

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Institut de Chimie, UMR 7177

THÈSE présentée par :

Eric MOSS

soutenue le : **16 janvier 2015**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline / Spécialité : Chimie

**Etude *in situ* par RMN HRMAS sur des
épidermes reconstruits du métabolisme et de la
réactivité de xénobiotiques allergisants**

THÈSE dirigée par :

M. LEPOITTEVIN Jean-Pierre
Mme BERL-BAUDER Valérie

Professeur, Université de Strasbourg
Maître de conférences, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. KAROYAN Philippe
M. MERK Hans

Professeur, Université Pierre et Marie Curie, Paris
Professeur, Université d'Aix-la-Chapelle, Allemagne

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. REMY Jean-Serge
Mme MALET-MARTINO Myriam

Directeur de recherche CNRS, Université de Strasbourg
Professeur, Université Paul Sabatier, Toulouse

MEMBRE INVITÉ :

M. ELBAYED Karim

Maître de conférences, Université de Strasbourg

*« Ce que l'on conçoit bien s'énonce clairement,
Et les mots pour le dire arrivent aisément. »*

*Nicolas Boileau,
L'Art poétique*

*A mon papa et ma maman,
A mon frère et ma sœur,
A ma grand-mère disparue,
A ma famille,*

A mes amis,

A toi, Laure.

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit a été réalisé au Laboratoire de Dermatochimie de l'Université de Strasbourg sous la responsabilité du Professeur Jean-Pierre Lepoittevin et du Docteur Valérie Berf-Bauder. Il a été rendu possible grâce au financement conjoint de la Région Alsace et du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

En premier lieu, je tiens à exprimer ma plus profonde reconnaissance au Professeur Lepoittevin pour m'avoir intégré dans son équipe de recherche, pour m'avoir accordé son entière confiance et pour m'avoir permis de bénéficier des moyens techniques et financiers indispensables à la réalisation de ce travail. De Paris à Barcelone en passant par la salle de convivialité, il a été durant ces trois années un chef professionnellement, scientifiquement et humainement extraordinaire. Quel honneur, quelle chance et quel plaisir de pouvoir poursuivre, pour quelques temps encore, cette belle aventure à vos côtés.

Je remercie également le Docteur Berf-Bauder pour son encadrement rigoureux et chaleureux, pour sa disponibilité permanente, pour son soutien sans faille ainsi que pour ses nombreux conseils avisés. Son savoir-faire et son faire-savoir ont été prépondérants dans l'avancement et l'aboutissement de nos travaux.

Mes remerciements s'adressent ensuite au Professeur Philippe Karoyan, au Professeur Hans Merck, au Professeur Myriam Malet-Martino et au Docteur Jean-Serge Remy. Je les remercie de m'avoir fait l'honneur de juger avec justesse et objectivité ce travail de thèse, d'y avoir apporté leur expertise mais aussi leur expérience et, bien entendu, de m'avoir accordé le grade de docteur.

J'adresse également mes plus sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de ce travail de recherche.

Je pense évidemment à nos collaborateurs du Laboratoire des sciences de l'ingénieur, de l'informatique et de l'imagerie (ICube), le Professeur Izzie-Jacques Namer, le Docteur Karim Elbayed et le Docteur François-Marie Moussallieh. Le Docteur Elbayed m'a offert l'opportunité unique de travailler en milieu hospitalier au CHU de Hautepierre. En tant que membre invité, il a également participé avec entrain à ma soutenance de thèse. Quant au Docteur Moussallieh, il m'a initié puis formé avec beaucoup de patience et de minutie à la technique de la spectroscopie RMN H¹RMAS. Sans eux, sans leur dévouement inconditionnel et leur abnégation, rien n'aurait été possible.

J'exprime ma reconnaissance aux différents services communs de l'Institut de Chimie et de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg. Je pense tout particulièrement à Lionel Allouche, Jean-Daniel Sauer, Maurice Coppe et Bruno Vincent du Service Commun de RMN, à Lydia Tortroteau, Georges Schwarz et au regretté Gilles Brenner du Magasin de Chimie, ainsi qu'à Pascale Buisine et Patrick Werhung du Service Commun d'Analyse (spectrométrie de masse).

Merci à Alain Gauger (Assistance à l'Enseignement - Salle de T.P.) de m'avoir donné accès à l'appareillage nécessaire aux mesures de spectroscopie IR.

Je remercie bien sûr toute l'équipe du Laboratoire de Dermatochimie, à commencer par le Docteur Elena Gimenez-Arnau pour son aide précieuse, son enthousiasme détonant et sa « grinta » quotidienne. Merci également à mes anciens et actuels collègues Dermatochimistes, doctorants ou stagiaires, avec lesquels j'ai partagé bien plus qu'un bout de paillasse. Je pense notamment à Audrey, Matthieu (Mana), Camille, Joan (Jojo), François (FF), Youssef et Mustapha (Les Bénévoles), Ricardo, Carole, Xiaomeng, Marion, Salen ou encore Fabrice.

Merci à mes précieux et solides amis qui ont contribué à ma bonne humeur et dont l'entourage a été une riche source d'énergie et d'inspiration au quotidien. Toujours fidèles au poste, vous n'avez jamais fait défection. A mes sportifs préférés, Cyrillou, Sébouille et Jeannot ; à mes chimistes adorés, Marie et Fabess.

La vie est faite de belles rencontres et certaines d'entre elles marquent plus que les autres. Ainsi, je lève mon verre à Set, Nikess, Zizou, Mich, Max, Drédeu, Dri-Dri, Miky, Matt ou encore Dam's. Entre fous rires et psychologie de comptoir, je remercie chacun d'entre vous d'avoir participé si activement à mes lendemains difficiles et mes migraines matinales.

Il paraît que « le gland ne tombe jamais loin du chêne ». Me concernant, il est tombé juste au pied de l'arbre. Je remercie mes parents, tous deux chimistes, qui ont su trouver l'alchimie parfaite entre tendresse et rigueur. A mon papa, mon pygmalion, qui jour après jour m'a guidé, orienté et subtilement conseillé. A ma maman, débordante d'amour, qui a toujours cru en moi en dépit des questionnements, doutes et difficultés rencontrés.

Je remercie également mon grand frère et ma grande sœur, omniprésents dans ma vie, qui ont toujours veillé soigneusement sur moi, m'ont protégé et ont contribué avec passion et raison à mon grandissement. Merci à ma grand-mère, ma deuxième maman, partie bien trop tôt. Où que tu sois, je sais que tu es fière de moi.

Merci aussi à l'ensemble de ma « petite » famille, Sèv, Fabi et ma marraine Christiane, mon filou de neveu Louis, ma filleule « petit fou » Apolline, sans oublier mon jeune filleul Mattéo ainsi que sa maman Emilie.

Enfin, j'adresse une pensée toute particulière à mes grands-parents paternels qui ont contribué à leur manière à cette réussite.

Il me reste à te remercier toi, Laure. Tu es arrivée à un moment charnière de ma vie, à un instant clé de cette thèse. Ta gentillesse, ta patience et ton amour m'ont constamment soutenu et porté vers l'avant, à chacun des mots que j'ai écrits ici. Du fond du cœur, merci.

En vous souhaitant une agréable lecture,

EM

Table des matières

Abréviations et acronymes	1
----------------------------------	----------

Avant-propos	4
---------------------	----------

Introduction générale

L'allergie de contact : introduction et concepts de base	6
--	---

I. La peau, première barrière de protection de l'organisme	6
---	----------

II. Les bases immunologiques de l'allergie de contact	8
--	----------

II.1. Classification des hypersensibilités selon Gell et Coombs	8
---	---

II.2. Contact cutané avec l'allergène : formation d'un complexe antigénique	9
---	---

II.3. Réponse allergique : les phases de sensibilisation et de révélation	10
---	----

III. L'allergie de contact d'un point de vue chimique	13
--	-----------

III.1. Exposition et pénétration	14
----------------------------------	----

III.2. Réactivité cutanée : la chimie des haptènes	15
--	----

III.3. Auto-oxydation et pré-haptènes	21
---------------------------------------	----

III.4. Métabolisme cutanée : détoxication et pro-haptènes	23
---	----

IV. Les méthodes de détection des sensibilisants potentiels	26
--	-----------

IV.1. Les méthodes <i>in vivo</i>	27
-----------------------------------	----

IV.2. Les méthodes <i>in vitro</i>	29
------------------------------------	----

IV.3. Les méthodes <i>in silico</i>	30
-------------------------------------	----

IV.4. Les méthodes <i>in chemico</i>	32
--------------------------------------	----

Chapitre I

Modèles d'études des mécanismes d'interaction haptène-protéine	37
--	----

I. Historique des modèles utilisés	37
---	-----------

II. Les épidermes reconstruits, un modèle <i>in situ</i>	38
III. La RMN HRMAS, une technique d'analyse de choix	41
IV. Le modèle RHE de SkinEthic en RMN HRMAS	45
V. La technique RHE/RMN HRMAS pour l'étude des interactions haptènes-protéines	50
VI. Objectifs du travail de thèse	51

Chapitre II

Synthèse du créosol substitué au carbone 13 et étude de ses interactions avec un modèle d'épiderme humain reconstruit	55
---	----

I. Le 2-méthoxy-4-méthylphénol ou créosol, modèle simplifié de l'eugénol	55
I.1. Généralités et postulat de départ	55
I.2. Synthèse en série substituée au carbone 13 et application sur le modèle RHE	60
I.2.A. Protocole expérimental : quatre étapes clés	60
I.2.B. Synthèse du créosol substitué au carbone 13	64
I.2.C. Application sur le modèle RHE et premières observations	65
I.2.D. Hypothèse de travail : passage par une orthoquinone	69
I.3. 4-méthyl-orthoquinone intermédiaire : synthèse et réactivité avec des acides aminés et des peptides	71
I.3.A. Synthèse et oxydation chimique du (¹³ C)-4-méthylcatéchol	72
I.3.B. Réactivité en milieu organique	72
I.3.C. Réactivité en milieu aqueux	94
I.3.D. Comparaison des résultats avec la RMN HRMAS	101
I.4. Synthèse en série doublement substituée au carbone 13 et application sur le modèle RHE	102
I.4.A. Synthèse du créosol doublement substitué au carbone 13	102
I.4.B. Application sur le modèle RHE et nouvelles observations	104
I.4.C. Confirmation de l'hypothèse de travail	105
I.5. Créosol appliqué sur le modèle RHE : à quelle concentration travailler ?	109
II. Le formaldéhyde, premier métabolite du créosol	112
II.1. Généralités et postulat de départ	112

II.2. Application en série substituée au carbone 13 sur le modèle RHE	113
II.2.A. Application sur le modèle RHE et observations	113
II.2.B. Métabolisation et réactivité au sein du modèle RHE	116
III. Conclusion	118

Chapitre III

Synthèse de dérivés de type <i>para</i> -alkylphénol substitués au carbone 13 et étude de leurs interactions avec un modèle d'épiderme humain reconstruit	119
---	-----

I. L'eugénol, comportement <i>in situ</i> identique à celui du créosol ?	119
I.1. Généralités et postulat de départ	119
I.2. Synthèse en série substituée au carbone 13 et application sur le modèle RHE	122
I.2.A. Synthèse de l'eugénol substitué au carbone 13	122
I.2.B. Application sur le modèle RHE et premières observations	124
I.3.C. Hypothèse de travail : prise en charge par une mono-oxygénase à CYP450	127
I.3. 4-allyl-orthoquinone intermédiaire : synthèse et réactivité avec des acides aminés et des peptides	129
I.3.A. Synthèse et oxydation chimique du (¹³ C)-4-allylcatéchol	129
I.3.B. Réactivité en milieu organique	130
I.3.C. Réactivité en milieu aqueux	141
I.3.D. Comparaison des résultats avec la RMN HRMAS	145
I.4. Synthèse en série doublement substituée au carbone 13 et application sur le modèle RHE	146
I.4.A. Synthèse de l'eugénol doublement substitué au carbone 13	146
I.4.B. Application sur le modèle RHE et nouvelles observations	148
I.4.C. Vers un comportement <i>in situ</i> similaire à celui du créosol	149
II. L'isoeugénol, réel pré-haptène ?	153
II.1. Généralités et postulat de départ	153
II.2. Synthèse en série substitué au carbone 13 et application sur le modèle RHE	154
II.2.A. Synthèse de l'isoeugénol substitué au carbone 13	154
II.2.B. Application sur le modèle RHE et observations	156
II.2.C. Isoeugénol <i>versus</i> eugénol ou pré- <i>versus</i> pro-haptène	157
III. Conclusion	162

Chapitre IV

Synthèse de dérivés de type corticostéroïde substitués au carbone 13 et étude préliminaire de leurs interactions avec un modèle d'épiderme humain reconstruit **163**

I. Les corticostéroïdes, naturels et de synthèse	163
I.1. Introduction et généralités	163
I.2. Allergie et allergie croisée aux corticostéroïdes	165
I.3. Cortexolone, 16 α -méthylcortexolone et métabolisme	168
II. La cortexolone, dérivé de l'hydrocortisone	171
II.1. Synthèse en série substituée au carbone 13 en position 20	172
II.2. Synthèse en série substituée au carbone 13 en position 21	173
II.3. Oxydation chimique en 21-déhydrocorticostéroïde	175
II.4. Application sur le modèle RHE et premières observations	177
II.5. Le DMSO, meilleur véhicule ?	184
II.5.A. Le modèle RHE en présence de DMSO	185
II.5.B. Application de la cortexolone dans le DMSO sur le modèle RHE	188
III. La 16α-méthylcortexolone, analogue de la bétaméthasone	191
III.1. Synthèse en série substituée au carbone 13 en position 20	192
III.2. Synthèse en série substituée au carbone 13 en position 21	193
III.3. 16 α -méthylcortexolone : perspectives sur le modèle RHE	195
IV. Conclusion	195

Conclusion générale et perspectives	197
--	------------

I. Problématique de thèse	197
II. Métabolisme des pro-haptènes au sein du modèle RHE	198
III. Vers une activité significative des estérases au sein du modèle RHE ?	201

Experimental section	210
-----------------------------	------------

Material and methods	210
----------------------	-----

Synthesis of ^{13}C -substituted molecules	215
---	-----

Reactivity studies in solution	257
--------------------------------	-----

Reactivity studies in RHE model	266
---------------------------------	-----

Références bibliographiques	271
------------------------------------	------------

Abréviations et acronymes

Δ	Chauffage
δ	Déplacement chimique
λ	Longueur d'onde
ν	Fréquence
μL	Microlitre
μmol	Micromole
1D	Une dimension
2D	Deux dimensions
3D	Trois dimensions
^1H	Proton
^{13}C	Carbone
Å	Ångström
Arg	Arginine
aq.	Aqueux
Ar	Aryle
Asn	Asparagine
Asp	Acide aspartique
ATR-FTIR	Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy
br.	Broad
°C	Degré Celsius
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
cm	Centimètre
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
COSY	Correlated spectroscopy
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
Cys	Cystéine
d	Doublet
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPRA	Direct Peptide Reactivity Assay
E	Electrophile
EC ₃	Concentration en molécule sensibilisante nécessaire pour obtenir un indice de stimulation de 3
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods

