Ebel, T. Johann, O. Löber.  
Method for the production of menthol.  
United States Patent 7709688, 2010.
20. <http://www.in-pharmatechnologist.com/Materials-Formulation/BASF-upgrades-citral-production>, National, Economic, Development, & Labour, Concl, Study, conducted, by, Triumph, Venture, Capital, (Pty), Limited.  
Part two : Aroma Chemicals Derived from Effluent from the Paper and Pulp Industry.  
<http://www.nedlac.org.za/media/5937/turpentine.pdf>, 2004.
21. J. Therre, G. Kaibel, W. Aquila, G. Wegner, H. Fuchs.  
Preparation of citral.  
United States Patent 6175044, 2001.
22. F. Ach.  
Process obtaining cinnamic aldehyde.  
United States Patent 581053, 1897.
23. J. Therre, A. Kramer, A. Weiper-Idelmann, M. Schulik, R. Benfer, J. Schossig, M. Haake, H. G. Göbbel.  
Continuous method for production of cinnamaldehyde and dihydrocinnamaldehyde derivatives.  
United States Patent 6723883, 2004.
24. D. L. Carbone, J. A. Doorn, Z. Kiebler, B. P. Sampey, D. R. Petersen.  
Inhibition of Hsp72-mediated protein refolding by 4-hydroxy-2-nonenal.  
Chem Res Toxicol, 2004, 17 (11), 1459-1467.
25. J. A. Doorn, D. R. Petersen.  
Covalent modification of amino acid nucleophiles by the lipid peroxidation products 4-hydroxy-2-nonenal and 4-oxo-2-nonenal.  
Chem Res Toxicol, 2002, 15 (11), 1445-1450.
26. I. R. Schmolka, P. E. Spoerri.  
Thiazolidine chemistry. The preparation of 2-substituted thiazolidine-4-carboxylic acids.  
J Org Chem, 1957, 22 (8), 943-946.
27. A. Böhme, D. Thaens, F. Schramm, A. Paschke, G. Schüürmann.  
Thiol reactivity and its impact on the ciliate toxicity of  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehydes, ketones, and esters.  
Chem Res Toxicol, 2010, 23 (12), 1905-1912.
28. C. Starkenmann, R. Brauchli, B. Maurer.  
How cysteine reacts with citral : an unexpected reaction of  $\beta,\beta$ -disubstituted acroleins with cysteine leading to hexahydro-1,4-thiazepines.  
J Agrig Food Chem, 2005, 53 (23), 9244-9248.

29. J. Mutschler.  
Etude de la réactivité chimique de molécules sensibilisantes dans le cadre du développement d'une méthode alternative pour la détection d'allergènes.  
Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur, 2007.
30. G. Bernard.  
Allergie de contact aux parfums. Identification et isolement d'allergènes contenus dans un mélange complexe. Synthèse d'aldéhydes sensibilisants marqués au carbone 13 et étude de leurs interactions avec les protéines cutanées.  
Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur, 2003.
31. F. Merckel, G. Bernard, J. Mutschler, E. Giménez-Arnau, G. F. Gerberick, J.-P. Lepoittevin.  
Effect of a microemulsion system on hapten-peptide reactivity studies: examples of hydroxycitronellal and citral, fragrance skin sensitizers, with glutathione.  
*Chem Res Toxicol*, 2010, 23 (9), 1433-1441.
32. H. Esterbauer, H. Zollner, N. Scholz.  
Reaction of glutathione with conjugated carbonyls.  
*Z Naturforsch C*, 1975, 30 (4), 466-473.
33. G. F. Gerberick, J. D. Vassallo, R. E. Bailey, J. G. Chaney, S. W. Morrall, J. P. Lepoittevin.  
Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens.  
*Toxicol Sci*, 2004, 81 (2), 332-343.



---

## CHAPITRE 3

Mélange atranol/chloroatranol : synthèse et étude de  
leur réactivité envers les peptides modèles

---



## I. Introduction

### I.1. Atranol et chloroatranol : des constituants de la mousse de chêne

L'absolu de mousse de chêne est un extrait naturel utilisé en parfumerie, issu du lichen *Evernia prunastri* (L.) Arch. Ce lichen se trouve principalement sur les chênes peuplant les forêts de l'Europe centrale.

Divers procédés sont utilisés pour l'obtention de cet absolu à partir du lichen. Ils reposent tous sur le même principe, à savoir l'extraction initiale à l'aide de divers solvants organiques apolaires (i.e. benzène, hexane, éther de pétrole ...), menant à l'obtention d'un « concret », avec des rendements allant de 1,5 à 10 %, suivie d'une extraction de ce concret à l'aide de solvants polaires (i.e. éthanol, isopropanol ...) pour mener à l'« absolu » avec un rendement avoisinant généralement les 60 %.<sup>1</sup>



Figure 1 : Mousse de chêne et absolu de mousse de chêne.

Du fait de la variété de traitements menant à l'absolu de mousse de chêne, les composants chimiques le constituant, ainsi que leurs concentrations peuvent varier. Des études analytiques ayant pour but de déterminer, entre autres, les molécules responsables de l'odeur de l'absolu avaient déjà été rapportées dès 1975.<sup>2-7</sup> Plus récemment, Joulain et Tabacchi ont proposé une revue combinant les différents travaux effectués dans cette optique.<sup>1</sup> Ils ont recensé plus de 170 molécules différentes contenues dans la mousse de chêne, dont 47 composés polyphénoliques, encore appelés depsides, et 25 triterpènes et

stéroïdes. Certains de ces depsides sont communs à un grand nombre de lichens et peuvent induire des réactions allergiques. C'est par exemple le cas de l'acide usnique et de l'acide évernique.<sup>8,9</sup>

La mousse de chêne est bien connue pour provoquer de nombreux cas d'allergie cutanée. Dans une étude menée par Schnuch *et al.* en 2003, la mousse de chêne a été décrite comme étant responsable de 2,2 % des cas d'allergie cutanée recensés sur 2063 patients testés.<sup>10</sup> En plus des depsides cités précédemment, la mousse de chêne contient de l'atranorine et de la chloroatranorine, également capables d'induire des réactions allergiques. En plus, l'atranorine et la chloroatranorine peuvent se décomposer au cours du processus de traitement de la mousse de chêne menant à l'absolu (Figure 2).<sup>11</sup>

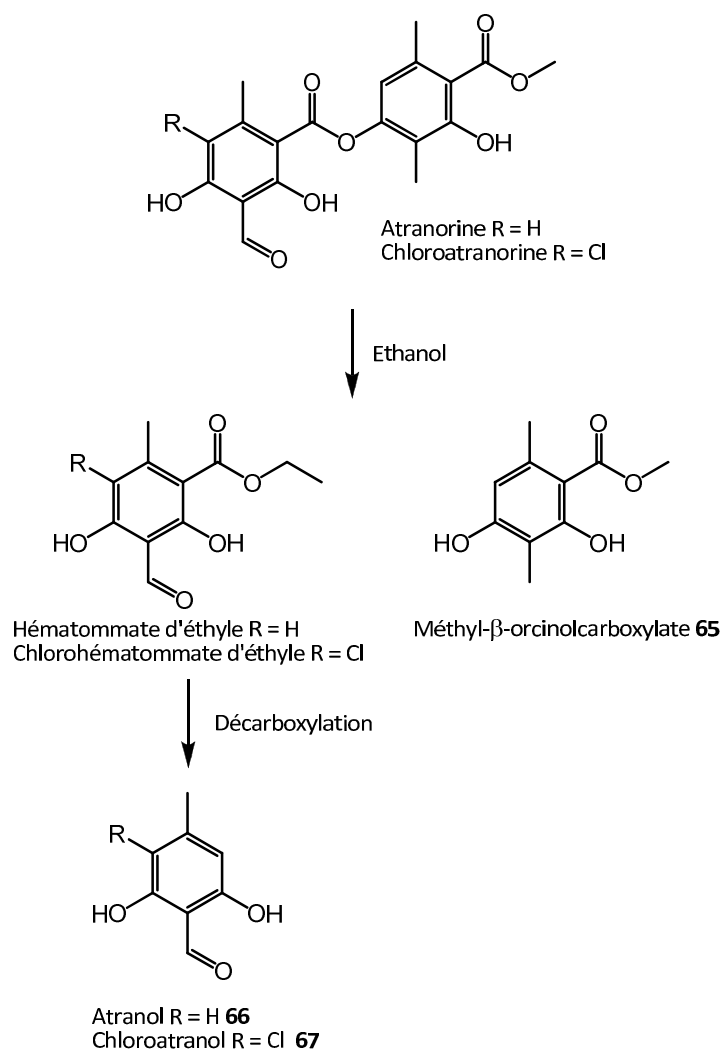


Figure 2 : Produits issus de la décomposition de l'atranorine et de la chloroatranorine lors du procédé de production de l'absolu de mousse de chêne.



Les produits issus de la dégradation de l'atranorine et de la chloroatranorine sont connus depuis le milieu des années 1970. Cependant, ce n'est que récemment que le méthyl- $\beta$ -orcinolcarboxylate **65**, ainsi que l'atranol **66** et le chloroatranol **67** ont été incriminés comme responsables majeurs de l'allergie de contact à l'absolu de mousse de chêne.<sup>2, 12</sup>

## I.2. Atranol et chloroatranol : des allergènes majeurs

Le chloroatranol et l'atranol ayant été identifiés comme étant les principaux responsables de l'allergie de contact à la mousse de chêne, de nombreuses études concernant ces deux molécules ont été effectuées afin de déterminer, entre autres, leurs potentiels de sensibilisation.

Le Research Institute for Fragrance Material (RIFM) indique les valeurs d'EC<sub>3</sub> obtenues par le LLNA, qui sont pour le méthyl- $\beta$ -orcinolcarboxylate **65**, l'atranol **66** et le chloroatranol **67** de 19 %, 0,6 % et de 0,4 % respectivement.<sup>13,14</sup>

Une étude de Johansen *et al.* en 2003, conduite sur 13 patients allergiques à la mousse de chêne, a montré que le chloroatranol était capable de déclencher une réaction allergique chez tous ces patients.<sup>15</sup> De plus, ce travail a montré que la dose minimale à laquelle 50 % des patients testés réagissaient positivement au chloroatranol était de 0,2 ppm (ED<sub>50</sub> %), faisant de cette molécule l'allergène le plus fort actuellement présent dans les produits de consommation.

Par la suite, une comparaison des potentiels d'élicitation entre l'atranol et le chloroatranol a été effectuée.<sup>16</sup> Cette étude, menée sur 10 patients sensibilisés à la mousse de chêne, a montré que les ED<sub>50</sub> % pour l'atranol et pour le chloroatranol étaient respectivement de 1,1 ppm et de 0,2 ppm. D'un autre côté, une étude de Rastogi *et al.* a montré la présence de ces deux molécules dans 87 % de divers parfums et eaux de toilettes testés, et ce à des concentrations médianes d'atranol et de chloroatranol de 0,5 ppm et de 0,25 ppm, respectivement.<sup>17</sup> Ces concentrations étant semblables à celles capables de déclencher des réactions allergiques chez des patients sensibilisés, le « Scientific Committee on Consumer Products » a émis une opinion en 2004 recommandant que ces deux molécules ne soient pas

présentes dans les produits cosmétiques.<sup>18</sup> Ces conclusions ont mené à l'élaboration de procédés visant à diminuer les quantités d'atranol et de chloroatranol présentes dans l'absolu de mousse de chêne.

Une étude récente conduite par Nardelli *et al.* a eu pour but de comparer, chez 14 patients sensibilisés à la mousse de chêne, le pouvoir d'élicitation d'un absolu de mousse de chêne ayant subi un traitement afin de diminuer les concentrations d'atranol et de chloroatranol et de trois absolus commerciaux non traités.<sup>19</sup> Le traitement utilisé lors de cette étude ciblait les aldéhydes en les faisant réagir avec un polymère, permettant ainsi de diminuer la concentration en atranol et en chloroatranol dans la mousse de chêne traitée. Ce traitement avait permis de faire passer les concentrations en atranol et en chloroatranol de 3,4 % à moins de 75 ppm, et de 1,8 % à moins de 25 ppm, respectivement. L'étude a montré une absence de réaction à l'absolu traité seulement chez 6 patients. Les auteurs suggèrent que cette observation pourrait avoir deux causes distinctes. D'une part, les réactions d'élicitation observées avec la mousse traitée pourraient éventuellement être dues au méthyl- $\beta$ -orcinolcarboxylate, un des responsables de l'odeur de l'absolu et qui est également un allergène « faible ». D'autre part, les concentrations en atranol et/ou en chloroatranol restantes lors de ce procédé pourraient être encore trop élevées pour certains patients fortement sensibilisés, permettant ainsi d'induire des réactions allergiques. Ainsi, même en très faibles quantités, ces deux molécules restent des allergènes très puissants. Afin de mieux comprendre leurs mécanismes d'action, des études de réactivité vis-à-vis de peptide nucléophiles sont en conséquence indispensables.

## II. Synthèse marquée au carbone 13 d'atranol et de chloroatranol

### II.1. Choix de la position de marquage

Dans le cas de l'atranol et du chloroatranol, le choix de la position de marquage au carbone 13 n'est pas facile. En effet, bien que la fonction carbonyle des aldéhydes soit bien connue comme étant souvent à l'origine de cas de sensibilisation, il a été montré que les aldéhydes directement liés à un cycle aromatique, moins électrophiles, ne sont que rarement sensibilisants.<sup>20</sup> C'est pourquoi, afin de devenir suffisamment électrophiles et ainsi pouvoir se lier à une protéine, ces deux molécules doivent sans doute, au préalable, être oxydées *in vivo*. Cependant, la structure exacte du véritable haptène dérivé de ces pro-haptènes reste à ce jour inconnue. Enfin, l'introduction d'un carbone 13 dans le cycle aromatique par voie synthétique est difficile. Notre choix s'est donc porté sur l'introduction du marquage au carbone 13 au niveau du groupement méthyle (Figure 3). Certes, l'introduction du marquage sur ce groupement non réactif n'offre pas d'informations directes quant à la réactivité de ces deux molécules. Cependant, ce groupement méthyle est proche des sites potentiellement réactifs et, une modification chimique des sites réactifs devrait aussi induire une modification du déplacement chimique de RMN caractéristique du carbone de ce groupement méthyle.

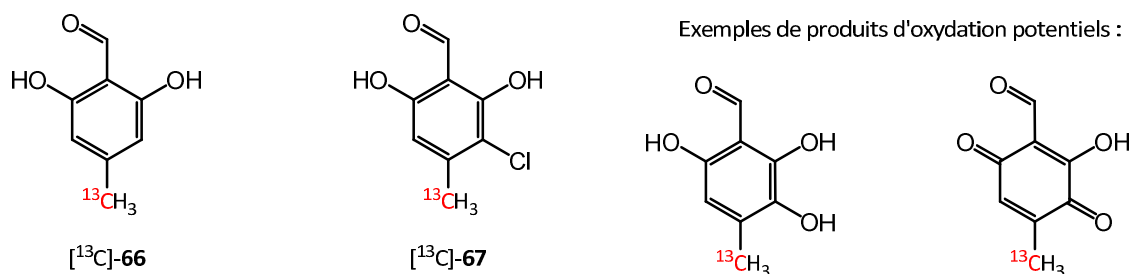


Figure 3 : Structure de l'atranol, du chloroatranol ainsi que d'exemples de produits d'oxydations potentiels marqués au  $^{13}\text{C}$  au niveau du groupement méthyle.

## II.2. Synthèse marquée au carbone 13 d'atranol et de chloroatranol

La voie de synthèse menant à l'obtention de l'atranol [ $^{13}\text{C}$ ]-**66** et du chloroatranol [ $^{13}\text{C}$ ]-**67** est schématisée dans la Figure 4.

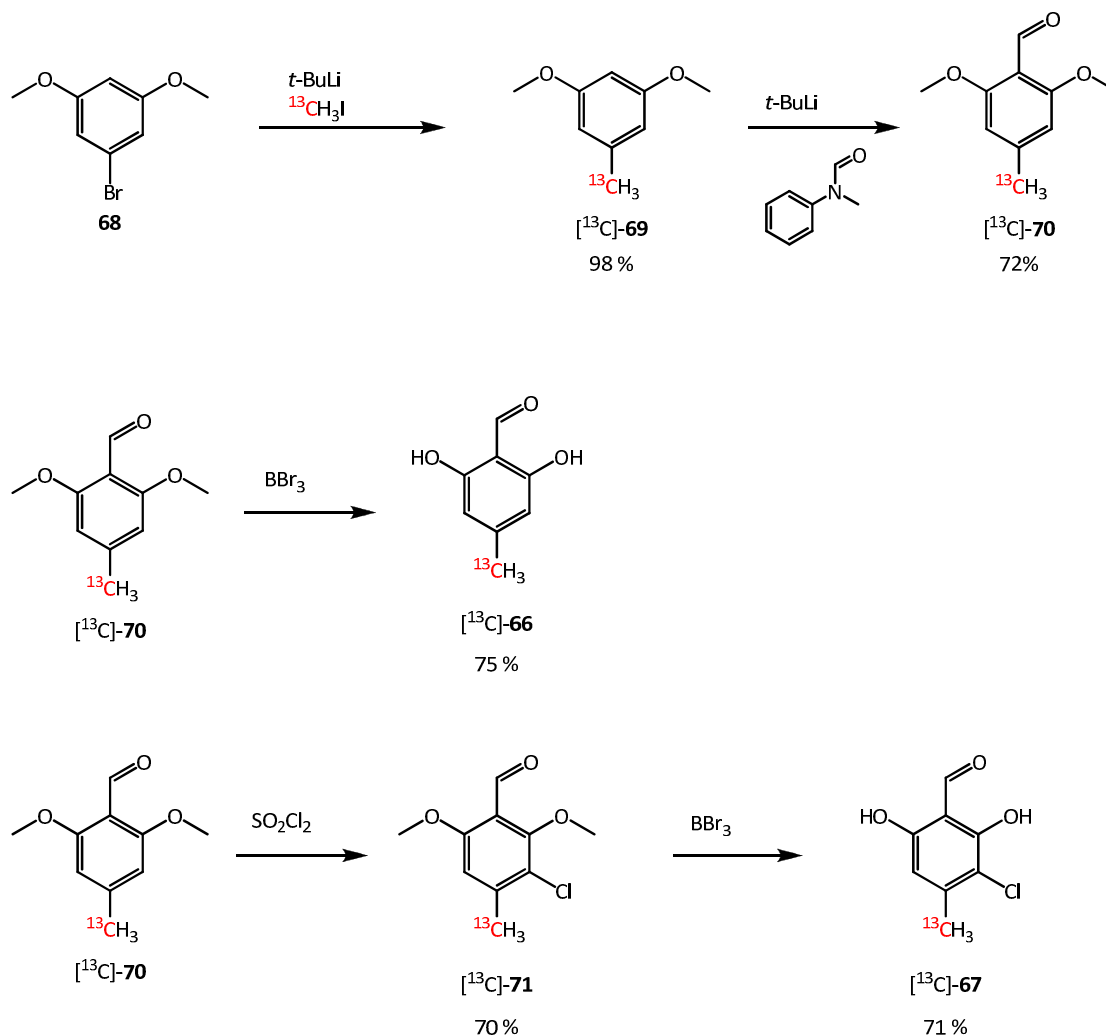


Figure 4 : Synthèse marquée au  $^{13}\text{C}$  d'atranol [ $^{13}\text{C}$ ]-**66** et de chloroatranol [ $^{13}\text{C}$ ]-**67**.

Cette synthèse s'appuie sur celle précédemment développée par Bernard *et al.* menant à l'obtention de l'atranol **66** et du chloroatranol **67**.<sup>12,21</sup> En effet, la seule étape qui diffère est celle de l'introduction du carbone marqué sur le groupement méthyle. Cette première étape consiste, dans un premier temps, en un échange halogène-métal sur le 1-bromo-3,5-diméthoxybenzène **68** par réaction avec du *tertio*-butyllithium pour former le lithien correspondant. Celui-ci est alors mis en réaction, dans un second temps et en « un pot », avec de l'iodure de méthyle marqué au carbone 13 pour ainsi former le 1,3-diméthoxy-5-

[<sup>13</sup>C]-méthylbenzène [<sup>13</sup>C]-**69** avec un rendement sur les deux étapes de 98 %. L'introduction du groupement carbonyle en position *ortho* des deux groupements méthoxy du composé [<sup>13</sup>C]-**69** s'effectue à l'aide de *N*-méthylformanilide et en présence de *tertio*-butyllithium. Ceci permet l'obtention du 2,6-diméthoxy-4-[<sup>13</sup>C]-méthylbenzaldéhyde [<sup>13</sup>C]-**70** avec un rendement de 72 %. Une déprotection des deux groupements méthoxy du composé [<sup>13</sup>C]-**70** à l'aide de tribromure de bore permet l'obtention de l'atranol marqué au carbone 13, [<sup>13</sup>C]-**66**, avec un rendement de 75 %. D'un autre côté, l'action de chlorure de sulfuryle sur ce même composé [<sup>13</sup>C]-**70** mène au 3-chloro-2,6-diméthoxy-4-[<sup>13</sup>C]-méthylbenzaldéhyde [<sup>13</sup>C]-**71** avec un rendement de 70 %. Le chloroatranol marqué au carbone 13, [<sup>13</sup>C]-**67**, est alors obtenu avec un rendement de 71 % par déprotection des deux groupements méthoxy à l'aide de tribromure de bore. Les rendements globaux de ces deux synthèses sont de 53 % et de 35 % pour l'atranol, [<sup>13</sup>C]-**66**, et le chloroatranol, [<sup>13</sup>C]-**67**, respectivement.

### III. Premières études de réactivité

#### III.1. Études d'oxydation de l'atranol et du chloroatranol

Afin de déterminer si l'atranol et le chloroatranol se classent dans la catégorie des pro- ou des pré-haptènes, une étude sur leur comportement en milieu oxydant a été entreprise. Cette étude a été réalisée en suivant, par RMN du carbone 13, la conversion/modification chimique de ces molécules en présence soit de peroxyde d'hydrogène, afin de mimer une oxydation à l'air (cas des pré-haptènes), soit en présence de peroxydase de raifort/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mimant une oxydation enzymatique (cas des pro-haptènes). Les résultats obtenus lors de cette étude préliminaire sont reportés dans la Figure 5 pour l'atranol et dans la Figure 6 pour le chloroatranol.

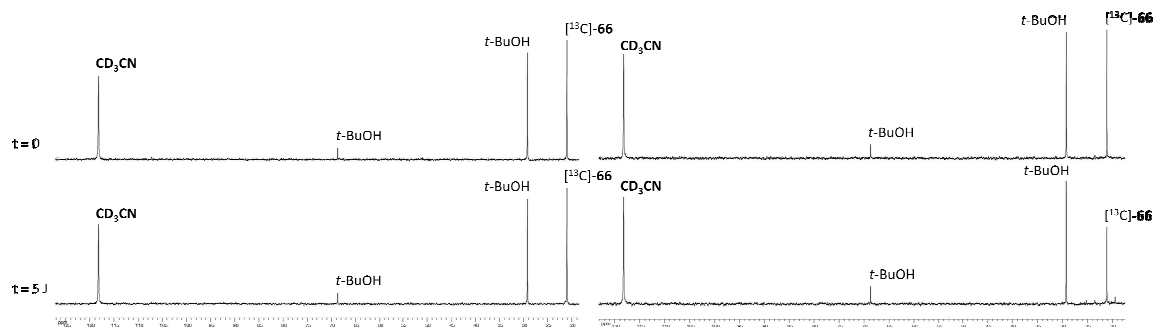


Figure 5 : Spectres de RMN du <sup>13</sup>C montrant l'évolution/comportement de l'atranol en fonction du temps en présence de peroxyde d'hydrogène (à gauche) et en présence de peroxydase de raifort/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (à droite).

Ces spectres de RMN du carbone 13 montrent bien que l'oxydation de l'atranol ne peut se produire qu'en présence d'un milieu enzymatique. En effet, ce n'est que dans ce cas que l'on remarque une diminution significative du signal à 21,1 ppm caractéristique du groupement méthyle de l'atranol [<sup>13</sup>C]-66. Cependant, aucun nouveau signal de RMN du carbone 13 n'est apparu lors de cette étude. Il est probable que l'oxydation de l'atranol dans ces conditions puisse mener à la formation de polymères. Cette réactivité pourrait expliquer la diminution du signal de RMN caractéristique de l'atranol sans que de nouveaux signaux apparaissent. En effet, de telles polymérisations en milieu enzymatique oxydant ont déjà pu être observées sur une grande variété de phénols.<sup>22-24</sup>

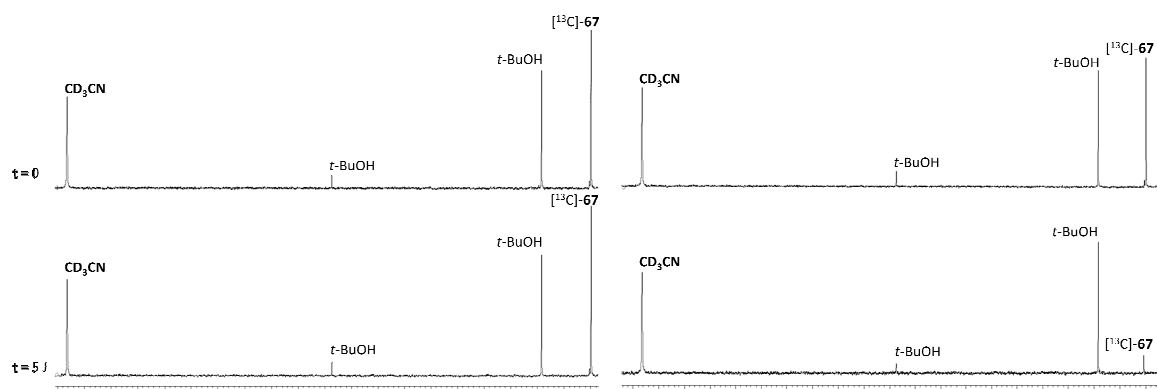


Figure 6 : Spectres de RMN du <sup>13</sup>C montrant l'évolution/comportement du chloroatranol en fonction du temps en présence de peroxyde d'hydrogène (à gauche) et en présence de peroxydase de raifort/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (à droite).

L'observation de ces spectres de RMN du carbone 13 mène aux mêmes conclusions que dans le cas de l'atranol. En effet, le chloroatranol n'est consommé qu'en la présence de

peroxydase de raifort/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dans le cas du chloroatranol, cette consommation semble beaucoup plus importante que dans le cas de l'atranol (J = 5). Enfin, l'absence de nouveaux signaux de RMN prouvant la formation de produits issus de l'oxydation du chloroatranol est certainement due à la formation de polymères comme dans le cas de l'atranol.

Cette étude a montré qu'une modification chimique de l'atranol et du chloroatranol ne s'est opérée que dans le cas d'une oxydation enzymatique. Il semble donc raisonnable de supposer que ces deux molécules se classent dans la catégorie des pro-haptènes, même si les haptènes issus de leurs oxydations n'ont pour l'instant pas pu être observés.

À la vue de ces résultats, des études sur la réactivité de ces deux molécules en milieu enzymatique vis-à-vis du glutathion ont été entreprises.

### III.2. Réactivité de l'atranol et du chloroatranol vis-à-vis du glutathion en milieu oxydant

Bien que les résultats obtenus précédemment semblent montrer que l'oxydation de l'atranol et du chloroatranol ne puisse s'effectuer qu'en milieu enzymatique, des études de réactivité vis-à-vis du glutathion ont été menées dans les deux milieux oxydants, peroxyde d'hydrogène et peroxydase de raifort/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

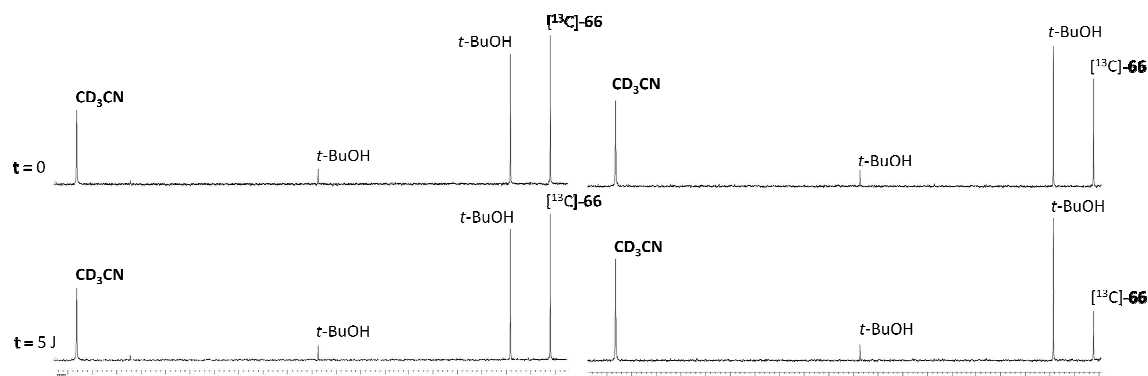


Figure 7 : Spectres de RMN du <sup>13</sup>C de la réaction entre l'atranol [<sup>13</sup>C]-66 et le GSH en présence de peroxyde d'hydrogène (à gauche) et en présence de peroxydase de raifort (à droite).

Ainsi, lorsque l'atranol [ $^{13}\text{C}$ ]-**66** est mis en présence de glutathion dans un milieu oxydant de peroxyde d'hydrogène, aucune évolution n'est observée, que ce soit une disparition du signal caractéristique de l'atranol marqué au carbone 13 à 21,1 ppm, ou que ce soit une apparition d'un autre signal pouvant correspondre à un éventuel adduit formé. Ceci semble indiquer que, non seulement l'atranol n'est pas oxydé par le peroxyde d'hydrogène, mais également que sans être chimiquement modifiée, cette molécule ne réagit pas de manière significative avec le glutathion. Cette dernière observation semblerait indiquer que l'atranol nécessiterait bien une modification chimique avant de pouvoir se lier à une protéine cutanée et ainsi déclencher une réaction allergique.

Par contre, en présence de peroxydase de raifort, une nette disparition du signal à 21,1 ppm a pu être notée sans pour autant observer l'apparition de nouveaux signaux. Ces résultats viennent appuyer le fait que l'atranol ne s'oxyde pas par simple action de peroxyde d'hydrogène mais nécessite bien la présence de peroxydase de raifort. Cependant, même si la consommation d'atranol est évidente dans le cas de l'utilisation d'un milieu enzymatique, aucun adduit n'a été observé avec le glutathion. En fait, que ce soit dans le cas de l'étude de l'atranol seul ou en présence de glutathion et dans un milieu enzymatique oxydant, aucun nouveau signal pouvant correspondre à une modification de la molécule de départ ou à un adduit n'a pu être observé. Comme indiqué précédemment, ceci pourrait être dû à une polymérisation éventuelle de l'atranol dans le milieu oxydant.

Dans le cas du chloroatranol [ $^{13}\text{C}$ ]-**67**, les résultats obtenus ont conduit aux mêmes observations et conclusions.



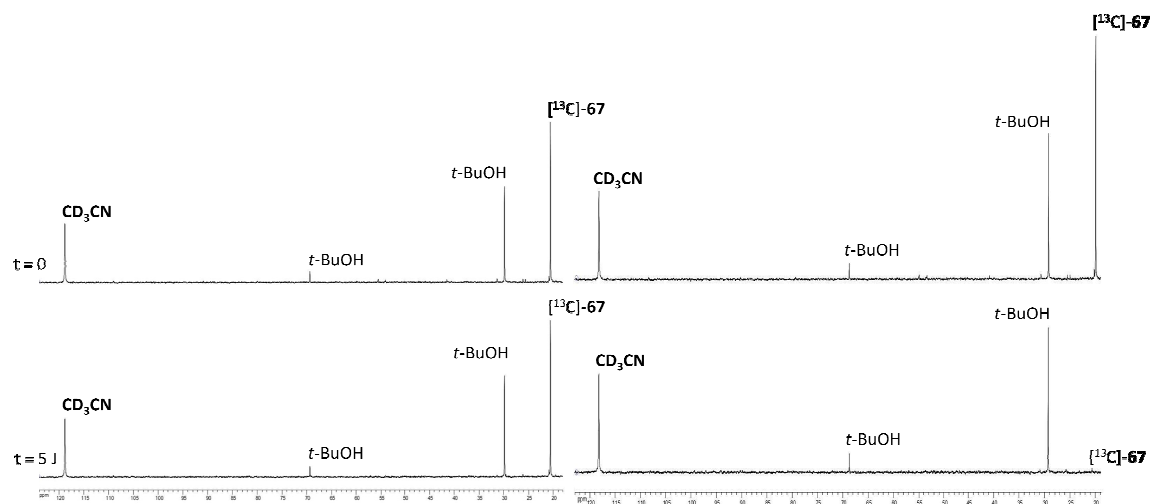


Figure 8 : Spectres de RMN du  $^{13}\text{C}$  de la réaction entre le chloroatranol  $[^{13}\text{C}]\text{-67}$  et le GSH en présence de peroxyde d'hydrogène (à gauche) et en présence de peroxydase de raifort/ $\text{H}_2\text{O}_2$  (à droite).

Le chloroatranol semble s'oxyder uniquement en présence d'un milieu enzymatique et le signal de RMN du carbone 13 caractéristique à 20,7 ppm de cette molécule disparaît presque totalement après cinq jours. Cependant, aucun nouveau signal de RMN du carbone 13, correspondant soit à un produit d'oxydation du chloroatranol, soit à un éventuel adduit avec le glutathion, n'apparaît. Ceci est probablement dû aux mêmes raisons que celle invoquées précédemment lors de l'étude de la réactivité de l'atranol avec le glutathion.

Du fait du manque d'information fournie par la RMN du carbone 13 pour le suivi de l'oxydation de l'atranol et du chloroatranol, ainsi que de leur réaction avec le glutathion, en milieu oxydant, nous n'avons pas voulu entamer des études de réactivité par RMN avec le mélange atranol/chloroatranol mais nous sommes alors dirigés vers l'utilisation de la spectroscopie de masse. Le principal avantage de cette technique d'analyse, par rapport à la RMN, est qu'elle permet la détection de molécules à de plus faibles concentrations (de l'ordre du mmol/L pour la RMN et du  $\mu\text{mol/L}$  pour la spectrométrie de masse) bien qu'elle ne permette pas l'élucidation des structures des molécules. Ainsi, les structures des composés décrits dans la section suivante sont des suggestions faites à partir des valeurs de masse obtenues, et à partir de la chimie caractérisant ce type de composés.

## IV. Études de la réactivité de l'atranol et du chloroatranol par spectrométrie de masse

### IV.1. Synthèse d'atranol et de chloroatranol

L'atranol et le chloroatranol n'étant pas accessibles commercialement, et dans le cadre de travaux visant à identifier les molécules responsables de l'allergie de contact à l'absolu de mousse de chêne, Bernard *et al.* avaient développé une synthèse de ces deux composés.<sup>12,21</sup> Cette synthèse est décrite dans la Figure 9. L'atranol et le chloroatranol ainsi obtenus ont été utilisés afin de mener à terme les études de la réactivité par spectrométrie de masse, ainsi que les tests biologiques portant sur le pouvoir sensibilisant du mélange atranol/chloroatranol décrits dans la section V de ce chapitre.