ESI	Ionisation par électrospray
equiv.	Equivalent
g	Gramme
g/mol	Gramme par mole
GSH	Glutathion
h	Heure
h-CLAT	Human Cell Line Activation Test
His	Histidine
Hz	Hertz
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMPA	Héxaméthylphosphoramide
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRMAS	High Resolution Magic Angle Spinning
HRP/H₂O₂	Peroxydase de raifort/peroxyde d'hydrogène
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
IFRA	International Fragrance Association
IR	Infrarouge
j	Jour
<i>J</i>	Constante de couplage
kg	Kilogramme
LLNA	Local Lymph Node Assay
lit	Littérature
Lys	Lysine
m	Multiplet
<i>m</i>	Méta-
M	Concentration molaire en g.mol ⁻¹
m/z	Rapport masse sur charge
m-CPBA	Acide métachloroperbenzoïque
Me	Méthyle
mg	Milligramme
MHz	Mégahertz
min	Minutes
mL	Millilitre
MM	Masse Molaire
mmol	Millimoles
mp	Melting point
MS	Mass spectrometry

MUSST	Myeloid U937 Skin Sensitization Test
MW	Molecular Weight
Nα-Ac	N α -acétyle
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
Nu	Nucléophile
<i>o</i>	Ortho-
[O]	Oxydation
<i>p</i>	Para-
ppm	Partie par millions
P	Coefficient de partage octanol/eau
Pep-Cys	Peptide cystéine
Pep-Lys	Peptide Lysine
PPRA	Peroxydase Peptide Reactivity Assay
q	Quadruplet
QSARs	Quantitative Structure-Activity Relationships
R	Rendement
RAI	Relative Alkylation Index
REACH	Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals
Rev.	Révéléateur
<i>R_f</i>	Rapport frontal
RHE	Reconstructed Human Epidermis
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
r.t.	Room temperature
s	Singulet
SARs	Structure-Activity Relationships
SM	Spectrométrie de masse
S_N	Substitution nucleophile
Ser	Sérine
t	Triplet
t.a.	Température ambiante
TBDPS	<i>tert</i> -butyldiphenylsilyl
THF	Tétrahydrofurane
TMS	Triméthylsilyle
Trp	Tryptophane
TSP	Acide triméthylsilylpropanoïque
Tyr	Tyrosine
UV	Ultraviolet

Avant-propos

Avant-propos

Première barrière de protection de l'organisme, la peau est en permanence exposée aux molécules de l'environnement. Ces contacts entre la peau et des molécules étrangères peuvent conduire dans certains cas à des pathologies telles que l'allergie de contact.

Dans les pays développés, le pourcentage de la population touchée par l'allergie de contact s'élève à près de 20 % et ce pourcentage tend à augmenter sans nul doute en raison du nombre toujours croissant de produits chimiques mis sur le marché.^[1,2] En moins d'un demi-siècle, la présence de plus en plus importante des allergènes dans notre environnement a provoqué une recrudescence des cas d'allergie cutanée. En conséquence, l'allergie de contact est maintenant considérée comme un problème de santé publique. Des produits naturels aux produits issus de la synthèse, la liste des molécules potentiellement allergisantes pour la peau est longue. Les cosmétiques,^[3] les vêtements,^[4] les matières plastiques,^[5] les médicaments,^[6] les pesticides^[7] ou encore les plantes^[8] sont autant d'exemples de sources susceptibles de contenir des allergènes.

Selon la classification établie par Gell et Coombs en 1963, l'allergie de contact est une réaction d'hypersensibilité retardée de type IV à médiation cellulaire qui fait suite au contact par voie cutanée avec certaines substances xénobiotiques.^[9,10] Il s'agit d'une réponse inadaptée et exagérée du système immunitaire face à un allergène, également appelé haptène (molécule non protéique de faible poids moléculaire).



Cliché : P. J. Frosch

Figure 1. Patiente atteinte d'eczéma cutané sur la nuque

D'un point de vue clinique, la maladie s'exprime par une réaction inflammatoire de la peau sous la forme d'eczéma, d'œdèmes (gonflements), d'érythèmes (rougeurs) et de prurits (démangeaisons) (**Figure 1**). A l'heure actuelle, aucune thérapie ne permet de soigner cette pathologie ; seuls des

traitements symptomatiques, basés sur l'utilisation de corticostéroïdes, permettent de soulager les patients. Le moyen le plus efficace pour prévenir l'allergie de contact est, aujourd'hui encore, l'éviction totale de la substance allergène.

La réduction des risques d'allergies de contact passe impérativement par la connaissance du potentiel sensibilisant des molécules avant leur mise sur le marché. Cette approche est soutenue depuis 2007 par la législation européenne REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) qui prévoit l'évaluation toxicologique de plus de 30 000 substances chimiques d'ici 2018.^[11] Actuellement, les tests d'évaluation du pouvoir sensibilisant des molécules sont essentiellement réalisés sur l'animal, en particulier la souris, en témoigne le LLNA (Local Lymph Node Assay).^[12] Le champ d'action de ces tests est cependant limité depuis le 1^{er} mars 2013 suite à l'adoption du 7^{ème} amendement de la Directive Cosmétique Européenne qui interdit l'importation et la vente de produits cosmétiques dont les ingrédients auraient été testés sur des animaux.^[13] Par conséquent, le développement de nouvelles méthodes dites « alternatives » permettant l'évaluation du potentiel sensibilisant des molécules et ne reposant pas sur l'utilisation d'animaux devient capital.

La chimie joue un rôle particulièrement important dans la compréhension des phénomènes qui conduisent à l'allergie de contact. A l'échelle moléculaire, cette dernière repose en effet sur la formation d'un complexe antigénique entre un allergène (ou haptène) et une protéine épidermique.^[14] Le développement de nouvelles méthodes alternatives passe indéniablement par la compréhension de cette étape chimique clé. Le laboratoire de Dermatochimie s'efforce ainsi de comprendre les mécanismes qui aboutissent à l'allergie de contact en étudiant les mécanismes d'interaction entre les allergènes et divers modèles : nucléophiles modèles,^[15] acides aminés,^[16] peptides,^[17] protéines,^[18] et plus récemment épidermes humains reconstruits.^[19] En constante évolution, ces différents modèles cherchent naturellement à se rapprocher le plus possible de la réalité du phénomène d'allergie de contact chez l'Homme.

Le travail de thèse présenté ici s'inscrit dans cette démarche logique. Il a pour cadre le développement et la mise au point d'une méthode d'étude des allergènes. Le support d'étude employé est basé sur l'utilisation d'épidermes humains reconstruits. Si ce modèle a montré de bons résultats concernant l'étude des haptènes, ce travail de thèse se propose d'élargir l'utilisation des épidermes humains reconstruits à l'investigation d'une autre classe d'allergènes, celle des pro-haptènes.

L'introduction générale qui suit aborde l'allergie de contact dans ces grandes lignes, de la structure de la peau à la chimie de cette dernière, en passant par les bases immunologiques qui la régissent. L'étude des interactions haptène-protéine au moyen de modèles étant au cœur de cette thèse, elle sera abordée séparément dans le premier chapitre.

Introduction générale

Introduction générale

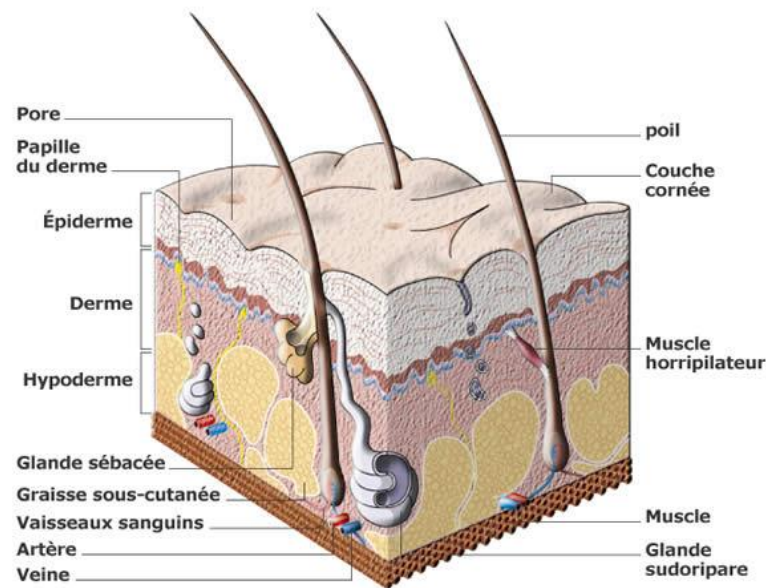
L'allergie de contact : introduction et concepts de base

La peau est le siège de l'allergie de contact, une réaction inflammatoire inappropriée et exagérée de l'organisme et de son système immunitaire face à une molécule étrangère. L'allergie de contact est définie comme une hypersensibilité retardée de type IV puisque les symptômes cliniques apparaissent, chez un sujet sensibilisé, 24 à 72 heures après une seconde exposition à l'allergène incriminé. L'intensité de la réponse allergique est dépendante de plusieurs facteurs tels que l'exposition aux allergènes, la faculté de ces derniers à pénétrer la peau, ainsi que leur capacité à réagir avec les protéines épidermiques.

I. La peau, première barrière de protection de l'organisme

La peau est, au regard de sa surface et de sa masse (à peu près 2 m² pour environ 1/6^{ème} du poids corporel), l'organe le plus important du corps humain.^[20] Formidable barrière de protection, elle n'est pas qu'une simple enveloppe. Parfois sous-estimées, souvent méconnues, les fonctions de protection de l'organisme assurées par la peau sont nombreuses.^[21] En effet, la peau maintient et régule la température corporelle. Elle constitue une barrière physique de protection des tissus et des organes face aux diverses agressions extérieures. Elle limite les pertes de fluides corporels et protège notre organisme des traumatismes mécaniques, des toxines, des rayonnements ultraviolets et des agents infectieux. Elle joue un rôle sensoriel essentiel en assurant le toucher (pression) et la sensibilité (chaleur et douleur) grâce à une multitude de terminaisons nerveuses. Extrêmement vascularisée, la peau est une zone d'échange privilégiée. Elle agit également comme un organe immunitaire à part entière.

La peau, dont l'épaisseur varie entre 1,5 et 4 mm selon les régions du corps, est hautement organisée. Dans sa structure, elle est composée de trois couches principales : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (**Figure 2**).



Source : CNRS

Figure 2. Coupe de la peau

L'épiderme, la couche la plus superficielle, est en lien direct avec l'extérieur. Mesurant de 0,1 à 1 mm suivant les zones de l'organisme, il constitue un système hautement organisé qui se renouvelle constamment.^[21] L'épiderme est constitué de différents types de cellules.^[22] Les kératinocytes, qui représentent 80 % de la population, sont des cellules produites à l'interface derme-épiderme. A chaque génération, elles progressent en direction de la surface en formant de la kératine, puis s'agrègent jusqu'à devenir des cellules mortes, formant ainsi la couche cornée. Ce mécanisme permet le renouvellement continu de l'épiderme. D'autres cellules sont également présentes telles que les mélanocytes qui assurent la production de mélanine, les cellules de Langerhans qui jouent un rôle important dans le système immunitaire cutané, ou encore les cellules de Merkel qui sont des mécanorécepteurs et interviennent dans la perception sensorielle.

Le derme, la couche intermédiaire, se situe juste en dessous de l'épiderme. Il est riche en fibres de collagène et en fibres élastiques.^[21] Ces fibres confèrent à la peau son élasticité et sa résistance. Contrairement à l'épiderme, le derme contient beaucoup de vaisseaux sanguins qui assurent sa nutrition. C'est l'endroit où les cellules se multiplient pour remplacer les cellules éliminées. A noter que le derme est également le lieu où l'on trouve l'acide hyaluronique, composé bien connu pour ses applications médicales et esthétiques. A l'état naturel, il permet l'adhésion et la migration des molécules et des cellules nécessaires à la cicatrisation.^[23]

L'hypoderme, la couche la plus profonde, est constitué de fibres identiques à celle du derme auxquelles s'additionnent des cellules adipeuses.^[21] L'hypoderme a pour fonction d'amortir la pression à laquelle la peau peut être soumise. Il la protège également contre les variations de températures.

II. Les bases immunologiques de l'allergie de contact

Que ce soit dans la nourriture, dans l'air, ou tout simplement dans l'environnement, l'Homme est en contact permanent avec pléthore d'envahisseurs potentiels. Pour se défendre des agressions extérieures et maintenir son intégrité, notre organisme possède un système de défense remarquable : le système immunitaire. Complexe et très bien organisé, il a pour fonction essentielle la destruction et l'élimination des organismes et molécules étrangers.

Deux grands moyens de défense composent le système immunitaire.^[24] D'un côté **l'immunité naturelle** (ou non spécifique), de l'autre **l'immunité adaptative** (ou spécifique). Ces deux moyens de défense agissent de manière interactive. En effet, l'immunité naturelle, indispensable à l'induction d'une réponse immunitaire adaptative, est la première ligne de défense de l'organisme. Elle emploie des défenses mécaniques (peau et muqueuses), chimiques (larmes et salive) et cellulaire (macrophages), et ceci indépendamment de la nature de l'agresseur. L'immunité adaptative est quant à elle dirigée contre un agresseur précis et réagit spécifiquement aux différents types de pathogène.

Dans le cas de l'allergie de contact, c'est l'immunité adaptative qui intervient. Lors du contact cutané avec un allergène, des lymphocytes T vont être activés, mettant ainsi en jeu un des mécanismes du système immunitaire adaptatif. Compte tenu de cette observation, l'allergie de contact est donc, d'après la classification de Gell et Coombs,^[9] une hypersensibilité retardée à médiation cellulaire de type IV.

II.1. Classification des hypersensibilités selon Gell et Coombs

En 1963, Gell et Coombs ont proposé une classification de l'hypersensibilité en quatre types basée sur le mode d'action et le temps de réponse après un second contact avec l'allergène.^[9] Actuellement moins utilisée, cette classification est néanmoins toujours en vigueur.^[25]

- **L'hypersensibilité de type I, ou immédiate** : elle correspond à une hypersensibilité quasi-instantanée puisque les symptômes apparaissent très rapidement (de l'ordre de quelques minutes) après une exposition à l'allergène. L'organisme se défend par intervention des anticorps de type IgE. Cette hypersensibilité est généralement provoquée par des protéines ou

des peptides, même si des molécules de faible poids moléculaire peuvent également l'induire. L'asthme et le choc anaphylactique sont classés dans cette catégorie.

- **L'hypersensibilité de type II, dite cytotoxique** : elle résulte de la reconnaissance d'antigène à la surface de cellules ou de composants tissulaires de l'organisme par des anticorps qui entraînent la détérioration des cellules ou l'activation du complément. Cette hypersensibilité peut être causée lors d'une transfusion sanguine, ou dans certains cas d'anémie.
- **L'hypersensibilité de type III, ou semi-retardée** : elle est provoquée par le dépôt de complexes antigène-anticorps produits en grande quantité et qui ne peuvent être éliminés correctement. Cette hypersensibilité entraîne une activation du complément et de l'inflammation. Un délai minimum de 6 heures est observé avant l'apparition des premiers symptômes. Les maladies sériques sont un exemple concret d'hypersensibilité de type III.
- **L'hypersensibilité de type IV, ou retardée** : elle se différencie des trois précédentes hypersensibilités par le fait qu'elle n'est pas induite par des anticorps, mais par des cellules immunocompétentes, les lymphocytes. Un long délai est observé avant apparition des premiers symptômes (de 24 à 48 heures). L'hypersensibilité de type IV provoque des lésions tissulaires inflammatoires avec infiltration de cellules mononuclées (lymphocytes et macrophages) qui peuvent être irréversibles. Elle est principalement causée par des molécules de faible poids moléculaire. L'allergie de contact fait partie de cette classe.

Les hypersensibilités de type I et IV sont courantes, celles de type II et III bien plus rares.

La classification de Cell et Coombs a été revisitée en 2001 par Johansson *et al.*,^[26] et deux années plus tard, en 2003, par Rajan.^[27] Il a ainsi été proposé l'introduction d'une cinquième classe d'hypersensibilité dans laquelle le système inné serait impliqué en tant que ligne de défense, via la formation de granulomes capables d'isoler l'anticorps.

II.2. Contact cutané avec l'allergène : formation d'un complexe antigénique

L'allergie de contact est une pathologie qui résulte d'une sensibilisation préalable de l'individu à une substance allergisante donnée. L'étape clé du processus de sensibilisation à un allergène (ou haptène) résulte dans la formation d'un adduit antigénique haptène-protéine stable par création d'une liaison,^[14] covalente ou de coordination,^[28] entre l'allergène et des protéines présentes dans l'épiderme. La formation du complexe antigénique engendre une modification de la structure initiale de la protéine. Par conséquent, cette dernière ne sera plus reconnue par le système immunitaire

comme appartenant au soi. Cette étape clé marque le point de départ du mécanisme immunologique caractéristique des réactions d'hypersensibilité de type IV.

Pour l'heure, la nature exacte des protéines épidermiques impliquées dans la formation du complexe antigénique demeure obscure. En revanche, celle des haptènes est bien mieux connue. Les haptènes sont des molécules naturelles ou synthétiques de faible poids moléculaire (inférieur à 1000 Da), relativement lipophiles ($\log P \approx 2$), pouvant aisément franchir la couche cornée et pénétrer dans l'épiderme.^[29] Trop petits pour être immunogènes, les haptènes peuvent néanmoins réagir avec les acides aminés de certaines protéines et ainsi engendrer une réponse immunitaire de l'organisme.

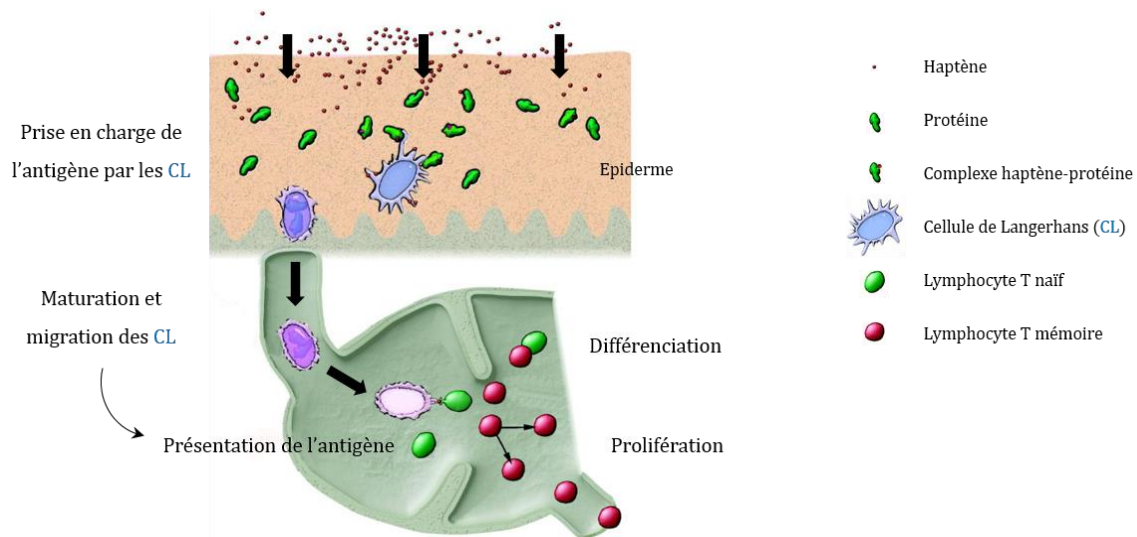
II.3. Réponse allergique : les phases de sensibilisation et de révélation

Le mécanisme immunologique qui mène à l'allergie de contact est composé de deux phases bien distinctes.^[30] La première, dite de « sensibilisation », résulte d'un premier contact cutané avec l'allergène. Elle dure en moyenne de 10 à 15 jours. Muette d'un point de vue clinique (absence de symptômes visibles), elle correspond à la création d'une mémoire immunologique. La deuxième phase, dite de « révélation », dure quant à elle 24 à 72 heures après une nouvelle exposition à l'allergène. C'est au cours de cette phase que vont apparaître les signes cliniques de l'allergie de contact : rougeur, gonflement, démangeaisons, etc.

La phase de sensibilisation

Découvertes en 1868,^[31] les cellules dendritiques de Langerhans (CL) sont la troisième population cellulaire de l'épiderme (3 à 8 % des cellules épidermiques). Elles sont, dans la peau, principalement localisées dans les couches basales de l'épiderme et couvrent la totalité de la surface de l'épiderme (300 à 900 cellules par mm^2). Grâce à leur morphologie, elles interagissent avec les kératinocytes en formant un véritable réseau, de telle manière qu'aucun xénobiotique ne peut traverser l'épiderme sans entrer en contact avec leurs prolongements cytoplasmiques.^[32]

Les CL dérivent de la moelle osseuse. Elles jouent un rôle important dans l'allergie de contact ; c'est elles qui occupent la fonction de cellules présentatrices d'antigène (CPA) au sein de l'épiderme. Les CL sont les seules cellules à exprimer, à leur surface et de manière constitutive, les protéines du complexe d'histocompatibilité de classe II (CMH II). La migration des CL portant l'information antigénique de l'épiderme vers les ganglions lymphatiques proximaux est une étape importante dans l'induction et la régulation d'une réponse immunitaire. La phase de sensibilisation ainsi que les différentes étapes qui la composent sont représentées sur le schéma qui suit (**Figure 3**).



Source : Karlberg *et al.* [30]

Figure 3. Phase de sensibilisation

○ *Formation du complexe haptène-protéine et prise en charge de l'antigène par les CPA*

Lorsqu'une molécule entre en contact avec la surface de la peau, si et seulement si ses propriétés physico-chimiques le permettent, elle traversera la couche cornée en direction de l'épiderme. Là, l'haptène seul ou le complexe haptène-protéine est pris en charge par les CPA qui ont pour capacité de capter l'antigène.[33] La nature et le mode de cette prise en charge de l'antigène par ces cellules peut se faire de différentes manières.

- Soit l'haptène est internalisé par les CPA et se fixe sur une protéine intracellulaire. C'est la voie de prise en charge dite « endogène ».
- Soit l'haptène se fixe sur une protéine extracellulaire ou membranaire formant ainsi le complexe haptène-protéine qui est ensuite internalisé dans les CPA. Cette voie est nommée « exogène ».
- Enfin, l'haptène peut se fixer directement sur des peptides présents dans le sillon des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II, à la surface de la membrane des CPA

Dans les deux premiers cas de figure, la digestion du complexe antigénique est réalisée par des endopeptidases.[34] Certains peptides modifiés générés portent les modifications produites par l'haptène et se couplent ensuite avec les protéines du CMH I ou II. Le complexe ternaire nouvellement formé est exporté à la surface de la membrane cellulaire.[35] Dans le troisième mode de prise en charge, le peptide hapténisé est déjà présent sur les protéines du CMH.

- ***Migration des CPA***

Les CPA vont migrer à travers l'épiderme et le derme vers le système lymphatique proximal.^[36] Les mécanismes cellulaires à l'origine de cette migration ne sont pas connus avec précision mais il semblerait que des cytokines pro-inflammatoires (principalement de type IL-1 β et TNF- α) jouent un rôle dans l'activation des CPA. Les cytokines sont des protéines de faible poids moléculaire produites transitoirement par la plupart des entités cellulaires de l'allergie de contact. Elles exercent un effet local via des interactions spécifiques avec des récepteurs cellulaires.^[37] La nature des cytokines produites dépend du type de l'haptène et de l'individu. Au cours de la migration, des modifications phénotypes s'opèrent.^[38] Les CPA perdent leur caractère dendritique et, en conséquence, leur faculté de traitement des antigènes. Elles acquièrent en revanche la capacité de stimuler les cellules T naïves.

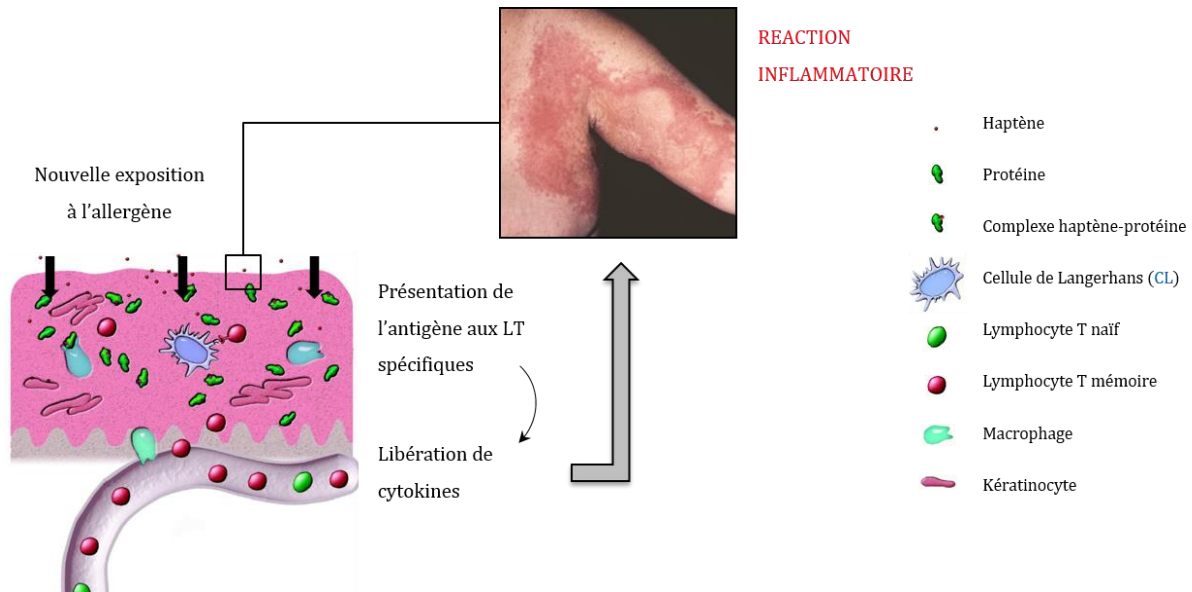
- ***Présentation de l'entité antigénique et expansion clonale***

Dans le cortex profond du ganglion lymphatique, les CPA présentent à des lymphocytes T (LT) « naïfs » l'antigène sous forme de peptides associés au CMH II ou I. Cette présentation aboutie entre autres à l'activation de deux sous-populations de LT : les LT effecteurs et les LT mémoires. Les premiers ont une activité cytotoxique. Les seconds possèdent une mémoire spécifique de l'haptène.^[39] Un antigène nommé CLA (Cutaneous Lymphocyte Antigen) est également induit sur les CPA durant la présentation. Les CPA qui expriment cet antigène pourront se lier de manière forte aux veinules post-capillaires cutanées leur permettant ainsi d'être présents en grand nombre dans le derme.

Les CPA porteurs de l'antigène CLA subissent un chimiotactisme positif. Ce dernier leur permet de migrer du ganglion vers la circulation générale par les canaux lymphatiques efférents et de se retrouver dans tous les tissus, notamment au niveau de la peau et de son derme. L'individu est à ce moment-là « sensibilisé » au composé chimique. Tout est prêt pour qu'une réponse inflammatoire se déclenche lors des prochains contacts avec l'haptène.

Phase de révélation

La séquence d'événements cliniques qui apparaissent après le second contact de l'organisme avec l'haptène caractérise la phase de révélation, également appelée phase d'élicitation.^[30] Une nouvelle fois, l'haptène qui pénètre dans la peau forme avec les protéines épidermiques le complexe antigénique haptène-protéine. Ce dernier va être pris en charge par les cellules cutanées. La phase de révélation est schématisée ci-dessous (**Figure 4**).



Source : Karlberg *et al.* [30]

Cliché : P. J. Frosch

Figure 4. Phase de révélation

Les CPA vont présenter le complexe antigénique aux lymphocytes T spécifiques de ce dernier. Les LT vont alors provoquer l'apoptose des CPA. L'activation et le recrutement des LT sur le site d'application de l'haptène sont associés à la production de cytokines pro-inflammatoires, produites entre autres par les CPA elles-mêmes et par les kératinocytes.^[40] L'ensemble de ces processus produit une vasodilatation qui aboutit à de l'eczéma de contact et aux différents symptômes cliniques de l'allergie de contact.

III. L'allergie de contact d'un point de vue chimique

L'importance de la réponse allergique est dépendante de plusieurs paramètres parmi lesquels le degré d'exposition à l'allergène, la capacité de ce dernier à pénétrer dans l'épiderme, et bien entendu son aptitude à pouvoir réagir avec les protéines de la peau. Ce sont les fonctions chimiques présentes dans la structure de l'haptène qui vont déterminer sa capacité à se lier aux protéines épidermiques pour former l'entité antigénique responsable de l'allergie de contact. Cette capacité est fonction du type de liaisons formées et des mécanismes impliqués.

III.1. Exposition et pénétration

Exposition

L'exposition, facteur majeur dans l'induction d'une allergie de contact, est difficile à quantifier. En effet, la mesure des doses d'allergène auxquelles les personnes sont soumises dépend des conditions très variables de l'exposition.^[41] Pour exemple, à une même concentration en matière active donnée dans un shampoing ou dans un parfum en spray, l'exposition à la molécule active est, dans chacun des cas, bien différente. Pour le shampoing, l'exposition est en moyenne de 0,08 $\mu\text{g.cm}^{-2}$. Celle du parfum en spray s'élève à près 8,7 $\mu\text{g.cm}^{-2}$. Cette différence est expliquée par le fait que l'exposition est dépendante d'un ensemble de facteurs : surface de la peau mise en contact, intensité de l'exposition, durée, fréquence, etc.

Il existe des techniques permettant d'évaluer l'exposition.^[42] Celle de la fluorescence permet par exemple d'évaluer l'exposition à certains allergènes contenus dans les peintures. Un traceur fluorescent est dissout dans la préparation d'intérêt puis des analyses sont effectuées, après utilisation, sur les parties non protégées de la peau. Ces analyses permettent d'évaluer de manière qualitative et quantitative la présence de l'allergène. Une autre illustration de ces techniques est celle du rinçage. Elle permet de déterminer, dans le cas des colorants capillaires, la quantité de certains allergènes à laquelle sont exposés les consommateurs et les coiffeurs. Il s'agit de laver les parties de la peau, principalement le cuir chevelu et les mains, qui ont été en contact avec la teinture capillaire. Dans la solution de rinçage est ensuite identifiée ou non la présence d'éventuels allergènes.