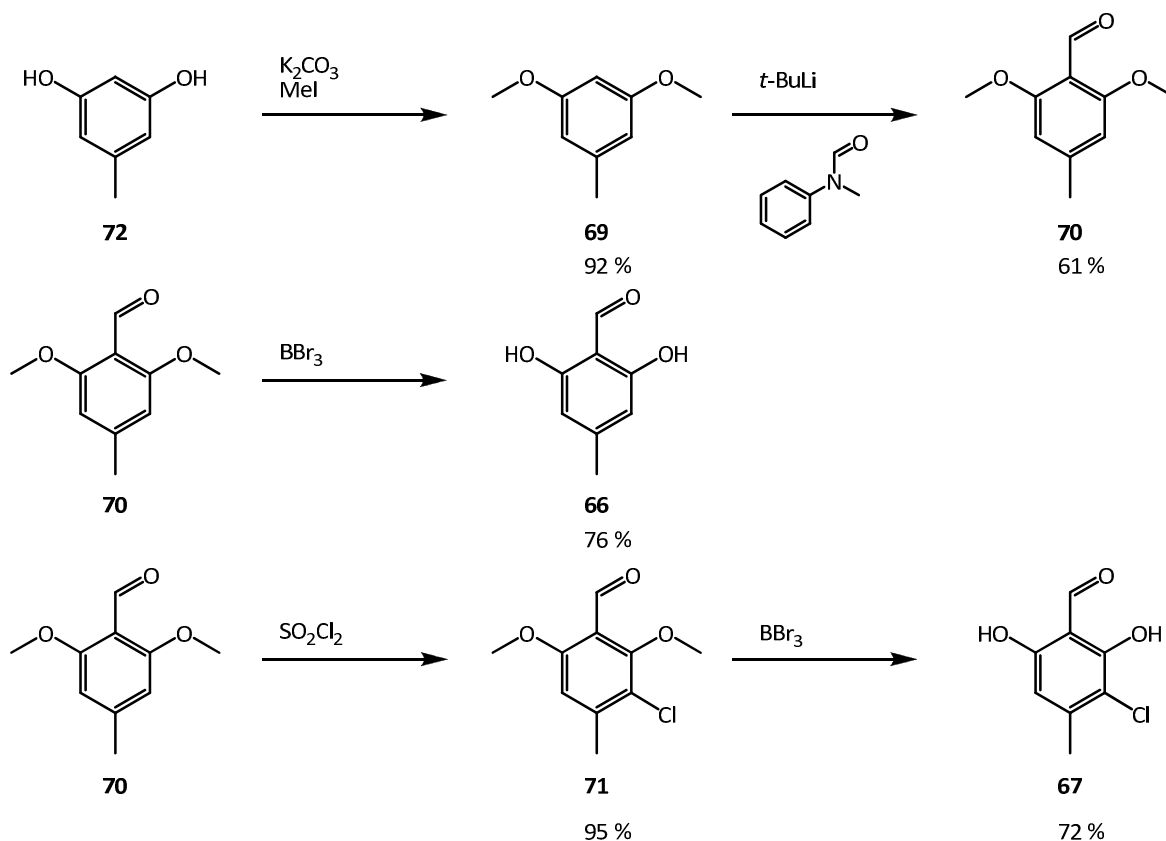


Figure 9 : Synthèse d'atranol et de chloroatranol développée par Bernard *et al.*<sup>12,21</sup>

Cette synthèse d'atranol et de chloroatranol repose sur l'obtention de l'aldéhyde **70** qui peut mener en une étape à l'atranol **66** et en deux étapes au chloroatranol **67**. La première étape

de cette synthèse consiste en la protection des deux groupements hydroxyles de l'orcinol **72** à l'aide d'iodure de méthyle et en présence de carbonate de potassium, pour conduire au 1,3-diméthoxy-5-méthylbenzène **69** avec un rendement de 92 %. L'introduction du groupement carbonyle en position *para* du groupement méthyle du composé **69** peut s'effectuer à l'aide de diméthylformamide, utilisé par Bernard *et al.*, mais aussi à l'aide de *N*-méthylformanilide en présence de *tertio*-butyllithium, et permet l'obtention dans ce dernier cas du 2,6-diméthoxy-4-méthylbenzaldéhyde **70** avec un rendement de 61 %. Le composé **70** permet, par déprotection des groupements méthoxy à l'aide de tribromure de bore, d'obtenir l'atranol **66** avec un rendement de 76 %. D'un autre côté, l'action de chlorure de sulfuryle sur ce même composé **70** mène au 3-chloro-2,6-diméthoxy-4-méthylbenzaldéhyde **71** avec un rendement de 95 %. Le chloroatranol **67** est alors obtenu avec un rendement de 72 % par déprotection des deux groupements méthoxy à l'aide de tribromure de bore. Les rendements globaux de ces deux synthèses sont de 43 % et de 38 %, pour l'atranol **66** et le chloroatranol **67**, respectivement.

## IV.2. Méthodologie

Dans un premier temps, afin de déterminer la réactivité propre à chaque composé, nous avons voulu étudier le comportement de l'atranol et du chloroatranol séparément vis-à-vis des peptides. Dans un deuxième temps, les résultats ainsi obtenus ont été comparés à ceux résultant de l'étude de la réactivité du mélange des deux composés avec les différents peptides.

Les échantillons ont été préparés selon le même principe de concentrations que celui utilisé lors des études de RMN, à savoir, un équivalent de composé, préalablement dissout dans 200  $\mu$ L d'acétonitrile, mis en réaction avec un équivalent de peptide, lui dissout dans 400  $\mu$ L d'eau contenant 37 unités de peroxydase de raifort et un équivalent de peroxyde d'hydrogène. Ce mélange réactionnel a alors été analysé par chromatographie liquide combinée à la spectrométrie de masse (LC-MS).

### IV.3. Études préliminaires portant sur l'oxydation en milieu enzymatique

Une première série d'études portant sur la détection de molécules issues de l'oxydation de l'atranol et du chloroatranol a été entreprise. Afin de mener à bien ces expériences, ces deux composés ont été mis, seuls ou en mélange, en présence de peroxydase de raifort. Le milieu de réaction a alors été analysé par LC-MS. Les spectres de masse des principaux produits observés sont répertoriés dans les Figures 10, 13 et 14.

Dans le cas de l'atranol, le chromatogramme issu de la chromatographie liquide montrait un grand pic à un  $T_R$  de 1,92 min avec une valeur de  $m/z$  associée de 153 correspondant à l'atranol, mais aussi deux autres pics à  $T_R$  de 2,25 min et de 3,02 min, avec des  $m/z$  associées qui pourrait correspondre à la formation de nouveaux produits issus de l'action de la peroxydase de raifort sur l'atranol.

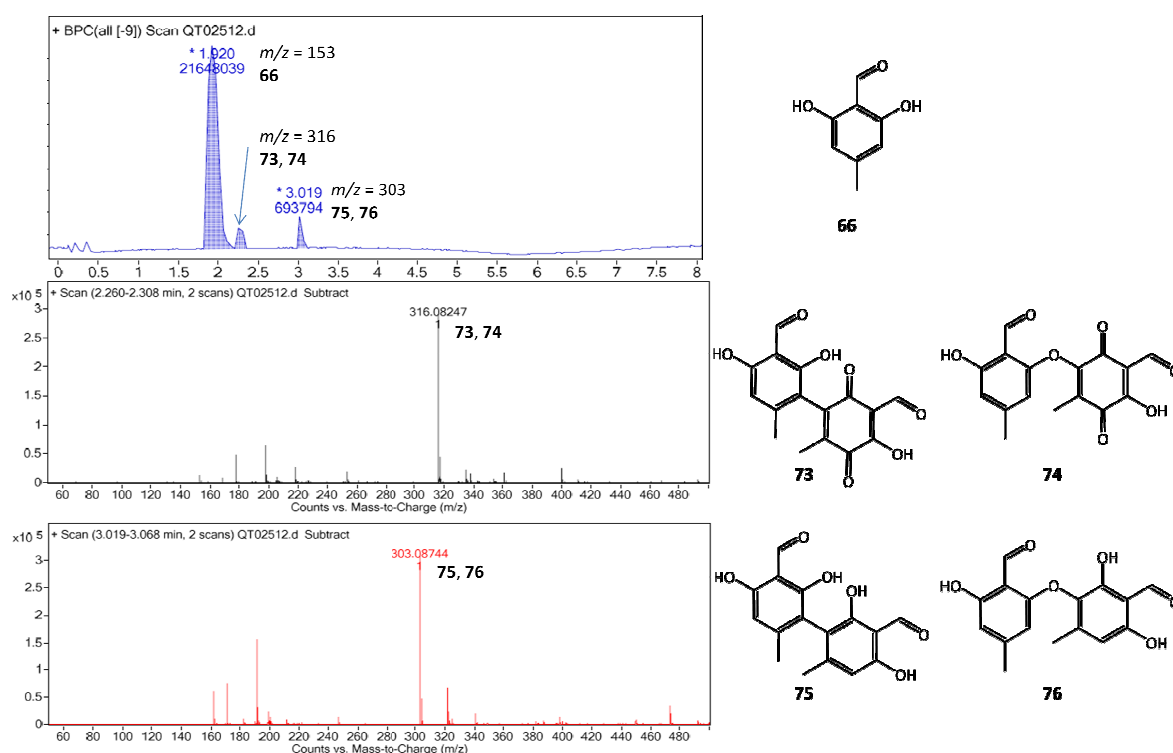


Figure 10 : Chromatogramme (LC) et spectres de masse correspondant aux produits observés lors de l'oxydation de l'atranol.

En plus de l'ion moléculaire correspondant à la masse de l'atranol **66**, on observe deux autres ions moléculaires correspondant à des valeurs de  $m/z$  de 303 et de 316. L'ion

moléculaire de valeur de  $m/z$  de 303 pourrait correspondre à la formation de deux dimères, isomères de position, que sont les composés **75** et **76** (Figure 10). Dec *et al.* proposent un mécanisme pour la formation de dimères similaires aux composés **75** et **76** en oxydant plusieurs phénols en présence de peroxydase de raifort.<sup>23</sup> La Figure 11 représente le mécanisme proposé par ces auteurs, transposé au cas de l'oxydation de l'atranol. Les différents composés identifiés lors de cette étude résulteraient de la présence de différents radicaux libres issus de l'action de la peroxydase de raifort sur l'atranol.

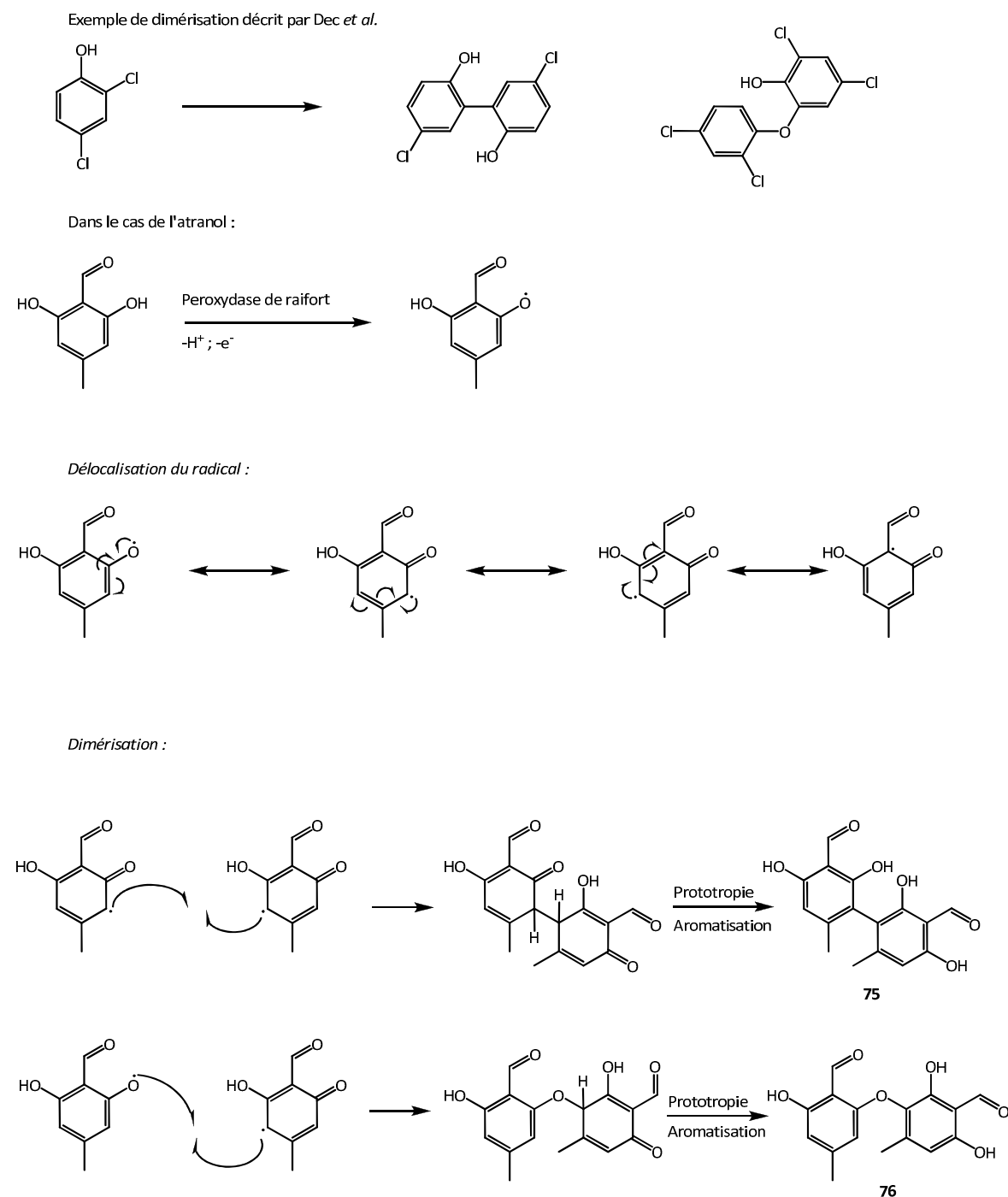
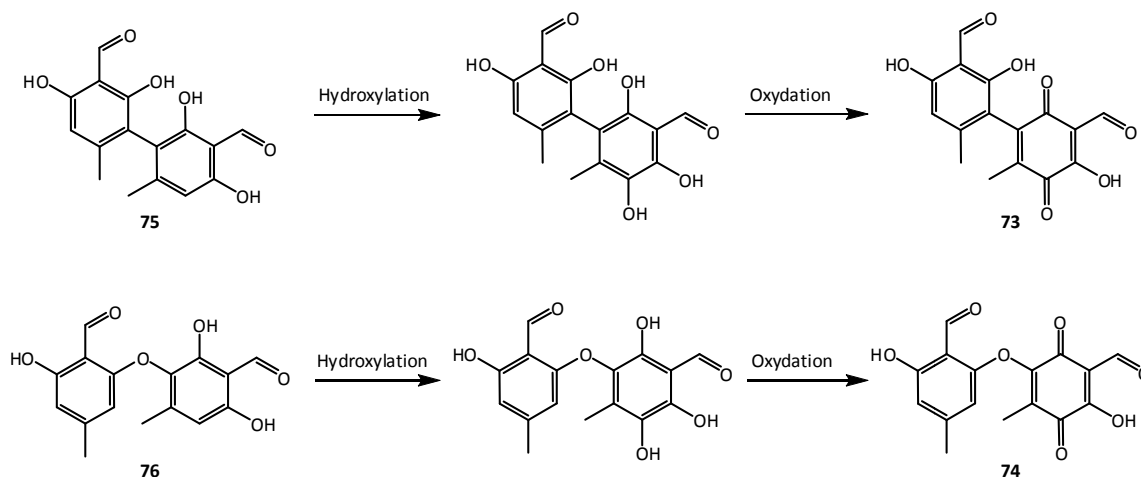


Figure 11 : Mécanisme proposé pour l'oxydation de l'atranol **66** menant à la formation des composés **75** et **76**.

L'ion moléculaire de valeur de  $m/z$  316 pourrait être issu de l'hydroxylation des dimères **75** et **76**, suivie d'une oxydation menant aux quinones **73** et **74** respectivement (Figure 12). De telles hydroxylations de composés aromatiques en présence de peroxydase de raifort ont en effet déjà été rapportées par Akasaka *et al.*<sup>25</sup> Enfin, le motif hydroquinone ainsi obtenu peut s'oxyder facilement pour former la quinone correspondante.


 Figure 12 : Mécanismes proposés pour la formation des composés **73** et **74**.

Dans le cas du chloroatranol, le chromatogramme LC montre l'apparition d'un seul nouveau pic à un  $T_R$  de 3,80 min, et avec une valeur de  $m/z$  associée de 371.

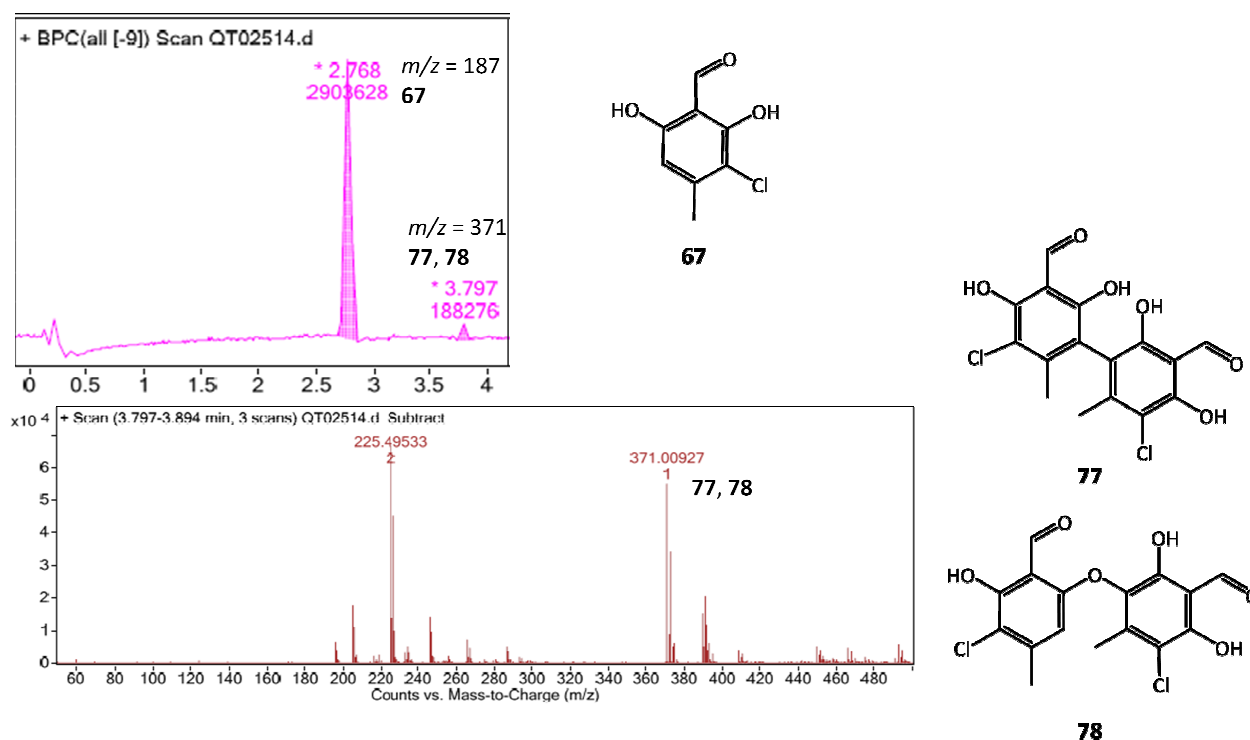


Figure 13 : Chromatogramme (LC) et spectre de masse correspondant aux produits observés lors de l'oxydation du chloroatranol.

Cet ion moléculaire de  $m/z$  371 pourrait bien correspondre à la formation des composés **77** et **78**, deux dimères de chloroatranol, dont le mécanisme de formation serait similaire à celui

proposé pour la formation des composés issus de l'oxydation de l'atranol. En plus de ces deux composés, trois autres ions moléculaires de valeurs de  $m/z$  associées de 225,5 450 et 779 ont pu être observés. Les deux premiers ( $m/z = 225,5$  et  $m/z = 450$ ) correspondent à la formation du ou des mêmes composés. En effet, en ajoutant un proton à l'ion moléculaire de valeur de  $m/z$  de 450 on obtient un nouvel ion moléculaire de  $m/z = 451/2 = 225,5$ . Ces valeurs de  $m/z$  pourraient correspondre à un trimère de chloroatranol, alors que celle de 779 pourrait être due à la présence d'un tétramère de cet aldéhyde. Cependant aucune structure précise n'a pu être attribuée à ces produits de réaction.

La Figure suivante montre le chromatogramme et les spectres de masse correspondant aux principaux produits observés lorsque l'atranol et le chloroatranol ont été traités en présence de peroxydase de raifort dans un mélange équimolaire.

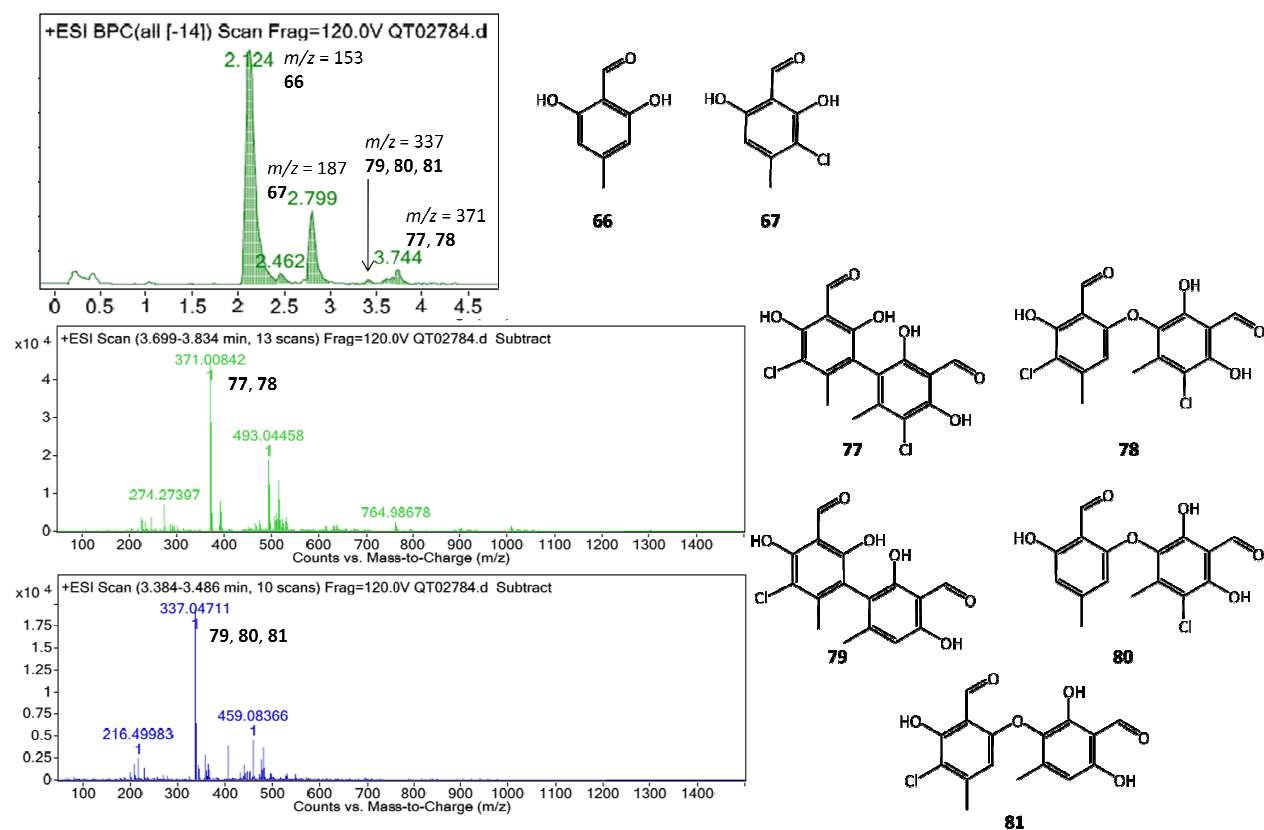


Figure 14 : Chromatogramme (LC) et spectres de masse correspondant aux produits observés lors de l'oxydation du mélange atranol/chloroatranol.

La formation des composés **77** et **78**, de valeur de  $m/z$  371 et issus de la dimérisation du chloroatranol décrite précédemment, a été aussi observée. De plus, un nouveau produit



avec une valeur de  $m/z$  associée de 337 pouvant correspondre aux structures des composés **79**, **80** et **81** a été observé. Ces composés résulteraient d'une éventuelle dimérisation à partir d'atranol et de chloroatranol par un mécanisme similaire à celui décrit dans la Figure 11. Enfin, lors de cette expérience, aucun produit éventuel issu de l'oxydation directe de l'atranol n'a pu être observé.

#### IV.4. Réactivité vis-à-vis du glutathion

##### IV.4.1. Atranol

La Figure 15 montre le chromatogramme issu de la LC du mélange réactionnel et le spectre de masse du principal composé identifié lors du suivi de la réaction entre l'atranol et le glutathion en présence de peroxydase de raifort.

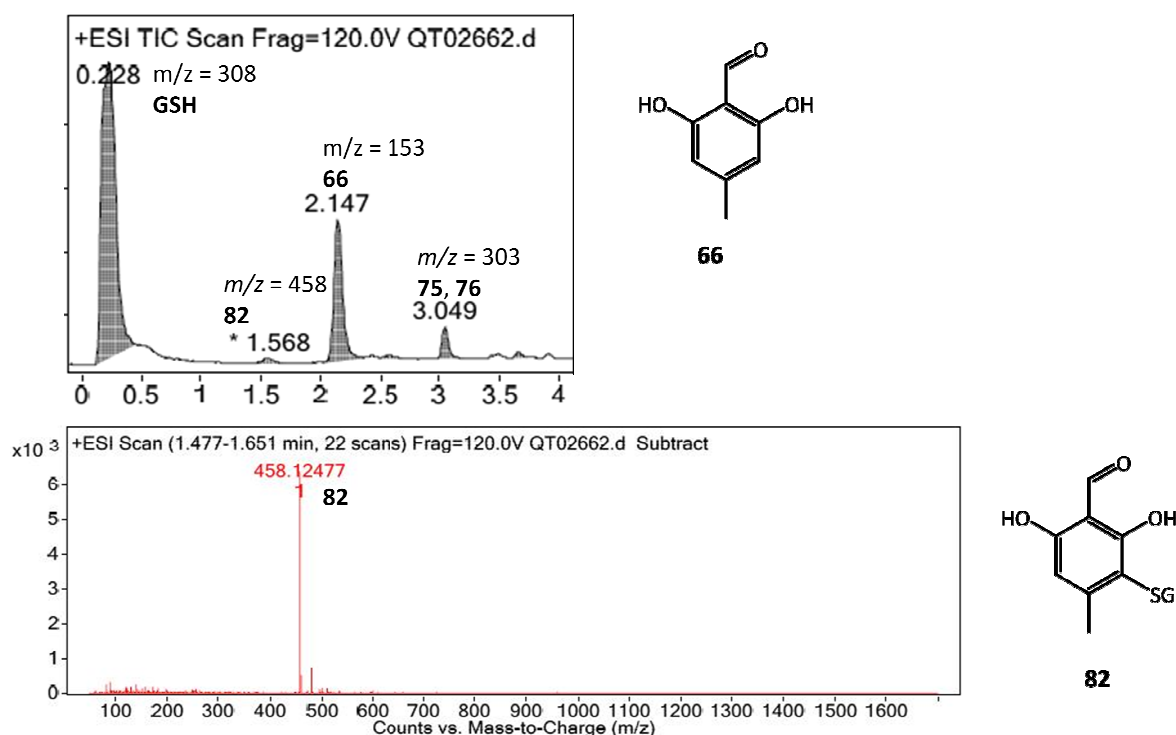


Figure 15 : Chromatogramme et spectre de masse correspondant aux produits observés lors la réaction entre l'atranol et le GSH.

En plus des pic de LC à des  $T_R$  de 2,15 min et de 0,23 min contenant des ions moléculaires à des valeurs de  $m/z$  de 153 et de 308 respectivement et correspondant à l'atranol et au

glutathion, cette étude a montré la formation d'un seul composé dont la masse de 457 pourrait correspondre à un adduit, **82**, entre le glutathion et l'atranol. Également, la LC/MS a permis d'observer la présence de l'ion moléculaire correspondant aux dimères d'atranol **75** et **76** décrits précédemment.

Le mécanisme que l'on pourrait proposer pour la formation de l'adduit **82** est décrit dans la Figure 16.

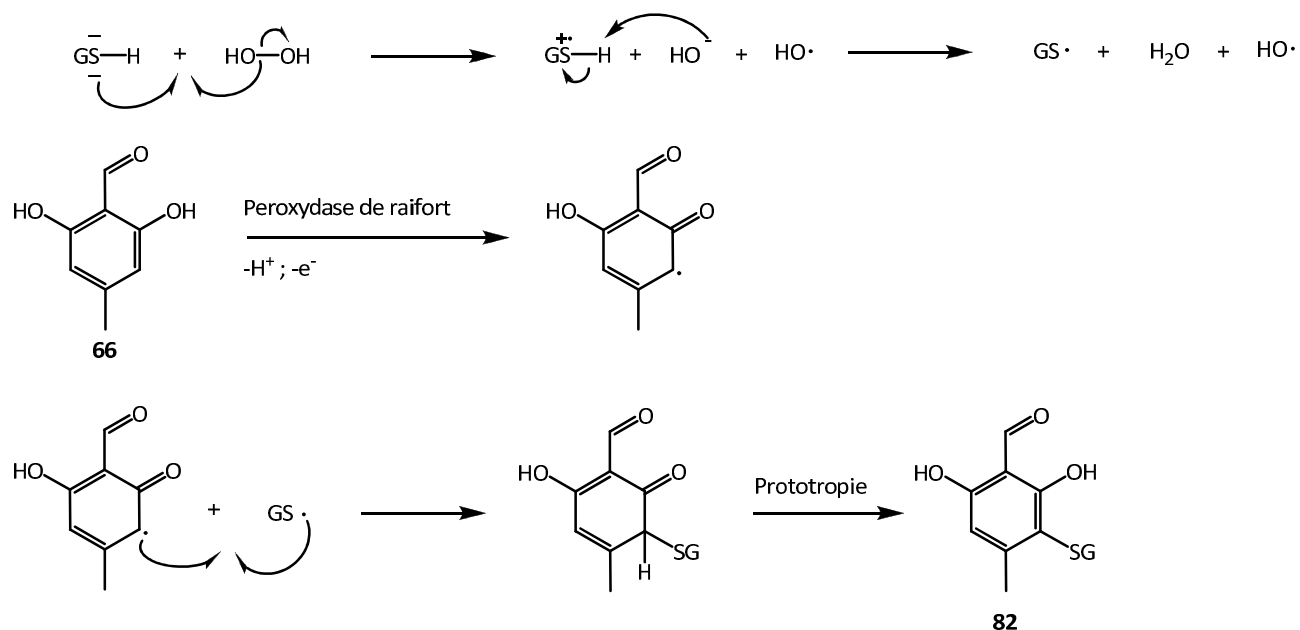


Figure 16 : Mécanisme supposé menant à la formation de l'adduit **82**.

#### IV.4.2. Chloroatranol

La Figure 17 montre le chromatogramme et le spectre de masse des composés identifiés lors du suivi de la réaction entre le chloroatranol et le glutathion en présence de peroxydase de raifort.

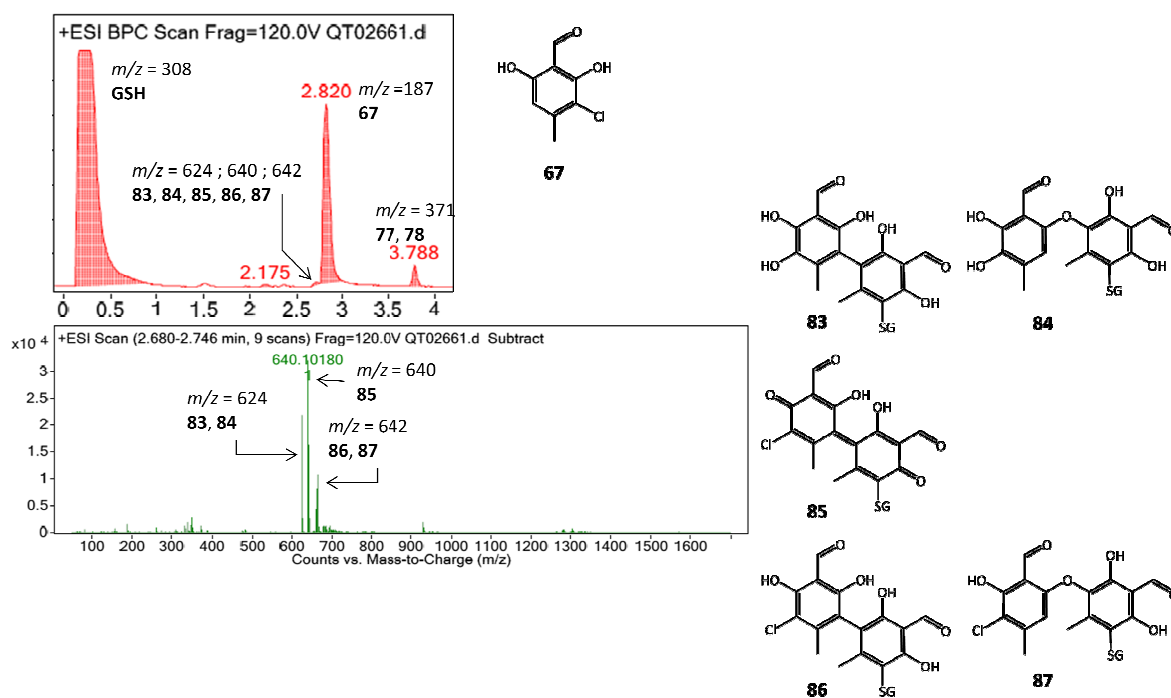


Figure 17 : Chromatogramme (LC) et spectre de masse correspondant aux produits observés lors de la réaction entre le chloroatranol et le GSH.

La LC montre clairement les pics correspondant au chloroatranol ( $T_R = 2,82$  min ;  $m/z$  187), au glutathion ( $T_R = 0,23$  min ;  $m/z$  308) et aux dimères de chloroatranol **77** et **78** décrits précédemment ( $T_R = 3,78$  min ;  $m/z$  371). Un pic extrêmement faible en intensité à un  $T_R$  de 2,17 min contient trois valeurs de  $m/z$  de 624, 640 et 642. Ces valeurs de masse pourraient bien correspondre aux composés **83-87** montrés dans la Figure 17. Ces cinq composés seraient certainement des adduits formés par réaction entre les différents dimères de chloroatranol et le glutathion. La voie réactionnelle probable de leur formation, inspirée du mécanisme décrit par Eastmond *et al.*<sup>26</sup> dans le cas de l'étude de la réactivité du phénol en présence de peroxydase de raifort et de glutathion, est schématisée dans la Figure 18.

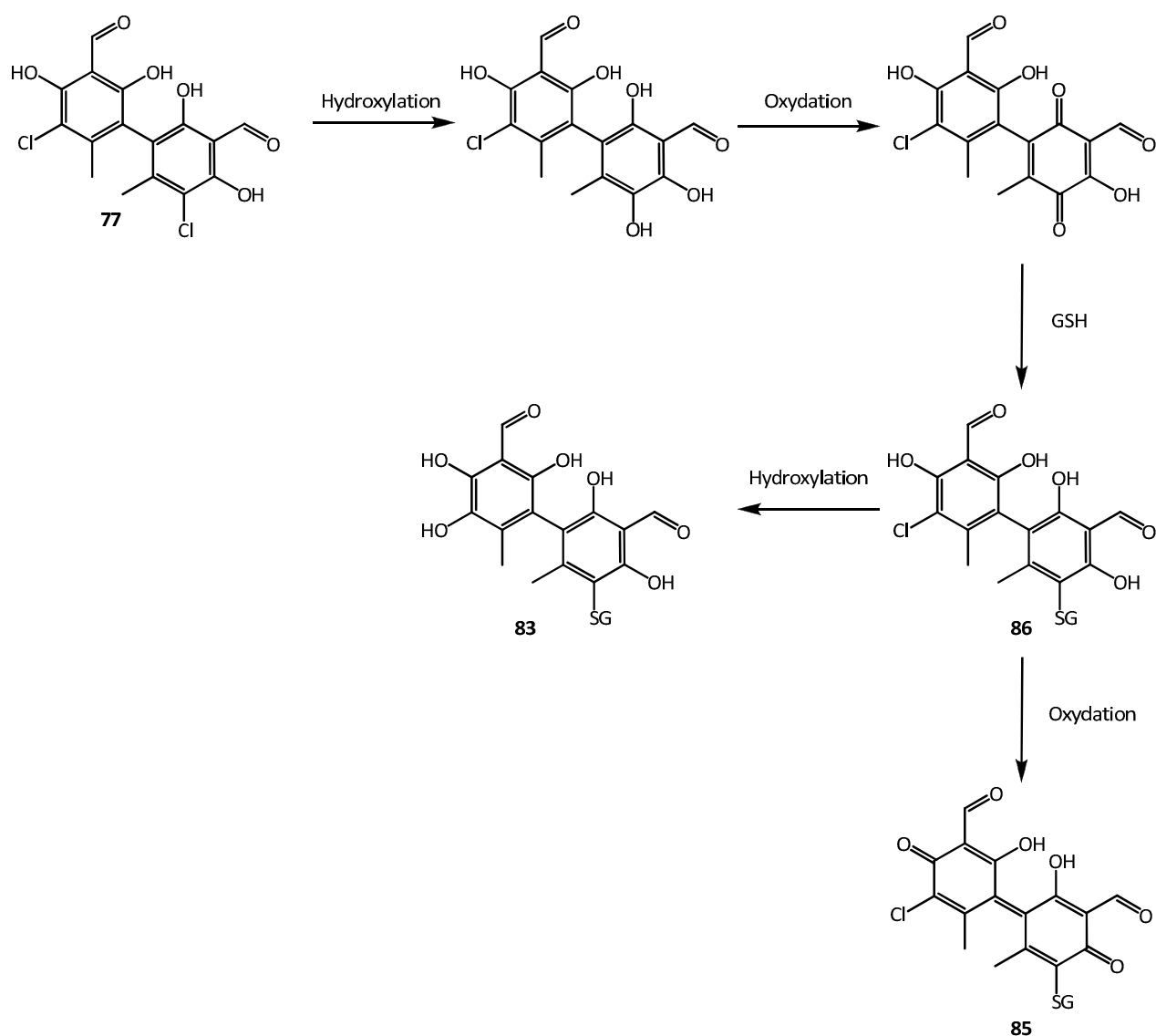


Figure 18 : Voie réactionnelle probable pour la formation des adduits **83**, **85** et **86**.

Il paraîtrait raisonnable de supposer que le dimère de chloroatranol **77** pourrait subir une hydroxylation et une oxydation avant de former, avec le glutathion, l'adduit **86**. Ce composé, par hydroxylation ou oxydation dues à la présence dans le milieu de peroxydase de raifort, peut mener aux composés **83** et **85** respectivement. La formation de diphénoquinones, similaires à celle de l'adduit **85**, a déjà été observée dans plusieurs études à propos de l'oxydation de phénols en présence de peroxydase de raifort.<sup>26,27</sup> Enfin, le même type de voie réactionnelle peut être envisagé à partir du dimère de chloroatranol **78** pour mener à la formation des adduits **84** et **87**.

#### IV.4.3. Mélange atranol/chloroatranol

À la suite de ces résultats, une étude concernant le mélange atranol/chloroatranol a été conduite dans les mêmes conditions expérimentales. Les résultats obtenus, ainsi que les structures supposées pour les adduits formés sont répertoriés dans les Figures 19 et 20.

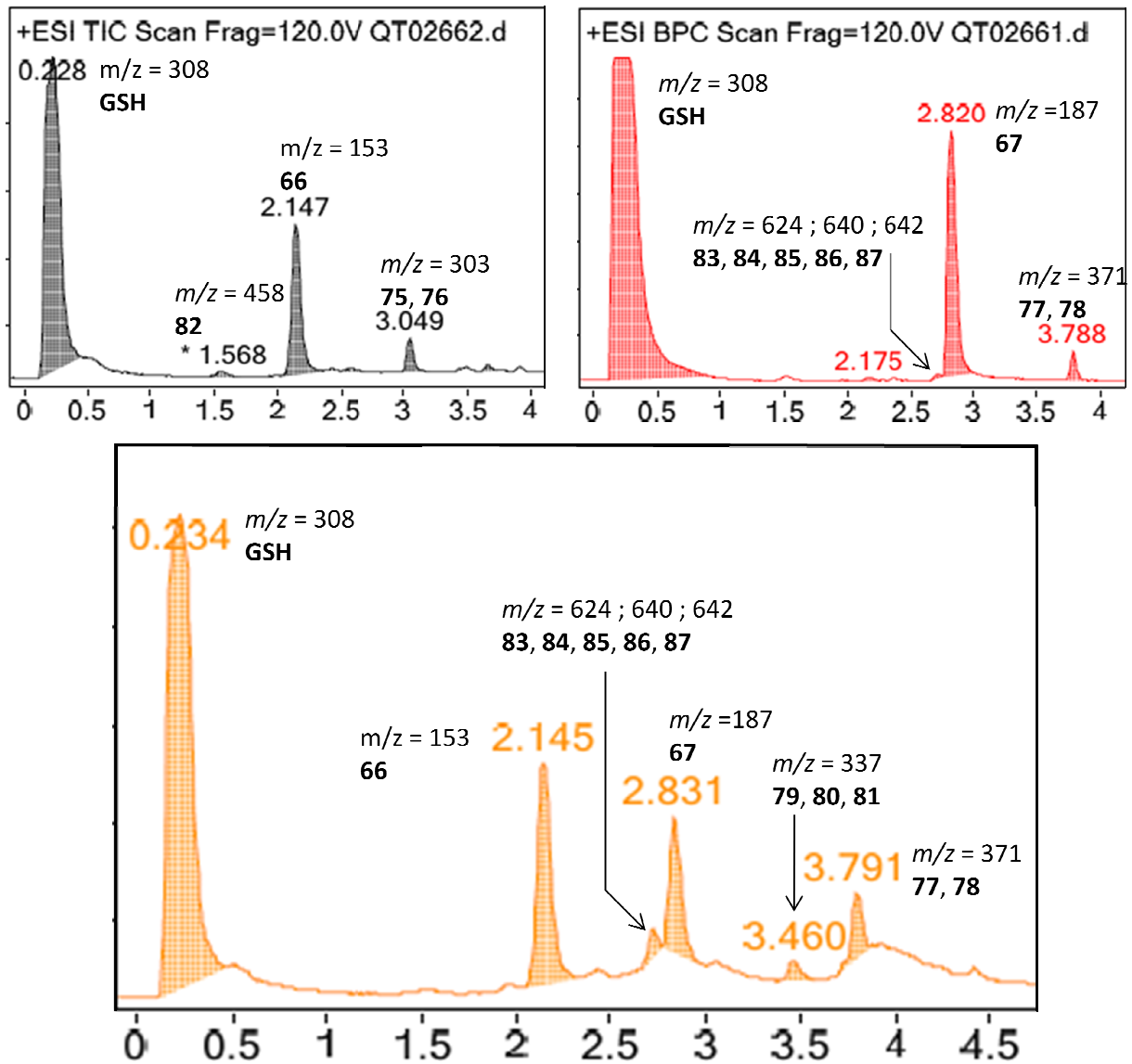


Figure 19 : Chromatogrammes (LC) issus des études de la réactivité de l'atranol (en haut à gauche), du chloroatranol (en haut à droite) et du mélange atranol/chloroatranol (en bas).

Ces chromatogrammes semblent montrer que la réactivité du mélange atranol/chloroatranol est principalement due au chloroatranol. En effet, l'adduit **82** observé

lors de l'étude de l'atranol en présence de glutathion semble ne pas se former dans ces conditions. Cependant, on remarque la présence dans le mélange des hétérodimères d'atranol et de chloroatranol que sont les composés **79**, **80** et **81**, déjà observés lors de l'étude de l'oxydation enzymatique du mélange (Figure 14).

La Figure 20 montre les spectres de masse correspondant à chacun des pics identifiés comme des adduits ou des produits d'oxydation.

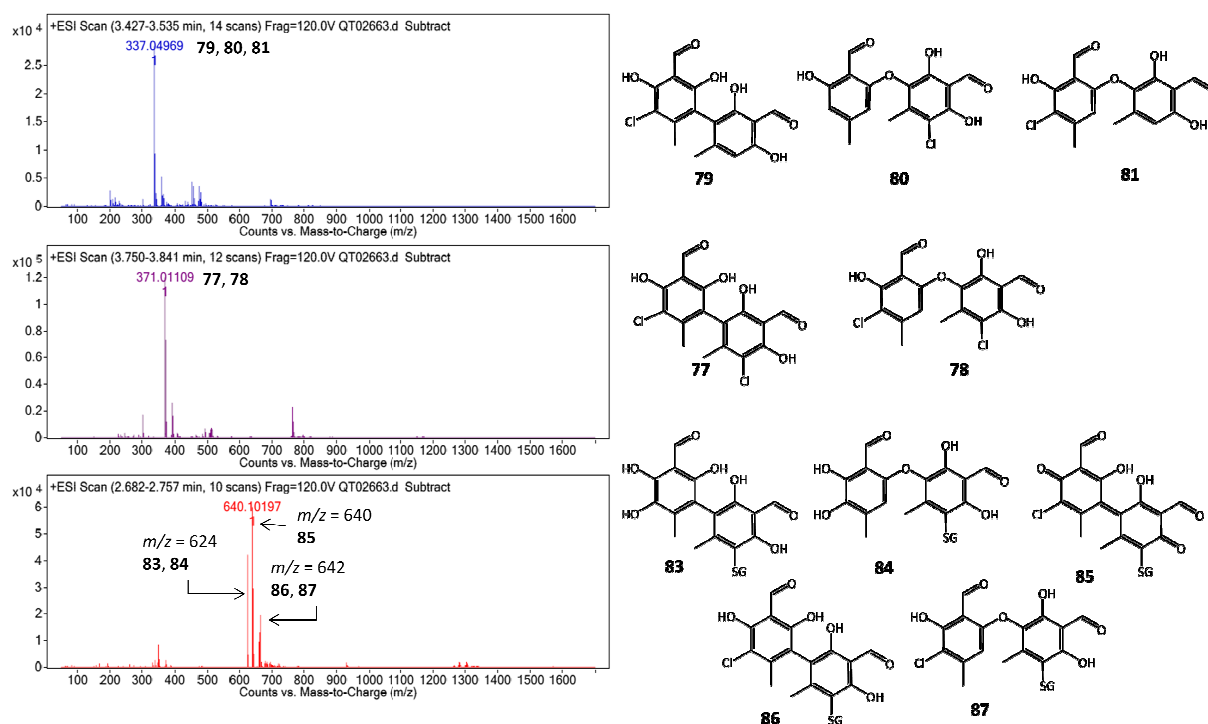


Figure 20 : Spectres de masse correspondant aux produits observés lors la réaction entre le mélange atranol/chloroatranol et le GSH.

En plus des ions moléculaires caractéristiques de la présence dans le milieu de l'atranol, du chloroatranol et du glutathion, cette étude a montré la formation des trois ions moléculaires précédemment observés lors de l'étude de la réaction entre le chloroatranol et le glutathion correspondant aux adduits **83**, **84**, **85**, **86** et **87**. De plus, les produits d'oxydation que sont les dimères de chloroatranol **77** et **78**, ainsi que les hétérodimères d'atranol et de chloroatranol **79**, **80** et **81** ont également pu être détectés. En conséquence, la réactivité observée lors de cette étude semble être due principalement à la présence dans le milieu de chloroatranol. Cependant, il est intéressant de noter que les adduits observés lors de cette étude

pourraient également provenir de la réactivité des hétérodimères d'atranol et de chloroatranol formés, comme le montre le schéma réactionnel montré dans la Figure 21.

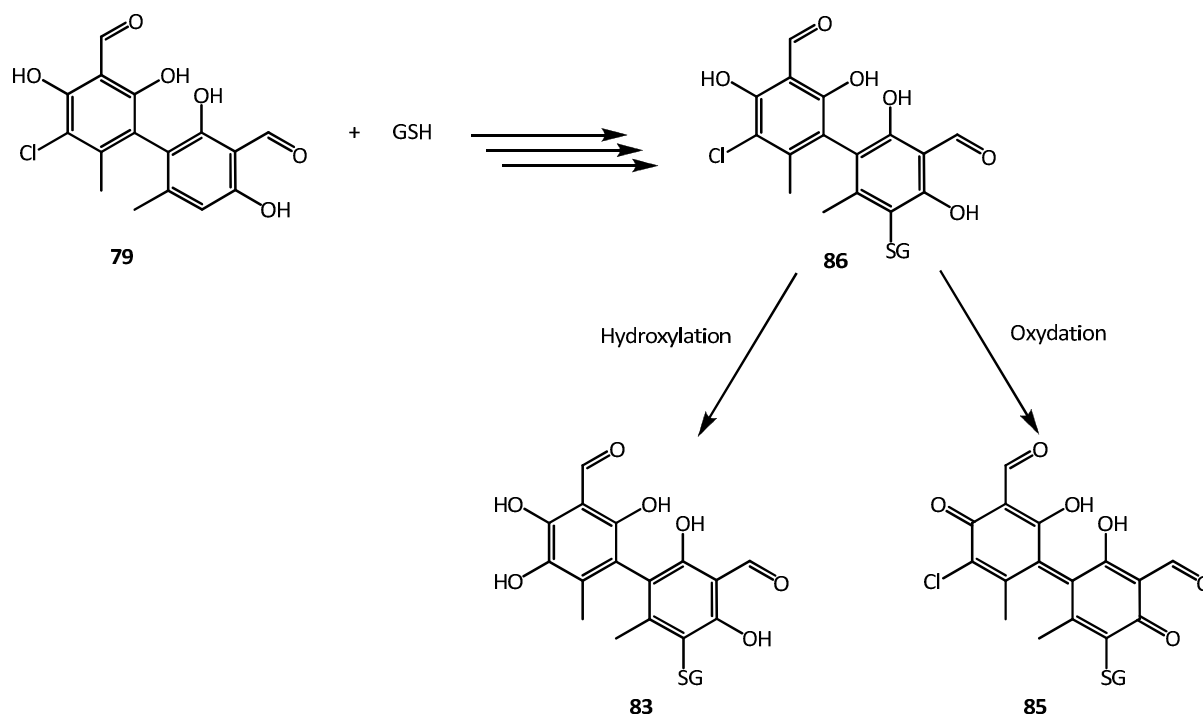


Figure 21 : Voie réactionnelle probable pour la formation des adduits **83**, **85** et **86**.

L'obtention des adduits **83**, **85** et **86** par cette voie réactionnelle indiquerait que le mélange atranol/chloroatranol est plus réactif que chaque molécule séparément. En effet, même si l'adduit **82** observé lors de l'étude de l'atranol seul n'apparaît pas, il est intéressant de noter que le signal correspondant aux adduits **83-87** ( $T_R = 2,72$  min) dans le chromatogramme obtenu lors de l'étude du mélange est plus intense que celui dans le cas de l'étude du chloroatranol seul.

## IV.5. Réactivité vis-à-vis du peptide cystéine

Le peptide cystéine est capable d'être ionisé plusieurs fois, ce qui implique en spectrométrie de masse la formation non plus d'un seul ion moléculaire caractéristique mais de deux, comme le montre le tableau dans la Figure 22. Cette propriété sera en conséquence également applicable à tous les adduits observés dans cette section.

	Peptide cystéine	Peptide cystéine + H <sup>+</sup>	Peptide cystéine + 2H <sup>+</sup>
Masse associée <i>m/z</i>	750,3 g.mol <sup>-1</sup>	$(750,3 + 1)/1 = 751,3$	$(750,3 + 2)/2 = 376,2$

Figure 22 : Tableau montrant les différentes ionisations possibles du Pep-Cys ainsi que leurs valeurs de *m/z* associés.

### IV.5.1. Atranol

La Figure 23 montre les spectres de masse correspondant aux composés identifiés par spectrométrie de masse lors du suivi de la réaction entre l'atranol et le peptide cystéine.

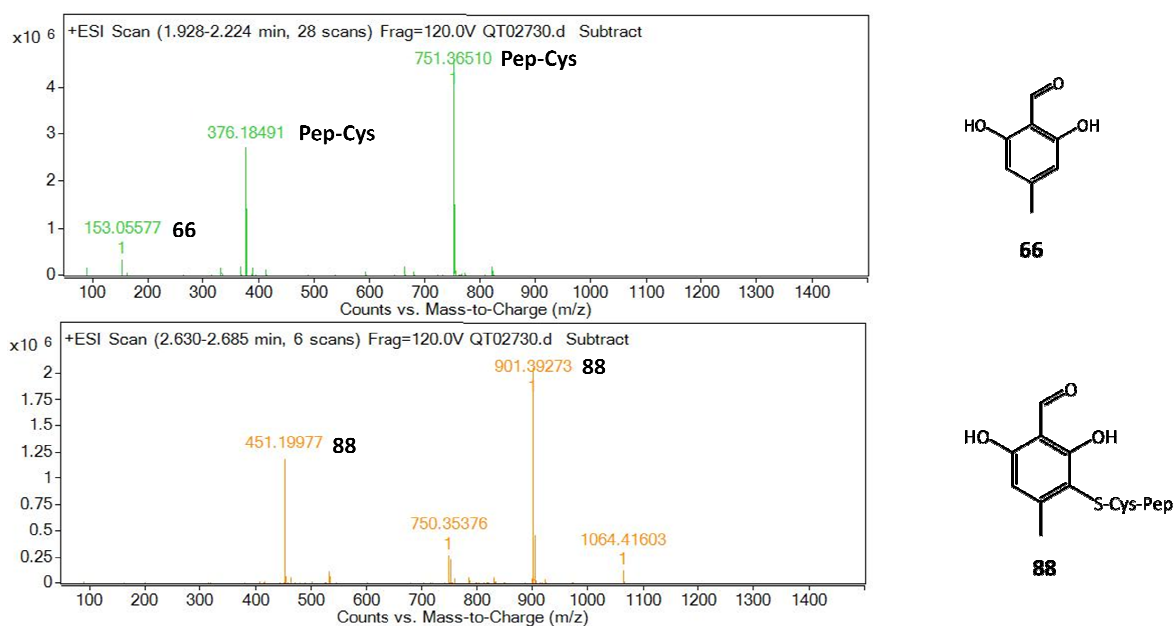


Figure 23 : Spectres de masse correspondant aux produits observés lors la réaction entre l'atranol et le Pep-Cys.



Lors de cette étude, en plus de la détection d'ions moléculaires correspondant à l'atranol et au peptide cystéine, la formation de deux autres ions moléculaires de  $m/z$  de 451 et de 901 a été observée. Ces ions moléculaires peuvent correspondre aux masses associées à l'adduit **88** formé par réaction entre l'atranol et le peptide cystéine chargé une ou deux fois.

Les adduits **82** et **88**, observés lors des études de réactivité de l'atranol vis-à-vis du glutathion et du peptide cystéine respectivement, semblent provenir du même type de mécanisme (Figure 16).

#### IV.5.2. Chloroatranol

Dans le cas du chloroatranol, la Figure 24 montre le spectre de masse ainsi que la structure du composé formé lors de l'étude de sa réactivité vis-à-vis du peptide cystéine.

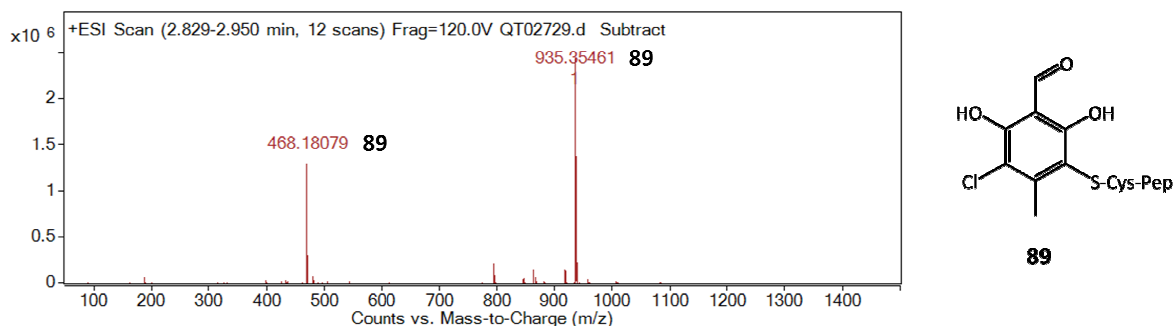


Figure 24 : Spectre de masse correspondant au produit observé lors la réaction entre le chloroatranol et le Pep-Cys.

Cette étude de réactivité a montré la formation d'un adduit, **89**, résultant de la réaction entre le chloroatranol et le peptide cystéine. Le spectre de masse de cet adduit présente deux ions moléculaires de valeurs de  $m/z$  associées de 935,4 et de 468,2. Ces deux valeurs correspondent aux deux ionisations possibles de ce même adduit.

Cet adduit semble résulter du même type de mécanisme que celui proposé pour la formation des composés **82** et **88** (Figure 25).

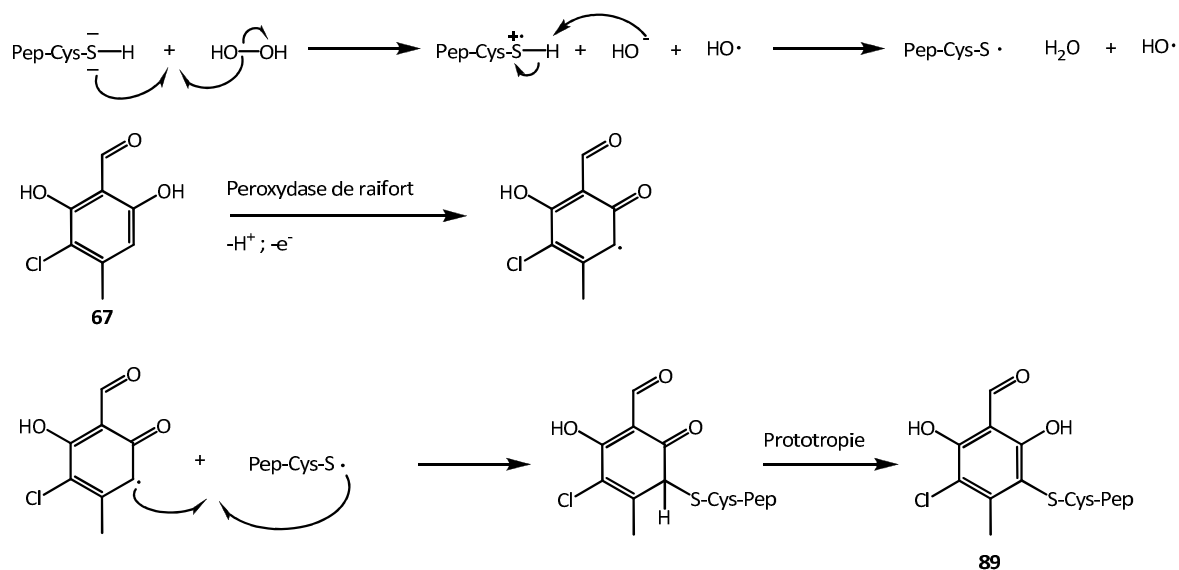


Figure 25 : Mécanisme supposé menant à la formation de l'adduit **89**.

Une telle réaction aurait également pu se produire sur le carbone portant le chlore menant ainsi à l'adduit **88** observé lors de l'étude de la réactivité de l'atranol. De telles déchloration oxydantes en présence de peroxydase de raifort ont été par le passé déjà observées sans qu'aucun mécanisme ne leur soit attribué.<sup>28,29</sup> Il est surprenant que dans le cas de notre étude, une telle réactivité n'ai pas été observée.

#### IV.5.3. Mélange atranol/chloroatranol

Une étude de suivi par spectrométrie de masse de la réaction avec le mélange atranol/chloroatranol a été entreprise. Le principal spectre de masse obtenu, ainsi que la structure supposée de l'éventuel adduit formé sont décrits dans la Figure 26.

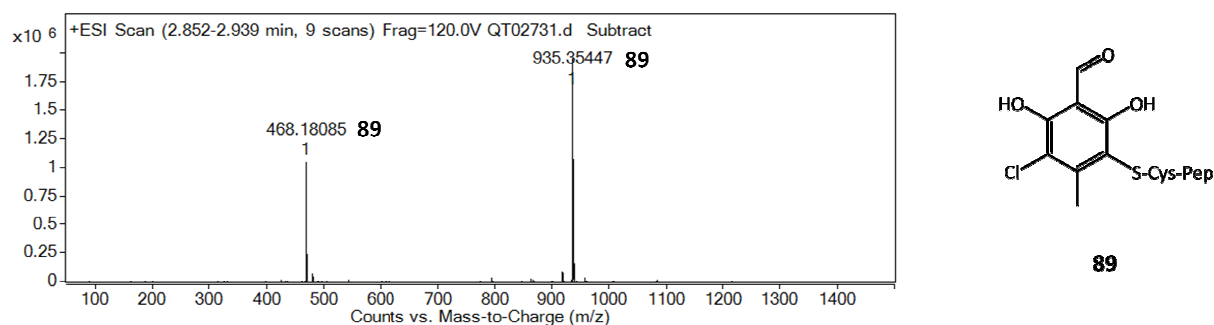


Figure 26 : Spectre de masse correspondant au produit observé lors la réaction entre le mélange atranol/chloroatranol et le Pep-Cys.

Parmi les différents pics obtenus lors de la chromatographie liquide, l'étude a montré la détection de six ions moléculaires. Deux d'entre eux, de  $m/z$  de 153 et de 187, correspondaient à l'atranol et au chloroatranol. Les quatre autres, de  $m/z$  de 376, 751, 468 et 935, correspondaient deux à deux au peptide cystéine et à l'adduit **89** respectivement chargés une ou deux fois. En conséquence, le seul adduit observé provient de la réactivité du chloroatranol envers le peptide cystéine. La réactivité de l'atranol quant à elle semble transparente dans le mélange. Cette différence de réactivité peut être due à l'étape d'oxydation qui est plus rapide dans le cas du chloroatranol que dans le cas de l'atranol. En conséquence, le mélange atranol/chloroatranol semble se comporter comme si le chloroatranol était le seul composé réactif présent.

## IV.6. Réactivité vis-à-vis du peptide lysine

### IV.6.1. Atranol

Une étude de la réactivité de l'atranol vis-à-vis du peptide lysine a été entreprise par spectrométrie de masse. Les résultats obtenus sont répertoriés dans la Figure 27.

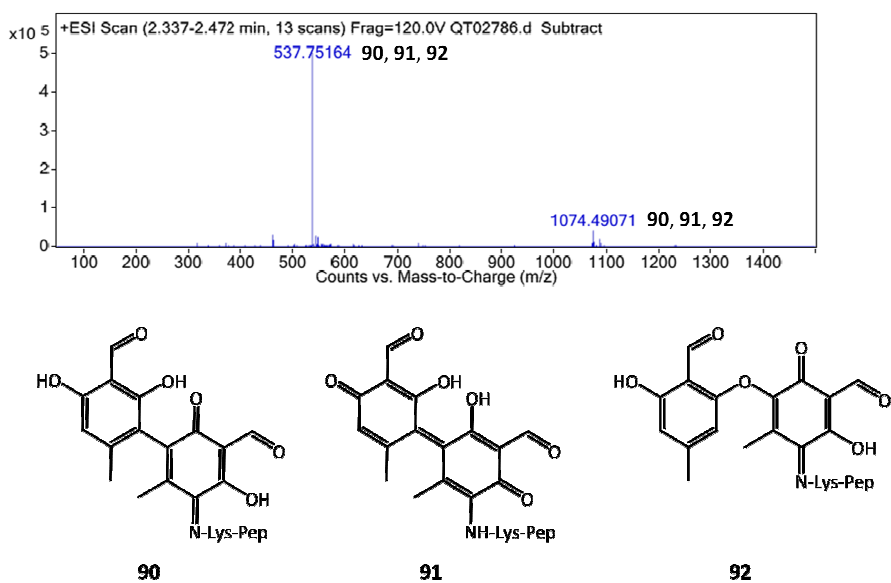


Figure 27 : Spectre de masse correspondant aux produits observés lors la réaction entre l'atranol et le Pep-Lys.

L'étude de cette réaction a montré la présence dans le milieu réactionnel de peptide lysine, d'atranol ainsi que de deux autres ions moléculaires de  $m/z$  de 537 et de 1074 correspondant à la formation d'adduits entre les dimères d'atranol décrits dans la section IV.3, **75** et **76**, et le peptide lysine. La voie réactionnelle probablement responsable de la formation des adduits **90**, **91** et **92** est décrite dans la Figure 28.

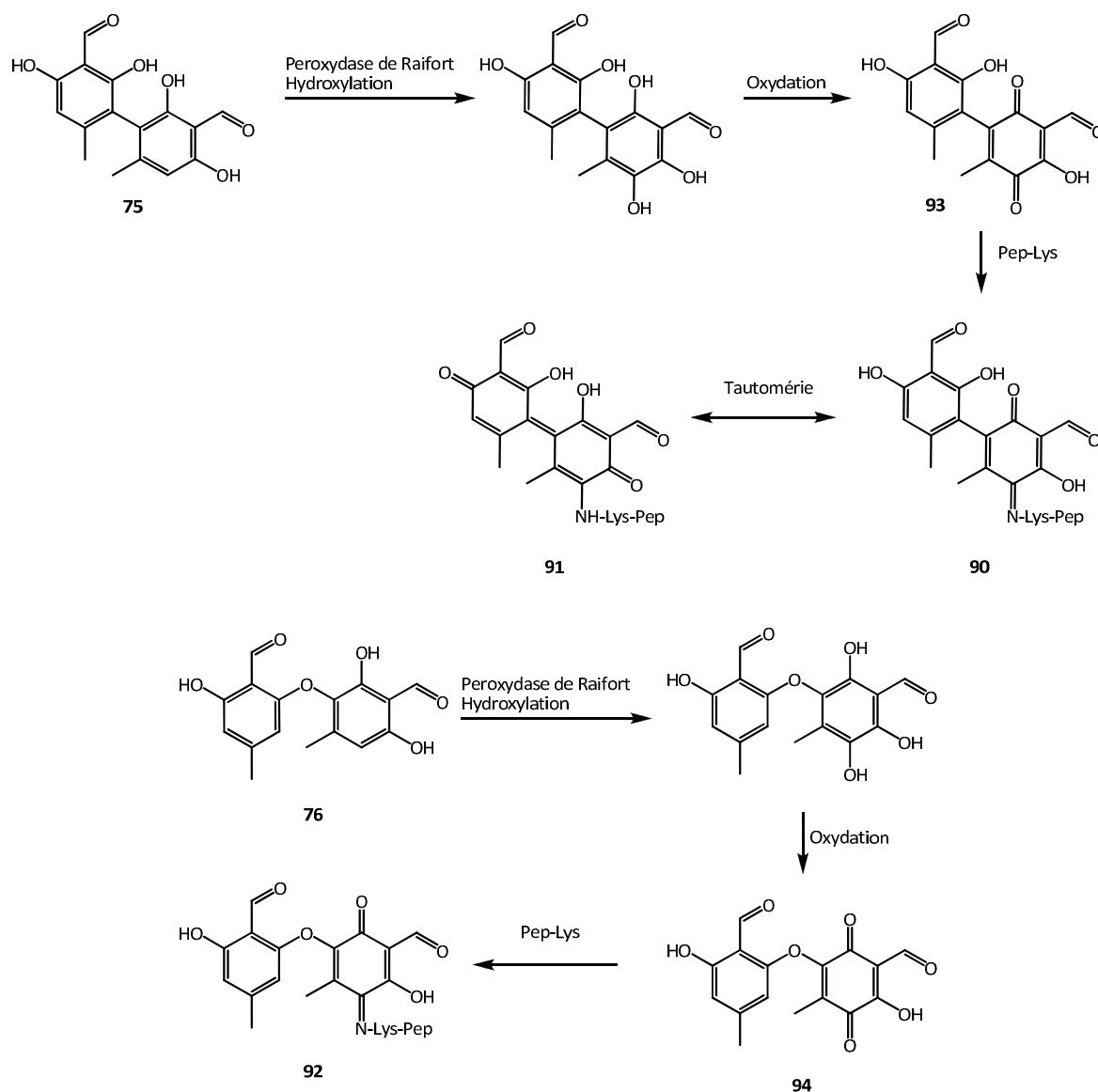


Figure 28 : Voie réactionnelle probable menant à la formation des adduits **90**, **91** et **92**.

Cette voie réactionnelle repose essentiellement sur l'hydroxylation des dimères **75** et **76**, suivie d'une oxydation menant à la formation des *para*-quinones **93** et **94**. L'obtention des adduits **90**, **91** et **92** résulterait ensuite de la formation de bases de Schiff entre les quinones et le groupement amine du peptide lysine.

### IV.6.2. Chloroatranol

L'étude de la réactivité du chloroatranol vis-à-vis du peptide lysine par spectrométrie de masse a montré la formation de plusieurs produits (Figure 29).

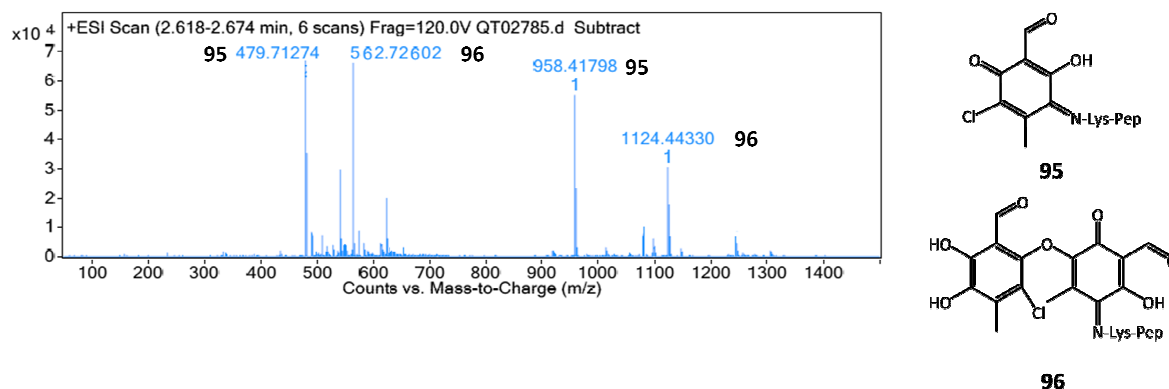


Figure 29 : Spectre de masse correspondant aux produits observés lors la réaction entre le chloroatranol et le Pep-Lys.

Quatre nouveaux ions moléculaires ont pu être détectés et identifiés, en plus de ceux caractéristiques du chloroatranol et du peptide lysine. Ces quatre ions moléculaires, avec des valeurs associées de  $m/z$  de 479, de 958, de 562 et de 1124, peuvent être dus à la présence dans l'échantillon des adduits **95** et **96**, chargés une ou deux fois respectivement. Ces deux adduits sont certainement issus d'une voie réactionnelle similaire à celle décrite dans la Figure 28.

Un dernier ion moléculaire pouvant aussi correspondre à un adduit entre un dière de chloroatranol et le peptide lysine, à une valeur de  $m/z$  de 1080, a pu être également détecté, cependant aucune structure n'a pu lui être attribuée.

### IV.6.3. Mélange atranol/chloroatranol

La Figure 30 montre les spectres de masse et les structures supposées des adduits détectés lors de l'étude de la réactivité entre le mélange atranol/chloroatranol et le peptide lysine.

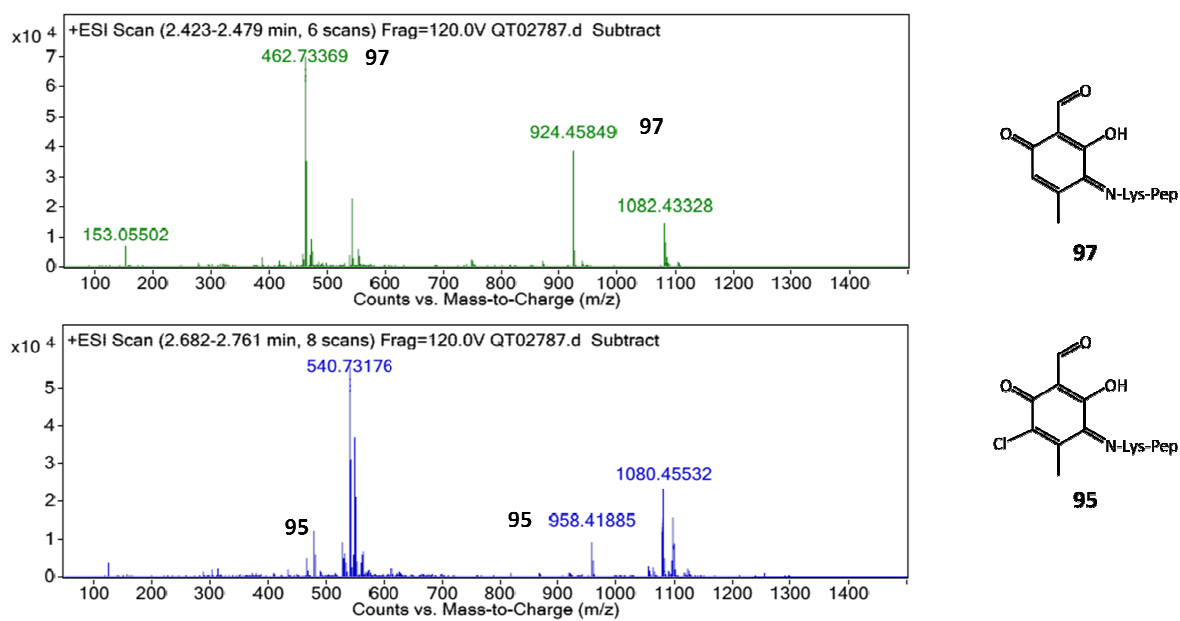


Figure 30 : Spectres de masse correspondant aux produits observés lors la réaction entre le mélange atranol/chloroatranol et le Pep-Lys.