La dose maximale admissible (DMA) définit l'exposition quotidienne sans danger sur une longue période. Elle a été mise en place pour faire face aux difficultés rencontrées lors des essais d'évaluation des doses d'exposition aux molécules actives. La DMA est obtenue par rapport entre le NOEL (No Observed Effect Level), la dose maximale sans effet observable chez les animaux témoins, et un facteur d'incertitude (FI) qui prend en compte les variations interindividuelles, les effets de matrice et les écarts d'utilisation.^[43]

Pénétration

La pénétration est un des autres facteurs importants qui joue un rôle dans l'induction d'une allergie de contact. Un composé chimique présentant toutes les caractéristiques d'une molécule extrêmement réactive vis-à-vis des protéines épidermiques ne sera un « bon » sensibilisant qu'à une condition, celle de pénétrer à travers la peau. Un des grands intérêts dans l'évaluation du potentiel sensibilisant des composés chimiques est la quantification de l'absorption cutanée de ces derniers.^[44]

La pénétration cutanée n'est pas prise en charge par une activité biologique. Par simple diffusion passive la molécule est à même de traverser l'épiderme. Des peaux humaines et des peaux animales ont longtemps été utilisées comme modèles pour effectuer les tests de pénétration cutanée mais, ces dernières années, de nouvelles techniques ont été développées. Elles sont basées sur l'existence de liens entre les paramètres physico-chimiques de l'allergène et sa capacité à pénétrer la peau. Sont de ce fait pris en compte la lipophilie de l'haptène, ses propriétés électroniques et ses caractéristiques stériques. La lipophilie est établie d'après le coefficient de partage octanol/eau. Les propriétés électroniques permettent de quantifier les liaisons hydrogènes pouvant être formées avec les structures épidermiques. Enfin, les propriétés stériques font références au poids, au volume et à la surface de l'haptène concerné.

III.2. Réactivité cutanée : la chimie des haptènes

Comme mentionnée antérieurement, l'étape clé du mécanisme de l'allergie de contact est la formation d'un complexe antigénique haptène-protéine. La capacité de l'haptène à se lier aux protéines, le type de liaisons formées et les mécanismes impliqués dans la formation de ces liaisons dépendent des fonctions chimiques présentes dans sa structure moléculaire.

Incapables de stimuler le système immunitaire sans être préalablement couplés à une protéine, les haptènes sont des petites molécules de faible poids moléculaire relativement lipophiles. Ils peuvent être classés en deux catégories selon le type de liaisons formées avec les protéines : d'un côté les haptènes se liant aux protéines par des liaisons de coordination, de l'autre, ceux pouvant former des liaisons covalentes.^[45,46]

- **Les liaisons de coordination** : elles mettent en jeu des énergies de l'ordre de 50 kJ par mole. Elles sont généralement observées dans le cas d'allergies de contact aux métaux : le cobalt, le chrome et bien entendu le nickel.^[47] Souvent contenu dans les aciers inoxydables, les bijoux et les pièces de monnaie, le nickel est connu pour être responsable d'un nombre important d'allergies cutanées.^[48] Les complexes de coordination formés entre ces métaux et les protéines sont suffisamment stables pour être pris en charge par le système immunitaire (**Figure 5**).

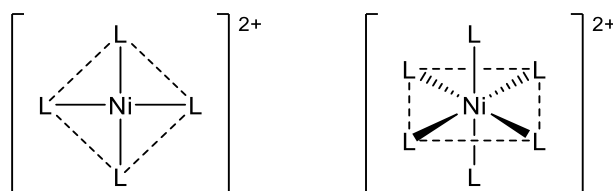


Figure 5. Exemples de complexes de coordination du nickel II

- **Les liaisons covalentes** : leur énergie, supérieure à 200 kJ par mole, en font des liaisons très stables. D'une manière générale, elle se forment entre les fonctions chimiques électrophiles de l'haptène et des résidus nucléophiles présents sur les protéines épidermiques par le biais d'un mécanisme classique à deux électrons.^[14] Néanmoins, le passage par un mécanisme de type radicalaire peut également être proposé (**Figure 6**).^[29] La formation de liaisons covalentes est observée dans la majorité des cas d'allergie de contact. Cette constatation peut être expliquée comme suit : les liaisons covalentes étant difficilement réversibles, elles confèrent au complexe antigénique formé une meilleure stabilité. A fortiori, un complexe antigénique haptène-protéine stable aura plus de chance d'évoluer vers une réponse immunologique de l'organisme et donc d'aboutir à une sensibilisation.

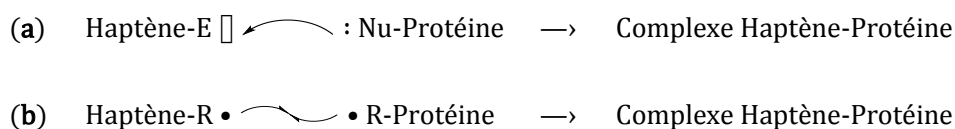


Figure 6. Formation de liaisons covalentes par réaction électrophile-nucléophile (a) et radicalaire (b)

En général, les haptènes de nature électrophile réagissent avec les chaînes latérales nucléophiles d'acides aminés qui constituent les protéines. Les acides aminés les plus fréquemment impliqués dans la formation de complexes antigéniques sont ceux qui portent au sein de leur chaîne latérale un ou plusieurs hétéroatomes riches en électrons (**Figure 7**).

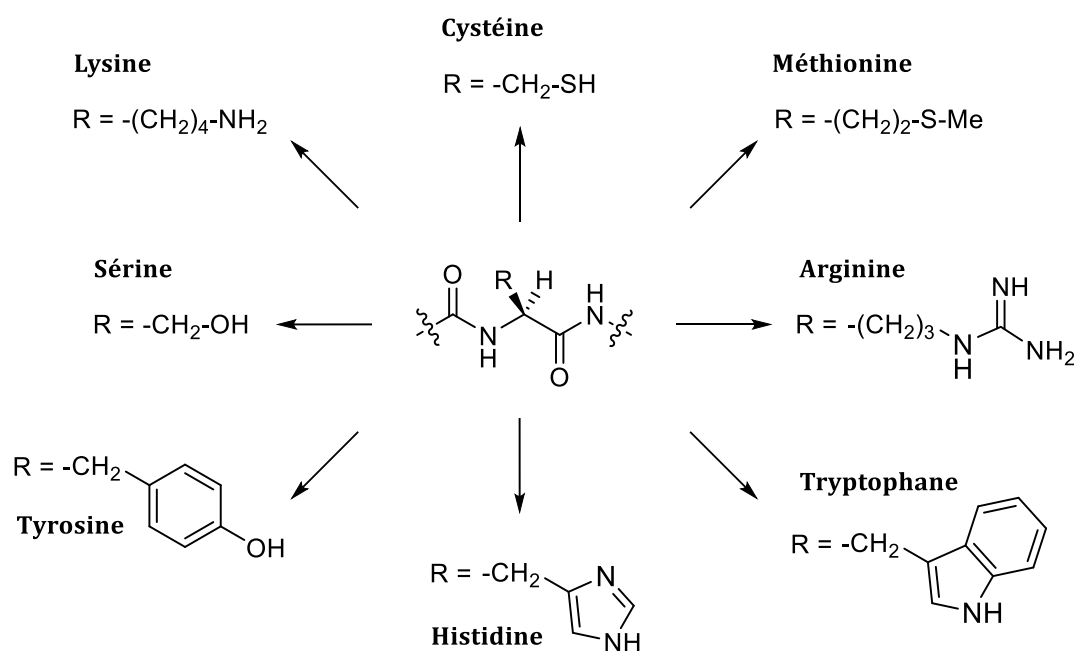


Figure 7. Principaux acides aminés nucléophiles

Non représentées, l'asparagine, la glutamine et la thréonine auraient trouvé leur place dans cette figure

Les fonctions électrophiles présentes sur les haptènes ainsi que les mécanismes réactionnels auxquels ils sont soumis sont représentés dans le tableau qui suit (**Tableau 1**). Non exhaustive, la liste dressée par ce tableau témoigne de la grande variété des fonctions chimiques électrophiles actuellement répertoriées.

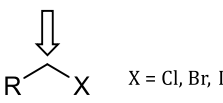
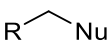
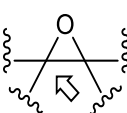
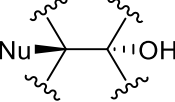
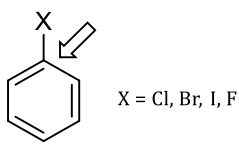
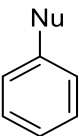
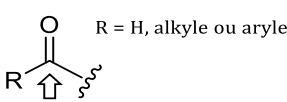
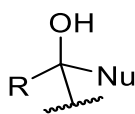
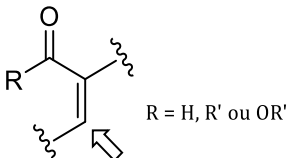
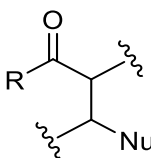
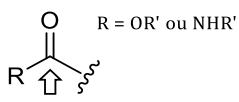
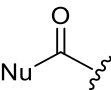
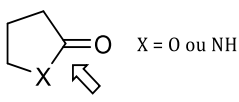
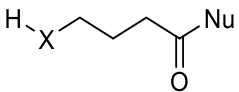
Type d'haptène	Adduit formé	Mécanisme de réaction
 Dérivé halogéné		Substitution nucléophile sur un centre saturé
 Epoxyde		
 Dérivé halogéné aromatique		Substitution nucléophile aromatique
 Aldéhyde ou cétone		Addition nucléophile
 Aldéhyde, cétone ou ester α,β-insaturés		
 Ester ou amide		Addition-élimination
 Lactone ou lactame		

Tableau 1. Différents types d'haptènes ainsi que les sites réactifs électrophiles ($\Rightarrow$), les adduits formés par réaction avec un nucléophile (**Nu**) et les noms des réactions chimiques mises en jeu

Les molécules électrophiles réagissent principalement avec les acides aminés des protéines par des réactions de substitution nucléophile, d'addition nucléophile ou d'addition-élimination.

La **substitution nucléophile** (S_N) sur un centre saturé (halogénure d'alkyle, époxyde) et la substitution nucléophile aromatique (S_NAr) (halogénure aromatique) concernent principalement les substances allergisantes d'origine synthétique. Les résines époxydiques préparées à partir de composés bis-phénoliques et utilisées en peinture et dans la réparation de certains matériaux illustrent parfaitement l'allergie de contact aux substances réagissant via une réaction de type S_N sur un centré saturé (**Figure 8**).^[49,50]

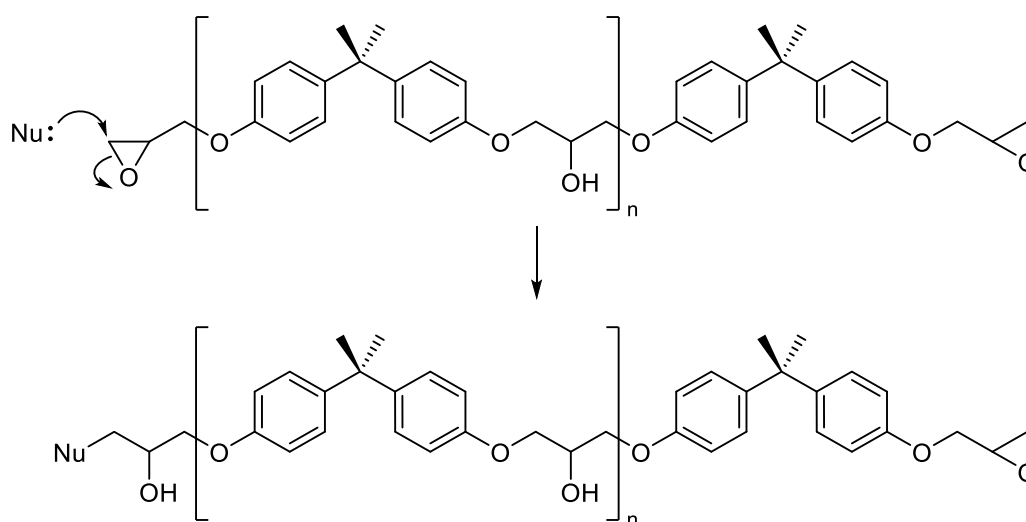


Figure 8. Le groupement glycidyle est responsable du caractère sensibilisant des résines époxyde

Un autre exemple bien connu est celui de la 4-bromométhyl-6,8-diméthyl-2-(1H)-quinolone, un intermédiaire de synthèse utilisé notamment dans l'industrie pharmaceutique (**Figure 9**).^[51]

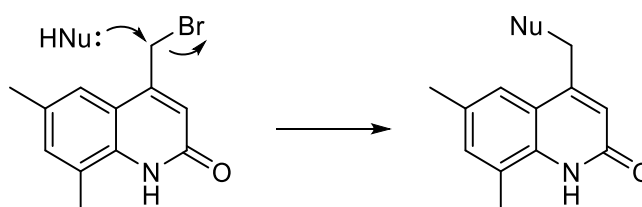


Figure 9. S_N sur un centre saturé : exemple de la 4-bromométhyl-6,8-diméthyl-2-(1H)-quinolone

Dans le cas du 2,4-dinitrofluorobenzène (DNFB), la formation du complexe antigénique est régit par une substitution nucléophile aromatique (S_NAr) (**Figure 10**).^[52,53]

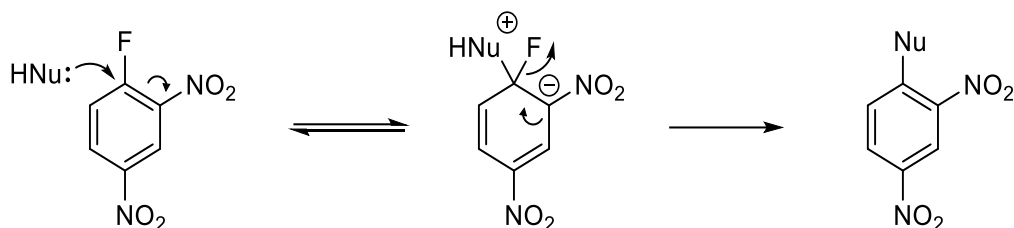


Figure 10. Le 2,4-dinitrofluorobenzène (DNFB) est un des allergènes les plus forts

L'**addition nucléophile** d'acides aminés sur des molécules allergisantes est fréquente. Souvent rencontrée dans la structure des allergènes et fortement électrophile, la fonction carbonyle est sujette à ce type de réaction (addition nucléophile 1,2). L'hydroxycitronellal, un allergène souvent rencontré dans les huiles essentielles et les parfums, en est le parfait exemple (**Figure 11**).^[54,55]

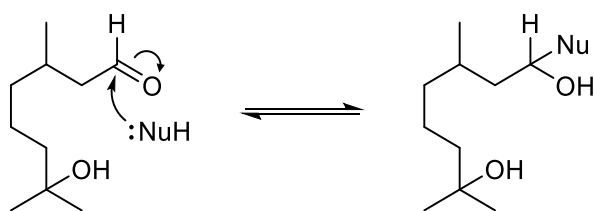


Figure 11. Addition nucléophile 1,2 sur l'hydroxycitronellal

L'addition nucléophile 1,4 (ou addition de Michael) sur un système α,β -insaturé est le mécanisme d'hapténisation le plus fréquemment rencontré dans l'allergie de contact. Les lactones sesquiterpéniques de la famille des *Asteraceae* (endive, laitue, etc.) possèdent un motif α -méthylène- γ -butyrolactone fortement électrophile qui illustre parfaitement cette réactivité (**Figure 12**).^[56,57]

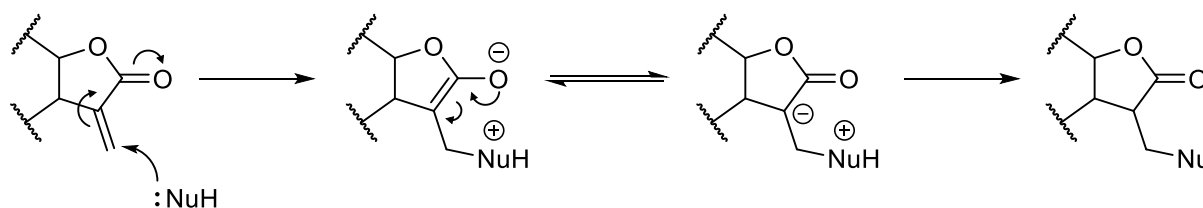


Figure 12. Réactivité du motif α -méthylène- γ -butyrolactone

La réaction d'addition-élimination régit l'allergie cutanée dans les cas de la lidocaïne (anesthésique local) et de la pénicilline (antibiotique). Pour la pénicilline, c'est le motif β -lactame qui est responsable de la réactivité cutanée (**Figure 13**).^[58]

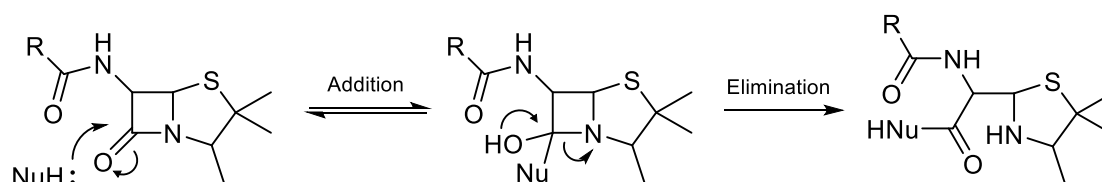


Figure 13. Réactivité cutanée de la pénicilline : addition-élimination sur le motif β -lactame

III.3. Auto-oxydation et pré-haptènes

Certaines molécules au départ non réactives vis-à-vis des protéines épidermiques peuvent acquérir, après transformation, la capacité d'interagir avec ces dernières. Introduit en 2006 par Lepoittevin,^[59] le concept de pré-haptène fait référence aux substances inertes qui deviennent des allergènes après exposition à leur environnement. Les modifications et transformations opérées sur les pré-haptènes sont réalisées par voie non métabolique sous l'action de facteurs externes (chaleur, lumière, oxygène, etc.) et conduisent à la formation d'espèces réactives qui peuvent potentiellement se fixer aux protéines. Dans la majorité des cas, l'activation des pré-haptènes est réalisée par oxydation lente via une exposition prolongée à l'air ambiant. « Auto-oxydation » est alors le terme communément employé. A titre d'exemple, le d-limonène, un terpène présent dans les agrumes et utilisé comme agent parfumant, peut être oxydé par le dioxygène de l'air ambiant pour donner un hydroperoxyde très réactif (**Figure 14**).^[60-62]

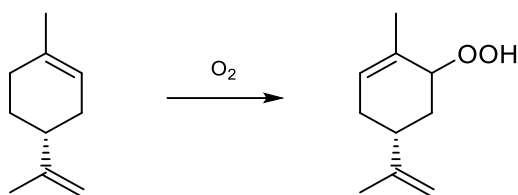


Figure 14. Action du dioxygène sur le d-limonène : formation d'un hydroperoxyde très réactif

D'autres exemples de pré-haptènes connus peuvent être cités. Le linalol est un alcool terpénique insaturé à l'odeur de muguet qui devient allergisant suite à son oxydation par le dioxygène (**Figure 15**). Le linalol est présent dans une majorité d'huiles essentielles notamment celle de lavande, de bergamote, de bois de rose et de menthe.

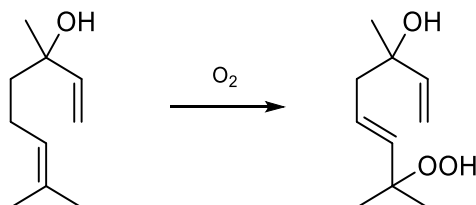


Figure 15. Cas du linalol : formation d'un hydroperoxyde allylique précurseur de radicaux hautement réactifs

La para-phénylènediamine (PPD) est l'un des constituants majeurs des teintures capillaires permanentes. Elle est additionnée de manière illicite au henné dans le but d'assombrir et de noircir la couleur des tatouages temporaires. La PDD est capable d'être oxydée par le dioxygène pour conduire à la formation d'une benzoquinone diimine ou d'une benzoquinone (après d'hydrolyse), toutes deux très réactives (**Figure 16**).^[63,64]

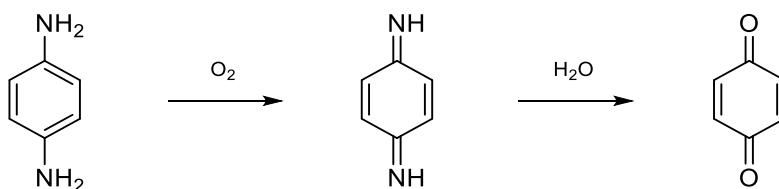


Figure 16. Oxydation de la PPD en benzoquinone diimine, et hydrolyse de cette dernière en benzoquinone

III.4. Métabolisme cutané : détoxification et pro-haptènes

La détoxification

Comme expliqué précédemment, les molécules lipophiles peuvent aisément pénétrer la barrière cutanée. Elles vont ensuite s'accumuler dans le derme et l'épiderme. Les systèmes enzymatiques de détoxification ont pour but l'élimination des xénobiotiques présents dans l'organisme.^[65] Pour ce faire, leur moyen est le suivant : transformer une molécule au départ lipophile en une molécule hydrosoluble facilement éliminable. Les systèmes enzymatiques de détoxification sont présents dans de nombreux organes. Pour des raisons fonctionnelles, ils sont particulièrement développés dans la peau.

Les systèmes enzymatiques de détoxification transforment une molécule lipophile en une molécule hydrophile via une ou plusieurs étapes de métabolisation classées en deux catégories. D'un côté le métabolisme de phase I, de l'autre celui de phase II (**Figure 17**).

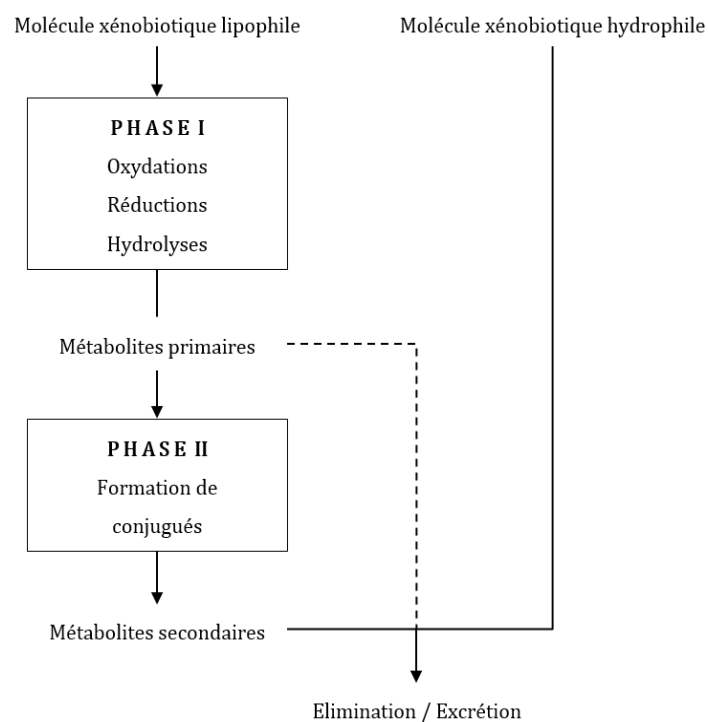


Figure 17. Processus de détoxification

Le métabolisme de phase I a pour objectif de fonctionnaliser les molécules, même les moins réactives, pour faire apparaître à leur surface des fonctions chimiques réactives. Il est généralement assuré par des enzymes membranaires de la famille des oxydoréductases (EC 1) qui, comme leur nom

le laisse supposer, sont chargées de réaliser des réactions d'oxydation et/ou de réduction. Peuvent ainsi être cités les mono-oxygénases à cytochromes P450 (CYP),^[66] les flavines mono-oxygénases (FMO),^[67] les alcools et aldéhydes déshydrogénases (ADH et ALDH),^[68] les monoamines oxydases (MAO),^[69] les peroxydases,^[70] les estérases^[62] et les azo-réductases.^[72] La liste demeure non exhaustive puisque d'autres enzymes participent également, dans une moindre mesure, au métabolisme de phase I.^[73]

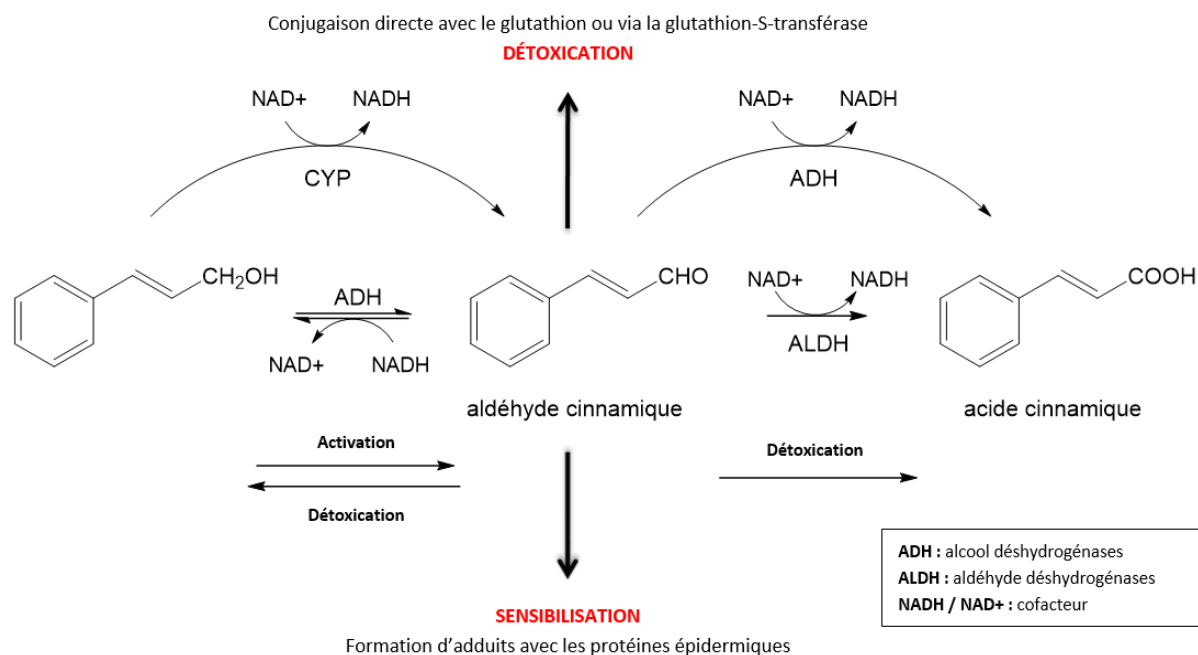
Le métabolisme de phase II vise la conjugaison des molécules issues de la phase I, encore relativement lipophiles, à des entités hydrosolubles dans le but d'en faciliter l'excrétion, principalement par voie urinaire. Il est essentiellement réalisé par des systèmes enzymatiques appartenant à la famille des transférases (EC 2). Les UDP-glucuronyl transférases (GT),^[74] les sulfotransférases (ST),^[75] les *N*-acétyltransférases (NAT)^[76] et les glutathion-S-transférases (GST)^[77] sont ainsi impliqués dans le métabolisme de phase II.

Lors du métabolisme de phase I, des intermédiaires fonctionnalisés, souvent réactifs, sont formés par les puissants systèmes d'oxydoréduction de la peau. Dans le cas d'une bonne détoxification, aucun de ces intermédiaires n'est accumulé dans le derme ou l'épiderme. Cependant, dans certaines situations, ces intermédiaires peuvent réagir avec les protéines et conduire à une toxicité. Alors que les corps étrangers étaient pris en charge par les enzymes de la phase I, ils deviennent, avant de subir la réaction de conjugaison de la phase II, des haptènes vrais. C'est le cas des pro-haptènes.

Les pro-haptènes

Initialement non réactifs vis-à-vis des protéines épidermiques, les pro-haptènes n'en restent pas moins des molécules allergisantes. Suite à leur pénétration cutanée, ils acquièrent leurs propriétés électrophiles après une ou plusieurs étapes de transformation par voie métabolique.^[29,30] Réalisées par des systèmes enzymatiques au cours du phénomène de détoxification,^[65] ces modifications dans leur structure chimique sont essentiellement dues à des réactions d'oxydoréduction.^[78]

Les pro-haptènes représentent plus d'un tiers des sensibilisants cutanés connus. Parmi eux, l'alcool cinnamique fait office de modèle. Utilisé à profusion en parfumerie, il fait partie du « Frangrance Mix I » qui réunit les 8 sensibilisants les plus couramment rencontrés dans les parfums.^[79] *In vivo*, l'alcool cinnamique est oxydé par une alcool déshydrogénase (ADH) en aldéhyde cinnamique. Ainsi fonctionnalisé, deux possibilités lui sont offertes : soit il se conjugue à une entité hydrosoluble dans le but d'être éliminé de l'organisme, soit il réagit avec les protéines épidermiques et forme un complexe antigénique capable de déclencher une réponse immunitaire (**Figure 18**).^[80]



Source : Smith *et al.*^[80]

Figure 18. Métabolisation proposée pour l'alcool cinnamique

Moins connue, la carvoxime est un autre exemple de pro-haptène. Oxime de la carvone, elle est un des intermédiaires de synthèse de cette dernière. La carvone peut être obtenue à partir du limonène. Elle trouve son utilisation dans l'alimentation pour son arôme de cumin, d'aneth et de menthe verte, et en agriculture pour sa faculté à empêcher la germination précoce des pommes de terre. En l'état, la carvoxime possède dans sa structure chimique deux sites électrophiles. Cependant, sa faible réactivité vis-à-vis des espèces nucléophiles ne permet pas d'expliquer son puissant pouvoir sensibilisant. Il a récemment été proposé que la carvoxime fasse l'objet d'une activation par voie métabolique.^[81] Ainsi, elle serait prise en charge par les cytochromes P450 avec pour résultat la formation d'un époxyde pouvant se réarranger en nitroso, un groupement fonctionnel électrophile extrêmement réactif (**Figure 19**).