Cette étude a montré l'apparition de deux pics dans le chromatogramme. Un à un  $T_R$  de 2,45 min ayant une valeur de  $m/z$  associée de 924 et un autre à un  $T_R$  de 2,70 min avec un  $m/z$  de 958, pouvant correspondre aux adduits **97** et **95** respectivement. L'adduit **95** avait déjà été observé lors de l'étude de la réactivité du chloroatranol vis-à-vis du peptide lysine. L'adduit **97**, quant à lui, est très certainement issu de la réactivité de l'atranol. Cependant, il n'avait pas été observé lors de l'étude de la réactivité de cette molécule seule en présence du peptide lysine et pourrait également provenir de la réactivité du chloroatranol suivant la voie réactionnelle décrite dans la Figure 31.

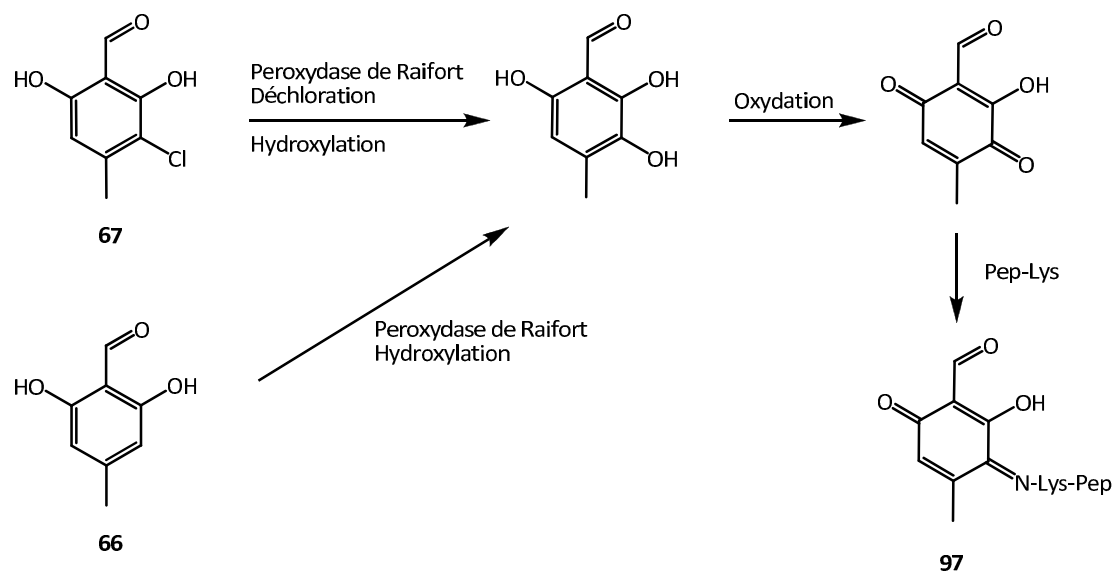


Figure 31 : Voies réactionnelles probables menant à la formation de l'adduit **97** à partir de chloroatranol ou d'atranol.

Deux autres ions moléculaires de  $m/z$  de 540,7 et de 1080,4 ont pu être détectés lors de cette étude. Ces deux ions moléculaires correspondent au composé décrit dans la section précédente, dont la structure n'a malheureusement pas pu être élucidée, mais est cependant très certainement due à la réactivité du chloroatranol vis-à-vis du peptide lysine.

## V. Tests biologiques : études du pouvoir sensibilisant du mélange atranol/chloroatranol

Une série d'études visant à mieux comprendre les mécanismes biologiques impliqués lors de la sensibilisation à l'atranol et au chloroatranol ont été entreprises, en partenariat avec le Department of International Health, Immunology and Microbiology de l'Université de Copenhague. Cette série d'études est basée sur des travaux réalisés récemment qui avaient pour but d'étudier le pouvoir de sensibilisation/élicitation de mélanges d'allergènes connus. Les travaux de Menné Bonefeld *et al.* avaient été conduits sur trois allergènes connus,



l'hydroxyisohexyl-3-cyclohexène carboxaldéhyde ou Lyrat<sup>®</sup>, l'isoeugénol et l'aldéhyde cinnamique seuls ou en mélanges.<sup>30</sup>

Une première série de tests *in vivo* a eu pour but d'étudier le pouvoir sensibilisant de plusieurs échantillons d'atranol et de chloroatranol en mesurant l'inflammation observée sur les oreilles des souris traitées, ainsi que la prolifération des cellules régulatrices des lymphocytes T. Ces expériences sont fréquemment utilisées pour la détection et l'évaluation du pouvoir sensibilisant des allergènes. La mesure de l'épaisseur de l'oreille, effectuée à l'aide d'un micromètre, permet de quantifier la réponse inflammatoire et traduit la présence et d'œdèmes au niveau de la zone d'application de l'allergène.<sup>31,32</sup> La prolifération des lymphocytes T, quant à elle, permet l'obtention de données plus objectives d'un point de vue de la sensibilisation à la molécule testée.<sup>33</sup> Dans un premier temps, une série de tests sur la souris a été menée en suivant le protocole décrit dans la Figure 32. Ce protocole implique l'incorporation de 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) dans l'alimentation des souris testées. Le BrdU est un marqueur de l'ADN des cellules récemment renouvelées et permet ainsi la quantification de la prolifération cellulaire.<sup>34</sup>

Dans cette première étude, différentes concentrations d'atranol et de chloroatranol, seuls ou en mélanges, ainsi que différentes mousses de chêne enrichies en atranol et en chloroatranol à des concentrations connues ont été utilisées (Figure 33). Les concentrations utilisées ont été reliées aux valeurs d'EC<sub>3</sub> de l'atranol et du chloroatranol.<sup>13,14</sup> Ainsi, la concentration moyenne utilisée correspond à cette valeur de 0,4 % pour le chloroatranol et 0,6 % pour l'atranol. Les deux autres concentrations correspondent au tiers et au triple de cette valeur pour les concentrations faibles et élevées respectivement (Figure 33). Le contrôle a été effectué en appliquant à la place de l'allergène le solvant seul (acétone/huile d'olive : 4/1)

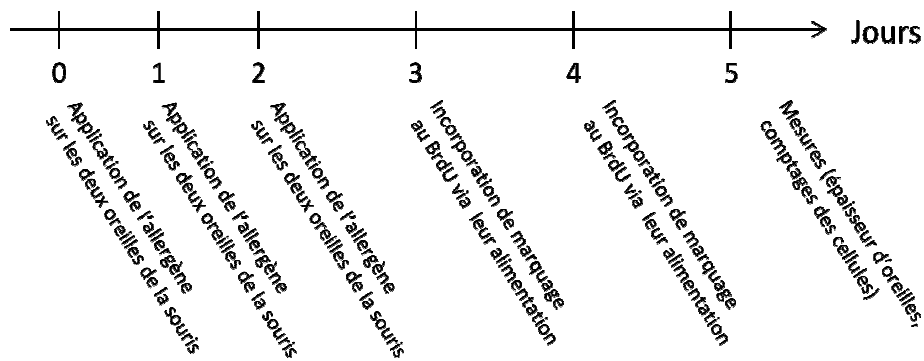


Figure 32 : Protocole expérimental des tests *in vivo* présentés dans cette partie.

Nom de l'échantillon	Concentrations	
	Atranol (%)	Chloroatranol (%)
Contrôle	0	0
Atranol faible	0,2	0
Atranol moyen	0,6	0
Atranol élevé	1,8	0
Chloroatranol faible	0	0,13
Chloroatranol moyen	0	0,4
Chloroatranol élevé	0	1,2
Mélange faible	0,2	0,13
Mélange moyen	0,6	0,4
Mélange élevé	1,8	1,2
Mousse de chêne	2,1	0,9
Mousse de chêne faible	2,3	1,03
Mousse de chêne moyen	2,7	1,3
Mousse de chêne élevé	3,9	2,1

Figure 33 : Tableau relatant les différents échantillons utilisés lors des premiers tests biologiques.

Les résultats obtenus sont répertoriés dans la Figure 34.

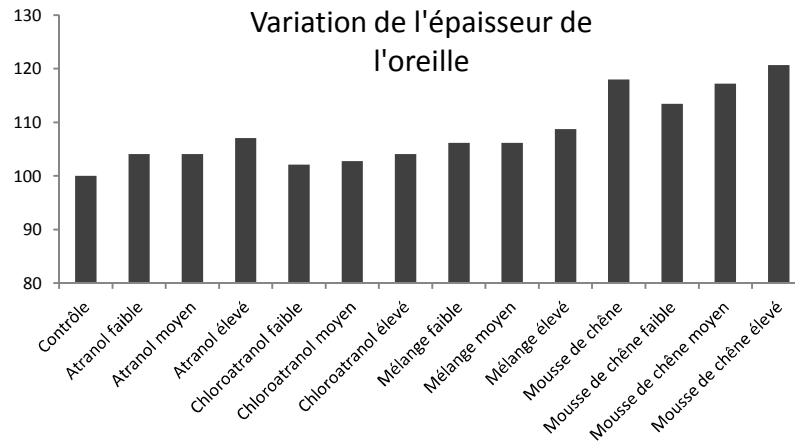


Figure 34 : Variation de l'épaisseur des oreilles de souris en fonction de l'échantillon appliqué.

Le graphique de la Figure 34 montre que la variation observée au niveau de l'épaisseur des oreilles des souris reste dans tous les cas très faible. Ceci semble indiquer que l'inflammation au cours de la phase de sensibilisation est peu importante.

Les résultats obtenus lors des études concernant la prolifération cellulaire ont été aussi peu concluants. Cependant, le décompte des cellules régulatrices des lymphocytes T semble montrer que plus la concentration en atranol et/ou en chloroatranol est élevée, plus les cellules régulatrices répondent fortement. Ceci pourrait peut être expliquer la faible réponse inflammatoire observée précédemment. En effet, l'induction de cellules régulatrices limite la libération de cytokines par les lymphocytes et ainsi la réaction inflammatoire proprement dite.

Aux vues de ces résultats, la question de la toxicité de ces molécules s'est posée. Deux expériences ont alors été menées en incubant pendant 24 heures, à 37 °C, deux lignées de cellules différentes avec diverses concentrations d'atranol et de chloroatranol. Les cellules utilisées lors de ces expériences ont été les DO11.10 (cellules T) et les PAM2.12 (kératinocytes). Les résultats obtenus lors de cette étude sont répertoriés dans la Figure 35.

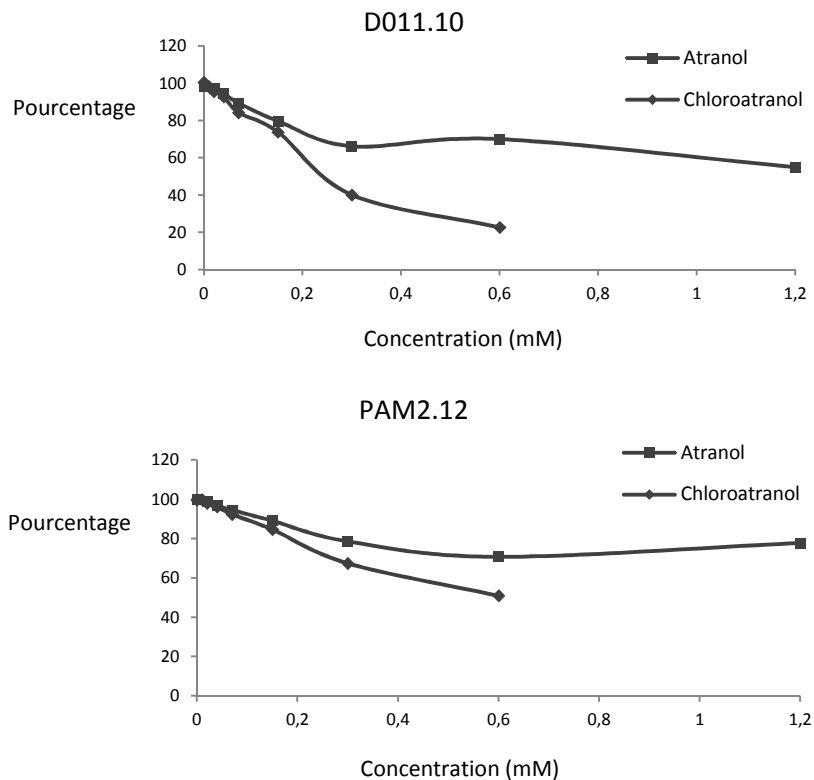


Figure 35 : Courbes représentant les quantités de cellules vivantes en fonction de la concentration en atranol ou en chloroatranol.

Ces courbes représentent le pourcentage de cellules vivantes dénombrées en fonction de la concentration en atranol ou en chloroatranol. Elles montrent, en général, que le chloroatranol est plus cytotoxique envers les cellules étudiées que l'atranol. En effet, la quantité de cellules vivantes est beaucoup plus faible, à concentrations égales, dans le cas du chloroatranol que dans celui de son homologue non chloré.

Il a été ensuite envisagé de réaliser de nouvelles expériences sur la souris, suivant le même protocole que celui décrit dans la Figure 32. Pour ces expériences, seuls l'atranol et le chloroatranol ont été testés mais sur une nouvelle gamme de concentrations allant de 1 à 20 %. La mesure de l'épaissement de l'oreille et de la prolifération de cellules lymphocytaires  $TCD_4^+$  et  $TCD_8^+$  par fluorimétrie a été réalisée. Les résultats ainsi obtenus sont reportés dans les Figures 36 et 37.

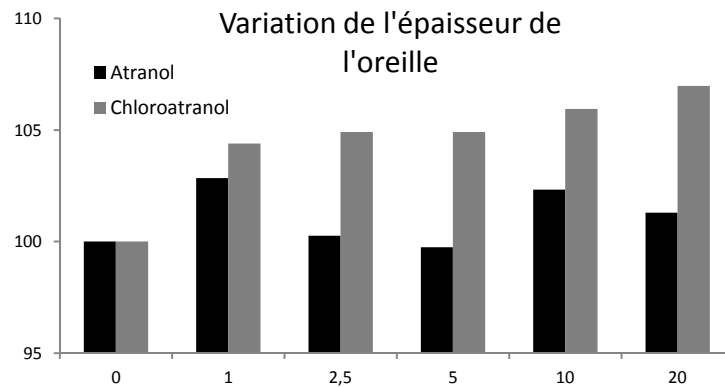


Figure 36 : Pourcentage de variation de l'épaisseur des oreilles des souris en fonction de la concentration d'allergène appliquée.

Le graphique de la Figure 36 montre que la variation de l'épaisseur de l'oreille mesurée est plus importante, à concentration égale, dans le cas du chloroatranol que dans celui de l'atranol. Et ceci, même si la réponse à l'atranol et au chloroatranol reste cependant minime par rapport à ce qui peut être observé pour d'autres allergènes.<sup>30</sup> De plus, ces résultats rejoignent ceux des expériences précédentes menées dans le cadre de l'étude décrite dans la Figure 34.

Dans la Figure 37, la courbe représentant l'index de stimulation des lymphocytes T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> en fonction de la concentration en atranol ou en chloroatranol montre que la concentration nécessaire pour induire une quantité de cellules triplée par rapport au contrôle (EC<sub>3</sub>) est plus faible pour le chloroatranol que pour son homologue non chloré. La prolifération des cellules CD<sub>8</sub><sup>+</sup>, quant à elle, est comparable pour ces deux molécules quelque soit la concentration utilisée.

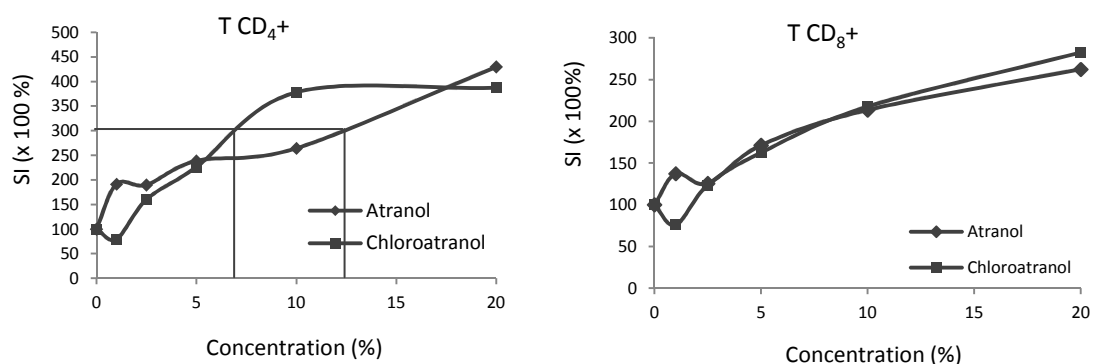


Figure 37 : Courbes représentant la prolifération cellulaire des différents lymphocytes étudiés en fonction de la concentration en atranol ou en chloroatranol.

De nouvelles expériences sont en cours de réalisation. Lors de ces expériences, trois groupes de quatre souris sont sensibilisés avec, soit de l'absolu de mousse de chêne, soit de l'atranol, soit du chloroatranol. Une fois les souris sensibilisées, elles sont mises en contact à nouveau avec les trois substances afin de mesurer l'élicitation de la réponse allergique par mesure de la variation de l'épaisseur des oreilles des souris testées, et par décompte de la prolifération des cellules lymphocytaires T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> et T CD<sub>8</sub><sup>+</sup> (Figure 38).

Sensibilisation	Élicitation	Entrée Figures 39 et 40
Atranol	Atranol	Atranol/Atranol
Chloroatranol	Atranol	Chloroatranol/Atranol
Absolu de mousse de chêne	Atranol	Mousse de chêne/Atranol
Chloroatranol	Chloroatranol	Chloroatranol/Chloroatranol
Atranol	Chloroatranol	Atranol/chloroatranol
Absolu de mousse de chêne	Chloroatranol	Mousse de chêne/Chloroatranol
Absolu de mousse de chêne	Absolu de mousse de chêne	Mousse de chêne/Mousse de chêne
Atranol	Absolu de mousse de chêne	Atranol/Mousse de chêne
Chloroatranol	Absolu de mousse de chêne	Chloroatranol/Mousse de chêne

Figure 38 : Tableau relatant les expériences de sensibilisation/élicitation envisagées entre l'absolu de mousse de chêne, l'atranol et le chloroatranol.

Lors de ces expériences, les souris ont été sensibilisées avec soit de l'absolu de mousse de chêne dilué 20 fois, ceci correspondant à des concentrations d'atranol et de chloroatranol de 0,42 % et de 0,18 % respectivement, soit avec une solution à 0,42 % en atranol, soit avec une solution à 0,18 % en chloroatranol. Les mêmes solutions ont été utilisées lors de des études d'élicitation.

Le but de cette expérience est de savoir si, par exemple, dans le cas d'une sensibilisation à l'absolu de mousse de chêne un contact ultérieur soit avec de l'atranol, soit avec du chloroatranol suffit à déclencher une réaction allergique. Ceci permettrait de comparer le

pouvoir d'élicitation des trois différentes substances chez des souris sensibilisées à chacune d'entre elles.

Les résultats obtenus lors de cette étude sont répertoriés dans les Figures 39 et 40.

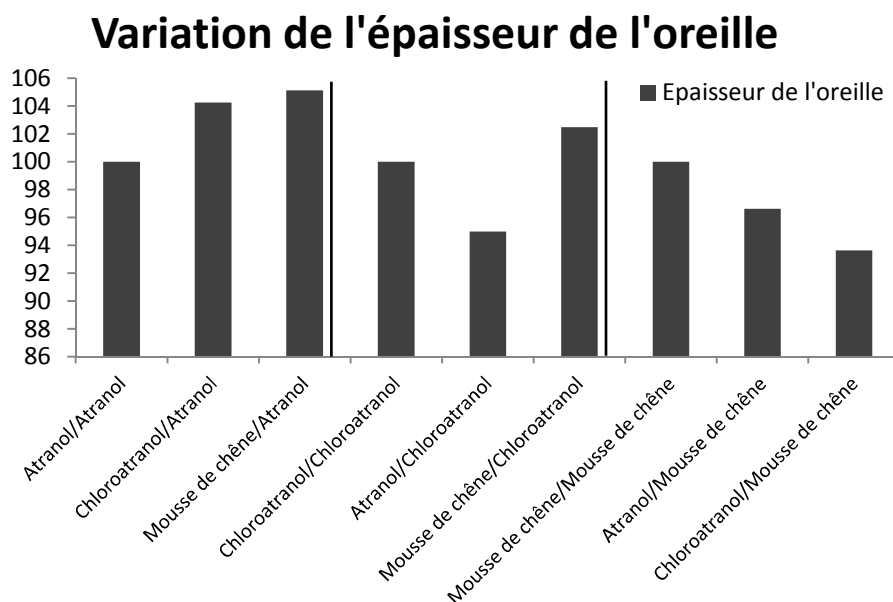


Figure 39 : Pourcentage de variation de l'épaisseur des oreilles des souris lors des expériences sensibilisation/élicitation.

Il est intéressant de noter que les plus grandes variations apparaissent dans le cas d'une élicitation à l'aide d'atranol. En effet, dans les cas d'une sensibilisation à l'absolu de mousse de chêne ou au chloroatranol, l'atranol semble induire la plus grande réponse d'élicitation. Ces variations restent, comme dans les cas précédents, très faibles par rapport à ce qui peut être observé pour d'autres allergènes.<sup>30</sup>

Le décompte des cellules lymphocytaires effectué lors de ces expériences est montré dans la Figure 40.

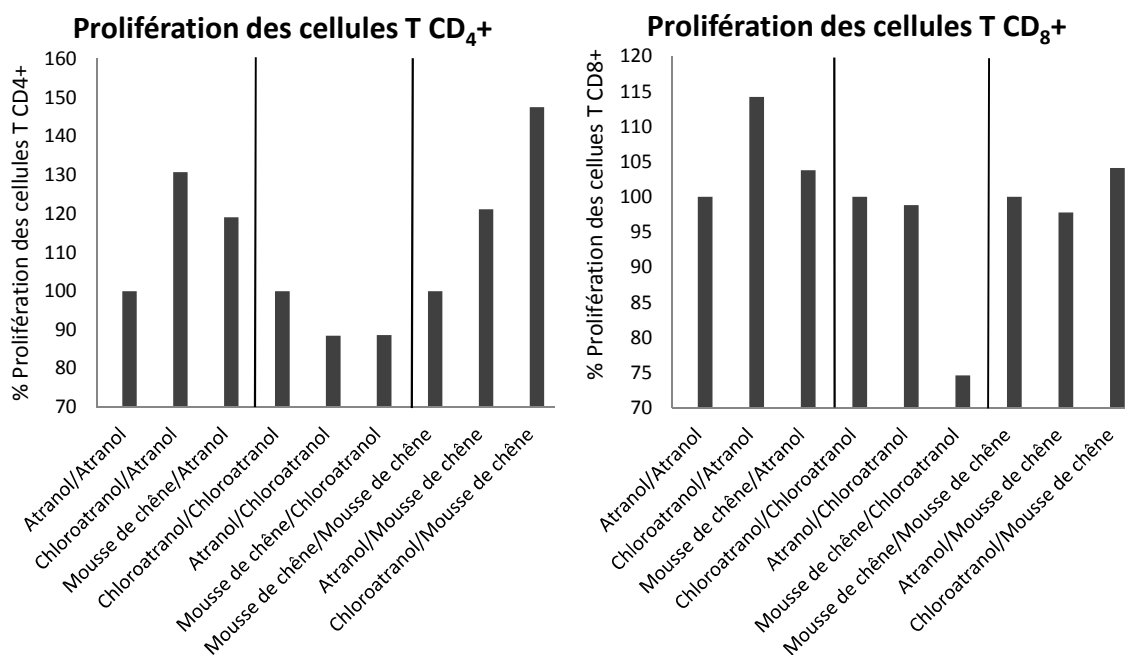


Figure 40 : Graphiques représentant la prolifération cellulaire des différents lymphocytes étudiés lors des expériences de sensibilisation/élicitation.

La réponse de ces cellules dans les entrées chloroatranol/atranol et mousse de chêne/atranol semblent indiquer que l'atranol seul permet d'éliciter une réaction plus importante chez des souris sensibilisées au chloroatranol et à l'absolu de mousse de chêne que chez des souris sensibilisées à l'atranol seul. Ceci implique que le chloroatranol et l'absolu de mousse de chêne sont des sensibilisants plus forts que ne l'est l'atranol.

Dans les deux entrées atranol/mousse de chêne et chloroatranol/mousse de chêne, la réponse des cellules T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> est très importante. Il semble donc que la mousse de chêne puisse éliciter une réaction allergique plus importante chez des souris sensibilisées au chloroatranol seul ou à l'atranol seul par rapport à celles sensibilisées à l'absolu de mousse de chêne. Cette observation pourrait provenir d'un effet de synergie due à la présence dans la mousse de chêne des deux molécules incriminées.

Enfin, à la vue des résultats après élicitation à l'aide de chloroatranol, il semblerait que cette molécule induise moins de réactions chez des souris sensibilisées soit à l'atranol soit à l'absolu de mousse de chêne.

Les résultats obtenus lors des études de prolifération des cellules T CD<sub>8</sub><sup>+</sup> semblent corroborer les observations faites précédemment, les maximums de réponse étant



également observés lors des élicitations faites à l'aide d'atranol et les minimums dans le cas d'élicitation à l'aide de chloroatranol.

Ces résultats indiquent que dans tous les cas, l'exposition à l'atranol ou au chloroatranol, chez des souris sensibilisées à l'une ou à l'autre de ces molécules, conduit à une réaction du système immunitaire. Les populations lymphocytaires mises en jeu lors de ces réactions sont donc les mêmes pour l'atranol et pour le chloroatranol.

D'un point de vue plus chimique, il a été montré dans ce chapitre que les adduits formés lors de réactions entre l'atranol, ou le chloroatranol, et les peptides ont des structures chimiques proches. Ces résultats concordent tout à fait avec les observations faites lors de ces tests biologiques. En effet, il est raisonnable de penser à la vue de ces différents résultats que les antigènes mis en jeu lors d'une sensibilisation/élicitation à l'atranol ou au chloroatranol sont suffisamment proches pour être reconnus indifféremment par les populations lymphocytaires présentes.

## VI. Conclusions

Les résultats obtenus lors des différents tests biologiques effectués sur l'atranol et le chloroatranol montrent clairement que la réponse du système immunitaire à l'application de mousse de chêne augmente considérablement en fonction de la concentration en atranol et en chloroatranol de celle-ci. Ceci constitue un élément de plus en faveur de l'hypothèse selon laquelle ces deux molécules sont les principales responsables de l'allergie à ce produit. De plus, il a été démontré dans cette partie que le chloroatranol induisait, dans tous les cas, une réponse plus importante que son homologue non chloré, que ce soit d'un point de vue immunologique que cytotoxique.

Il a également pu être démontré dans cette partie, grâce aux études de RMN concernant ces deux molécules, que l'atranol et le chloroatranol nécessitent une étape préalable d'oxydation par voie métabolique afin de devenir réactifs vis-à-vis des résidus nucléophiles des protéines cutanées. En effet, ces deux molécules ne s'oxydent qu'en présence d'un milieu enzymatique, et réagissent avec le glutathion uniquement dans ce même milieu. Ces études ont permis d'établir, de façon formelle, que l'atranol et le chloroatranol font partie de la sous famille des pro-haptènes.

Les premières études portant sur le suivi, à l'aide de la spectrométrie de masse, de l'oxydation de l'atranol et du chloroatranol en présence de peroxydase de raifort, ont permis d'établir que ces deux molécules forment, dans ces conditions, des dimères. L'observation de tels dimères confirme bien que ces deux molécules ont subi une réaction d'oxydation. Dans le cas du mélange d'atranol et de chloroatranol, seuls les dimères issus de l'oxydation du chloroatranol ont pu être observés. Cependant, la formation d'hétérodimères d'atranol et de chloroatranol a pu être également constatée. L'observation de telles molécules dans le mélange semble indiquer que le chloroatranol est plus réactif dans les conditions d'étude que son homologue non chloré.

Les études de réactivité de l'atranol et du chloroatranol séparément menées en présence de glutathion, ont montré la formation d'un adduit dans le cas de l'atranol et de cinq dans celui du chloroatranol. L'étude de la réactivité du mélange, quant à elle, a montré la formation de cinq adduits. Ces cinq adduits correspondent à ceux observés lors des expériences menées lorsque le chloroatranol est seul en solution avec le glutathion et sont certainement issus de la réactivité des dimères de chloroatranol. Cependant, il a également été montré que de tels adduits peuvent aussi provenir de la réactivité des hétérodimères d'atranol et de chloroatranol. La réactivité du mélange semble donc, dans ce cas, correspondre à celle du chloroatranol et est également amplifiée par la présence d'atranol.

Dans le cas de la réactivité de l'atranol et du chloroatranol vis-à-vis du peptide cystéine, il a été montré que chacune de ces deux molécules menaient à la formation d'un seul adduit. L'étude du mélange de ces deux allergènes a montré la formation d'un unique adduit issu de la réactivité du chloroatranol. Dans ce cas, à l'inverse du précédent, la réactivité du mélange est strictement identique à celle du chloroatranol.

L'étude de la réactivité séparée de ces deux molécules en présence de peptide lysine a montré la formation de trois adduits dans le cas de l'atranol et de deux adduits dans celui du chloroatranol. Lors de l'étude du mélange, l'un des adduits observé provenait de la réactivité de l'atranol et l'autre de celle de son homologue chloré. Les réactivités respectives de ces deux molécules semblent dans ce cas s'exprimer à égale valeur. Cependant, un ion moléculaire supplémentaire a été observé lors de l'étude de la réactivité du chloroatranol vis-à-vis du peptide lysine et lors de celle du mélange. Cet ion moléculaire est très probablement dû à la présence d'un adduit entre le peptide et le chloroatranol mais sa structure n'a pas pu être établie.

Le but de ces études était de déterminer la réactivité de l'atranol et du chloroatranol vis-à-vis des trois peptides testés, qu'ils soient seuls ou en mélange, et de donner des bases quant à la détection et/ou l'évaluation des pré- ou des pro-haptènes présents dans un mélange. Le cas étudié dans ce chapitre était l'un des plus difficiles. En effet la faible différence de potentiel sensibilisant, fourni par le LLNA, de ces deux molécules ne donnait aucune

perspective quant à leur éventuelle différence de réactivité vis-à-vis des peptides. Les études conduites à propos de la réactivité de chaque molécule en présence des peptides utilisés lors du DPRA ont d'ailleurs confirmé que la quantité d'adduits est similaire pour l'atranol et pour le chloroatranol. Du point de vue de la sécurité du consommateur, il paraît indispensable qu'un mélange de deux molécules classées par des études de LLNA comme étant des sensibilisants forts soit détecté par le DPRA comme étant un allergène fort. Ces études ont montré que dans le cas du peptide cystéine, la réactivité du mélange correspond à celle du chloroatranol, l'allergène le plus fort du mélange, et que dans le cas du peptide lysine, les réactivités des deux constituants du mélange s'exprimaient de manière similaire à celle des études portant sur chaque molécule séparément. Il paraît raisonnable alors de supposer que de tels comportements se retrouveraient lors d'études du DPRA. Ainsi, la déplétion peptidique observée serait dans le cas du peptide cystéine comparable à celle du chloroatranol correspondant donc à celle d'un allergène fort. Dans le cas du peptide lysine, les choses sont encore plus simples. En effet, la réactivité des deux molécules s'exprimant, la déplétion peptidique observée dans le cas d'un test du DPRA sur ce mélange serait alors due à l'atranol ainsi qu'au chloroatranol et serait éventuellement surexprimée par rapport à celle observée de chaque molécule seule. Cette surexpression de la réactivité ne serait certainement pas une mauvaise chose en soi pour la sécurité du consommateur. En effet, de telles observations peuvent au pire des cas surévaluer la classe des mélanges testés et ainsi surprotéger le consommateur. À la vue de ces résultats et de ces observations, il paraît raisonnable de penser que si le DPRA classe ces deux molécules comme le fait le LLNA, c'est-à-dire comme étant des allergènes forts, ce test devrait logiquement classer le mélange atranol/chloroatranol de la même manière.

Enfin, les études de réactivité par spectrométrie de masses ont permis également de mettre en évidence que ces deux molécules réagissent par le biais de réaction radicalaires avec les différents peptides. Afin de mieux comprendre et de déterminer avec plus de certitudes les mécanismes mis en jeu lors de ces réactions, il serait intéressant de compléter ces études par des expériences de résonance paramagnétique électronique. De telles expériences permettraient éventuellement de confirmer ou d'améliorer les mécanismes proposés tout au long de ce chapitre.

## Bibliographie

1. D. Joulain, R. Tabacchi.  
Lichen extracts as raw materials in perfumery. Part 1: oakmoss.  
Flavour Frag J, 2009, 24 (2), 49-61.
2. R. Ter Heide, N. Provatoroff, P. C. Traas, P. J. De Valois, N. Van der Plasse, H. J. Wobben, R. Timmer.  
Qualitative analysis of the odoriferous fraction of oakmoss (*Evernia prunastri*).  
J Agric Food Chem, 1975, 23 (5), 950-957.
3. J. Gavin, R. Tabacchi.  
Isolement et identification de composés phénoliques et monoterpéniques de la mousse de chêne (*Evernia prunastri* (L.) Arch.).  
Helv Chim Acta, 1975, 58 (1), 190-194.
4. G. Nicollier, R. Tabacchi.  
Isolement et identification de l'évérynine dans la «mousse de chêne» (*Evernia prunastri* (L.) Arch.). 2e Communication.  
Helv Chim Acta, 1976, 59 (8), 2979-2983.
5. J. Gavin, G. Nicollier, R. Tabacchi.  
Composants volatils de la «mousse de chêne» (*Evernia Prunastri* (L.) Arch.) 3e communication.  
Helv Chim Acta, 1978, 61 (1), 352-357.
6. G. Nicollier, M. Rebetz, R. Tabacchi.  
Identification et synthèse de nouveaux depsides isolés de la mousse de chêne (*Evernia Prunastri* (L.) Arch.). 4e Communication.  
Helv Chim Acta, 1979, 62 (3), 711-717.
7. G. Nicollier, R. Tabacchi, J. Gavin, J. L. Breton, A. G. Gonzalez.  
Triterpènes de la «mousse de chêne» (*Evernia Prunastri* (L.) Arch.). 5e Communication.  
Helv Chim Acta, 1979, 62 (3), 807-810.
8. C. Stinchi, V. Guerrini, E. Ghetti, A. Tosti.  
Contact dermatitis from lichens.  
Contact Dermatitis, 1997, 36 (6), 309-310.
9. J. C. Mitchell, S. Shibata.  
Immunologic activity of some substances derived from lichenized fungi.  
J Invest Dermatol, 1969, 52 (6), 517-520.

10. A. Schnuch, W. Uter, J. Geier, H. Lessmann, P. J. Frosch.  
Sensitization to 26 fragrances to be labelled according to current European regulation : Results of the IVDK and review of the literature.  
Contact Dermatitis, 2007, 57 (1), 1-10.
11. R. D. Hiserodt, D. F. H. Swijter, C. J. Mussinan.  
Identification of atranorin and related potential allergens in oakmoss absolute by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using negative ion atmospheric pressure chemical ionization.  
J of Chromatogr A, 2000, 888 (1-2), 103-111.
12. G. Bernard, E. Giménez-Arnau, S. C. Rastogi, S. Heydorn, J. D. Johansen, T. Menne, A. Goossens, K. Andersen, J. P. Lepoittevin.  
Contact allergy to oak moss: search for sensitizing molecules using combined bioassay-guided chemical fractionation, GC-MS, and structure-activity relationship analysis.  
Arch Dermatol Res, 2003, 295 (6), 229-235.
13. Research Institute for Fragrance Material.  
Atranol : local lymph node assay. Woodcliff Lake (NJ) : RIFM, 2004, Report No. : 44366.
14. Research Institute for Fragrance Material.  
Chloroatranol : local lymph node assay. Woodcliff Lake (NJ) : RIFM, 2004, Report No. : 44365.
15. J. D. Johansen, K. E. Andersen, C. Svedman, M. Bruze, G. Bernard, E. Gimenez-Arnau, S. C. Rastogi, J. P. Lepoittevin, T. Menne.  
Chloroatranol, an extremely potent allergen hidden in perfumes: a dose-response elicitation study.  
Contact Dermatitis, 2003, 49 (4), 180-184.
16. J. D. Johansen, G. Bernard, E. Giménez-Arnau, J. P. Lepoittevin, M. Bruze, K. E. Andersen.  
Comparison of elicitation potential of chloroatranol and atranol - 2 allergens in oak moss absolute.  
Contact Dermatitis, 2006, 54 (4), 192-195.
17. S. C. Rastogi, R. Bossi, J. D. Johansen, T. Menné, G. Bernard, E. Giménez-Arnau, J. P. Lepoittevin.  
Content of oak moss allergens atranol and chloroatranol in perfumes and similar products.  
Contact Dermatitis, 2004, 50 (6), 367-370.

18. SCCP.  
Opinion on Atranol and Chloroatranol present in natural extracts (e.g. oak moss and tree moss extract).  
[http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/04\\_sccp/docs/sccp\\_o\\_006.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_006.pdf),  
Adopted on the 7<sup>th</sup> December 2004.
19. A. Nardelli, E. Giménez-Arnau, G. Bernard, J.-P. Lepoittevin, A. Goossens.  
Is a low content in atranol/chloroatranol safe in oak moss-sensitized individuals?  
Contact Dermatitis, 2009, 60 (2), 91-95.
20. D. A. Basketter, Z. M. Wright, E. V. Warbrick, R. J. Dearman, I. Kimber, C. A. Ryan, G. F. Gerberick, I. R. White.  
Human potency predictions for aldehydes using the local lymph node assay.  
Contact Dermatitis, 2001, 45 (2), 89-94.
21. G. Bernard.  
Allergie de contact aux parfums. Identification et isolement d'allergènes contenus dans un mélange complexe. Synthèse d'aldéhydes sensibilisants marqués au carbone 13 et étude de leurs interactions avec les protéines cutanées.  
Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur, 2003.
22. H. Musso.  
Phenol Oxidation Reactions.  
Angew Chem Int Ed Engl, 1963, 2 (12), 723-735.
23. J. Dec, K. Haider, J.-M. Bollag.  
Release of substituents from phenolic compounds during oxidative coupling reactions.  
Chemosphere, 2003, 52 (3), 549-556.
24. J. A. Akkara, K. J. Senecal, D. L. Kaplan.  
Synthesis and characterization of polymers produced by horseradish peroxidase in dioxane.  
Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 1991, 29 (11), 1561-1574.
25. R. Akasaka, T. Mashino, M. Hirobe.  
Hydroxylation of benzene by horseradish peroxidase and immobilized horseradish peroxidase in an organic solvent.  
Bioorg Med Chem Lett, 1995, 5 (16), 1861-1864.
26. D. A. Eastmond, M. T. Smith, L. O. Ruzo, D. Ross.  
Metabolic activation of phenol by human myeloperoxidase and horseradish peroxidase.  
Mol Pharmacol, 1986, 30 (6), 674-679.

27. M. T. Smith, J. W. Yager, K. L. Steinmetz, D. A. Eastmond.  
Peroxidase-dependent metabolism of benzene's phenolic metabolites and its potential role in benzene toxicity and carcinogenicity.  
*Environ Health Perspect*, 1989, 82, 23-29.
28. K. E. Hammel, P. J. Tardone.  
The oxidative 4-dechlorination of polychlorinated phenols is catalyzed by extracellular fungal lignin peroxidases.  
*Biochemistry*, 1988, 27 (17), 6563-6568.
29. J. Dec, J. M. Bollag.  
Dehalogenation of Chlorinated Phenols during Oxidative Coupling.  
*Environ Sci Technol*, 1994, 28 (3), 484-490.
30. C. M. Bonefeld, M. M. Nielsen, I. M. Rubin, M. T. Vennegaard, S. Dabelsteen, E. Giménez-Arnau, J. P. Lepoittevin, C. Geisler, J. D. Johansen.  
Enhanced sensitization and elicitation responses caused by mixtures of common fragrance allergens.  
*Contact Dermatitis*, 2011. DOI : 10.1111/j.1600-0536.2011.01945.x.
31. S. C. Gad, B. J. Dunn, D. W. Dobbs, C. Reilly, R. D. Walsh.  
Development and validation of an alternative dermal sensitization test: The mouse ear swelling test (MEST).  
*Toxicol Appl Pharm*, 1986, 84 (1), 93-114.
32. S. C.  
The mouse ear swelling test (MEST) in the 1990s.  
*Toxicology*, 1994, 93 (1), 33-46.
33. J. K. Lee, J. H. Park, H. S. Kim, S. T. Chung, J. H. Eom, K. T. Nam, H. Y. Oh.  
Evaluation of cell proliferation in ear and lymph node using BrdU immunohistochemistry for mouse ear swelling test.  
*Environ Toxicol Pharmacol*, 2003, 14 (1-2), 61-68.
34. M. Takeyoshi, K. Yamasaki, Y. Yakabe, M. Takatsuki, I. Kimber.  
Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation.  
*Toxicol Lett*, 2001, 119 (3), 203-208.



---

## CONCLUSION GENERALE

---



L'allergie de contact est une maladie sans traitement autre que symptomatique et le seul moyen de prévenir son apparition est d'agir avant l'exposition du consommateur. Dans cette optique, il est nécessaire de tester de manière systématique tous les composants étant amenés à être en contact avec la peau. Cette nécessité va même devenir une obligation du fait de l'entrée progressive en application de la réglementation REACH. Parallelement, le 7<sup>ème</sup> amendement à la Directive Européenne sur les cosmétiques demande la suppression des tests basés sur l'utilisation d'animaux pour l'évaluation du pouvoir sensibilisant. Il en résulte que le développement et l'amélioration de méthodes alternatives pour la détection d'allergènes sont devenus un enjeu majeur. Dans le cas précis du DPRA, il pourrait être très intéressant de l'adapter à l'évaluation du pouvoir sensibilisant de mélanges complexes afin, par exemple, de diminuer la quantité de tests à effectuer. En effet, bien qu'un effort important ait été fait pour l'évaluation du pouvoir sensibilisant des composés chimiques individuellement, il n'existe toujours pas de méthode permettant de le faire dans le cas de mélanges de composés. Ceci est d'un intérêt majeur lorsque l'on considère les produits cosmétiques pour lesquels de nombreux ingrédients sont des extraits naturels (i.e. huiles essentielles...). Il serait donc intéressant de savoir si les études de réactivité peptidique, appliquées aux mélanges de composés chimiques allergisants, pourraient corrélérer avec leur pouvoir sensibilisant.

Le but de ce travail de thèse a été d'étudier la réactivité de plusieurs mélanges d'allergènes connus afin d'apporter des éléments de réponse à la question de savoir si le DPRA est capable de détecter et/ou d'évaluer le potentiel sensibilisant de mélanges complexes. Le travail a été réalisé à l'aide de cinq mélanges binaires de composés :

*N*-Méthyl-5-chloroiso-thiazolinone/*N*-méthyliso-thiazolinone

Hydroxycitronellal/citral

Hydroxycitronellal/aldéhyde cinnamique

Citral/aldéhyde cinnamique

Atranol/chloroatranol

Ces mélanges ont l'avantage de couvrir une gamme de potentiels de sensibilisation et de mécanismes de réactivité vis-à-vis d'acides aminés nucléophiles. Les potentiels de sensibilisation des molécules choisies vont de fort (MCI) à faible (hydroxycitronellal). Leurs mécanismes de réaction reflètent la complexité des réactivités observées que l'on peut trouver chez les haptènes (isothiazolinones et aldéhydes) ou pro-haptènes (atranol et chloroatranol). Enfin, les conditions expérimentales ont été choisies (équimolarité) afin d'étudier l'existence d'une éventuelle compétition entre la réactivité des deux composants du mélange.

Ce travail de thèse s'est articulé autour de trois grandes parties. Une première partie a concerné un mélange d'allergènes aux pouvoirs sensibilisants éloignés (MI/MCI) afin d'étudier dans un premier temps un mélange « simple ». Dans un second temps, sont venues les études mettant en jeu les mélanges d'aldéhydes aux potentiels de sensibilisation plus proches afin de confirmer ou infirmer les résultats obtenus dans la première partie. Enfin, l'étude d'un mélange de pro-haptènes, aux mécanismes d'action encore inconnus, que sont l'atranol et le chloroatranol est venue clore ce travail.

Tous les mélanges étudiés lors de ce travail se sont montrés réactifs vis-à-vis des différents peptides utilisés. Ceci a permis de montrer que le DPRA est tout à fait capable de détecter la présence d'allergènes dans des mélanges. Cependant, la difficulté de ce travail résidait dans la corrélation entre les résultats de réactivité observés et la prédiction du pouvoir sensibilisant du mélange testé. Deux cas se sont présentés à nous.

Dans un premier temps, les résultats obtenus lors des études de la réactivité des mélanges d'allergènes ayant des potentiels de sensibilisation significativement différents vis-à-vis des peptides et les études cinétiques effectuées, nous ont permis de suggérer que le DPRA prédirait le pouvoir sensibilisant d'un tel mélange comme étant celui de l'allergène le plus fort présent. Ainsi un mélange d'allergène fort/allergène modéré (MCI/MI) serait considéré par ce test comme étant un allergène fort, un mélange d'allergène modéré/allergène faible

(citral/hydroxycitronellal) comme un allergène modéré. Ceci est nécessairement à moduler en fonction des concentrations relatives des deux allergènes.

Dans le cas des mélange d'allergènes aux potentiels de sensibilisations proches, comme le mélange citral/aldéhyde cinnamique, le comportement s'est avéré être différent dans le sens où la réactivité d'aucun des deux haptènes n'a pris le pas sur celle de l'autre. Les deux composants du mélange ayant réagi, d'un point de vue purement chimique, on peut extrapoler ce comportement en disant que la réactivité du mélange correspond à la somme des réactivités des constituants. Ainsi, pour deux molécules dont les constantes de vitesse de réaction envers les peptides sont proches, on peut s'attendre à obtenir des résultats de déplétion peptidiques similaires à ceux obtenus pour une molécule seule pour une même quantité totale d'allergène. D'un autre côté, une étude récente a montré que la réponse immunitaire à l'aldéhyde cinnamique, chez des souris sensibilisées à un mélange d'aldéhyde cinnamique, d'isoeugénol et d'hydroxyisoheptyl-3-cyclohexène carboxaldéhyde était supérieure à celle observée chez des souris sensibilisées à l'aldéhyde cinnamique seul.<sup>1</sup> Ainsi, même si la présence d'allergène en mélange est compatible avec les lectures de déplétions peptidiques, le lien entre cette réactivité peptidique et l'allergie de contact, au travers de l'arbre décisionnel développé lors de l'élaboration du DPRA, n'est plus valable.

De manière plus générale, ce travail a montré que le dans cas des mélanges binaires et équimolaires, la détection d'allergènes par le DPRA serait envisageable. Cependant, dans les cas où les deux allergènes du mélange ont des potentiels de sensibilisation très proches (citral/aldéhyde cinnamique et atranol/chloroatranol) la déplétion peptidique ne permettra sans doute pas de déterminer le potentiel de sensibilisation sur la base du test DPRA. En effet, même si la détection d'allergène en mélange est possible, il est très important de pouvoir prédire le pouvoir sensibilisant des composés et ainsi éviter au consommateur une exposition qui pourrait déclencher chez lui une allergie de contact.

1. C. M. Bonefeld, M. M. Nielsen, I. M. Rubin, M. T. Vennegaard, S. Dabelsteen, E. Giménez-Arnau, J. P. Lepoittevin, C. Geisler, J. D. Johansen. Enhanced sensitization and elicitation responses caused by mixtures of common fragrance allergens. *Contact Dermatitis*, 2011. DOI : 10.1111/j.1600-0536.2011.01945.x.

Cette étude visait à donner des éléments de réponse quant à la possibilité de détecter et/ou d'évaluer le potentiel allergisant de mélanges complexe par le DPRA. Les résultats obtenus sont encourageants mais ont révélé certaines limites. Des études de type LLNA sont maintenant nécessaires pour mieux comprendre l'effet des mélanges d'allergènes sur la sensibilisation et l'élicitation des réactions allergiques. Il est important de comprendre l'effet de tels mélanges d'une part sur la sélection et l'activation des sous populations de lymphocytes T et sur la production de signaux de dangers qui vont réguler l'intensité de la réponse du système immunitaire.

---

## Parties Expérimentales

---





## Matériels et méthodes

### Solvants et réactifs

Les réactions sensibles à l'air et/ou à l'humidité ont été conduites sous atmosphère d'argon dans de la verrerie préalablement flambée sous vide.

Les solvants anhydres utilisés dans les différentes synthèses ont été préparés de la façon suivante :

- L'éther diéthylique et le tétrahydrofurane ont été distillés sous argon en présence de sodium et de benzophénone.
- Le dichlorométhane a été distillé sous argon sur pentoxyde de phosphore associé à un indicateur coloré (Sicapent®)

Les réactifs utilisés lors des différentes synthèses ont été fournis par Sigma-Aldrich (Saint Quentin, Fallavier, France).

Les réactifs marqués au carbone 13 ont été fournis par Euriso-top (Saint-Aubin, France).

Le suivi des réactions a été effectué par chromatographie sur couche mince (CCM) (silica gel 60 F<sub>254</sub>, 0,25 mm, Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne). La révélation des plaques a été effectuée soit par ultraviolet ( $\lambda = 254$  nm), soit à l'aide de révélateurs spécifiques suivi d'un chauffage au décapeur thermique.

Les purifications des produits ont été effectuées, sauf indication du contraire, par chromatographie sur colonne de silice (Geduran Si60, 40-63  $\mu$ m, Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne) ou d'oxyde d'aluminium (alumine standardisée, 63-200  $\mu$ m, Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne).

### Caractérisation des produits

Les spectres de RMN du proton et du carbone 13 ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre Bruker Avance 300 MHz (300 MHz  $^1\text{H}$  ; 75 MHz  $^{13}\text{C}$ ). Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont donnés en parties par million (ppm) par rapport au tétraméthylsilane. Les constantes de couplage sont exprimées en Hertz. Les abréviations s, sl, d, t, q et m indiquent, respectivement, les multiplicités suivantes : singulet, singulet large, doublet, triplet, quadruplet et multiplet. Le tableau ci-dessous décrit les déplacements chimiques des signaux résiduels des solvants deutérés utilisés lors des caractérisations.

Solvant	$\delta\text{RMN } ^1\text{H}$ (ppm)	$\delta\text{RMN } ^{13}\text{C}$ (ppm)
Chloroforme- <i>d</i>	7,24	77,16
Méthanol- <i>d</i> <sub>4</sub>	3,30	49,02
Acétonitrile- <i>d</i> <sub>3</sub>	1,94	118,26

### Études de RMN

Le suivi par RMN du carbone 13 de la réactivité des allergènes étudiés vis-à-vis des peptides a été réalisé à l'aide d'un spectromètre Bruker Avance 300 MHz. Les adduits formés ont été caractérisés à l'aide d'expériences de corrélations hétéronucléaires  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  courtes et longues distances (Heteronuclear Single-Quantum Correlation Spectroscopy, HSQC et Heteronuclear Multiple-Bond Correlation, HMBC) effectuées à l'aide d'un spectromètre Bruker Avance 400 MHz (400 MHz  $^1\text{H}$  ; 100 MHz  $^{13}\text{C}$ ) ou d'un spectromètre Bruker Avance 500 MHz (500 MHz  $^1\text{H}$  ; 125 MHz  $^{13}\text{C}$ ). Les déplacements chimiques décrits (exprimés en ppm) pour les protons et les carbones attribués aux adduits correspondent à une compilation des différentes expériences de RMN ( $^{13}\text{C}$  monodimensionnelle,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  bidimensionnelle HMBC et HSQC). Dans le cas des études concernant des composés ayant deux positions marquées au carbone 13 (i.e. aldéhyde cinnamique et citral), les déplacements chimiques décrits pour les adduits observés tiennent compte des

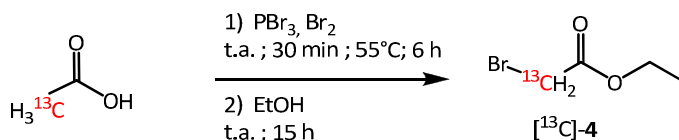
expériences réalisées avec chacune des molécules marquées. Les paramètres d'acquisition des différentes expériences de RMN effectuées sont récapitulés dans le tableau ci-dessous.

	RMN 1D $^{13}\text{C}$	RMN 2D $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC	RMN 2D $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC
NS	800	40	120
SWH (Hz)	20325,203	4807,692	20325,203
FIDRES (Hz)	0,620	2,348	0,620
AQ (s)	0,806	0,213	0,806
D1 (s)	0,6	2,5	2,2
Pulse (s)	30		

### Études de spectrométrie de masse

Les spectres de masse ont été enregistrés sur un appareil Agilent QtoF couplé à une chaîne HPLC Agilent 1200SL RRLC équipée d'une colonne Thermo Hypersyl Gold (C18 ; 1 mm x 100 mm ; taille des particules 1,9  $\mu\text{m}$ ).



Synthèse de MI, [<sup>13</sup>C]-1, et de MCI, [<sup>13</sup>C]-22-[<sup>13</sup>C]-Bromoacétate d'éthyle, [<sup>13</sup>C]-4

Dans un tricol de 100 mL, muni d'un réfrigérant et d'un tube de garde rempli de chlorure de calcium, de l'acide acétique marqué au carbone 13 en position 2 (3 g ; 49,14 mmol) et du tribromure de phosphore (6,65 g ; 2,3 mL ; 24,57 mmol ; 0,5 équ.) sont agités à température ambiante. Du brome (27,49 g ; 8,6 mL ; 171,99 mmol ; 3,5 équ.) est ajouté très lentement dans le milieu à température ambiante. Le milieu est par la suite agité pendant 30 minutes avant d'être chauffé à 55 °C pendant 6 heures. Après ce temps, la température du milieu est redescendue à température ambiante et de l'éthanol anhydre est additionné (4,29 g ; 5,3 mL ; 93,37 mmol ; 1,9 équ.). Le milieu est alors laissé sous agitation à température ambiante pendant 15 heures. De l'éthanol (10 mL), ainsi que de l'eau (30 mL) et de l'éther diéthylique (60 mL), sont additionnés. La phase aqueuse est extraite avec de l'éther diéthylique (3 x 40 mL) et l'ensemble des phases organiques est neutralisé à l'aide d'une solution saturée de bicarbonate de sodium (3 x 20 mL) puis lavé avec une solution saturée de thiosulfate de sodium (2 x 20 mL). La phase organique est alors séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et concentrée sous pression réduite pour donner une huile jaune qui est purifiée par distillation sous vide (50 °C à 20 mbar) afin d'obtenir le 2-[<sup>13</sup>C]-bromoacétate d'éthyle, [<sup>13</sup>C]-4, sous forme d'une huile incolore (6,3 g ; 37,5 mmol ; rendement : 77 %).

$^{13}\text{CC}_3\text{H}_7\text{O}_2\text{Br}$  ; MM = 167,96 g.mol<sup>-1</sup>

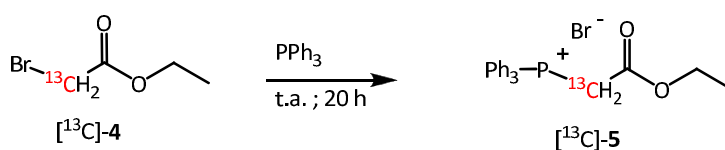
Numéro de registre CAS : 85539-84-0

CCM – silice Rf = 0,63 (AcOEt/EtOH : 95/5)

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$  – 300 MHz) :** 1,23 (t, 3H,  $^3J_{\text{HH}} = 7,1$  Hz,  $-\text{CH}_3$ ) ; 3,76 (d, 2H,  $^1J_{\text{HC}} = 153,2$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{Br}$ ) ; 4,16 (q, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 7,1$  Hz,  $-\text{OCH}_2-$ )

**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$  – 75 MHz) :** 14,0 ( $-\text{CH}_3$ ) ; 26,0 ( $-\text{CH}_2\text{Br}$ ) ; 62,3 ( $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ) ; 167,2 (d,  $^1J_{\text{CC}} = 65,0$  Hz,  $-\text{C}(\text{O})-$ )

**Bromure de 1- $^{13}\text{C}$ -(2-éthoxy-2-oxoéthyl)-triphénylphosphonium,  $^{13}\text{C}$ -5**



Dans un ballon de 100 mL, de la triphénylphosphine (10,3 g ; 41,25 mmol ; 1,1 éq.) est dissoute dans 40 mL d'acétate d'éthyle. À cette solution est ajoutée une solution de 2- $^{13}\text{C}$ -bromoacétate d'éthyle  $^{13}\text{C}$ -4 (6,3 g ; 37,5 mmol) dans 40 mL d'acétate d'éthyle. Le mélange est alors laissé sous agitation à température ambiante pendant 20 heures. Le précipité formé est lavé avec de l'acétate d'éthyle (2 x 10 mL) et du pentane (2 x 10 mL), avant d'être séché sous vide. Le bromure de 1- $^{13}\text{C}$ -(2-éthoxy-2-oxoéthyl)-triphénylphosphonium  $^{13}\text{C}$ -5 est alors obtenu sous la forme d'un solide blanc (16,13 g ; 37,5 mmol ; rendement : quantitatif).

$^{13}\text{CC}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{PBr}$  ; MM = 430,31 g.mol $^{-1}$

**Numéro de registre CAS :** 167906-95-8

**CCM** – silice : Rf = 0,17 (AcOEt /EtOH : 8/2)

Point de fusion : 154 °C

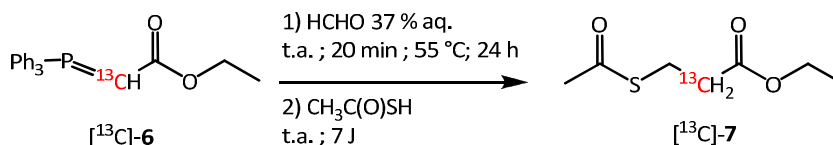
**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$  – 300 MHz) :** 1,03 (t, 3H,  $^3J_{\text{HH}} = 7,2$  Hz,  $-\text{CH}_3$ ) ; 4,00 (q, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 7,2$  Hz,  $-\text{OCH}_2-$ ) ; 5,54 (dd, 2H,  $^2J_{\text{HP}} = 13,8$  Hz,  $^1J_{\text{HC}} = 134,5$  Hz,  $-\text{P}^{13}\text{CH}_2-$ ) ; 7,61-7,68 (m, 6H,  $m\text{-CH}(\text{Ar})$ ) ; 7,73-7,79 (m, 3H,  $p\text{-CH}(\text{Ar})$ ) ; 7,84-7,91 (m, 6H,  $o\text{-CH}(\text{Ar})$ )



**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$  – 300 MHz) :** 1,02 (sl, 3H,  $-\text{CH}_3$ ) ; 2,87 (sl, 1H,  $-\text{CHCO}_2-$ ) ; 3,94 (q, 2H,  $^3J_{\text{HH}}=6,8$  Hz,  $-\text{OCH}_2-$ ) ; 7,41-7,47 (m, 6H,  $m\text{-CH}(\text{Ar})$ ) ; 7,50-7,56 (m, 3H,  $p\text{-CH}(\text{Ar})$ ) ; 7,61-7,67 (m, 6H,  $o\text{-CH}(\text{Ar})$ )

**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$  – 75 MHz) :** 14,9 ( $-\text{CH}_3$ ) ; 30,4 (d,  $^1J_{\text{CP}}=123,2$  Hz,  $-\text{CHP}-$ ) ; 58,0 ( $-\text{OCH}_2-$ ) ; 128,5 (d, 3C,  $^1J_{\text{CP}}=101,8$  Hz,  $-\text{C}(\text{Ar})$ ) ; 128,8 (d, 6C,  $^3J_{\text{CP}}=12,2$  Hz,  $m\text{-CH}(\text{Ar})$ ) ; 133,2 (d, 6C,  $^2J_{\text{CP}}=9,9$  Hz,  $o\text{-CH}(\text{Ar})$ ) ; 133,7 (3C,  $p\text{-CH}(\text{Ar})$ ) ; 163,4 ( $-\text{C}(\text{O})-$ )

### 2- $^{13}\text{C}$ -3-(Acétylthio)-propanoate d'éthyle, $^{13}\text{C}$ -7



Dans un bicol équipé d'un réfrigérant est dissout du 2- $^{13}\text{C}$ - (triphénylphosphoranylidène)acétate d'éthyle  $^{13}\text{C}$ -6 (4,6 g ; 13,16 mmol) dans 50 mL de dioxane. Une solution aqueuse de formaldéhyde à 37 % (395 mg ; 0,99 mL ; 13,16 mmol ; 1 éq.) est alors ajoutée lentement à température ambiante. Le mélange est laissé sous agitation à cette température pendant 20 minutes avant d'être chauffé à 55 °C pendant 24 heures. Le mélange est ensuite ramené à température ambiante, avant d'y ajouter de l'acide thioacétique (2 g ; 1,88 mL ; 26,33 mmol ; 2 éq.). L'agitation est maintenue durant 7 jours à température ambiante avant que le milieu ne soit concentré sous pression réduite. Le brut réactionnel est alors récupéré dans 50 mL de dioxane et 100 mL d'éther diéthylique. De l'eau (100 mL) est également ajoutée. La phase aqueuse est séparée avant d'être extraite à l'aide d'éther diéthylique (3 x 100 mL). Les différentes phases organiques sont alors rassemblées, séchées sur du sulfate de magnésium, avant d'être évaporées sous pression réduite. L'huile jaune ainsi obtenue est alors purifiée par chromatographie sur gel de silice (éther de pétrole/AcOEt : 8/2). Le 2- $^{13}\text{C}$ -3-(acétylthio)propanoate d'éthyle  $^{13}\text{C}$ -7 est obtenu sous forme d'une huile rouge (1,1 g ; 6,17 mmol ; rendement : 45 %).



$^{13}\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_3\text{S}$  ; MM = 177,23 g.mol<sup>-1</sup>

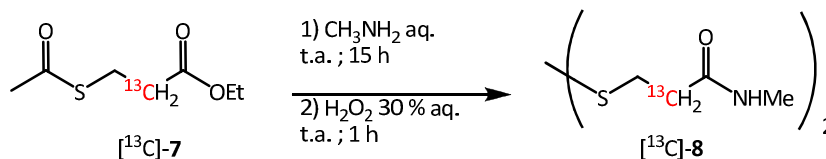
Numéro de registre CAS : 532989-58-5

CCM – silice : Rf = 0,34 (pentane/AcOEt : 92/8)

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub> – 300 MHz) :** 1,23 (t, 3H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,1 Hz, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; 2,30 (s, 3H, -C(O)CH<sub>3</sub>) ; 2,58 (dt, 2H, <sup>1</sup>J<sub>HC</sub> = 130,6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,9 Hz, <sup>13</sup>CH<sub>2</sub>-) ; 3,06 (m, 2H, -S-CH<sub>2</sub>-) ; 4,12 (q, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,1 Hz, -OCH<sub>2</sub>-)

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub> – 75 MHz) :** 14,1 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; 24,1 (d, <sup>1</sup>J<sub>CC</sub> = 36,7 Hz, -SCH<sub>2</sub>-) ; 30,5 (-CH<sub>3</sub>C(O)S-) ; 30,4 (-<sup>13</sup>CH<sub>2</sub>-) ; 60,7 (-OCH<sub>2</sub>-) ; 171,5 (d, <sup>1</sup>J<sub>CC</sub> = 57,2 Hz, -C(O)OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; 195,4 (-C(O)S-)

### 2,2'-[<sup>13</sup>C]-3,3'-Dithiobis-(N-méthylpropionamide), [<sup>13</sup>C]-8



Une solution aqueuse de méthylamine (41 % ; 709 mg ; 1,93 mL ; 22,88 mmol ; 4,2 éq.) est ajoutée, dans un ballon de 25 mL, à du 2-[<sup>13</sup>C]-3-(acétylthio)-propanoate d'éthyle [<sup>13</sup>C]-7 (970 mg ; 5,44 mmol). Le milieu est laissé sous agitation à température ambiante pendant 15 heures. La température du milieu est ensuite abaissée à 0 °C avant d'ajouter au mélange une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène (35 % ; 185 mg ; 0,46 mL ; 5,44 mmol ; 1 éq.). Le milieu réactionnel est alors laissé sous agitation à température ambiante pendant une heure avant d'être dilué dans une solution saturée de chlorure de sodium (15 mL) afin de stopper la réaction. La phase aqueuse ainsi obtenue est extraite à l'aide de dichlorométhane (10 x 25 mL). Les phases organiques sont ensuite rassemblées et séchées sur sulfate de magnésium avant d'être évaporées. Le 2,2'-[<sup>13</sup>C]-3,3'-dithiobis-

(*N*-méthylpropionamide) [ $^{13}\text{C}$ ]-**8** (330 mg ; 1,39 mmol ; rendement : 25 %) est alors obtenu après recristallisation dans le benzène.

$^{13}\text{C}_2\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$  ; MM = 238,34 g.mol $^{-1}$

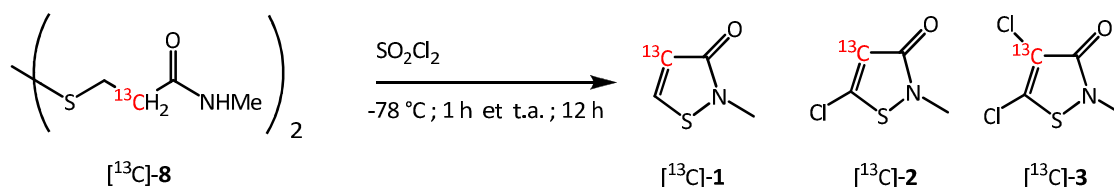
Numéro de registre CAS : 532989-61-0

CCM – silice : Rf = 0,36 (AcOEt/EtOH : 8/2)

RMN  $^1\text{H}$  (CD $_3$ OD – 300 MHz) : 2,57 (dt, 4H,  $^1J_{\text{HC}} = 129,3$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 7,1$  Hz,  $2 \times -^{13}\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{N}-$ ) ; 2,79 (s, 6H,  $2 \times -\text{CH}_3$ ) ; 2,93 (m, 4H,  $2 \times -\text{SCH}_2-$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  (CD $_3$ OD – 75 MHz) : 24,8 ( $2 \times -\text{CH}_3$ ) ; 33,6 (d,  $^1J_{\text{CC}} = 36,0$  Hz,  $2 \times -\text{SCH}_2-$ ) ; 34,9 ( $2 \times -^{13}\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ ) ; 172,7 (d,  $^1J_{\text{CC}} = 49,0$  Hz,  $2 \times -\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ )

#### 4- $^{13}\text{C}$ -Isothiazolinones, [ $^{13}\text{C}$ ]-**1**, [ $^{13}\text{C}$ ]-**2**



Dans un bicol de 50 mL, flambé et sous argon, est dissout le 2,2'- $^{13}\text{C}$ -3,3'-dithiobis-(*N*-méthylpropionamide) [ $^{13}\text{C}$ ]-**8** (330 mg ; 1,39 mmol) dans 20 mL de dichlorométhane distillé. Le milieu est refroidi à  $-78$  °C avant d'y être ajouté du chlorure de sulfuryle (1,05 g ; 0,63 mL ; 7,78 mmol ; 5,6 éq.). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à  $-78$  °C pendant une heure avant d'être ramené à température ambiante. L'agitation est maintenue à cette température pendant 12 heures. Le milieu est ensuite repris dans 8 mL de méthanol et un dépôt solide sur silice est réalisé. Une purification sur gel d'alumine (AcOEt/pentane : 7/3) permet de purifier la 4- $^{13}\text{C}$ -2-*N*-méthylisothiazolin-3-one [ $^{13}\text{C}$ ]-**1** (75 mg ; 0,64 mmol ; rendement : 47 %) et la 4- $^{13}\text{C}$ -5-chloro-2-*N*-méthylisothiazolin-3-

one [ $^{13}\text{C}$ ]-2 (112 mg ; 0,74 mmol ; rendement : 53 %) [ $^{13}\text{C}$ ]-3 a été détecté sous forme de traces par CCM.

**4-[ $^{13}\text{C}$ ]-2-N-Méthylisothiazolin-3-one, 4-[ $^{13}\text{C}$ ]-MI, [ $^{13}\text{C}$ ]-1**

$^{13}\text{CC}_3\text{H}_5\text{NOS}$  ; MM = 116,16 g.mol $^{-1}$

**Numéro de registre CAS** : 532989-67-6

**CCM** – alumine : Rf = 0,20 (pentane/AcOEt : 5/5)

**RMN  $^1\text{H}$  (CD $_3$ OD – 300 MHz)** : 3,36 (s, 3H, -CH $_3$ ) ; 6,24 (dd, 1H,  $^1J_{\text{HC}} = 179,1$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 6,2$  Hz, - $^{13}\text{CHC}(\text{O})\text{N}$ -) ; 8,44 (dd, 1H,  $^2J_{\text{HC}} = 3,0$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 6,2$  Hz, -SCH-)

**RMN  $^{13}\text{C}$  (CD $_3$ OD – 75 MHz)** : 30,8 (-CH $_3$ ) ; 114,5 (- $^{13}\text{CHC}(\text{O})\text{N}$ -) ; 143,3 (d,  $^1J_{\text{CC}} = 65,6$  Hz, -SCH-) ; 171,6 (d,  $^1J_{\text{CC}} = 68,4$  Hz, -C(O)N-)

**4-[ $^{13}\text{C}$ ]-5-Chloro-2-N-méthyl-isothiazolin-3-one, 4-[ $^{13}\text{C}$ ]-MCI, [ $^{13}\text{C}$ ]-2**

$^{13}\text{CC}_3\text{H}_4\text{ClNOS}$  ; MM = 150,59 g.mol $^{-1}$

**Numéro de registre CAS** : 532989-66-5

**CCM** – alumine : Rf = 0,45 (pentane/AcOEt : 5/5)

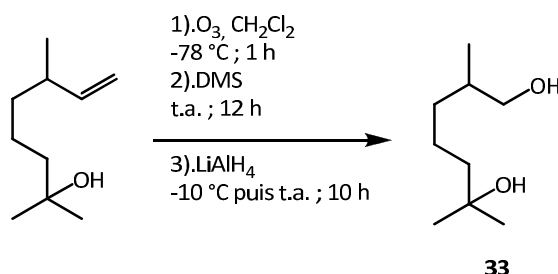
**RMN  $^1\text{H}$  (CDCl $_3$  – 300 MHz)** : 3,29 (s, 3H, -CH $_3$ ) ; 6,28 (d, 1H,  $^1J_{\text{HC}} = 183,2$  Hz, - $^{13}\text{CH}$ -)

**RMN  $^{13}\text{C}$  (CDCl $_3$  – 75 MHz)** : 30,1 (CH $_3$ ) ; 114,6 (- $^{13}\text{CH}$ -) ; 142,4 (-CCl) ; 164,1 (d,  $^1J_{\text{CC}} = 78,9$  Hz, -C(O)N-)



Synthèse du [<sup>13</sup>C]-hydroxycitronellal, [<sup>13</sup>C]-30

## 2,6-Diméthylheptan-1,6-diol 33



Dans un tricol, une solution de dihydromyrcénol (1,58 g ; 2 mL ; 9,93 mmol) dans du dichlorométhane (100 mL) est refroidie à -78 °C. De l'ozone est mis à buller dans la solution jusqu'à ce qu'une coloration bleue apparaisse, caractéristique de la saturation du milieu en ozone. L'excès d'ozone est purgé avec de l'oxygène pendant 15 minutes. Du diméthylsulfure (2,45 g ; 2,9 mL ; 38,73 mmol ; 3,9 éq.) est ajouté et le milieu est laissé sous agitation à température ambiante pendant 12 heures. Le milieu réactionnel est ensuite concentré sous pression réduite avant d'être repris dans de l'éther diéthylique (30 mL). La phase organique est lavée avec de l'eau (3 × 30 mL), avec une solution saturée de chlorure de sodium (3 × 30 mL). L'ensemble des phases organiques est séché sur sulfate de magnésium, filtré et concentré sous pression réduite afin d'obtenir une huile jaune qui est utilisée telle quelle pour la suite de la synthèse.