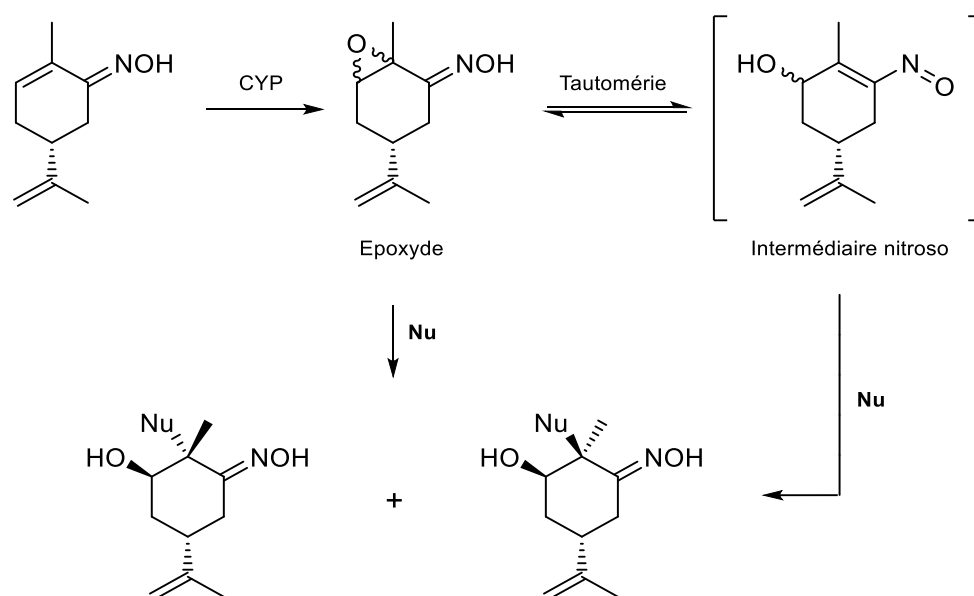


Figure 19. Bioactivation et réactivité proposées pour la carvoxime^[81]

IV. Les méthodes de détection des sensibilisants potentiels

En moins d'un demi-siècle, l'allergie de contact est devenue un problème majeur de santé publique. Actuellement, les diagnostics et traitements mis en place pour contrôler cette pathologie cutanée sont similaires à ceux décrits dans les années 60. Le test épicutané (ou « patch test » en anglais) reste le meilleur moyen de diagnostiquer une allergie de contact à un composé chimique.^[82] Malheureusement, une fois l'allergène incriminé identifié, seule une éviction totale permet au patient de contourner l'apparition des symptômes. Dans le cas où l'éviction est impossible, les seuls traitements disponibles sont basés sur l'utilisation d'anti-inflammatoire stéroïdiens puissants.^[83] Dans le but de minimiser les risques liés à l'allergie de contact, il est crucial de pouvoir déterminer avec précision le potentiel sensibilisant des substances chimiques avant leur commercialisation. En ce sens, de nombreuses méthodes qualitatives et quantitatives ont déjà prouvé leur efficacité. D'autres très prometteuses sont encore en phase de développement.

Depuis toujours, les tests d'évaluation du potentiel sensibilisant des molécules sont réalisés sur l'animal. En 1959, après avoir gradué les souffrances subies par les animaux lors de ces tests, Russel et Burch énoncèrent le concept déontologique des « 3R » signifiant « Replace, Reduce, Refine » en anglais.^[84] Toujours d'actualité, ce concept vise à remplacer (« Replace ») autant que possible les expérimentations *in vivo* par des tests *in vitro*, à réduire (« Reduce ») au maximum le nombre d'animaux en expérimentation et à affiner (« Refine ») les méthodes utilisées sur ces derniers dans l'optique de réduire au minimum leurs souffrances. Cette prise de conscience s'est peu à peu

généralisée et a été confortée puis renforcée par l'adoption en 1967 et 1999 par la Commission Européenne de deux directives,^[85,86] et par l'instauration en 2006 de l'ambitieux projet REACH qui prévoit l'évaluation toxicologique de plus de 30 000 substances chimiques d'ici 2018,^[11] et plus récemment en 2013 par la prise d'effet du 7^{ème} amendement de la Directive Cosmétique Européenne qui interdit l'importation et la vente de produits cosmétiques dont les ingrédients auraient été testés sur des animaux.^[13] Dans ce contexte, le développement de méthodes dites « alternatives » qui visent à évaluer le potentiel sensibilisant des molécules et qui ne reposent pas sur l'utilisation d'animaux devient un objectif de tout premier ordre. Qu'elles soient *in vivo*, *in vitro*, *in silico* ou encore *in chemico*, ces méthodes ont toutes le même objectif : détecter les potentiels sensibilisants des molécules avant leur mise sur le marché tout en s'accordant au concept des « 3R ».

IV.1. Les méthodes in vivo

Historiquement les tests d'évaluation du potentiel sensibilisant des molécules ont toujours été réalisés *in vivo*, notamment le cobaye, à l'aide du test de Buehler (1965) et du GPMT (Guinea Pig Maximization Test, 1969).^[87,88] Ces deux méthodes sont basées sur l'évaluation du potentiel d'éllicitation d'une réaction allergique après application topique d'un composé chimique sur des cobayes préalablement sensibilisés à ce même composé. Dans le cas du test de Buehler, l'application de la substance chimique est cutanée. Dans le cas du GPMT, la substance chimique est injectée à l'animal par voie intradermique. Les deux méthodes nécessitent l'utilisation d'un nombre très important d'animaux soumis au stress, aux souffrances et à des temps d'expérimentation longs (20 jours pour le GPMT, plus de 30 jours pour le test de Buehler). Excepté le fait que ces méthodes soient incompatibles avec une évaluation massive à grande échelle d'un nombre important de substances chimiques (objectif de mission du projet REACH),^[11] elles sont en désaccord total avec le principe déontologique des « 3R ».

Le LLNA

Développé dans les années 90 par Kimber et Basketter,^[89] et validé en 2001 par l'ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods),^[90] le LLNA (Local Lymph Node Assay) est un test basé sur l'utilisation de la souris et repose uniquement sur la phase de sensibilisation, et non sur celle de révélation (éllicitation) contrairement au test de Buehler et du GPMT. Le principe du LLNA est le suivant : mesurer la prolifération lymphocytaire après l'application topique sur l'oreille de l'animal d'une substance chimique à tester. A l'heure actuelle, le LLNA est le test le plus couramment utilisé pour la détection et la classification de nouveaux sensibilisants cutanés.^[91]

Son protocole expérimental recommande l'application de la molécule sur l'oreille de souris pendant 3 jours successifs au moyen d'un véhicule adapté, généralement un mélange composé d'acétone et d'huile d'olive. Au 6^{ème} jour, un radioisotope (de la thymidine tritiée) est injecté par voie intraveineuse. Cinq heures après l'injection l'animal est sacrifié, les ganglions lymphatiques de l'oreille sont excisés et la prolifération lymphocytaire est mesurée par β -scintillation grâce à la radioactivité émise par le radioisotope. La mesure d'un taux de radioactivité élevé est interprétée comme une expansion clonale importante et traduit une forte réponse immunitaire. En pratique, toute substance capable de provoquer une prolifération de lymphocytes trois fois supérieure au témoin sera considérée comme sensibilisante. Il est alors possible de classer les composés en fonction de leur valeur d' EC_3 correspondant à la dose nécessaire pour provoquer un index de stimulation de trois (**Figure 20**).

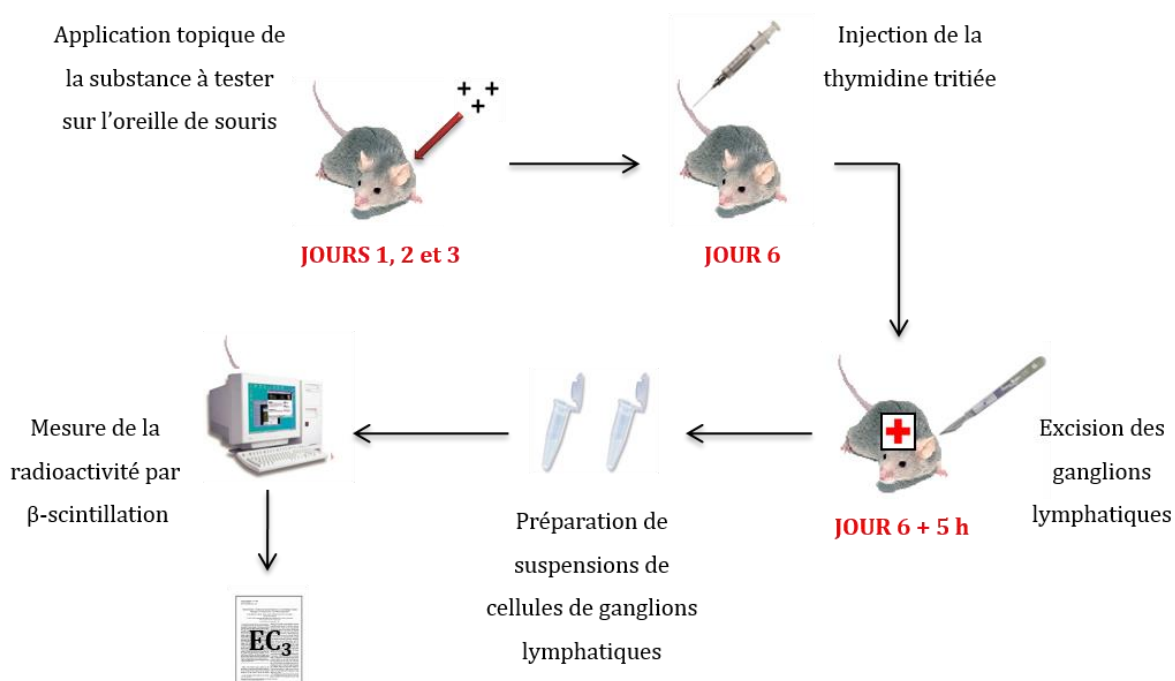


Figure 20. Protocole expérimental du LLNA

Si le LLNA permet la détection des molécules allergisantes et la quantification de leur potentiel sensibilisant en amoindrissant l'utilisation des animaux, il n'en reste pas moins un test *in vivo* qui passe par le sacrifice d'un nombre non négligeable de souris de laboratoire.

IV.2. Les méthodes in vitro

Le début du 21^{ème} siècle est marqué par la mise au point de méthodes de détection *in vitro* employées dans l'évaluation du potentiel sensibilisant des allergènes. Le h-CLAT, le MUSST, le keratinoSens® assay ou encore l'utilisation d'épidermes reconstruits peuvent ainsi être cités.

Le h-CLAT et le MUSST

Acceptés en pré-validation par l'ECVAM (European Center for Validation of Alternative Methods),^[92] le h-CLAT (human Cell Line Activation Test) et le MUSST (Myeloid Y-937 Skin Sensitization Test) reposent sur la mesure de l'activation de marqueurs de surface (CD54 ou CD86) des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes après exposition à un allergène donné. Dans le cas du h-CLAT, des cellules THP-1 sont mises en pré-culture (48 à 72 heures) avant d'être placées en présence de la molécule à tester (24 heures).^[93] La viabilité des cellules et la surexpression des marqueurs de surface CD54 ou CD86 sont décelés grâce à un anticorps fluorescent spécifique aux marqueurs CD54 ou CD86. Suite à la phase d'incubation, la molécule testée est répertoriée comme étant sensibilisante si l'expression des marqueurs CD54 et CD86 est 1,5 fois supérieur à l'expression des cellules de contrôle. Le test du MUSST ressemble fortement à celui du h-CLAT.^[94] Des cellules U-937 sont mises en présence de la molécule à tester pendant 48 heures, puis la viabilité des cellules et la surexpression du marqueur CD86 sont testés via un anticorps fluorescent spécifique au marqueur CD86. Après incubation des cellules testées, la molécule est considérée comme allergisante si l'expression du marqueur CD86 est 1,2 supérieur à l'expression des cellules témoins.

Le KeratinoSens® assay

Le KeratinoSens® assay repose sur l'utilisation de kératinocytes humains.^[95] Ces cellules sont en mesure de produire, après une modification génétique et en présence d'une molécule sensibilisante, de la luciférase. La luciférase est une enzyme capable d'émettre un rayonnement lumineux au contact de son substrat. Suivant le mode opératoire, les kératinocytes humains, la molécule à tester et le substrat de l'enzyme sont incubés 48 heures. Il s'ensuit une mesure de l'activité de la luciférase par luminescence. Si cette activité est 150 % supérieure à l'activité des cellules de contrôles, la molécule testée est jugée sensibilisante.

Les épidermes reconstruits

En 2005, Facy *et al.* ont montré que les cellules de Langerhans présentes dans les épidermes reconstruits s'activaient et exprimaient à leur surface des marqueurs spécifiques au contact d'un allergène.^[96] Expérimentalement, les molécules sensibilisantes sont appliquées à la surface des épidermes reconstruits et on observe l'expression de gènes spécifiques ainsi que l'aspect des cellules de Langerhans. Si d'autres exemples peuvent également illustrer l'utilisation adaptée des épidermes reconstruits dans la détection du pouvoir sensibilisant des allergènes,^[97] le champ d'étude à explorer reste pour l'heure relativement large.

Le nombre de méthodes *in vitro* adaptées à l'évaluation du potentiel sensibilisant des allergènes est en constante augmentation. En ce sens, l'ECVAM appuie depuis 2005 le développement de méthodes de détection des molécules allergisantes basées sur la mesure des variations du nombre de cellules dendritiques au sein de cultures cellulaires.^[98]

IV.3. Les méthodes *in silico*

Le développement d'outils informatiques fiables couplé à la croissance de la puissance informatique a permis la mise en place de techniques de simulations numériques centrées sur la prédiction du pouvoir sensibilisant des allergènes cutanés. Les méthodes *in silico* axées sur les relations de structure-activité (SARs) des composés allergisants permettent de faire le rapprochement entre leurs propriétés physico-chimiques et leur potentiel sensibilisant.^[99] Trois approches différentes basées sur les SARs existent actuellement et sont brièvement détaillées ci-dessous.

Les bases de données

Les bases de données cherchent à compiler un maximum d'informations relatives à des cas d'allergies observés. Généralement hospitalières, elles sont basées sur des données cliniques et non chimiques. En 1985, Benezra *et al.* ont développé une base de données mettant en avant l'aspect chimique des molécules allergisantes et fonctionnant via un programme informatique appelé PROPHET.^[100] A l'origine, cette base de données regroupait toutes les données extraites du journal *Contact Dermatitis* (sur la période 1975-1982). La recherche s'effectue à l'aide d'un arbre de classification (structures, sous-structures chimiques, etc.). La limite de cette méthode tient à la manière dont la base de données est alimentée. En effet, dans la littérature, les cas d'allergies les plus bénins, mais les plus communs, sont souvent moins cités que des cas atypiques.

Les logiciels informatiques experts

Les logiciels informatiques dits « experts » sont fondés sur la comparaison structurale de la molécule suspectée sensibilisante avec des motifs réactifs déjà référencés.^[30] Pour chaque molécule un profil des risques peut ainsi être dressé. Outre les données structurales, certains paramètres physico-chimiques sont également pris en compte (capacité à pénétrer l'épiderme, faculté des métabolites issus de la détoxification à réagir avec les acides aminés, etc.). Suite à l'évaluation de plus de 200 composés, plusieurs de ces logiciels experts ont été validés par l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economique) parmi lesquels DEREK (Deduction and Estimation of Risk from Existing Knowledge)^[101] et TOPKAT (Toxicity Prediction by Komputer Assisted Technology)^[102]. Bien que performantes, ces méthodes informatiques sont quelque peu limitées en raison de leur incapacité à identifier les pré- et les pro-haptènes, des molécules qui au regard de leur structure chimique sont non sensibilisantes.

Les méthodes quantitatives basées sur la relation structure-activité

Les méthodes quantitatives basées sur la relation structure-activité (QSARs, Quantitative Structure-Activity Relationships) permettent elles aussi d'échelonner l'intensité d'une réponse biologique. Dans le domaine de l'allergie de contact, la méthode la plus couramment utilisée est le RAI (Relative Alkylation Index).^[103] Suivant cette méthode, le potentiel sensibilisant d'une molécule est en rapport avec son aptitude à se lier à une protéine. Le RAI estime le taux d'hapténisation des protéines par une substance chimique donnée et en déduit l'intensité de la réponse biologique. Trois paramètres sont ainsi pris en compte : la dose de produit appliquée, la lipophilie de la molécule et sa réactivité chimique. Il en découle une relation mathématique :

$$\text{RAI} = A \log(k) + B \log(P) + C \log(D)$$

où **k**, la constante cinétique de la réaction entre la molécule à tester et le nucléophile modèle

log(P), le coefficient de partage octanol/eau

D, la dose du produit à tester

A, B et C, le poids de chacun des paramètres

Chaque famille de molécules a une équation qui lui est propre en fonction de la manière dont les molécules sont susceptibles d'interagir avec des nucléophiles (S_N , accepteur de Michael, etc.).

Initialement, le modèle du RAI s'appuyait uniquement sur des données fournies par le GPMT. Par la suite, des données issues du LLNA ont été introduites dans son modèle mathématique.^[104] Si le RAI permet d'évaluer avec une assez bonne précision le potentiel sensibilisant de deux molécules issues d'une même famille, il ne permet pas d'évaluer deux substances provenant de familles chimiques différentes. C'est-à-dire qu'aucune extrapolation de résultats d'une famille de composés à une autre n'est possible. Pour cette raison, d'autres méthodes complémentaires sont nécessaires pour évaluer le potentiel sensibilisant des molécules xénobiotiques.

IV.4. Les méthodes in chemico

Au courant des années 1930, Landsteiner et Jacobs ont entrepris les premiers travaux sur l'étude de la réactivité de molécules sensibilisantes.^[105] Partant de dérivés halogénés du nitrobenzène, ils les ont fait réagir avec un nucléophile modèle simple, l'aniline. Parallèlement, ces mêmes dérivés halogénés ont été testés sur le cochon d'inde et les réponses allergiques résultantes observées. Ils ont constaté qu'un dérivé halogéné du nitrobenzène réactif vis-à-vis de l'aniline présentait également la faculté d'induire une allergie cutanée chez le cochon d'inde et, qu'inversement, un dérivé non réactif vis-à-vis de l'aniline était non allergisant chez ce même animal. Ainsi, pour la première fois, les auteurs ont démontré qu'une corrélation existe entre la réactivité d'une molécule et son pouvoir allergisant.

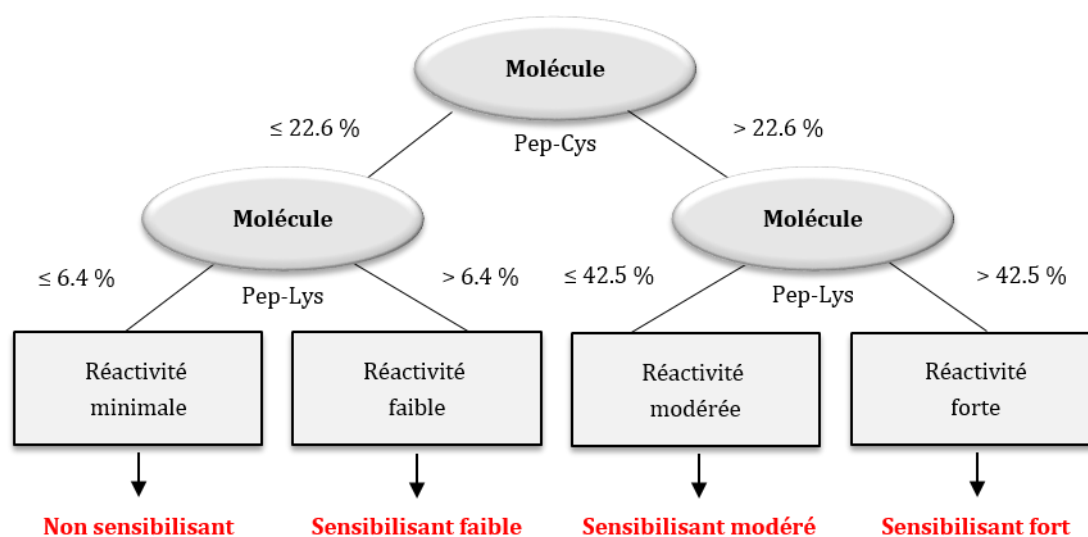
Si les premiers travaux réalisés dans le but d'améliorer la compréhension de la réactivité chimique entre haptènes et protéines ont été entrepris dans les années 30, ce n'est qu'à partir des années 2000, en raison des législations européennes, que des méthodes de détection *in chemico* d'allergènes cutanés ont été développées. Elles sont fondées sur le postulat que le potentiel sensibilisant d'une substance chimique est directement corrélé à sa réactivité vis-à-vis de peptides. Si certaines de ces méthodes sont à l'heure actuelle en phase de développement, d'autres ont déjà prouvé le bien-fondé de leur efficacité.^[106]

Le DPRA

Le DPRA (Direct Peptide Reactivity Assay) est un test rapide d'évaluation du pouvoir sensibilisant des composés chimiques basé sur leur réactivité avec des peptides. Développé en 2004 par Gerberick et *al.*, le DPRA reposait à l'origine sur l'observation de la déplétion peptidique de quatre peptides différents après incubation/réaction de ces derniers avec la molécule soumise au test.^[17] Ces peptides étaient le glutathion, un peptide naturel impliqué dans le processus de détoxification de l'organisme, et trois peptides de synthèse de séquence générale AcRFAAXAA (avec X = cystéine, lysine ou histidine).

Au vu de sa faible réactivité vis-à-vis des haptènes testés, le peptide possédant une histidine en guise de groupement nucléophile a rapidement été abandonné.

Dans la pratique, l'haptène sélectionné est incubé séparément avec chacun des peptides à température ambiante sur une durée de 24 heures. La déplétion des différents peptides est ensuite mesurée par CLHP (chromatographie liquide haute performance) couplée à une détection UV. Basé sur les données de déplétion peptidique obtenues avec les peptides lysine et cystéine, un arbre décisionnel permet la classification des haptènes en quatre catégories en fonction de leur potentiel sensibilisant : non sensibilisants, sensibilisants faibles, sensibilisants modérés et sensibilisants forts (**Figure 22**).^[107]



Source : Gerberick *et al.*^[107]

Figure 22. Arbre décisionnel de classification des allergènes selon la méthode du DPRA

Réalisés sur 82 molécules, les premiers essais ont montré une bonne précision concernant la prédiction des allergènes puisqu'une similitude de l'ordre de 89 %, par comparaison avec les résultats obtenus dans le test du LLNA, a été observée. Le test du DPRA est depuis 2013 validé par l'ECVAM.^[108] Cependant, il trouve sa principale limite dans le fait qu'il n'autorise pas la détection de pré- et de pro-haptènes. Autre ombre au tableau : des problèmes liés à la faible solubilité des haptènes lipophiles dans le milieu semi-organique imposé par le protocole expérimental du DPRA ont été décrits. Pour surmonter cette difficulté, Merckel *et al.* ont proposé en 2010 l'utilisation de microémulsions permettant une meilleure solubilité des différents réactifs.^[109] Leurs travaux ont démontré la possibilité d'effectuer des réactions de type haptènes-peptides dans un milieu contenant une phase aqueuse, une phase organique, un surfactant et un co-surfactant. Néanmoins, les études de réactivité

menées par RMN du carbone 13 ont montré la limite de la méthode puisque les réactivités observées en milieu semi-organique ne sont pas toujours identiques à celles réalisées dans les microémulsions.

Le PPRA

Le PPRA (Peroxydase Peptide Reactivity Assay) est un test de détection des allergènes qui s'inscrit dans la continuité du DPRA.^[110] Mis au point en 2009 par Gerberick *et al.*, il vient pallier au manquement du DPRA en proposant l'évaluation du pouvoir sensibilisant de pré- et pro-haptènes. Le PPRA se différencie du DPRA par l'intégration d'une étape d'oxydation dans son protocole expérimental. Les peroxydases sont largement présentes dans la peau et leur rôle dans l'activation de certains xénobiotiques est important.^[111,112] Les premières études réalisées se sont donc basées sur l'utilisation d'un système oxydant composé de peroxydases de raifort et d'eau oxygénée (HRP/P) (Figure 23).

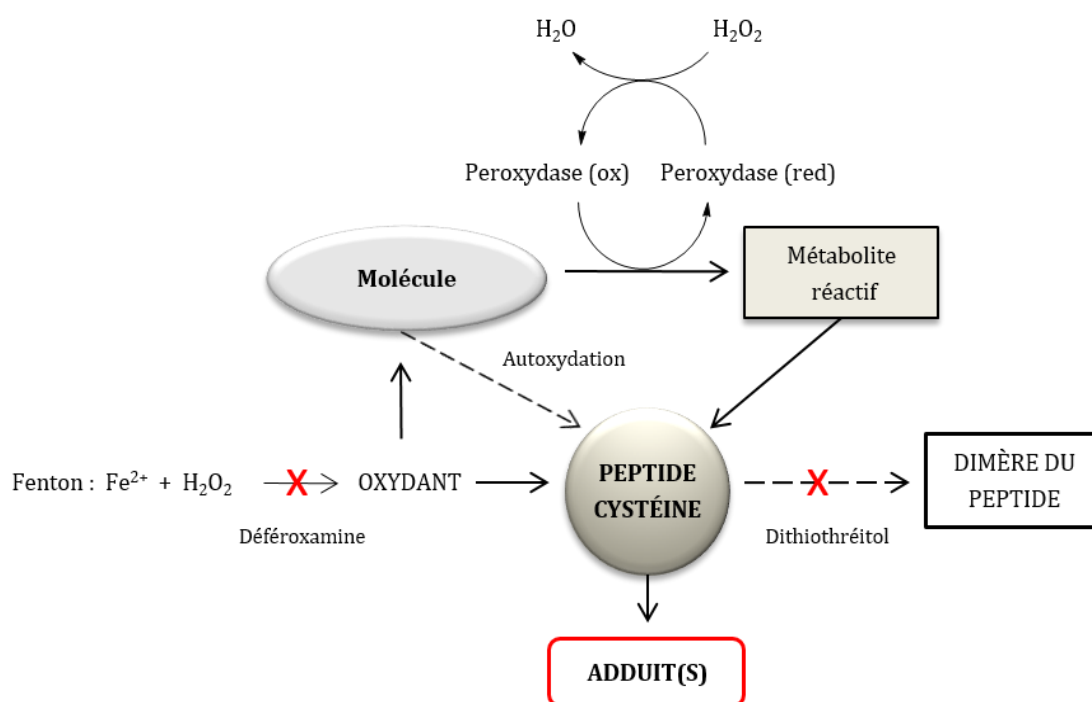


Figure 23. Test de réactivité peptidique en présence du système HRP/P

Lors des premiers travaux, la déplétion d'un peptide, le peptide cystéine, était mesuré par CLHP après son incubation en présence du système HRP/P et de la substance à tester. Un agent chélateur, la déféroxamine, était introduit afin d'inhiber la réaction de Fenton qui conduit à la formation d'espèces radicalaires oxygénées parasites. Du dithiothréitol était également additionné avant chaque analyse afin d'éviter la formation d'éventuels dimères du peptide cystéine pouvant potentiellement se former. En suivant ce protocole, Gerberick *et al.* ont développé une technique capable de détecter des pré- et des pro-haptènes. En outre, la méthode mise en place permet de discriminer ces deux classes d'allergènes. La différenciation s'appuie sur le fait que les pré-haptènes réagissent avec le peptide cystéine qu'ils soient ou non en présence du système oxydant HRP/P. *A contrario*, les pro-haptènes réagissent avec le peptide cystéine si et seulement si ils sont mis à incuber avec le système oxydant HRP/P.

Depuis 2011, le PPRA ne se limite plus à l'utilisation unique du peptide cystéine. Si bon nombre d'allergènes sont réactifs vis-à-vis du groupement thiol des résidus cystéines, d'autres sont plus spécifiques des groupements aminés. En ce sens, le peptide lysine possédant une amine primaire nucléophile a été introduit au PPRA.^[113]

Autres méthodes basées sur la réactivité peptidique

Parallèlement au DPRA et au PPRA, d'autres travaux ont été menés dans le but de développer des méthodes *in chemico* de détection des sensibilisants cutanés basées sur la réactivité de peptides.

En 2003, Kato *et al.* ont pour la première fois proposé une technique s'appuyant sur l'observation par SM (spectrométrie de masse) d'adduits pouvant se former entre des substances chimiques et le glutathion.^[114] Un total de 18 molécules dont 14 sensibilisantes et 4 non sensibilisantes a été testé. Les résultats, qui ont été comparés aux données issues des tests du LLNA et du GPMT, sont satisfaisants puisque des adduits ont été observés pour 13 des 14 molécules sensibilisantes testées.

En 2005, Schultz *et al.* ont développé un test basé sur la réactivité de composés envers le glutathion.^[115] Ils ont proposé d'incuber les substances chimiques à évaluer avec un excès de glutathion puis de mesurer la déplétion peptidique au cours du temps par spectroscopie ultraviolet-visible. Le calcul d'une valeur EC₅₀ correspondant à la dose nécessaire pour provoquer une déplétion peptidique de 50 % du glutathion est réalisé. Il devient alors possible de comparer les potentiels allergisants des composés chimiques entre eux. Si ce test s'est avéré être relativement précis, Aptula *et al.* ont suggéré en 2006 de le combiner avec un autre test développé quelques années plus tôt, celui du TETRATOX.^[116] Ce dernier est basé sur l'utilisation de protozoaires ciliés soumis aux substances chimiques à tester et dont la population est ensuite mesurée par spectrométrie UV-visible.

Enfin, en 2008, Natsch et Gfeller ont imaginé un test basé sur l'observation de la réactivité par CLMS (chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse) d'un allergène potentiel avec un peptide unique de séquence Ac-NKKCDLF.^[117] La CLMS permet de combiner plusieurs avantages. Outre l'observation de la déplétion peptidique, il est possible d'obtenir simultanément des informations sur les éventuels adduits formés. L'utilisation d'un seul peptide présentant dans sa séquence les résidus cystéine et lysine permet de réduire le nombre d'expériences à réaliser. Revers de la médaille, ce peptide unique exclut la possibilité de connaître la nature exacte des acides aminés impliqués dans la formation des adduits.

Le premier chapitre de thèse qui suit est consacré à l'étude des interactions haptène-protéine. Cette dernière étant au cœur du sujet de thèse, elle ne pouvait être exposée de façon exhaustive dans l'introduction générale.

Chapitre I

Modèle d'études des mécanismes
d'interaction haptène-protéine

Chapitre I

Modèles d'études des mécanismes d'interaction haptène-protéine

Comme détaillé précédemment, l'étape clé dans le déclenchement de l'allergie de contact est la formation d'une entité antigénique entre un haptène et une protéine épidermique.^[14] Le développement de nouvelles méthodes alternatives visant à détecter le pouvoir sensibilisant des molécules passe donc par la compréhension des mécanismes qui régissent cette étape clé. Différents modèles permettant l'étude des interactions haptène-protéine ont donc été développés. Ce premier chapitre de thèse se propose de les présenter. Dans la continuité, nous présenterons le modèle et la technique d'analyse utilisés pour nos études. Enfin, nous exposerons le sujet de thèse.