Une solution du brut réactionnel précédemment obtenu dans du tétrahydrofurane anhydre (20 mL) est refroidie à -10 °C dans un bicol sec et sous argon. Une suspension de tétrahydrure d'aluminium et de lithium (753 mg ; 19,84 mmol ; 2 éq. par rapport au dihydromyrcénol) dans du tétrahydrofurane anhydre (20 mL) est lentement additionnée à -10 °C. Le milieu est agité pendant 10 heures à température ambiante. Après ce temps, la température du milieu est descendue à 5 °C et de l'eau (0,8 mL) est ajoutée lentement. Après 15 minutes d'agitation, une solution d'hydroxyde de sodium dans de l'eau (10 % ; 0,8 mL) est additionnée. Après 15 minutes supplémentaires d'agitation, de l'eau (2,4 mL) est à nouveau ajoutée. La phase organique est lavée avec une solution saturée de

chlorure de sodium (30 mL), séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et concentrée sous pression réduite. Le 2,6-diméthylheptan-1,6-diol **33** est purifié par chromatographie sur colonne de silice (pentane/AcOEt : 4/6) et est obtenu sous forme d'une huile jaune (1,44 g ; 8,99 mmol ; rendement : 91 %).

$C_9H_{20}O_2$  ; MM = 160,24 g.mol<sup>-1</sup>

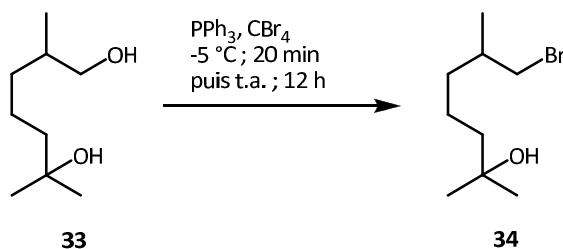
Numéro de registre CAS : 36809-41-3

CCM – silice : R<sub>f</sub> = 0,35 (pentane/AcOEt : 4/6)

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub> – 300 MHz) : 0,92 (d, 3H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,8 Hz, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>OH) ; 1,20 (s, 6H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>OH) ; 1,42 (m, 6H, -CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 1,61 (m, 1H, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>OH) ; 3,45 (m, 2H, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>OH)

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub> – 75 MHz) : 16,6 (-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>OH) ; 21,6 (-CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 29,3 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>OH) ; 33,8 (-CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 35,7 (-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>OH) ; 44,1 (-CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 68,2 (-CH<sub>2</sub>OH) ; 71,0 (-C(OH)-)

#### 7-Bromo-2,6-diméthylheptan-2-ol, **34**



Dans un bicol sec et sous argon, une solution de 2,6-diméthylheptan-1,6-diol **33** (5 g ; 31,2 mmol) dans du dichlorométhane anhydre (200 mL) est refroidie à -5 °C. De la triphénylphosphine (16,5 g ; 62,3 mmol ; 2 éq.) et du tétrabromure de carbone (10,56 g ; 31,2 mmol ; 1 éq.) sont ajoutés. La solution prend une teinte orange foncée et après 20

minutes d'agitation la température du milieu est remontée à température ambiante. Le milieu est alors laissé sous agitation pendant 12 heures. Il est ensuite concentré sous pression réduite et le brut obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (gradient d'éluion : pentane/AcOEt : 85/15 puis pentane/AcOEt : 7/3). Le 7-bromo-2,6-diméthylheptan-2-ol **34** est obtenu sous forme d'une huile jaune (4,43 g ; 19,85 mmol ; rendement : 64 %).

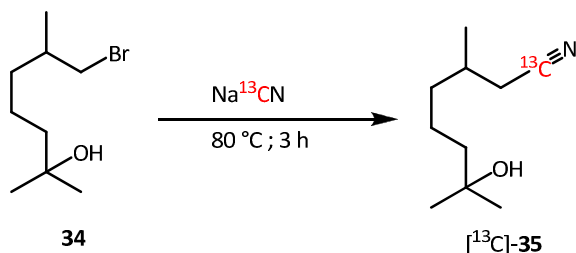
**C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>BrO** ; MM = 223,15 g.mol<sup>-1</sup>

**Numéro de registre CAS** : 959395-28-9

**CCM** – silice : R<sub>f</sub> = 0,26 (pentane/AcOEt : 8/2)

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub> – 300 MHz)** : 0,97 (d, 3H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,8 Hz, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>Br) ; 1,15 (s, 6H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>OH) ; 1,37 (m, 6H, -CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 1,78 (m, 1H, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>Br) ; 3,32 (m, 2H, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>Br)

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub> – 75 MHz)** : 18,7 (-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>Br) ; 21,6 (-CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 29,2 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>OH) ; 35,2 (-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>Br) ; 35,3 (-CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 41,4 (-CH<sub>2</sub>Br) ; 43,6 (-CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 70,7 (-C(OH)-)

1-<sup>13</sup>C]-3,7-Diméthyl-7-hydroxyoctanenitrile, [<sup>13</sup>C]-35

Dans un bicol sec et sous argon, du cyanure de sodium marqué au carbone 13 (208 mg ; 4,12 mmol ; 1 éq.) est additionné à une solution de 7-bromo-2,6-diméthylheptan-2-ol **34** (920 mg ; 4,12 mmol) dans du diméthylformamide fraîchement distillé (23 mL). Le milieu réactionnel est agité pendant 3 heures à 80 °C et est ensuite hydrolysé avec de l'eau (20 mL). La phase aqueuse est extraite avec de l'éther diéthylique (4 × 100 mL). Les phases organiques combinées sont lavées avec une solution saturée de chlorure de sodium (100 mL), séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et concentrées sous pression réduite. Le 1-<sup>13</sup>C]-3,7-diméthyl-7-hydroxyoctanenitrile [<sup>13</sup>C]-**35** est purifié par chromatographie sur gel de silice (éther de pétrole/AcOEt : 6/4) et est obtenu sous forme d'une huile incolore (618 mg ; 3,63 mmol ; rendement : 88 %).

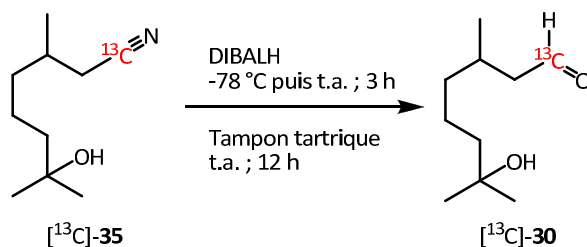
<sup>13</sup>CC<sub>9</sub>H<sub>19</sub>NO ; MM = 170,27 g.mol<sup>-1</sup>

CCM – silice : R<sub>f</sub> = 0,29 (pentane/AcOEt : 6/4)

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub> – 300 MHz) : 1,03 (d, 3H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,7 Hz, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub><sup>13</sup>CN) ; 1,18 (s, 6H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>OH) ; 1,41 (m, 6H, -CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 1,84 (m, 1H, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub><sup>13</sup>CN) ; 2,27 (m, 2H, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub><sup>13</sup>CN)

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub> – 75 MHz) : 19,4 (-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub><sup>13</sup>CN) ; 21,5 (-CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 24,4 (d, <sup>1</sup>J<sub>CC</sub> = 55,5 Hz, -CH<sub>2</sub><sup>13</sup>CN) ; 29,2 (Z-CH<sub>3</sub>) ; 29,3 (E-CH<sub>3</sub>) ; 30,4 (-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub><sup>13</sup>CN) ; 36,3 (-CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 43,6 (-CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 70,7 (-C(OH)-) ; 118,9 (-<sup>13</sup>CN)



1-[<sup>13</sup>C]-Hydroxycitronellal, [<sup>13</sup>C]-30

Dans un bicol sec et sous argon, une solution de 1-[<sup>13</sup>C]-3,7-diméthyl-7-hydroxyoctanenitrile [<sup>13</sup>C]-35 (65 mg ; 0,38 mmol) dans le dichlorométhane anhydre (3 mL) est refroidie à -78 °C. Une solution d'hydrure de diisobutylaluminium (1 M dans le dichlorométhane ; 1,15 mL ; 1,15 mmol ; 3 éq.) est lentement additionnée. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 3 heures puis hydrolysé avec une solution de tampon tartrique (3 mL). Il est ensuite laissé sous agitation à température ambiante pendant 12 heures. Après ce temps, la phase aqueuse est extraite avec de l'éther diéthylique (3 × 5 mL). Les phases organiques rassemblées sont lavées avec une solution saturée de chlorure de sodium (25 mL), séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et concentrées sous pression réduite. Le 1-[<sup>13</sup>C]-hydroxycitronellal [<sup>13</sup>C]-30 est purifié par chromatographie sur gel de silice (pentane/Et<sub>2</sub>O : 4/6) et est obtenu sous forme d'une huile jaune (47 mg ; 0,27 mmol ; rendement : 72 %).

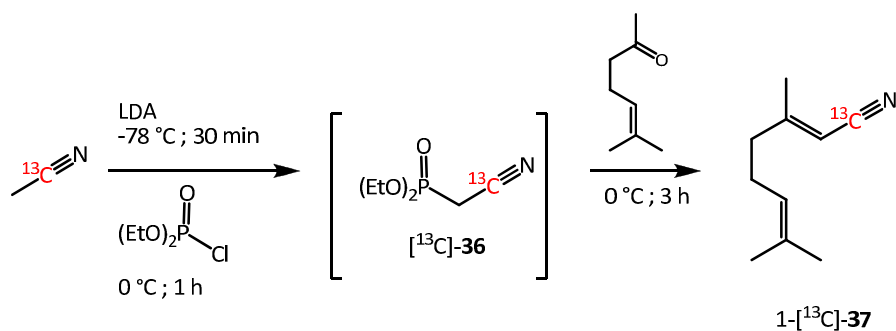
<sup>13</sup>CC<sub>9</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub> ; MM = 173,27 g.mol<sup>-1</sup>

CCM – silice : R<sub>f</sub> = 0,28 (pentane/Et<sub>2</sub>O : 4/6)

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub> – 300 MHz) : 0,95 (d, 3H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,6 Hz, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub><sup>13</sup>CHO) ; 1,20 (s, 6H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>OH) ; 1,42 (m, 6H, -CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 2,25 (m, 1H, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub><sup>13</sup>CHO) ; 2,37 (m, 2H, -CH<sub>2</sub><sup>13</sup>CHO) ; 9,75 (d, 1H, <sup>1</sup>J<sub>HC</sub> = 169,5 Hz, -<sup>13</sup>CHO)

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub> – 75 MHz) : 19,9 (-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub><sup>13</sup>CHO) ; 21,7 (-CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 28,1 (-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub><sup>13</sup>CHO) ; 29,3 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>OH) ; 37,3 (d, <sup>3</sup>J<sub>CC</sub> = 3,1 Hz, -CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 43,9 (-CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 50,8 (d, <sup>1</sup>J<sub>CC</sub> = 38,8 Hz, -CH<sub>2</sub><sup>13</sup>CHO) ; 70,9 (-C(OH)-) ; 203,0 (-<sup>13</sup>CHO)



Synthèses du 1-[<sup>13</sup>C] et du 3-[<sup>13</sup>C]-citral, 1-[<sup>13</sup>C]-31 et 3-[<sup>13</sup>C]-311-[<sup>13</sup>C]-3,7-Diméthyl-oct-2,6-diène-1-nitrile, 1-[<sup>13</sup>C]-37

Dans un ballon sec et sous argon, une solution de diisopropylamine fraîchement distillée (2,39 g ; 3,33 mL ; 23,78 mmol ; 4 éq.) dans du tétrahydrofurane aussi fraîchement distillé (42 mL) est refroidie à -20 °C. A cette température, une solution de *n*-butyllithium (1,44 M dans de l'éther diéthylique ; 16,5 mL ; 23,78 mmol ; 4 éq.) est lentement ajoutée. Le milieu réactionnel est agité pendant 1 heure à cette température et est ensuite refroidi à -78 °C. Une solution d'acétonitrile marqué au carbone 13 en position 1 (500 mg ; 11,9 mmol ; 2 éq.) dans du tétrahydrofurane (10 mL) est alors ajoutée. Après 30 minutes d'agitation, la température du milieu est remontée à 0 °C avant d'ajouter une solution de diéthylchlorophosphate (2,17 g ; 1,82 mL ; 11,9 mmol ; 2 éq.) dans du tétrahydrofurane (10 mL). Après 1 heure d'agitation à 0 °C, une solution de 6-méthyl-5-heptèn-2-one (774 mg ; 905 µL ; 5,95 mmol) dans du tétrahydrofurane (10 mL) est ajoutée. Le milieu est agité à 0 °C pendant 3 heures avant d'être hydrolysé avec de l'eau (40 mL). La phase aqueuse est extraite avec de l'éther diéthylique (3 × 50 mL). Les phases organiques rassemblées sont lavées avec une solution saturée de chlorure de sodium (100 mL), séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et concentrées sous pression réduite. Le 1-[<sup>13</sup>C]-3,7-diméthyl-oct-2,6-diène-1-nitrile 1-[<sup>13</sup>C]-37 est obtenu sous forme d'une huile incolore (866 mg ; 5,76 mmol ; rendement : 97 %) par purification sur gel de silice (pentane/Et<sub>2</sub>O : 9/1).

$^{13}\text{C}_9\text{H}_{15}\text{N}$  ; MM = 150,24 g.mol<sup>-1</sup>

Numéro de registre CAS : (E) 100187-30-2

(Z) 105175-98-2

CCM – silice : Rf = 0,40 (pentane/Et<sub>2</sub>O : 95/5)

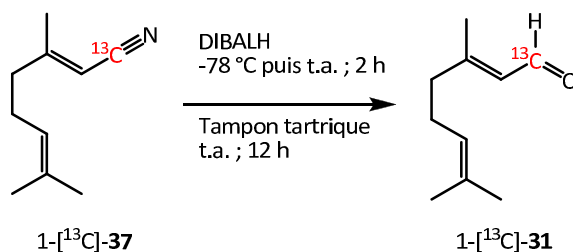
**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub> – 300 MHz)** : Isomère E (66 %, intégration des signaux RMN <sup>1</sup>H) : 1,58 (s, 3H, Z-CH<sub>3</sub>) ; 1,67 (s, 3H, E-CH<sub>3</sub>) ; 2,03 (s, 3H, -CCH<sub>3</sub>) ; 2,17 (m, 4H, -CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 5,00 (m, 1H, -CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 5,08 (d, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HC</sub>= 1,1 Hz, -CH<sup>13</sup>CN)

Isomère Z (34 %, intégration des signaux RMN <sup>1</sup>H) : 1,60 (s, 3H, Z-CH<sub>3</sub>) ; 1,67 (s, 3H, E-CH<sub>3</sub>) ; 1,89 (s, 3H, -CCH<sub>3</sub>) ; 2,17 (m, 2H, -CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 2,41 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>= 7,6 Hz, -CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 5,00 (m, 1H, -CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 5,08 (d, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HC</sub>= 1,1 Hz, -CH<sup>13</sup>CN)

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub> – 75 MHz)** : Isomère E : 17,6 (Z-CH<sub>3</sub>) ; 21,0 (d, <sup>3</sup>J<sub>CC</sub>= 4,3 Hz, -CCH<sub>3</sub>) ; 25,6 (E-CH<sub>3</sub>) ; 25,6 (-CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 38,5 (d, <sup>3</sup>J<sub>CC</sub>= 6,8 Hz, -CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 95,7 (d, <sup>1</sup>J<sub>CC</sub>= 78,3 Hz, -CH<sup>13</sup>CN) ; 117,2 (-<sup>13</sup>CN) ; 122,1 (-CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 133,1 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ; 164,9 (-CH<sub>2</sub>CCH<sub>3</sub>)

Isomère Z : 17,6 (Z-CH<sub>3</sub>) ; 22,9 (d, <sup>3</sup>J<sub>CC</sub>= 8,0 Hz, -CCH<sub>3</sub>) ; 25,6 (E-CH<sub>3</sub>) ; 26,1 (-CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 36,2 (d, <sup>3</sup>J<sub>CC</sub>= 3,1 Hz, -CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 96,2 (d, <sup>1</sup>J<sub>CC</sub>= 78,3 Hz, -CH<sup>13</sup>CN) ; 116,9 (-<sup>13</sup>CN) ; 122,1 (-CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 133,2 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ; 165,1 (-CH<sub>2</sub>CCH<sub>3</sub>)

### 1-[<sup>13</sup>C]-Citral, 1-[<sup>13</sup>C]-31



Dans un bicol sec et sous argon, une solution de 1-[<sup>13</sup>C]-3,7-diméthyl-2,6-diène-1-nitrile 1-[<sup>13</sup>C]-**37** (866 mg ; 5,76 mmol) dans du dichlorométhane fraîchement distillé (50 mL) est

refroidie à  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Une solution d'hydrure de diisobutylaluminium (1 M dans le dichlorométhane ; 11,53 mL ; 11,53 mmol ; 2 éq.) est ajoutée lentement. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 heures puis est hydrolysé avec une solution de tampon tartrique (60 mL) et laissé agiter pendant 12 heures. La phase aqueuse est ensuite extraite au dichlorométhane ( $3 \times 50\text{ mL}$ ). Les phases organiques rassemblées sont lavées avec une solution saturée de chlorure de sodium (100 mL), séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et concentrées sous pression réduite. Le citral 1- $^{13}\text{C}$ -**31** est purifié par chromatographie sur gel de silice (pentane/ $\text{Et}_2\text{O}$  : 9/1) et est obtenu sous forme d'une huile jaune (587 mg ; 3,83 mmol ; rendement : 67 %).

$^{13}\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}$  ; MM = 153,23 g.mol $^{-1}$

Numéro de registre CAS : (E) 105176-00-9

(Z) 105176-02-1

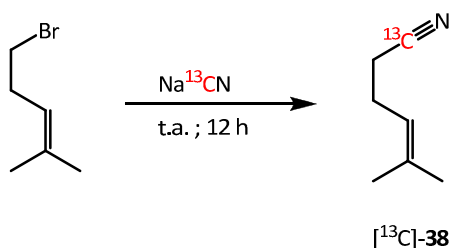
CCM – silice : Rf = 0,38 (pentane/ $\text{Et}_2\text{O}$  : 8/2)

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$  – 300 MHz)** : Isomère E (66 %, intégration des signaux RMN  $^1\text{H}$ ) : 1,57 (s, 3H, Z- $\text{CH}_3$ ) ; 1,64 (s, 3H, E- $\text{CH}_3$ ) ; 2,13 (m, 5H,  $-\text{CCH}_3$  et  $-\text{CHCH}_2\text{CH}_2-$ ) ; 2,19 (m, 2H,  $-\text{CHCH}_2\text{CH}_2-$ ) ; 5,03 (m, 1H,  $-\text{CHCH}_2\text{CH}_2-$ ) ; 5,82 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 9,0\text{ Hz}$ ,  $-\text{CH}^{13}\text{CHO}$ ) ; 9,68 (dd, 1H,  $^1J_{\text{HC}} = 169,3\text{ Hz}$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 8,0\text{ Hz}$ ,  $^{-13}\text{CHO}$ )

Isomère Z (34 %, intégration des signaux RMN  $^1\text{H}$ ) : 1,55 (s, 3H, Z- $\text{CH}_3$ ) ; 1,64 (s, 3H, E- $\text{CH}_3$ ) ; 1,94 (d, 3H,  $^4J_{\text{HH}} = 0,9\text{ Hz}$ ,  $-\text{CCH}_3$ ) ; 2,13 (m, 2H,  $-\text{CHCH}_2\text{CH}_2-$ ) ; 2,19 (m, 2H,  $-\text{CHCH}_2\text{CH}_2-$ ) ; 5,05 (m, 1H,  $-\text{CHCH}_2\text{CH}_2-$ ) ; 5,85 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 9,0\text{ Hz}$ ,  $-\text{CH}^{13}\text{CHO}$ ) ; 9,58 (dd, 1H,  $^1J_{\text{HC}} = 169,7\text{ Hz}$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 8,3\text{ Hz}$ ,  $^{-13}\text{CHO}$ )

**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$  – 75 MHz)** : Isomère E : 17,5 (d,  $^3J_{\text{CC}} = 4,9\text{ Hz}$ ,  $-\text{CCH}_3$ ) ; 17,6 ( $-\text{CH}_3$ ) ; 25,6 ( $-\text{CH}_3$ ) ; 26,9 ( $-\text{CHCH}_2\text{CH}_2-$ ) ; 40,6 (d,  $^2J_{\text{CC}} = 5,5\text{ Hz}$ ,  $-\text{CHCH}_2\text{CH}_2-$ ) ; 122,2 ( $-\text{CHCH}_2\text{CH}_2-$ ) ; 127,7 (d,  $^1J_{\text{CC}} = 55,5\text{ Hz}$ ,  $-\text{CH}^{13}\text{CHO}$ ) ; 132,8 ( $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ) ; 163,7 ( $-\text{CH}_2\text{CCH}_3$ ) ; 191,2 ( $^{-13}\text{CHO}$ )

Isomère Z : 17,6 ( $-\text{CH}_3$ ) ; 25,0 (d,  $^3J_{\text{CC}} = 5,6\text{ Hz}$ ,  $-\text{CCH}_3$ ) ; 25,6 ( $-\text{CH}_3$ ) ; 25,6 ( $-\text{CHCH}_2\text{CH}_2-$ ) ; 32,5 (d,  $^2J_{\text{CC}} = 3,7\text{ Hz}$ ,  $-\text{CHCH}_2\text{CH}_2-$ ) ; 122,5 ( $-\text{CHCH}_2\text{CH}_2-$ ) ; 128,9 (d,  $^1J_{\text{CC}} = 55,5\text{ Hz}$ ,  $-\text{CH}^{13}\text{CHO}$ ) ; 133,6 ( $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ) ; 163,7 ( $-\text{CH}_2\text{CCH}_3$ ) ; 191,2 ( $^{-13}\text{CHO}$ )

1-<sup>13</sup>C]-5-Méthylhex-4-èn-1-nitrile, 1-<sup>13</sup>C]-38

Dans un bicol sec et sous argon, une solution de 5-bromo-2-méthyl-2-pentène (1,66 g ; 1,37 mL ; 9,9 mmol) dans du diméthylformamide fraîchement distillé (10 mL) est additionnée à température ambiante à une suspension de cyanure de sodium marqué au carbone 13 (500 mg ; 9,9 mmol, 1 éq.) dans du diméthylformamide fraîchement distillé (20 mL). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation durant 12 heures. Après hydrolyse à l'eau (60 mL), la phase aqueuse est extraite au pentane (3 × 50 mL). Les phases organiques rassemblées sont lavées avec une solution saturée de chlorure de sodium (100 mL), séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et concentrées sous pression réduite à froid. Le 1-<sup>13</sup>C]-5-méthylhex-4-èn-1-nitrile, 1-<sup>13</sup>C]-38, est purifié par chromatographie sur gel de silice (pentane/Et<sub>2</sub>O : 9/1) et est obtenu sous forme d'une huile incolore (963 mg ; 8,74 mmol ; rendement : 88 %).

<sup>13</sup>CC<sub>6</sub>H<sub>11</sub>N ; MM = 110,17 g.mol<sup>-1</sup>

Numéro de registre CAS : 125095-55-8

CCM – silice : R<sub>f</sub> = 0,27 (pentane/Et<sub>2</sub>O : 95/5)

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub> – 300 MHz) : 1,60 (s, 3H, E-CH<sub>3</sub>) ; 1,68 (s, 3H, Z-CH<sub>3</sub>) ; 2,28 (m, 4H, -CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 5,09 (m, 1H, -CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub> – 75 MHz) : 17,4 (d, <sup>1</sup>J<sub>CC</sub> = 55,5 Hz, -CH<sub>2</sub><sup>13</sup>CN) ; 17,6 (Z-CH<sub>3</sub>) ; 23,9 (d, <sup>2</sup>J<sub>CC</sub> = 1,9 Hz, -CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>) ; 25,4 (E-CH<sub>3</sub>) ; 119,5 (-<sup>13</sup>CN) ; 120,1 (d, <sup>3</sup>J<sub>CC</sub> = 3,1 Hz, -CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 135,2 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)



rassemblées sont lavées avec une solution saturée de chlorure de sodium (200 mL), séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et concentrées sous pression réduite à froid. Le 3- $^{13}\text{C}$ -3,7-diméthyl-oct-2,6-diène-1-nitrile, 3- $^{13}\text{C}$ -**37**, est purifié par chromatographie sur gel de silice (pentane/Et<sub>2</sub>O : 95/5) et est obtenu sous forme d'une huile incolore (491 mg ; 3,27 mmol ; rendement : 37 %).

$^{13}\text{C}_9\text{H}_{15}\text{N}$  ; MM = 150,24 g.mol<sup>-1</sup>

CCM – silice : R<sub>f</sub> = 0,40 (pentane/Et<sub>2</sub>O : 95/5)

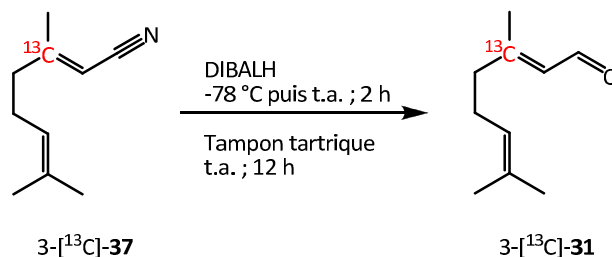
**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub> – 300 MHz)** : Isomère E (65 %, intégration des signaux RMN <sup>1</sup>H) : 1,57 (s, 3H, Z-CH<sub>3</sub>) ; 1,65 (s, 3H, E-CH<sub>3</sub>) ; 2,00 (d, 3H, <sup>2</sup>J<sub>HC</sub> = 6,2 Hz, -<sup>13</sup>CCH<sub>3</sub>) ; 2,15 (m, 4H, -CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 4,99 (m, 1H, -CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 5,07 (m, 1H, -CHCN)

Isomère Z (35 %, intégration des signaux RMN <sup>1</sup>H) : 1,59 (s, 3H, Z-CH<sub>3</sub>) ; 1,65 (s, 3H, E-CH<sub>3</sub>) ; 1,86 (d, 3H, <sup>2</sup>J<sub>HC</sub> = 6,6 Hz, -<sup>13</sup>CCH<sub>3</sub>) ; 2,15 (m, 2H, -CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 2,38 (m, 2H, -CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 4,99 (m, 1H, -CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 5,07 (m, 1H, -CHCN)

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub> – 75 MHz)** : Isomère E : 17,6 (Z-CH<sub>3</sub>) ; 21,0 (d, <sup>1</sup>J<sub>CC</sub> = 40,7 Hz, -<sup>13</sup>CCH<sub>3</sub>) ; 22,5 (E-CH<sub>3</sub>) ; 25,5 (-CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 38,2 (d, <sup>1</sup>J<sub>CC</sub> = 40,0 Hz, -CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 94,6 (d, <sup>1</sup>J<sub>CC</sub> = 74,0 Hz, -CHCN) ; 117,1 (-CN) ; 122,1 (-CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 133,0 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ; 164,9 (-CH<sub>2</sub><sup>13</sup>CCH<sub>3</sub>)

Isomère Z : 17,6 (Z-CH<sub>3</sub>) ; 21,4 (d, <sup>1</sup>J<sub>CC</sub> = 41,3 Hz, -<sup>13</sup>CCH<sub>3</sub>) ; 22,5 (E-CH<sub>3</sub>) ; 26,0 (-CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 35,9 (d, <sup>1</sup>J<sub>CC</sub> = 40,1 Hz, -CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 95,6 (d, <sup>1</sup>J<sub>CC</sub> = 73,4 Hz, -CHCN) ; 117,0 (-CN) ; 122,1 (-CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 133,0 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ; 164,9 (-CH<sub>2</sub><sup>13</sup>CCH<sub>3</sub>)



3-<sup>13</sup>C]-Citral, 3-<sup>13</sup>C]-31

Dans un bicol sec et sous argon, une solution de 3-<sup>13</sup>C]-3,7-diméthyl-2,6-diène-1-nitrile 3-<sup>13</sup>C]-**37** (491 mg, 3,27 mmol) dans du dichlorométhane anhydre (40 mL) est refroidie à -78 °C. Une solution d'hydrure de diisobutylaluminium (1 M dans le dichlorométhane ; 6,23 mL ; 6,23 mmol ; 2 équ.) est ajoutée lentement. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 heures puis hydrolysé avec une solution de tampon tartrique (9 mL) et laissé sous agitation durant 12 heures. La phase aqueuse est extraite au dichlorométhane (3 × 50 mL) et toutes les phases organiques sont lavées avec une solution saturée de chlorure de sodium (50 mL), séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et concentrées sous pression réduite. Le citral 3-<sup>13</sup>C]-**31** est purifié par chromatographie sur colonne de silice (pentane/Et<sub>2</sub>O : 9/1) et est obtenu sous forme d'une huile jaune (356 mg ; 2,31 mmol ; rendement 71 %).

<sup>13</sup>CC<sub>9</sub>H<sub>16</sub>O ; MM = 153,23 g.mol<sup>-1</sup>

CCM – silice : R<sub>f</sub> = 0,36 (pentane/Et<sub>2</sub>O : 8/2)

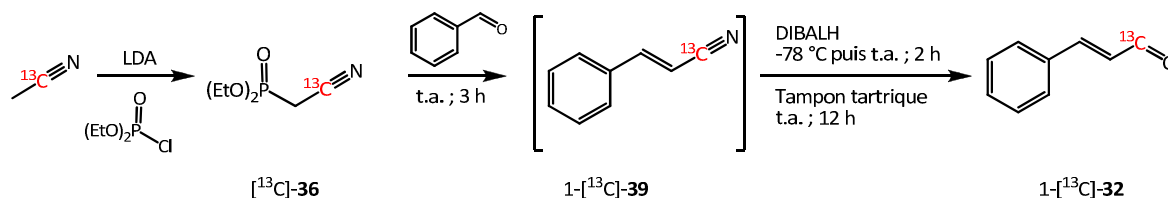
**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub> – 300 MHz) :** Isomère E (65 %, intégration des signaux RMN <sup>1</sup>H) : 1,59 (s, 3H, Z-CH<sub>3</sub>) ; 1,67 (s, 3H, E-CH<sub>3</sub>) ; 2,14 (dd, 3H, <sup>2</sup>J<sub>HC</sub> = 6,2 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1,3 Hz, <sup>13</sup>CCH<sub>3</sub>) ; 2,21 (m, 4H, -CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 5,05 (m, 1H, -CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 5,85 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,0 Hz, -CHCHO) ; 9,96 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,0 Hz, -CHO)

Isomère Z (35 %, intégration des signaux RMN <sup>1</sup>H) : 1,58 (s, 3H, Z-CH<sub>3</sub>) ; 1,67 (s, 3H, E-CH<sub>3</sub>) ; 1,96 (dd, 3H, <sup>2</sup>J<sub>HC</sub> = 6,4 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1,3 Hz, <sup>13</sup>CCH<sub>3</sub>) ; 2,21 (m, 2H, -CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 2,56 (m, 2H,

-CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 5,08 (m, 1H, -CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 5,85 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>= 8,0 Hz, -CHCHO) ; 9,87 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>= 8,2 Hz, -CHO)

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub> – 75 MHz) :** Isomère E : 17,4 (d, <sup>1</sup>J<sub>CC</sub>= 39,7 Hz, -<sup>13</sup>CCH<sub>3</sub>) ; 17,5 (Z-CH<sub>3</sub>) ; 25,6 (E-CH<sub>3</sub> et -CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 40,3 (d, <sup>1</sup>J<sub>CC</sub>= 39,5 Hz, -CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 122,5 (d, <sup>3</sup>J<sub>CC</sub>= 3,1 Hz, -CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 126,9 (d, <sup>1</sup>J<sub>CC</sub>= 67,2 Hz, -CHCHO) ; 132,9 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ; 163,8 (-CH<sub>2</sub><sup>13</sup>CCH<sub>3</sub>) ; 191,3 (-CHO)

Isomère Z : 17,5 (Z-CH<sub>3</sub>) ; 24,8 (d, <sup>1</sup>J<sub>CC</sub>= 40,1 Hz, -<sup>13</sup>CCH<sub>3</sub>) ; 25,6 (E-CH<sub>3</sub>) ; 25,7 (-CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 32,8 (d, <sup>1</sup>J<sub>CC</sub>= 38,8 Hz, -CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 122,2 (d, <sup>3</sup>J<sub>CC</sub>= 2,5 Hz, -CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ; 128,2 (d, <sup>1</sup>J<sub>CC</sub>= 66,6 Hz, -CHCHO) ; 133,6 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ; 163,8 (-CH<sub>2</sub><sup>13</sup>CCH<sub>3</sub>) ; 190,8 (-CHO)

Synthèse du 1-<sup>13</sup>C]- et du 3-<sup>13</sup>C]-aldéhyde cinnamique, 1-<sup>13</sup>C]-32 et 3-<sup>13</sup>C]-321-<sup>13</sup>C]-Aldéhyde cinnamique, 1-<sup>13</sup>C]-32

Dans un bicol sec et sous argon, une solution de diisopropylamine distillée (1,06 mL ; 7,52 mmol ; 4 éq.) dans du tétrahydrofurane anhydre (6 mL) est refroidie à -20 °C. Du *n*-butyllithium (1,64 M dans l'hexane ; 4,59 mL ; 7,52 mmol ; 4 éq.) est additionné au goutte à goutte. Le milieu est laissé sous agitation pendant 30 minutes, puis la température est amenée à -70 °C. Une solution d'acétonitrile marqué au carbone 13 en position 1 (197 µL ; 3,76 mmol ; 2 éq.) dans du tétrahydrofurane anhydre (3 mL) est ajoutée en une fois. Après 30 minutes d'agitation à -70 °C, la température du milieu est ramenée à 0 °C et une solution de chlorophosphonate de diéthyle (575 µL ; 3,76 mmol ; 2 éq.) dans du tétrahydrofurane anhydre (3 mL) est ajoutée lentement. Le milieu est agité pendant 1 heure à 0 °C puis une solution de benzaldéhyde, distillé, au préalable (192 µL ; 1,88 mmol) dans du tétrahydrofurane anhydre (3 mL) est ajoutée en une seule fois. Le milieu réactionnel est alors agité à température ambiante pendant 3 heures. La réaction est ensuite hydrolysée par ajout d'eau (30 mL). La phase aqueuse est extraite avec de l'éther diéthylique (3 × 30 mL), les phases organiques rassemblées sont lavées avec de la saumure (50 mL), séchées sur sulfate de magnésium et concentrées sous pression réduite.

Le brut réactionnel obtenu, sous forme d'huile et contenant le cinnamonitrile 1-<sup>13</sup>C]-39, est utilisé tel quel pour la suite de la synthèse.

Dans un bicol sec et sous argon, le brut réactionnel obtenu précédemment est dilué dans du dichlorométhane anhydre (20 mL). De l'hydrure de diisobutylaluminium (1 M dans

l'hexane ; 7,52 mL ; 7,52 mmol ; 4 éq.) est ajouté au goutte à goutte à -78 °C. Après 15 minutes d'agitation à cette température, celle-ci est remontée à température ambiante. Après 2 heures supplémentaires d'agitation à température ambiante, du tampon tartrique (45 mL) est ajouté lentement puis le milieu est encore laissé sous agitation pendant 12 heures. Par la suite, le milieu est extrait au dichlorométhane (4 × 20 mL), les phases organiques réunies sont lavées avec de la saumure (60 mL), séchées sur sulfate de magnésium et concentrées sous pression réduite à froid. Le brut obtenu est purifié par distillation sous pression réduite (90 °C à 4 mbars) pour obtenir l'aldéhyde cinnamique 1-<sup>13</sup>C]-**32** sous forme d'une huile jaune (177 mg ; 1,34 mmol ; rendement : 71 %).

<sup>13</sup>CC<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O ; MM = 133,16 g.mol<sup>-1</sup>

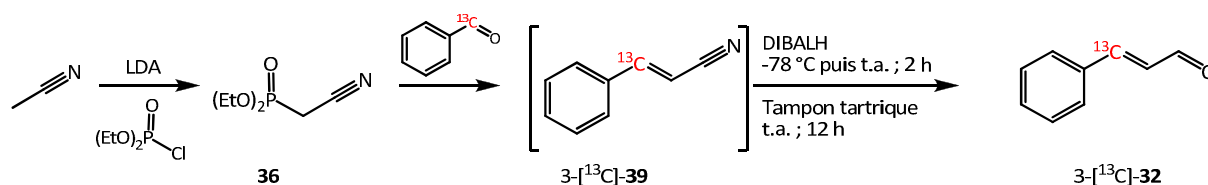
CCM – silice : R<sub>f</sub> = 0,20 (pentane/Et<sub>2</sub>O : 9/1)

Seul l'isomère E a été détecté par RMN lors de cette synthèse.

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub> – 300 MHz) :** Isomère E : 6,68 (ddd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 15,8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,5 Hz, <sup>2</sup>J<sub>HC</sub> = 1,2 Hz, -CH<sup>13</sup>CHO) ; 7,40 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 15,8 Hz, -CHCH<sup>13</sup>CHO) ; 7,39-7,49 (m, 3H, 2 × *m*-CH(Ar) et *p*-CH(Ar)) ; 7,51-7,55 (m, 2H, 2 × *o*-CH(Ar)) ; 9,67 (dd, 1H, <sup>1</sup>J<sub>HC</sub> = 172,0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,5 Hz, -<sup>13</sup>CHO)

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub> – 75 MHz) :** Isomère E : 128,5 (2 × *o*-CH(Ar)) ; 129,1 (*m*-CH(Ar)) ; 131,3 (*p*-CH(Ar)) ; 134,0 (-C(Ar)) ; 144,1 (-CH<sup>13</sup>CHO) ; 152,8 (-CHCH<sup>13</sup>CHO) ; 193,7 (-<sup>13</sup>CHO)

### 3-[<sup>13</sup>C]-Aldéhyde cinnamique, 3-[<sup>13</sup>C]-**32**



Même mode opératoire que celui utilisé pour la synthèse du 1-[<sup>13</sup>C]-aldéhyde cinnamique 1-[<sup>13</sup>C]-**32**, en utilisant 2,56 mL de diisopropylamine distillée (18,3 mmol ; 4 éq.), 30 mL de

tétrahydrofurane anhydre, 11,40 mL de *n*-butyllithium (1,60 M dans l'hexane ; 18,3 mmol ; 4 équ.), 478  $\mu$ L d'acétonitrile anhydre (9,15 mmol ; 2 équ.), 1,40 mL de chlorophosphonate de diéthyle (9,15 mmol ; 2 équ.), 479 mL de 1- $^{13}\text{C}$ -benzaldéhyde (98 % ; 4,57 mmol), 50 mL de dichlorométhane anhydre, 18,3 mL d'hydrure de diisobutylaluminium (1 M dans l'hexane ; 18,4 mmol ; 4 équ.) et 112 mL de tampon tartrique. Le brut de réaction est purifié par distillation sous pression réduite (90 °C à 4 mbars) afin d'obtenir le 3- $^{13}\text{C}$ -aldéhyde cinnamique, 3- $^{13}\text{C}$ -**32**, sous forme d'une huile jaune (265 mg ; 1,99 mmoles ; rendement : 44 %).

$^{13}\text{C}_8\text{H}_8\text{O}$  ; MM = 133,16 g.mol $^{-1}$

CCM – silice : Rf = 0,20 (pentane/Et $_2$ O : 9/1)

**RMN  $^1\text{H}$  (CDCl $_3$  – 300 MHz) :** Isomère E (98 %, intégration des signaux RMN  $^1\text{H}$ ) : 6,69 (dd, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 15,9$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 7,7$  Hz, -CHCHO) ; 7,20 (dd, 1H,  $^1J_{\text{HC}} = 152,2$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 16,3$  Hz,  $^{-13}\text{CHCHCHO}$ ) ; 7,42-7,45 (m, 3H, 2  $\times$  *m*-CH(Ar) et *p*-CH(Ar)) ; 7,55-7,60 (m, 2H, 2  $\times$  *o*-CH(Ar)) ; 9,72 (dd, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7,7$  Hz,  $^4J_{\text{HH}} = 0,9$  Hz, -CHO)

Isomère Z (2 %, intégration des signaux RMN  $^1\text{H}$ ) : 6,16 (dd, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 11,7$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 8,1$  Hz, -CHCHO) ; 7,34 (dd, 1H,  $^1J_{\text{HC}} = 156,8$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 11,5$  Hz,  $^{-13}\text{CHCHCHO}$ ) ; 7,42-7,45 (m, 3H, 2  $\times$  *m*-CH(Ar) et *p*-CH(Ar)) ; 7,55-7,60 (m, 2H, 2  $\times$  *o*-CH(Ar)) ; 9,96 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 8,1$  Hz, -CHO)

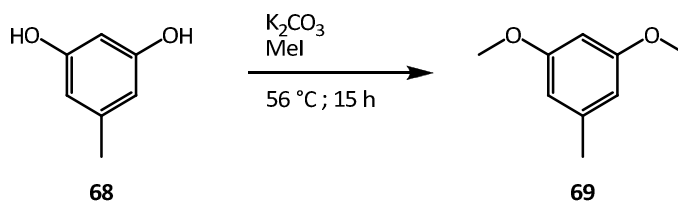
**RMN  $^{13}\text{C}$  (CDCl $_3$  – 75 MHz) :** Isomère E : 128,5 (2  $\times$  *o*-CH(Ar) et *p*-CH(Ar)) ; 129,1 (2  $\times$  *m*-CH(Ar)) ; 131,3 (-CHCHO) ; 133,6 (-C(Ar)) ; 152,8 ( $^{-13}\text{CHCHCHO}$ ) ; 193,7 (-CHO)

Isomère Z : 128,5 (2  $\times$  *o*-CH(Ar) et *p*-CH(Ar)) ; 129,1 (2  $\times$  *m*-CH(Ar)) ; 128,2 (-CHCHO) ; 134,2 (-C(Ar)) ; 146,7 ( $^{-13}\text{CHCHCHO}$ ) ; 193,7 (-CHO)



## Synthèse de l'atranol et du chloroatranol, 66 et 67

## 1,3-Diméthoxy-5-méthylbenzène, 69



Dans un bicol muni d'un réfrigérant, une solution d'orcinol **68** (15 g ; 120,8 mmol) dans de l'acétonitrile (50 mL) est additionnée lentement à une suspension de carbonate de potassium (133 g ; 966 mmol ; 8 éq.) dans de l'acétonitrile (100 mL). Le mélange est alors porté à reflux et est agité pendant une heure. L'iodure de méthyle (51,4 g ; 22,5 mL ; 362 mmol ; 3éq.) est alors ajouté au milieu qui est vigoureusement agité pendant 15 heures. Le milieu est alors refroidi, évaporé à sec et repris dans de l'eau (300 mL) avant d'être extrait avec de l'éther diéthylique (3 x 200 mL). Les phases organiques rassemblées sont alors séchées sur sulfate de magnésium, filtrées puis évaporées sous pression réduite. Le 1,3-diméthoxy-5-méthylbenzène **69** est obtenu par purification par chromatographie sur gel de silice (pentane/ Et<sub>2</sub>O : 9/1) sous la forme d'une huile incolore (17 g ; 111,7 mmol ; rendement : 92 %).

**C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>** ; MM = 152,19 g.mol<sup>-1</sup>

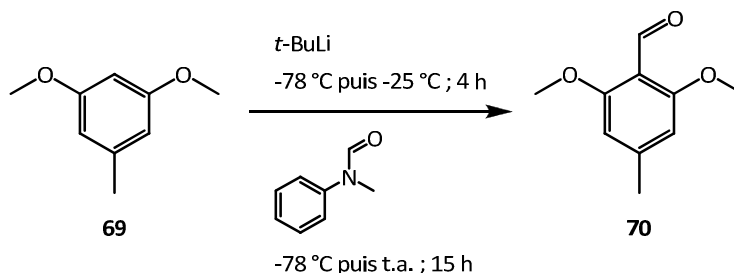
**CCM** – silice : R<sub>f</sub> = 0,79 (pentane/Et<sub>2</sub>O : 7/3)

**Numéro de registre CAS** : 4179-19-5

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub> – 300 MHz)** : 2,37 (s, 3H, ArCH<sub>3</sub>) ; 3,82 (s, 6H, 2 x OCH<sub>3</sub>) ; 6,35 (m, 1H, C<sub>2</sub>-H) ; 6,40 (m, 2H, C<sub>4</sub>-H et C<sub>6</sub>-H)

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub> – 75 MHz)** : 21,6 (ArCH<sub>3</sub>) ; 55,0 (2 x OCH<sub>3</sub>) ; 97,4 (C<sub>2</sub>) ; 106,9 (C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>) ; 140,1 (C<sub>5</sub>) ; 160,6 (C<sub>1</sub>, C<sub>3</sub>)

## 2,6-Diméthoxy-4-méthylbenzaldéhyde, 70



À une solution de 1,3-diméthoxy-5-méthylbenzène **69** (13 g ; 85 mmol) dans de l'éther diéthylique (130 mL) est ajoutée, au goutte à goutte et à -78 °C, une solution de *tertio*-butyllithium (1,7 M ; 100 mL ; 170 mmol ; 2 éq.). La solution est alors agitée à -25 °C pendant 4 heures. Le milieu réactionnel est ensuite ramené à -78 °C avant d'y ajouter du *N*-méthylformanilide (23 g ; 21 mL ; 170 mmol ; 2 éq.) puis laissé sous agitation à température ambiante pendant 15 heures. Une solution d'acide chlorhydrique (3 M ; 100 mL) est ensuite ajoutée lentement à 0 °C. Le milieu est ensuite laissé sous agitation à cette température pendant 2 heures. Après ce temps, la phase aqueuse est séparée par gravitation puis est extraite avec de l'éther diéthylique (3 x 250 mL). Les phases organiques sont alors rassemblées, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées puis évaporées sous pression réduite. Le 2,6-diméthoxy-4-méthylbenzaldéhyde **70** est obtenu par purification par chromatographie sur gel de silice (pentane/ Et<sub>2</sub>O : 8/2) sous la forme d'un solide jaune (9,3 g ; 51,6 mmol ; rendement : 61 %).

**C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>** ; MM = 180,20 g.mol<sup>-1</sup>

**CCM** – silice : R<sub>f</sub> = 0,24 (hexane/AcOEt : 7/3)

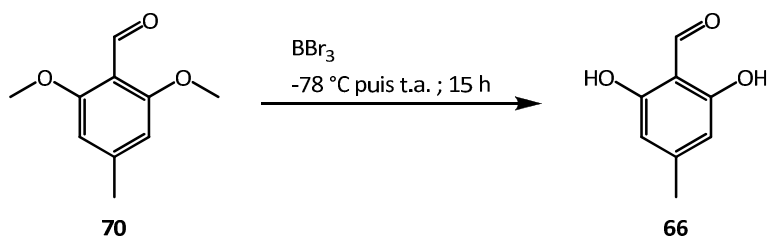
**Numéro de registre CAS** : 6937-96-8

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub> – 300 MHz)** : 2,35 (s, 3H, ArCH<sub>3</sub>) ; 3,85 (s, 6H, 2 x OCH<sub>3</sub>) ; 6,36 (m, 2H, C<sub>3</sub>-H et C<sub>5</sub>-H) ; 10,42 (s, 1H, CHO)

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub> – 75 MHz)** : 22,8 (ArCH<sub>3</sub>) ; 55,9 (2 x OCH<sub>3</sub>) ; 104,6 (C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub>) ; 112,0 (C<sub>1</sub>) ; 147,6 (C<sub>4</sub>) ; 162,2 (C<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>) ; 188,9 (CHO)



## Atranol, 66



À une solution de 2,6-diméthoxy-4-méthylbenzaldéhyde **70** (3,6 g ; 20,0 mmol) dans du dichlorométhane (200 mL) est ajoutée, lentement et à -78 °C, une solution de tribromure de bore (1 M dans le dichlorométhane; 100 mL ; 100 mmol ; 5 éq.). Le milieu est ensuite agité à température ambiante pendant 15 heures. Après ce temps, le milieu réactionnel est hydrolysé avec de l'eau (100 mL) puis extrait avec du dichlorométhane (6 x 50 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées puis évaporées sous pression réduite. L'atranol **66** est obtenu par purification par chromatographie sur gel de silice (pentane/ Et<sub>2</sub>O: 8/2) sous la forme d'un solide jaune (2,3 g ; 15,1 mmol ; rendement : 76 %).

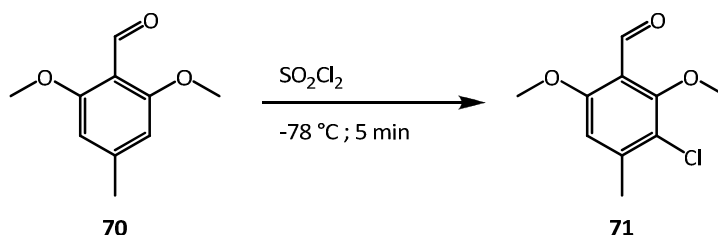
**C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>** ; MM = 152,15 g.mol<sup>-1</sup>

**CCM** – silice : R<sub>f</sub> = 0,31 (pentane/Et<sub>2</sub>O : 7/3)

**Numéro de registre CAS** : 526-37-4

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub> – 300 MHz)** : 2,23 (s, 3H, ArCH<sub>3</sub>) ; 6,22 (s, 2H, C<sub>3</sub>-H et C<sub>5</sub>-H) ; 10,20 (s, 1H, CHO)

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub> – 75 MHz)** : 22,4 (ArCH<sub>3</sub>) ; 108,6 (C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub>) ; 109,2 (C<sub>1</sub>) ; 151,9 (C<sub>4</sub>) ; 162,7 (C<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>) ; 194,4 (CHO)

**3-Chloro-2,6-diméthoxy-4-méthylbenzaldéhyde, 71**

À une solution de 2,6-diméthoxy-4-méthylbenzaldéhyde **70** (4,3 g ; 25,6 mmol) dans du dichlorométhane (115 mL) est ajouté, lentement et à -78 °C, du chlorure de sulfuryle (3,44 g ; 2,1 mL ; 25,6 mmol ; 1 éq.). Le mélange est laissé sous agitation à cette température pendant 5 minutes avant d'être ramené à température ambiante. Une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (40 mL) est alors additionnée au milieu. La phase aqueuse est extraite avec de l'éther diéthylique (3 x 100 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées puis évaporées sous pression réduite. Le 3-chloro-2,6-diméthoxy-4-méthylbenzaldéhyde **71** est obtenu par purification par chromatographie sur gel de silice (pentane/ Et<sub>2</sub>O : 6/4) sous la forme d'un solide jaune (5,2 g ; 24,2 mmol ; rendement : 95 %).

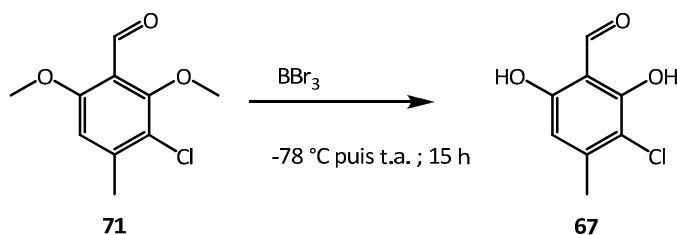
**C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>ClO<sub>3</sub>** ; MM = 214,65 g.mol<sup>-1</sup>

**CCM** – silice : R<sub>f</sub> = 0,32 (hexane/AcOEt : 8/2)

**Numéro de registre CAS** : 251654-48-5

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub> – 300 MHz)** : 2,36 (d, 3H, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 0,5 Hz, ArCH<sub>3</sub>) ; 3,83 (s, 6H, 2 x OCH<sub>3</sub>) ; 6,61 (d, 1H, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 0,5 Hz, C<sub>5</sub>-H) ; 10,30 (s, 1H, CHO)

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub> – 75 MHz)** : 21,4 (ArCH<sub>3</sub>) ; 56,9 (C<sub>2</sub>-OCH<sub>3</sub>) ; 62,7 (C<sub>6</sub>-OCH<sub>3</sub>) ; 111,1 (C<sub>4</sub>) ; 117,9 (C<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>) ; 145,9 (C<sub>3</sub>) ; 158,3 (C<sub>1</sub>) ; 160,9 (C<sub>5</sub>) ; 188,7 (CHO)

Chloroatranol, **67**

Même mode opératoire que celui utilisé pour la synthèse de l'atranol **66** en utilisant 4,3 g (20 mmol) de 3-chloro-2,6-diméthoxy-4-méthylbenzaldéhyde **71**, 100 mL d'une solution 1 M dans du dichlorométhane de tribromure de bore (100 mmol ; 5 équ.), le tout dans 220 mL de dichlorométhane. Le chloroatranol est obtenu par purification par chromatographie sur gel de silice (pentane/ Et<sub>2</sub>O : 8/2) sous la forme d'un solide jaune (2,7 g ; 14,5 mmol ; rendement : 72 %).

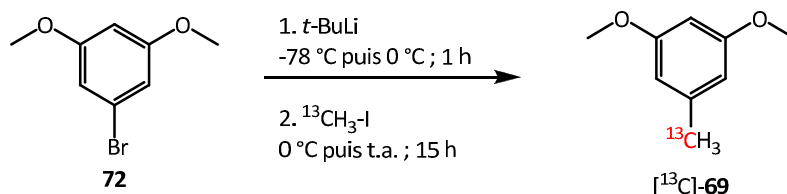
**C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>ClO<sub>3</sub>** ; MM = 186,59 g.mol<sup>-1</sup>

**CCM** – silice : R<sub>f</sub> = 0,31 (hexane/AcOEt : 8/2)

**Numéro de registre CAS** : 57074-21-2

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub> – 300 MHz)** : 2,31 (d, 3H, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 0,5 Hz, ArCH<sub>3</sub>) ; 6,37 (d, 1H, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 0,5 Hz, C<sub>5</sub>-H) ; 9,96 (sl, 2H, 2 x OH) ; 10,19 (s, 1H, CHO)

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub> – 75 MHz)** : 21,3 (ArCH<sub>3</sub>) ; 109,7 (C<sub>4</sub>) ; 109,9 (C<sub>2</sub>) ; 112,1 (C<sub>6</sub>) ; 148,6 (C<sub>5</sub>) ; 158,1 (C<sub>1</sub>) ; 160,3 (C<sub>3</sub>) ; 194,6 (CHO)

Synthèse du [ $^{13}\text{C}$ ]-atranol et du [ $^{13}\text{C}$ ]-chloroatranol, [ $^{13}\text{C}$ ]-66 et [ $^{13}\text{C}$ ]-671,3-Diméthoxy-5- $^{13}\text{C}$ -méthylbenzène, [ $^{13}\text{C}$ ]-69

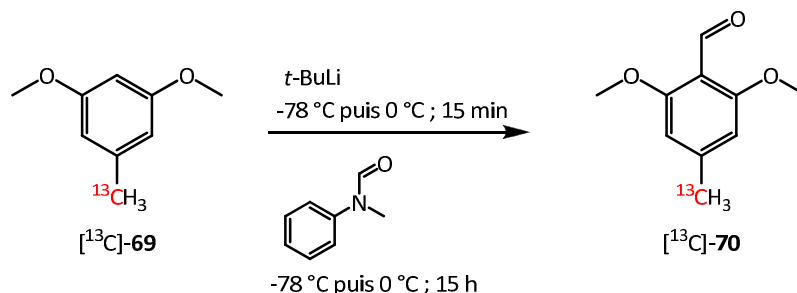
À une solution de 1-bromo-3,5-diméthoxybenzène (1,1 g ; 5,07 mmol) dans de l'éther diéthylique fraîchement distillé (10 mL) est ajoutée, au goutte à goutte et à -78 °C, une solution de *tertio*-butyllithium (1,7 M ; 7,5 mL ; 12,7 mmol ; 2,5 éq.). Le milieu réactionnel est ramené à 0 °C et est laissé sous agitation à cette température pendant 1 heure. Après ce temps, du iodométhane marqué au carbone 13 (1 g ; 6,99 mmol ; 1,4 éq.) est ajouté au goutte à goutte à la solution. Le milieu est ensuite laissé sous agitation à température ambiante pendant 15 heures. Le milieu réactionnel est alors hydrolysé avec de l'eau (50 mL) puis la phase aqueuse est extraite avec de l'éther diéthylique (3 x 25 mL). Les phases organiques sont alors rassemblées, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées puis évaporées sous pression réduite. Le 1,3-diméthoxy-5- $^{13}\text{C}$ -méthylbenzène [ $^{13}\text{C}$ ]-69 est obtenu par purification par chromatographie sur gel de silice (pentane/ $\text{Et}_2\text{O}$  : 8/2) sous la forme d'une huile incolore (758 mg ; 4,95 mmol ; rendement : 98 %).

$^{13}\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_2$  ; MM = 153,19 g.mol $^{-1}$

CCM – silice : Rf = 0,79 (pentane/ $\text{Et}_2\text{O}$  : 7/3)

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$  – 300 MHz) : 2,31 (d, 3H,  $^1J_{\text{HC}} = 127,2$  Hz,  $\text{Ar}^{13}\text{CH}_3$ ) ; 3,78 (s, 6H, 2 x  $\text{OCH}_3$ ) ; 6,26 (m, 1H,  $\text{C}_2\text{-H}$ ) ; 6,29 (m, 2H,  $\text{C}_4\text{-H}$  et  $\text{C}_6\text{-H}$ )

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$  – 75 MHz) : 22,0 ( $\text{Ar}^{13}\text{CH}_3$ ) ; 55,5 (2 x  $\text{OCH}_3$ ) ; 98,0 ( $\text{C}_2$ ) ; 107,3 (d,  $^2J_{\text{CC}} = 5,7$  Hz,  $\text{C}_4$ ,  $\text{C}_6$ ) ; 139,0 (d,  $^1J_{\text{CC}} = 43,2$  Hz,  $\text{C}_5$ ) ; 162,0 (d,  $^3J_{\text{CC}} = 3,1$  Hz,  $\text{C}_1$ ,  $\text{C}_3$ )

2,6-Diméthoxy-4-<sup>13</sup>C-méthylbenzaldéhyde, [<sup>13</sup>C]-70

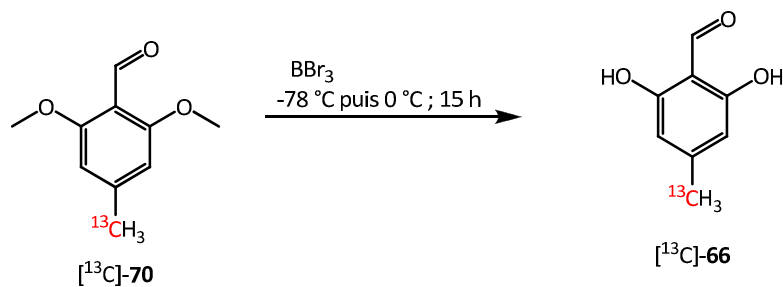
Même mode opératoire que pour la synthèse du 2,6-diméthoxy-4-méthylbenzaldéhyde **70** en utilisant 758 mg (4,95 mmol) de 1,3-diméthoxy-5-<sup>13</sup>C-méthylbenzène [<sup>13</sup>C]-**69**, 5,8 mL d'une solution de *tertio*-butyllithium (1,7 M; 9,9 mmol; 2 éq.) et 1,22 mL de *N*-méthylformanilide (1,34 g; 9,9 mmol; 2 éq.). Le 2,6-diméthoxy-4-<sup>13</sup>C-méthylbenzaldéhyde [<sup>13</sup>C]-**70** est obtenu par purification par chromatographie sur gel de silice (pentane/ Et<sub>2</sub>O : 8/2) sous la forme d'un solide jaune (610 mg; 3,36 mmol ; rendement : 68 %).

<sup>13</sup>CC<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub> ; MM = 181,20 g.mol<sup>-1</sup>

CCM – silice : R<sub>f</sub> = 0,24 (hexane/AcOEt : 7/3)

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub> – 300 MHz) : 2,59 (d, 3H, <sup>1</sup>J<sub>HC</sub> = 127,9 Hz, Ar<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>) ; 3,85 (s, 6H, 2 x OCH<sub>3</sub>) ; 6,58 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HC</sub> = 4,6 Hz, C<sub>3</sub>-H et C<sub>5</sub>-H) ; 10,37 (s, 1H, CHO)

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub> – 75 MHz) : 22,8 (Ar<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>) ; 55,9 (2 x OCH<sub>3</sub>) ; 104,6 (d, <sup>2</sup>J<sub>CC</sub> = 5,7 Hz, C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub>) ; 117,0 (C<sub>1</sub>) ; 147,6 (d, <sup>1</sup>J<sub>CC</sub> = 42,7 Hz, C<sub>4</sub>) ; 162,2 (C<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>) ; 188,9 (CHO)

**[<sup>13</sup>C]-Atranol, [<sup>13</sup>C]-66**

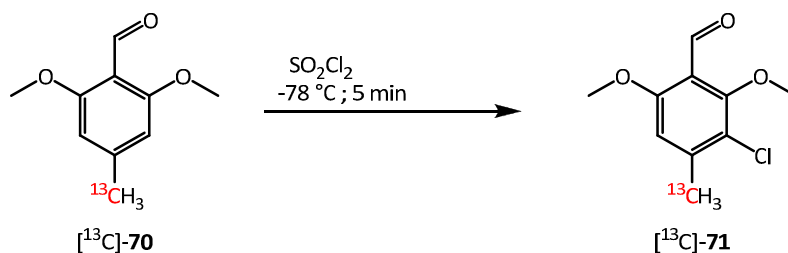
Même mode opératoire que pour la synthèse de l'atranol **66** en utilisant 310 mg (1,71 mmol) de 2,6-diméthoxy-4-[<sup>13</sup>C]-méthylbenzaldéhyde [<sup>13</sup>C]-**70** et 8,5 mL d'une solution de tribromure de bore (8,55 mmol ; 5 équ.). L'atranol [<sup>13</sup>C]-**66** est obtenu par purification par chromatographie sur gel de silice (pentane/ Et<sub>2</sub>O: 8/2) sous la forme d'un solide jaune (196 mg ; 1,28 mmol ; rendement : 75 %).

<sup>13</sup>CC<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub> ; MM = 153,15 g.mol<sup>-1</sup>

CCM – silice : R<sub>f</sub> = 0,31 (pentane/Et<sub>2</sub>O : 7/3)

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub> – 300 MHz) : 2,23 (d, 3H, <sup>1</sup>J<sub>HC</sub> = 127,3 Hz, Ar<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>) ; 6,22 (d, 2H, <sup>2</sup>J<sub>HC</sub> = 4,6 Hz, C<sub>3</sub>-H et C<sub>5</sub>-H) ; 9,90 (sl, 2H, 2 x OH) ; 10,25 (s, 1H, CHO)

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub> – 75 MHz) : 22,5 (Ar<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>) ; 108,7 (d, <sup>2</sup>J<sub>CC</sub> = 5,7 Hz, C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub>) ; 109,2 (C<sub>1</sub>) ; 151,9 (d, <sup>1</sup>J<sub>CC</sub> = 42,7 Hz, C<sub>4</sub>) ; 162,9 (d, <sup>3</sup>J<sub>CC</sub> = 6,3 Hz, C<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>) ; 194,4 (CHO)

3-Chloro-2,6-diméthoxy-4-[<sup>13</sup>C]-méthylbenzaldéhyde, [<sup>13</sup>C]-71

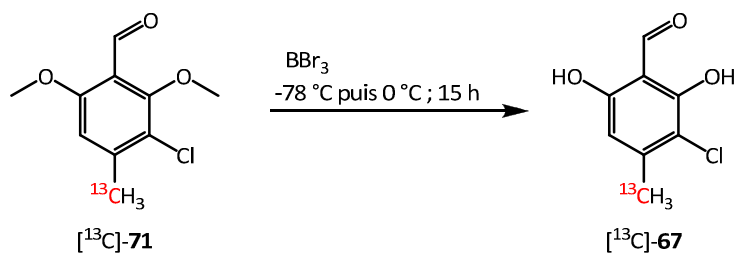
Même mode opératoire que pour la synthèse du 3-chloro-2,6-diméthoxy-4-méthylbenzaldéhyde **71** en utilisant 300 mg (1,65 mmol) de 2,6-diméthoxy-4-[<sup>13</sup>C]-méthylbenzaldéhyde [<sup>13</sup>C]-**70** et 130  $\mu\text{L}$  de chlorure de sulfuryle (223 mg ; 1,65 mmol ; 1 éq.). Le 3-chloro-2,6-diméthoxy-4-[<sup>13</sup>C]-méthylbenzaldéhyde [<sup>13</sup>C]-**71** est obtenu par purification par chromatographie sur gel de silice (pentane/ Et<sub>2</sub>O: 6/4) sous la forme d'un solide jaune (250 mg ; 1,16 mmol ; rendement : 70 %).

<sup>13</sup>CC<sub>9</sub>H<sub>11</sub>ClO<sub>3</sub> ; MM = 215,65 g.mol<sup>-1</sup>

CCM – silice : R<sub>f</sub> = 0,32 (hexane/AcOEt : 8/2)

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub> – 300 MHz) : 2,41 (d, 3H, <sup>1</sup>J<sub>HC</sub> = 129,1 Hz, Ar<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>) ; 3,87 (s, 6H, 2 x OCH<sub>3</sub>) ; 6,64 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HC</sub> = 5,9 Hz, C<sub>5</sub>-H) ; 10,34 (s, 1H, CHO)

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub> – 75 MHz) : 22,5 (Ar<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>) ; 56,8 (C<sub>2</sub>-OCH<sub>3</sub>) ; 62,7 (C<sub>6</sub>-OCH<sub>3</sub>) ; 109,1 (d, <sup>1</sup>J<sub>CC</sub> = 43,7 Hz, C<sub>4</sub>) ; 118,3 (C<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>) ; 139,7 (d, <sup>2</sup>J<sub>CC</sub> = 5,6 Hz, C<sub>3</sub>) ; 158,4 (C<sub>1</sub>) ; 162,9 (d, <sup>2</sup>J<sub>CC</sub> = 5,3 Hz, C<sub>5</sub>) ; 188,7 (CHO)

**[<sup>13</sup>C]-Chloroatranol, [<sup>13</sup>C]-67**

Même mode opératoire que pour la synthèse du [<sup>13</sup>C]-atranol [<sup>13</sup>C]-66 en utilisant 250 mg (1,45 mmol) de 3-chloro-2,6-diméthoxy-4-[<sup>13</sup>C]-méthylbenzaldéhyde [<sup>13</sup>C]-71 et 7,3 mL de tribromure de bore (1 M dans le dichlorométhane; 7,3 mmol ; 5 éq.). Le [<sup>13</sup>C]-chloroatranol [<sup>13</sup>C]-67 est obtenu par purification par chromatographie sur gel de silice (pentane/ Et<sub>2</sub>O: 8/2) sous la forme d'un solide jaune (193 mg ; 1,02 mmol ; rendement : 71 %).

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub> – 300 MHz) :** 2,29 (d, 3H, <sup>1</sup>J<sub>HC</sub> = 130,2 Hz, Ar<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>) ; 6,36 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HC</sub> = 5,9 Hz, C<sub>5</sub>-H) ; 9,95 (sl, 2H, 2 x OH) ; 10,17 (s, 1H, CHO)

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub> – 75 MHz) :** 21,3 (Ar<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>) ; 109,7 (d, <sup>1</sup>J<sub>CC</sub> = 43,7 Hz, C<sub>4</sub>) ; 110,0 (C<sub>2</sub>) ; 112,1 (C<sub>6</sub>) ; 139,7 (d, <sup>2</sup>J<sub>CC</sub> = 5,6 Hz, C<sub>3</sub>) ; 158,4 (C<sub>1</sub>) ; 162,9 (d, <sup>2</sup>J<sub>CC</sub> = 5,3 Hz, C<sub>5</sub>) ; 188,7 (CHO)



## Études de réactivité par RMN

Le tableau ci-dessous récapitule, d'une façon générale, les conditions expérimentales et les quantités de produits utilisées lors des différentes expériences de suivi de réactivité réalisées par RMN.

	Expériences réalisées avec l'haptène 1	Expériences réalisées avec l'haptène 2 seul	Expériences réalisées avec le mélange d'haptènes
Haptène 1	6 $\mu\text{mol}$	-	6 $\mu\text{mol}$
Haptène 2	-	6 $\mu\text{mol}$	6 $\mu\text{mol}$
Peptide	6 $\mu\text{mol}$	6 $\mu\text{mol}$	6 $\mu\text{mol}$
Acétonitrile	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
Eau/Tampon	400 $\mu\text{L}$	400 $\mu\text{L}$	400 $\mu\text{L}$

Le suivi de la réaction a été réalisé par RMN du carbone 13. Ensuite, des expériences de RMN bidimensionnelle  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  (HMBC et HSQC) ont été effectuées afin de déterminer les structures des produits observés.

Les déplacements chimiques du proton ainsi que du carbone 13 (exprimés en ppm) décrits dans cette section sont une compilation des différentes expériences de RMN réalisées sur les échantillons (RMN  $^{13}\text{C}$ , RMN bidimensionnelle  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ , HMBC et HSQC). Lors des études conduites avec des composés contenant deux positions de marquage, pour les produits observés dans les deux cas, les déplacements chimiques décrits tiennent simultanément compte des expériences réalisées avec les deux composés marqués au carbone 13.

Dans un premier temps, les adduits observés lors des études concernant les mélanges d'allergènes seront décrits puis, le cas échéant, les adduits supplémentaires issus de la réactivité de chaque composé seul.

## Réactivité du mélange MI/MCI ( $[^{13}\text{C}]-1/[^{13}\text{C}]-2$ ) vis-à-vis du glutathion

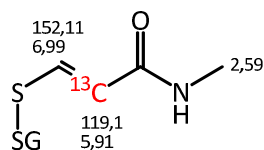
### Conditions expérimentales

MI : 0,7 mg (6  $\mu\text{mol}$ ) ; MCI : 0,9 mg (6  $\mu\text{mol}$ ) ; GSH : 1,8 mg (6  $\mu\text{mol}$ ) ;  $\text{CD}_3\text{CN}$  : 200  $\mu\text{L}$  ;  
 $\text{H}_2\text{O}$  : 400  $\mu\text{L}$ .

Lors de l'étude cinétique, les mêmes conditions expérimentales ont été utilisées en ajoutant 10  $\mu\text{L}$  de *tertio*-butanol, celui-ci servant de référence interne pour les calculs d'intensités relatives.

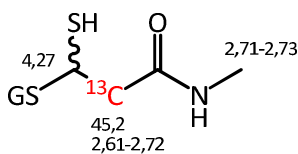
### Adduit issu de la réactivité de MI dans le mélange :

$[^{13}\text{C}]-9$  :

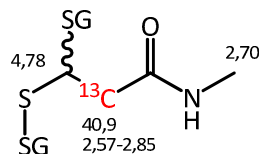


Lorsque MI se trouve seul en solution avec le glutathion, en plus de cet adduit, trois autres composés ont pu être identifiés.

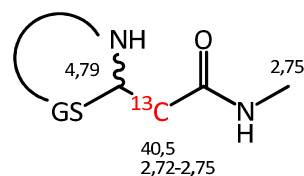
$[^{13}\text{C}]-10$  :

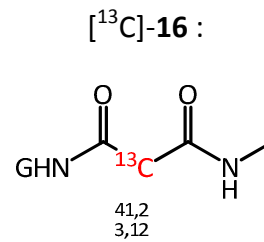
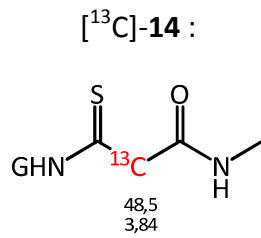


$[^{13}\text{C}]-11$  :

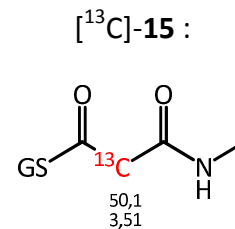
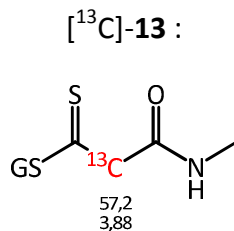


$[^{13}\text{C}]-12$  :



**Adduits issus de la réactivité de MCI dans le mélange :**

Lorsque MCI se trouve seul en solution avec le glutathion, en plus de ces adduits, deux autres composés ont pu être identifiés.

**Réactivité du mélange MI/MCI ( $[^{13}\text{C}]\text{-1}/[^{13}\text{C}]\text{-2}$ ) vis-à-vis du peptide cystéine***Conditions expérimentales*

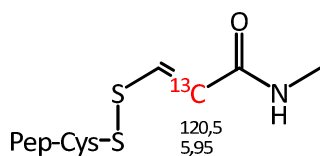
MI : 0,7 mg (6  $\mu\text{mol}$ ) ; MCI : 0,9 mg (6  $\mu\text{mol}$ ) ; Pep-Cys : 4,5 mg (6  $\mu\text{mol}$ ) ;  $\text{CD}_3\text{CN}$  : 200  $\mu\text{L}$  ;  
tampon phosphate pH = 7,4 : 400  $\mu\text{L}$ .

Lors de l'étude cinétique, les mêmes conditions expérimentales ont été utilisées en ajoutant 10  $\mu\text{L}$  de *tertio*-butanol, celui-ci servant de référence interne pour les calculs d'intensités relatives.

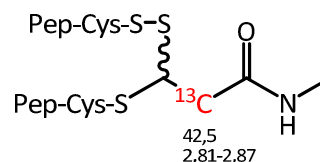
### Adduit issu de la réactivité de MI dans le mélange :

Aucun adduit n'a pu être observé dans ces conditions. Cependant, deux composés ont été identifiés dans le cas où MI se trouve seul en solution avec le peptide cystéine.

[<sup>13</sup>C]-19 :

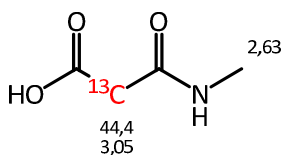


[<sup>13</sup>C]-20 :

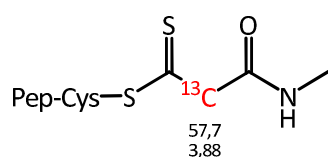
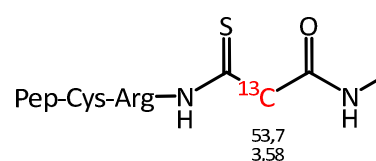
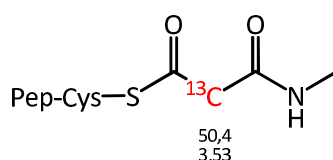
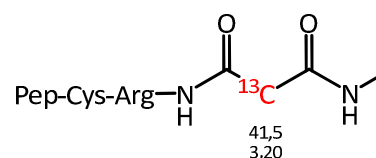


### Adduits issus de la réactivité de MCI dans le mélange :

[<sup>13</sup>C]-25 :



Lorsque MCI se trouve seul en solution avec le peptide cystéine, en plus de ce composé, quatre autres adduits ont pu être identifiés.

$[^{13}\text{C}]$ -21 : $[^{13}\text{C}]$ -22 : $[^{13}\text{C}]$ -23 : $[^{13}\text{C}]$ -24 :

### Réactivité du mélange MI/MCI ( $[^{13}\text{C}]$ -1/ $[^{13}\text{C}]$ -2) vis-à-vis du peptide lysine

#### Conditions expérimentales

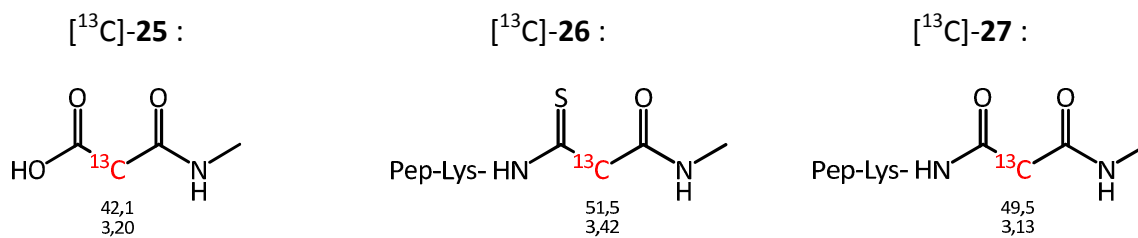
MI : 0,7 mg (6  $\mu\text{mol}$ ) ; MCI : 0,9 mg (6  $\mu\text{mol}$ ) ; Pep-Lys : 4,7 mg (6  $\mu\text{mol}$ ) ;  $\text{CD}_3\text{CN}$  : 200  $\mu\text{L}$  ;  
tampon acétate d'ammonium pH = 10,2 : 400  $\mu\text{L}$ .

Lors de l'étude cinétique, les mêmes conditions expérimentales ont été utilisées en ajoutant 10  $\mu\text{L}$  de *tertio*-butanol, celui-ci servant de référence interne pour les calculs d'intensités relatives.

#### Adduit issu de la réactivité de MI dans le mélange :

Aucun adduit issu de la réactivité de MI n'a été observé dans ces conditions, que ce soit lors de l'étude de la réactivité du mélange MI/MCI ou de celle de MI.

### Adduits issus de la réactivité de MCI dans le mélange :



Ces trois adduits, observés lors de l'étude du mélange, sont les mêmes que ceux observés lorsque MCI se trouve seul en solution avec le peptide lysine. Aucun autre adduit n'a pu être observé dans ces conditions.

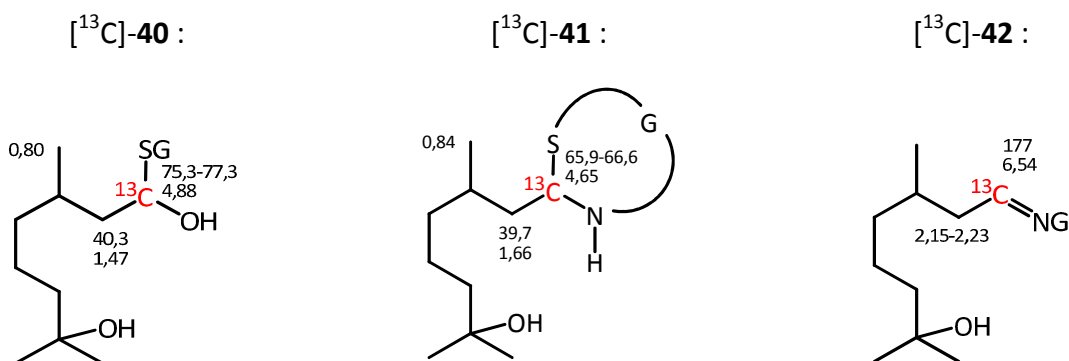
## Réactivité du mélange hydroxycitronellal/citral ( $[^{13}\text{C}]\text{-30}/1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-31}$ et $[^{13}\text{C}]\text{-30}/3\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-31}$ ) vis-à-vis du glutathion

### Conditions expérimentales

Hydroxycitronellal : 1 mg (6  $\mu\text{mol}$ ) ; citral : 0,9 mg (6  $\mu\text{mol}$ ) ; GSH : 1,8 mg (6  $\mu\text{mol}$ ) ;  $\text{CD}_3\text{CN}$  : 200  $\mu\text{L}$  ; eau : 400  $\mu\text{L}$ .

Lors de l'étude cinétique, les mêmes conditions expérimentales ont été utilisées en ajoutant 10  $\mu\text{L}$  de *tertio*-butanol servant de référence interne pour les calculs d'intensités relatives.

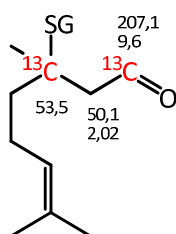
### Adduits issus de la réactivité de l'hydroxycitronellal dans le mélange :



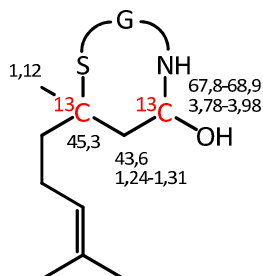
Les trois adduits observés lors de l'étude du mélange sont les mêmes que ceux observés lorsque l'hydroxycitronellal se trouve seul en solution avec le glutathion. Aucun autre adduit n'a pu être observé dans ces conditions.

### Adduits issus de la réactivité du citral dans le mélange :

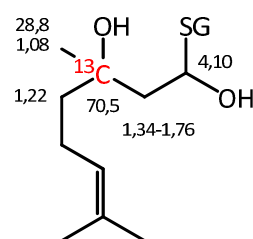
$[^{13}\text{C}]$ -43 :



$[^{13}\text{C}]$ -44 :



3- $[^{13}\text{C}]$ -45 :



Les adduits  $[^{13}\text{C}]$ -43 et  $[^{13}\text{C}]$ -44 ont pu être observés lors des études du mélange  $[^{13}\text{C}]$ -30/1- $[^{13}\text{C}]$ -31 et celles du mélange  $[^{13}\text{C}]$ -30/3- $[^{13}\text{C}]$ -31.

Les trois adduits observés lors de l'étude des mélanges sont les mêmes que ceux observés lorsque le citral se trouve seul en solution avec le glutathion. Aucun autre adduit n'a pu être observé dans ces conditions.

### Réactivité du mélange hydroxycitronellal/aldéhyde cinnamique ( $[^{13}\text{C}]$ -30/1- $[^{13}\text{C}]$ -32 et $[^{13}\text{C}]$ -30/3- $[^{13}\text{C}]$ -32) vis-à-vis du glutathion

#### Conditions expérimentales

Hydroxycitronellal : 1 mg (6  $\mu\text{mol}$ ) ; aldéhyde cinnamique : 0,8 mg (6  $\mu\text{mol}$ ) ; GSH : 1,8 mg (6  $\mu\text{mol}$ ) ;  $\text{CD}_3\text{CN}$  : 200  $\mu\text{L}$  ; eau : 400  $\mu\text{L}$ .

Lors de l'étude cinétique, les mêmes conditions expérimentales ont été utilisées en ajoutant 10  $\mu\text{L}$  de *tertio*-butanol, celui-ci servant de référence interne pour les calculs d'intensités relatives.

### Adduits issus de la réactivité de l'hydroxycitronellal dans le mélange :

Dans ce mélange, les adduits issus de la réactivité de l'hydroxycitronellal  $[^{13}\text{C}]$ -40,  $[^{13}\text{C}]$ -41,  $[^{13}\text{C}]$ -42 ont pu être observés.



### Adduits issus de la réactivité de l'aldéhyde cinnamique dans le mélange :



Les adduits  $[^{13}\text{C}]\text{-48}$  et  $[^{13}\text{C}]\text{-49}$  ont pu être observés lors des études du mélange  $[^{13}\text{C}]\text{-30}/1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-32}$  et celles du mélange  $[^{13}\text{C}]\text{-30}/3\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-32}$ .

Les deux adduits observés lors de l'étude des mélanges sont les mêmes que ceux observés lorsque l'aldéhyde cinnamique se trouve seul en solution avec le glutathion. Aucun autre adduit n'a pu être observé dans ces conditions.

### Réactivité du mélange citral/aldéhyde cinnamique ( $1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-31}/1\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-32}$ et $3\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-31}/3\text{-}[^{13}\text{C}]\text{-32}$ ) vis-à-vis du glutathion

#### Conditions expérimentales

Citral : 0,9 mg (6  $\mu\text{mol}$ ) ; aldéhyde cinnamique : 0,8 mg (6  $\mu\text{mol}$ ) ; GSH : 1,8 mg (6  $\mu\text{mol}$ ) ;  $\text{CD}_3\text{CN}$  : 200  $\mu\text{L}$  ; eau : 400  $\mu\text{L}$ .

Lors de l'étude cinétique, les mêmes conditions expérimentales ont été utilisées en ajoutant 10  $\mu\text{L}$  de *tertio*-butanol, celui-ci servant de référence interne pour les calculs d'intensités relatives.

**Adduits issus de la réactivité du citral dans le mélange :**

Les adduits [<sup>13</sup>C]-**43**, [<sup>13</sup>C]-**44** et 3-[<sup>13</sup>C]-**45** issus de la réactivité du citral ont pu également être observés lors de l'étude de ce mélange.

**Adduits issus de la réactivité de l'aldéhyde cinnamique dans le mélange :**

Les adduits [<sup>13</sup>C]-**48** et [<sup>13</sup>C]-**49** issus de la réactivité de l'aldéhyde cinnamique ont pu également être observés lors de l'étude de ce mélange.

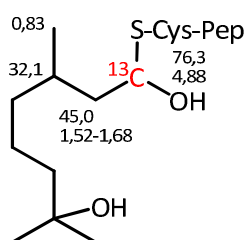
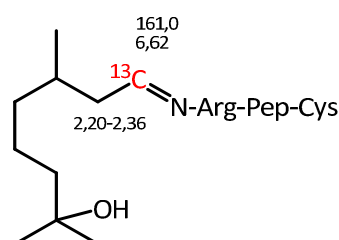
**Réactivité du mélange hydroxycitronellal/citral ([<sup>13</sup>C]-**30**/1-[<sup>13</sup>C]-**31** et [<sup>13</sup>C]-**30**/3-[<sup>13</sup>C]-**31**) vis-à-vis du peptide cystéine***Conditions expérimentales*

Hydroxycitronellal : 1 mg (6 μmol) ; citral : 0,9 mg (6 μmol) ; Pep-Cys : 4,5 mg (6 μmol) ; CD<sub>3</sub>CN : 200 μL ; tampon phosphate pH = 7,4 : 400 μL.

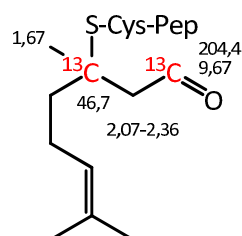
Lors de l'étude cinétique, les mêmes conditions expérimentales ont été utilisées en ajoutant 10 μL de *tertio*-butanol, celui-ci servant de référence interne pour les calculs d'intensités relatives.

**Adduits issus de la réactivité de l'hydroxycitronellal dans le mélange :**

Lors de l'étude de la réactivité de ce mélange, aucun adduit issu de la réactivité de l'hydroxycitronellal n'a pu être détecté. Cependant, lorsque cet aldéhyde se trouve seul avec le peptide cystéine, il mène à la formation de deux adduits.

[<sup>13</sup>C]-50 :[<sup>13</sup>C]-51 :

**Adduit issu de la réactivité du citral dans le mélange :**

[<sup>13</sup>C]-52 :

L'adduit [<sup>13</sup>C]-52 a pu être observé lors de l'étude du mélange [<sup>13</sup>C]-30/1-[<sup>13</sup>C]-31 et celle du mélange [<sup>13</sup>C]-30/3-[<sup>13</sup>C]-31.

Lorsque le citral se trouve seul en solution avec le peptide cystéine, seul l'adduit [<sup>13</sup>C]-52 a pu être observé. Aucune réactivité supplémentaire n'a alors été détectée.

**Réactivité du mélange hydroxycitronellal/aldéhyde cinnamique ([<sup>13</sup>C]-30/1-[<sup>13</sup>C]-32 et [<sup>13</sup>C]-30/3-[<sup>13</sup>C]-32) vis-à-vis du peptide cystéine**

#### *Conditions expérimentales*

Hydroxycitronellal : 1 mg (6 μmol) ; aldéhyde cinnamique : 0,8 mg (6 μmol) ; Pep-Cys : 4,5 mg (6 μmol) ; CD<sub>3</sub>CN : 200 μL ; tampon phosphate pH = 7,4 : 400 μL.

Lors de l'étude cinétique, les mêmes conditions expérimentales ont été utilisées en ajoutant 10  $\mu\text{L}$  de *tertio*-butanol, celui-ci servant de référence interne pour les calculs d'intensités relatives.

### Adduits issus de la réactivité de l'hydroxycitronellal dans le mélange :

Lors de l'étude de la réactivité de ce mélange, aucun adduit issu de la réactivité de l'hydroxycitronellal n'a pu être détecté.

### Adduits issus de la réactivité de l'aldéhyde cinnamique dans le mélange :



Les adduits  $^{13}\text{C}$ -53 et  $^{13}\text{C}$ -54 ont pu être observés lors des études du mélange  $^{13}\text{C}$ -30/1- $^{13}\text{C}$ -32 et celles du mélange  $^{13}\text{C}$ -30/3- $^{13}\text{C}$ -32.

Les deux adduits observés lors de l'étude des mélanges sont les mêmes que ceux observés lorsque l'aldéhyde cinnamique se trouve seul en solution avec le peptide cystéine. Aucun autre adduit n'a pu être observé dans ces conditions.

### Réactivité du mélange citral/aldéhyde cinnamique (1-[<sup>13</sup>C]-31/1-[<sup>13</sup>C]-32 et 3-[<sup>13</sup>C]-31/3-[<sup>13</sup>C]-32) vis-à-vis du peptide cystéine

#### *Conditions expérimentales*

Citral : 0,9 mg (6 μmol) ; aldéhyde cinnamique : 0,8 mg (6 μmol) ; Pep-Cys : 4,5 mg (6 μmol) ; CD<sub>3</sub>CN : 200 μL ; tampon phosphate pH = 7,4 : 400 μL.

Lors de l'étude cinétique, les mêmes conditions expérimentales ont été utilisées en ajoutant 10 μL de *tertio*-butanol, celui-ci servant de référence interne pour les calculs d'intensités relatives.

#### **Adduits issus de la réactivité du citral dans le mélange :**

L'adduit [<sup>13</sup>C]-52 issu de la réactivité du citral a également pu être observé lors de l'étude de ces mélanges.

#### **Adduits issus de la réactivité de l'aldéhyde cinnamique dans le mélange :**

Les adduits [<sup>13</sup>C]-53 et [<sup>13</sup>C]-54 issus de la réactivité de l'aldéhyde cinnamique ont également pu être observés lors de l'étude de ces mélanges.

### Réactivité du mélange hydroxycitronellal/citral ([<sup>13</sup>C]-30/1-[<sup>13</sup>C]-31 et [<sup>13</sup>C]-30/3-[<sup>13</sup>C]-31) vis-à-vis du peptide lysine

#### *Conditions expérimentales*

Hydroxycitronellal : 1 mg (6 μmol) ; citral : 0,9 mg (6 μmol) ; Pep-Lys : 4,7 mg (6 μmol) ; CD<sub>3</sub>CN : 200 μL ; tampon acétate d'ammonium pH = 10,2 : 400 μL.

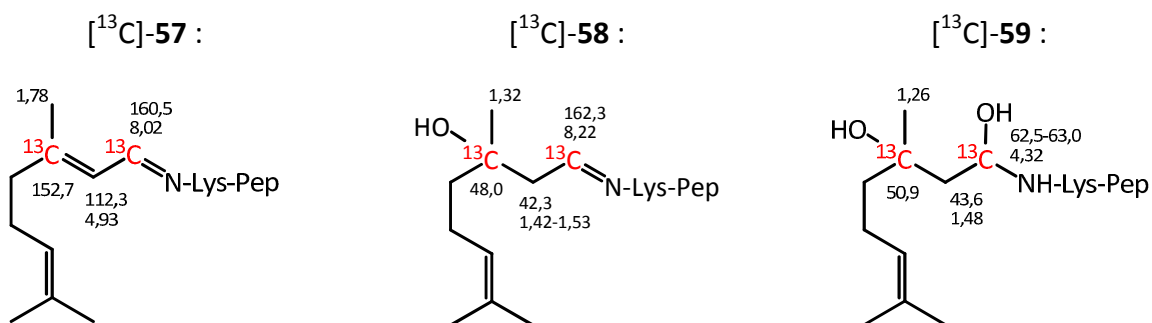
Lors de l'étude cinétique, les mêmes conditions expérimentales ont été utilisées en ajoutant 10  $\mu\text{L}$  de *tertio*-butanol, celui-ci servant de référence interne pour les calculs d'intensités relatives.

**Adduits issus de la réactivité de l'hydroxycitronellal dans le mélange :**



Les deux adduits observés lors de l'étude des mélanges sont les mêmes que ceux observés lorsque l'hydroxycitronellal se trouve seul en solution avec le peptide lysine. Aucun autre adduit n'a pu être observé dans ces conditions.

**Adduits issus de la réactivité du citral dans le mélange :**



Les adduits  $^{13}\text{C}$ -57,  $^{13}\text{C}$ -58 et  $^{13}\text{C}$ -59 ont pu être observés lors des études du mélange  $^{13}\text{C}$ -30/1- $^{13}\text{C}$ -31 et celles du mélange  $^{13}\text{C}$ -30/3- $^{13}\text{C}$ -31.

Les trois adduits observés lors de l'étude des mélanges sont les mêmes que ceux observés lorsque le citral se trouve seul en solution avec le peptide lysine. Aucun autre adduit n'a pu être observé dans ces conditions.

**Réactivité du mélange hydroxycitronellal/aldéhyde cinnamique ( $[^{13}\text{C}]$ -30/ $1$ - $[^{13}\text{C}]$ -32 et  $[^{13}\text{C}]$ -30/ $3$ - $[^{13}\text{C}]$ -32) vis-à-vis du peptide lysine**

*Conditions expérimentales*

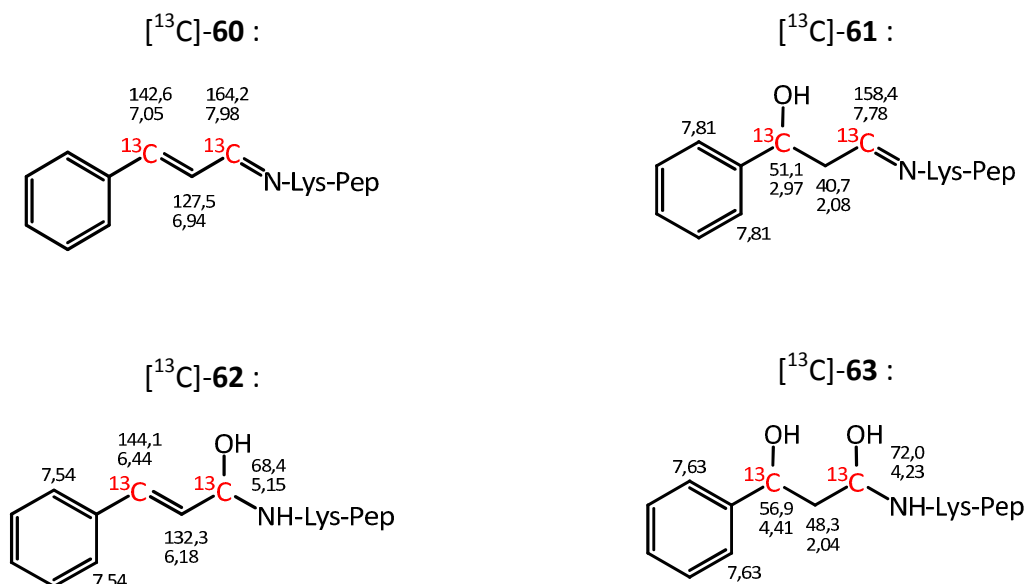
Hydroxycitronellal : 1 mg (6  $\mu\text{mol}$ ) ; aldéhyde cinnamique : 0,8 mg (6  $\mu\text{mol}$ ) ; Pep-Lys : 4,7 mg (6  $\mu\text{mol}$ ) ;  $\text{CD}_3\text{CN}$  : 200  $\mu\text{L}$  ; tampon acétate d'ammonium pH = 10,2 : 400  $\mu\text{L}$ .

Lors de l'étude cinétique, les mêmes conditions expérimentales ont été utilisées en ajoutant 10  $\mu\text{L}$  de *tertio*-butanol, celui-ci servant de référence interne pour les calculs d'intensités relatives.

**Adduits issus de la réactivité de l'hydroxycitronellal dans le mélange :**

Lors de cette étude, seul le composé  $[^{13}\text{C}]$ -55, issu de la réactivité de l'hydroxycitronellal a pu être observé.

### Adduits issus de la réactivité de l'aldéhyde cinnamique dans le mélange :



Les adduits [<sup>13</sup>C]-60, [<sup>13</sup>C]-61, [<sup>13</sup>C]-62 et [<sup>13</sup>C]-63 ont pu être observés lors des études du mélange [<sup>13</sup>C]-30/1-[<sup>13</sup>C]-32 et celles du mélange [<sup>13</sup>C]-30/3-[<sup>13</sup>C]-32.

Les quatre adduits observés lors de l'étude des mélanges sont les mêmes que ceux observés lorsque l'aldéhyde cinnamique se trouve seul en solution avec le peptide lysine. Aucun autre adduit n'a pu être observé dans ces conditions.

### Réactivité du mélange citral/aldéhyde cinnamique (1-[<sup>13</sup>C]-31/1-[<sup>13</sup>C]-32 et 3-[<sup>13</sup>C]-31/3-[<sup>13</sup>C]-32) vis-à-vis du peptide lysine

#### Conditions expérimentales

Citral : 0,9 mg (6 μmol) ; aldéhyde cinnamique : 0,8 mg (6 μmol) ; Pep-Lys : 4,7 mg (6 μmol) ; CD<sub>3</sub>CN : 200 μL ; tampon acétate d'ammonium pH = 10,2 : 400 μL.

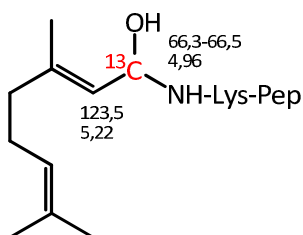
Lors de l'étude cinétique, les mêmes conditions expérimentales ont été utilisées en ajoutant 10 μL de *tertio*-butanol, celui-ci servant de référence interne pour les calculs d'intensités relatives.



### Adduits issus de la réactivité du citral dans le mélange :

Lors de cette étude, en plus des composés [ $^{13}\text{C}$ ]-**57** et [ $^{13}\text{C}$ ]-**58** précédemment décrits, l'adduit 1- $^{13}\text{C}$ -**64** a également pu être observé.

1- $^{13}\text{C}$ -**64** :



### Adduits issus de la réactivité de l'aldéhyde cinnamique dans le mélange :

Lors de cette étude, seuls les adduits [ $^{13}\text{C}$ ]-**60**, [ $^{13}\text{C}$ ]-**62** et [ $^{13}\text{C}$ ]-**63** issus de la réactivité de l'aldéhyde cinnamique ont pu être observés.



## Études de réactivité par spectrométrie de masse

Les conditions expérimentales employées pour les études de réactivité conduites par spectrométrie de masse sont : 6  $\mu\text{mol}$  d'haptène(s) ; 6  $\mu\text{mol}$  de peptide ; 6  $\mu\text{mol}$  de peroxyde d'hydrogène ; 37 unités de peroxydase de raifort ; 200  $\mu\text{L}$  d'acétonitrile ; 370  $\mu\text{L}$  d'eau.

### Réactivité du mélange atranol/chloroatranol (66/67) vis-à-vis du glutathion

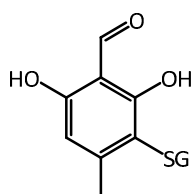
#### Conditions expérimentales

Atranol : 0,9 mg (6  $\mu\text{mol}$ ) ; chloroatranol : 1,1 mg (6  $\mu\text{mol}$ ) ; GSH : 1,8 mg (6  $\mu\text{mol}$ ) ;  $\text{H}_2\text{O}_2$  : 10,2  $\mu\text{L}$  (2 %, 6  $\mu\text{mol}$ ) ; HRP : 18  $\mu\text{L}$  (37 unités, 2000 unités/mL) ;  $\text{CH}_3\text{CN}$  : 200  $\mu\text{L}$  ; eau : 370  $\mu\text{L}$ .

#### Adduits issus de la réactivité de l'atranol dans le mélange :

Aucun adduit issu de la réactivité de l'atranol avec le glutathion n'a pu être observé lors de l'étude de ce mélange. Cependant, un ion moléculaire a été identifié dans le cas où l'atranol se trouve seul en solution avec le glutathion. Celui-ci pourrait correspondre à **82**.

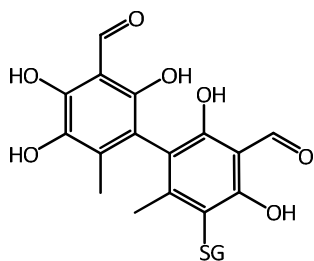
**82 :**



$m/z = 458,12$

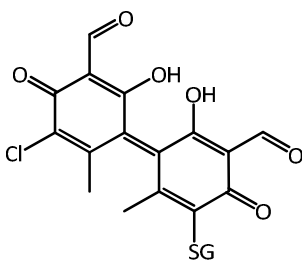
### Adduits issus de la réactivité du chloroatranol dans le mélange :

**83 :**



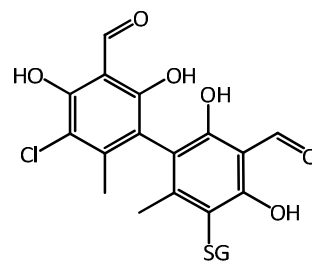
$m/z = 624,10$

**85 :**



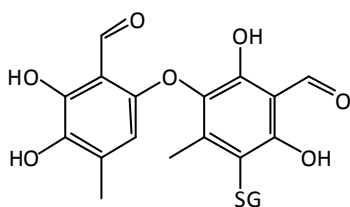
$m/z = 640,10$

**86 :**



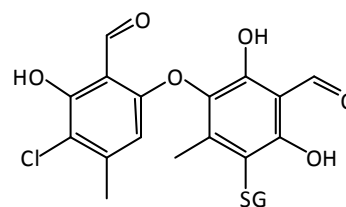
$m/z = 642,10$

**84 :**



$m/z = 624,10$

**87 :**



$m/z = 642,10$

Ces ions moléculaires sont identiques à ceux observés dans le cas où le chloroatranol se trouve seul en solution avec le glutathion.

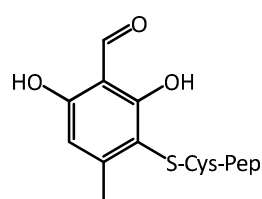
### Réactivité du mélange atranol/chloroatranol (66/67) vis-à-vis du peptide cystéine

#### Conditions expérimentales

Atranol : 0,9 mg (6  $\mu\text{mol}$ ) ; chloroatranol : 1,1 mg (6  $\mu\text{mol}$ ) ; Pep-Cys : 4,5 mg (6  $\mu\text{mol}$ ) ;  $\text{H}_2\text{O}_2$  : 10,2  $\mu\text{L}$  (2 %, 6  $\mu\text{mol}$ ) ; HRP : 18  $\mu\text{L}$  (37 unités, 2000 unités/mL) ;  $\text{CH}_3\text{CN}$  : 200  $\mu\text{L}$  ; eau : 370  $\mu\text{L}$ .

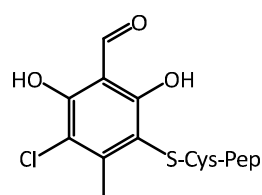
**Adduits issus de la réactivité de l'atranol dans le mélange :**

Aucun adduit issu de la réactivité de l'atranol avec le peptide cystéine n'a pu être observé lors de l'étude de ce mélange. Cependant, deux ions moléculaires ont été identifiés dans le cas où l'atranol se trouve seul en solution avec le peptide cystéine.

**88 :**

$$m/z = 901,39 (+ H^+)$$

$$m/z = 451,20 (+ 2 H^+)$$

**Adduits issus de la réactivité du chloroatranol dans le mélange :****89 :**

$$m/z = 935,35 (+ H^+)$$

$$m/z = 468,18 (+ 2 H^+)$$

Ces ions moléculaires sont identiques à ceux observés dans le cas où le chloroatranol se trouve seul en solution avec le peptide cystéine.

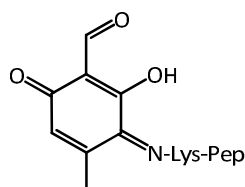
## Réactivité du mélange atranol/chloroatranol (66/67) vis-à-vis du peptide lysine

### Conditions expérimentales

Atranol : 0,9 mg (6  $\mu\text{mol}$ ) ; chloroatranol : 1,1 mg (6  $\mu\text{mol}$ ) ; Pep-Lys : 4,7 mg (6  $\mu\text{mol}$ ) ;  $\text{H}_2\text{O}_2$  : 10,2  $\mu\text{L}$  (2 %, 6  $\mu\text{mol}$ ) ; HRP : 18  $\mu\text{L}$  (37 unités, 2000 unités/mL ) ;  $\text{CH}_3\text{CN}$  : 200  $\mu\text{L}$  ; eau : 370  $\mu\text{L}$ .

### Adduits issus de la réactivité de l'atranol dans le mélange :

97 :

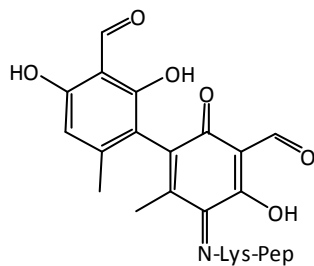


$$m/z = 924,46 (+ \text{H}^+)$$

$$m/z = 462,73 (+ 2 \text{H}^+)$$

Lorsque l'atranol se trouve seul en solution avec le peptide lysine, deux ions moléculaires différents de ceux observés lors de l'étude du mélange ont pu être identifiés.

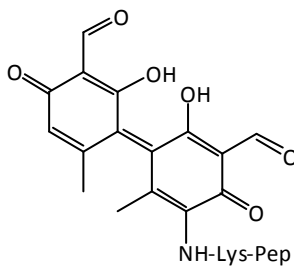
90 :



$$m/z = 1074,49 (+ \text{H}^+)$$

$$m/z = 537,75 (+ 2 \text{H}^+)$$

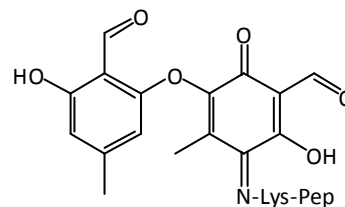
91 :



$$m/z = 1074,49 (+ \text{H}^+)$$

$$m/z = 537,75 (+ 2 \text{H}^+)$$

92 :

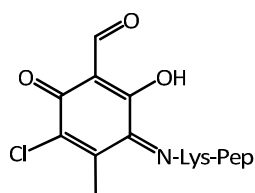


$$m/z = 1074,49 (+ \text{H}^+)$$

$$m/z = 537,75 (+ 2 \text{H}^+)$$

**Adduits issus de la réactivité du chloroatranol dans le mélange :**

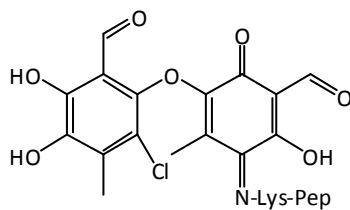
En plus d'un ion moléculaire de  $m/z$  de 1080,45 dont la structure n'a pas pu être élucidée, un adduit issu de la réactivité du chloroatranol a pu être identifié lors de l'étude de ce mélange.

**95 :**

$$m/z = 958,42 (+ H^+)$$

$$m/z = 479,71 (+ 2 H^+)$$

Lorsque le chloroatranol se trouve seul en solution avec le peptide lysine, deux autres ions moléculaires ont pu être identifiés.

**96 :**

$$m/z = 1124,44 (+ H^+)$$

$$m/z = 562,73 (+ 2 H^+)$$





Placez votre main sur un poêle une minute et ça vous semble durer une heure. Asseyez-vous auprès d'une jolie fille une heure et ça vous semble durer une minute. C'est ça la relativité.

A. Einstein





Évaluation du pouvoir allergisant de mélanges complexes :  
étude de la réactivité de molécules sensibilisantes en mélanges envers des peptides nucléophiles.

## Résumé

L'allergie de contact est une pathologie très répandue. Il n'existe cependant aucun traitement permettant de la soigner. L'éviction de l'allergène reste à ce jour le seul moyen de la prévenir. De nombreux tests visant à déterminer le pouvoir allergisant des molécules ont été développés. L'un de ces tests est le Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA), une méthode chimique visant à mimer une étape clé du mécanisme immunitaire menant à l'allergie de contact : la formation d'un complexe antigénique par réaction entre l'allergène et une protéine cutanée. Dans le cadre de la législation actuelle sur les cosmétiques, il pourrait être intéressant d'adapter ce test aux mélanges complexes.

Le but de ce travail de thèse a été d'étudier la réactivité de différents mélanges d'allergènes connus vis-à-vis des trois peptides utilisés dans le DPRA et de la comparer à celle de chaque composant seul.

Trois types de mélanges ont été étudiés. Un mélange d'isothiazolinones utilisées comme conservateurs, trois mélanges binaires de trois aldéhydes utilisés comme parfums et enfin un mélange des deux responsables majeurs de l'allergie à l'absolu de mousse de chêne, un extrait utilisé en parfumerie.

## Résumé en anglais

Contact dermatitis is one of the most common health problems. It has unfortunately no cure yet. The only way to prevent it is to avoid contact with the allergen. Numerous tests have been developed in order to evaluate the allergenic potency of the tested chemical. One of these tests is the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) which aim is to mimic one of the key steps leading to sensitisation: the formation of an antigenic complex by reaction between the allergen and a cutaneous protein. Due to the recent legislation on cosmetic which ask to test every chemical used in the formulation of cosmetics it could be interesting to adapt the DPRA to complex mixtures.

The aim of this PhD work is to study the reactivity of some known mixtures of allergens towards the three peptides used in the DPRA and to compare it with the reactivity of each compound alone.

In this approach three different types of mixtures have been studied. The first one concerns two isothiazolinones used as preservatives the second one three different aldehydes used as fragrance and the third one concerns the main responsible of contact dermatitis to oak moss absolute a natural extract used in perfumery.