I. Historique des modèles utilisés

Dans les années 30, les premières études sur les interactions haptène-protéine se sont appuyées sur l'utilisation de nucléophiles modèles simples (aniline, thiophénol, etc.).^[105] Naturellement, au fil du temps, les modèles d'études ont cherché à se rapprocher au plus près de la réalité du phénomène d'allergie de contact chez l'Homme. Au courant des années 80, les acides aminés^[118] et les peptides^[119] se sont présentés comme de nouveaux modèles adaptés. Ces modèles se sont encore un peu plus sophistiqués avec l'utilisation dans les années 90 de protéines modèles.^[120] Le développement des modèles s'est fortement accéléré au début des années 2000 par le besoin de faire face aux législations européennes (cf. 7^{ème} amendement de la Directive Cosmétique Européenne) (**Figure 1**).

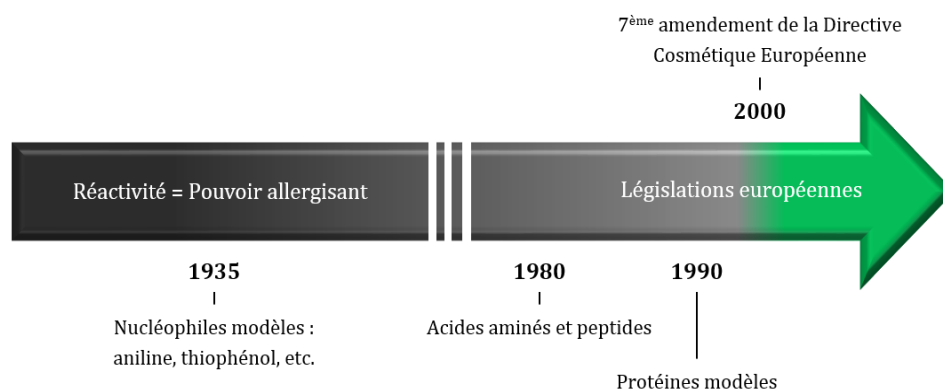


Figure 1. Chronologie des modèles utilisés dans l'étude des interactions haptène-protéine depuis 1935

Depuis les années 1980, le laboratoire de Dermatochimie s'efforce de comprendre, d'un point de vue moléculaire, les mécanismes qui aboutissent à l'allergie de contact. En proposant l'utilisation d'acides aminés, de peptides ou de protéines dans l'étude des interactions haptène-protéine,^[15-18] le laboratoire a su s'adapter à la constante évolution des modèles. Les interactions entre haptènes et modèles sont étudiés au moyen de la RMN (Résonance Magnétique Nucléaire), une technique d'analyse permettant l'obtention rapide d'informations sur la cinétique et les mécanismes des réactions. L'évolution des réactions au cours du temps est généralement suivie à l'aide d'expériences monodimensionnelles du carbone 13. La nature et la structure des adduits formés sont quant à elles déterminées grâce à des expériences bidimensionnelles hétéronucléaires ^1H - ^{13}C .

L'utilisation conjointe de divers modèles d'études et de la RMN du carbone 13 est donc un outil précieux dans la compréhension du comportement de nombreuses molécules sensibilisantes, qu'elles soient des haptènes, des pré-haptènes ou des pro-haptènes.^[121] Cependant, l'observation clinique de certains cas d'allergie cutanée semble indiquer que les mécanismes réactionnels observés sur les modèles d'étude diffèrent de ceux qui aboutissent à l'apparition de symptômes chez le patient. Dans le but d'assurer une meilleure prévention face aux allergènes potentiels, il devient nécessaire d'affiner nos connaissances en améliorant les modèles utilisés.

Dans une volonté de se rapprocher au plus près des phénomènes *in vivo* qui aboutissent à l'allergie de contact, nous avons entrepris de suivre le devenir d'allergènes *in situ* grâce à un modèle d'épiderme. A l'aide d'une méthode non invasive, nous nous proposons d'observer le devenir d'allergènes, de leur(s) éventuelle(s) transformation(s) métabolique(s) (dans le cas de pro-haptènes), jusqu'à leur fixation sur les protéines épidermiques. Nous avons donc combiné l'utilisation d'un système biologique connu, les épidermes humains reconstruits (EHR), avec une technique adaptée, la RMN HRMAS.

II. Les épidermes reconstruits, un modèle *in situ*

Un peu d'histoire

Si la culture *in vivo* de cellules de peau est connue depuis le milieu du 20^{ème} siècle,^[122] ce n'est qu'à partir des années 1970 que débute réellement l'histoire des épidermes reconstruits. Initialement, l'objectif était le suivant : créer, à partir d'une culture de cellules, un épiderme reconstruit possédant la structure et les fonctionnalités d'un épiderme humain. En 1975, Rheinwald et Green ont en partie atteint cet objectif en obtenant, par prolifération de kératinocytes humains et sous la forme de lambeaux, le premier modèle d'épiderme reconstruit.^[123] En 1983, un modèle d'épiderme reconstruit possédant une couche cornée voit le jour.^[124] En 1986, des épidermes sont reconstruits à partir

d'équivalents dermiques. Outre le fait de mimer les propriétés physiques d'un épiderme natif, ils possèdent également celles d'un derme fonctionnel puisque le support dermique sur lequel les épidermes sont reconstruits contient des fibroblastes qui synthétisent du collagène et d'autres molécules de la matrice extracellulaire.^[125] Les années 1990 sont marquées par l'apport de nombreuses améliorations. Depuis 1993, les épidermes reconstruits peuvent contenir des mélanocytes.^[126] En 1997, des cellules de Langerhans ont été intégrées dans leur composition.^[127,128] Aujourd'hui, la culture de cellules de peau s'est démocratisée,^[129] et les progrès de l'ingénierie permettent d'obtenir des épidermes reconstruits dont la structure, la composition et l'aspect sont hautement ressemblant à ceux des épidermes humains.^[130]

Les utilisations à court, moyen et long terme des peaux issues de cultures cellulaires sont nombreux et variés. Elles visent la modélisation biologique de certaines pathologies de la peau, le traitement et la fermeture des plaies cutanées (greffes de peau chez les grands brûlés), le transfert et l'expression de gènes modifiés, et bien entendu la substitution des modèles animaux.^[131]

Les principaux modèles et leurs applications

De nombreux modèles d'épidermes reconstruits ont été développés et certains d'entre eux sont disponibles. Actuellement, sont commercialisés les modèles EpiDerm® (MatTek Corporation-Ashland, USA), EpiSkin® (L'Oréal, France) et SkinEthic® (SkinEthic, France).

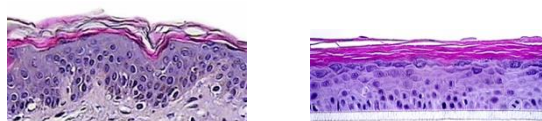
Ces différents modèles d'épidermes reconstruits diffèrent par leurs propriétés structurales.^[132] Ils trouvent cependant leur utilité dans des domaines d'applications proches : étude de la corrosion de substances d'essai, évaluation de la phototoxicité suite à l'application de composés phototoxiques, mesure du taux d'irritation lié au contact avec des xénobiotiques et recueil de données sur le transport de molécules au sein de l'épiderme.^[133] L'ECVAM a récemment validé l'utilisation des modèles EpiDerm® et EpiSkin® pour les tests de corrosivité et d'irritation.^[134,135]

La présence dans ces modèles d'épidermes reconstruits d'enzymes responsables de la bioconversion des xénobiotiques est démontrée.^[136] Ainsi, de nombreux enzymes appartenant aux métabolismes de phase I (alcool et aldéhyde déshydrogénases, flavines mono-oxygénases, estérases, cytochromes P450, etc.) et II (essentiellement des transférases) sont identifiées.^[137] Dans chacun des modèles, l'activité des enzymes a été mesurée et comparée à celle des enzymes présents dans des échantillons *ex vivo* de peau humaine.^[138] Si l'activité des cytochrome P450 au sein des modèles d'épidermes reconstruits semble peu élevée, celle des autres enzymes est significative.

Pour l'heure, la principale limitation de ces trois modèles commerciaux réside dans leur fonction de barrière cutanée relativement faible. En d'autres termes, comparativement à un épiderme natif, leur perméabilité est très élevée. Des troubles lors du phénomène de desquamation,^[139] ou la présence de microscopiques foyers non kératinisés^[140] pourraient être à l'origine de ce problème.

Le modèle RHE de SkinEthic®

Pour nos études, nous avons choisi de travailler avec le modèle RHE (Reconstructed Human Epidermis) de SkinEthic® qui est le leader mondial de l'ingénierie de tissus humains reconstruits et de modèles cellulaires épithéliaux. Cet épiderme est reconstitué au contact de l'air par culture de kératinocytes humains normaux.^[141] Bien différenciées, les cellules en culture reposent sur un support inerte en polycarbonate. Le modèle RHE de SkinEthic® est composé d'une couche cornée et des différentes couches présentes dans un épiderme naturel. Sa structure est donc hautement similaire à celle d'un épiderme humain (**Figure 2**).^[133] En revanche, la concentration en lipide du modèle est plus faible que celle d'un épiderme natif.^[142]



Source : skinethic.com

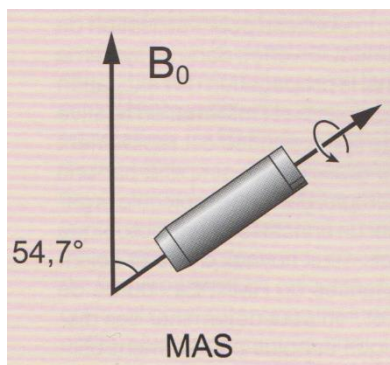
Figure 2. Coupes histologiques d'un épiderme humain (à gauche) et du modèle RHE de SkinEthic® (à droite)

Comme énoncé précédemment, le modèle RHE de SkinEthic® est essentiellement utilisé dans le cadre de tests de corrosion,^[143] de phototoxicité^[144] et d'irritation^[145] ; le recueil de données sur le transport de molécules étant plus difficile à mettre en œuvre.^[146] A l'instar des modèles EpiDerm® et EpiSkin®, le modèle RHE de SkinEthic® est doté d'enzymes de bioconversion capables de métaboliser des xénobiotiques. Cette donnée est indispensable à l'étude de la réactivité de pro-haptènes nécessitant une activation par voie métabolique pour devenir réactifs vis-à-vis des protéines épidermiques.

Le choix du modèle RHE de SkinEthic® pour nos études s'inscrit dans une volonté de continuité avec les travaux précédemment réalisés et validés au laboratoire.^[19] Ces travaux seront présentés plus loin dans le Chapitre I.

III. Le RMN HRMAS, une technique d'analyse de choix

La RMN HRMAS (high-Resolution Magic Angle Spinning) est l'étude par RMN, à un angle de rotation spécifique et à une fréquence de rotation élevée, de composés mobiles présents dans un milieu hétérogène.^[147] L'angle de rotation par rapport au champ magnétique principal B_0 a une valeur de $54,7^\circ$ et est appelé angle « magique » (**Figure 3**).



Source : l'actualité chimique
Juin-Août 2012

Figure 3. Echantillon en rotation à l'angle magique θ_m par rapport au champ magnétique principal B_0

Si la RMN HRMAS est une technique développée à l'origine pour la synthèse organique en phase solide, elle trouve aujourd'hui de nombreuses applications dans des domaines variés tels que la biologie, la médecine ou encore l'agroalimentaire.

Un peu d'histoire

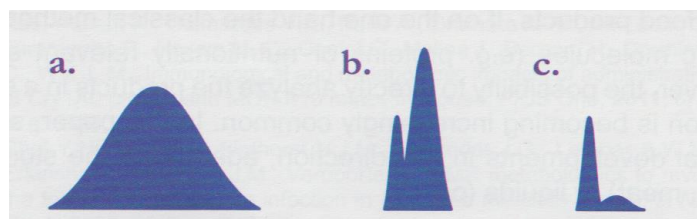
En 1959, Andrew *et al.* ont montré pour la première fois un affinement maximal du signal pour un angle de $54,7^\circ$.^[148] En RMN du solide du sodium 23, ils ont observé l'effet de l'inclinaison sur un tube en rotation contenant du chlorure de sodium. Pour des angles de rotation allant de 50° à 100° , ils ont mesuré la largeur du signal correspondant. Leurs travaux démontrèrent que l'affinement du signal est maximal pour une valeur d'angle de $54,7^\circ$. Cet affinement est expliqué par l'élimination des couplages dipolaires. La même année, les expériences de Lowe ont mis en avant la présence de bandes latérales de rotation sur des spectres acquis par RMN du solide du fluor 19 à l'angle magique.^[149] Ces bandes, dont l'origine provient d'une inhomogénéité du champ, peuvent être supprimées en augmentant significativement la vitesse de rotation de l'échantillon.

Dans les années 1970, Dostrová *et al.* ont démontré que l'application à un échantillon non homogène (mélange liquide-solide) d'une vitesse de rotation élevée, combinée à son inclinaison à l'angle magique, permettait de supprimer les effets des différences de susceptibilités magnétiques dues à la nature du système étudié.^[150]

Introduite en 1995 pour faciliter la caractérisation de résines fonctionnalisées dans le cadre de la chimie combinatoire,^[151] la technique dite de la rotation à l'angle magique (MAS, « magic-angle spinning ») à haute résolution (HRMAS) découle de la RMN du solide. Elle définit la rotation à l'angle magique optimisée pour l'observation des noyaux ^1H , ^{13}C et ^{15}N sur des phases hétérogènes. La qualité des spectres est proche de celle obtenue en RMN du liquide sur des phases homogènes (composés en solution).

Principes de base de la RMN HRMAS

Dans un échantillon donné, liquide ou solide, une mobilité minimale des molécules est nécessaire à l'obtention de spectres RMN de qualité suffisante. En RMN en phase liquide « classique », les milieux utilisés sont isotropes.^[152] Autrement dit, en tous points des échantillons, l'environnement autour d'une molécule donnée est invariant quelle que soit la direction de l'espace considérée. Dans un solide, les milieux sont anisotropes et les mouvements moléculaires sont souvent faibles, parfois inexistant. Dans un milieu solide, en plus des déplacements chimiques et des couplages indirects qui ne sont pas moyennés (à contrario de la RMN liquide), d'autres interactions non désirées viennent s'ajouter telles que les interactions dipôle-dipôle (dipolaire), les différences de susceptibilité magnétique, l'anisotropie de déplacement chimique et les interactions quadripolaires. La RMN HRMAS a la capacité d'annuler tous ces effets en moyennant les différences mécanistiques d'élargissement des raies. Pour ce faire, il est indispensable de placer le système à analyser en rotation rapide à l'angle magique (**Figure 4**).^[153,154]



Source : l'actualité chimique

Juin-Août 2012

Figure 4. Rotation à l'angle « magique » à haute résolution (HRMAS)

a. Spectre RMN ^1H d'un mélange hétérogène donne des signaux large ; b. la rotation à l'angle magique récupère de la résolution si les molécules sont au moins partiellement mobiles ; c. un filtre de relaxation (CPMG ou similaire) peut être utilisé pour réduire l'intensité des signaux en provenance des molécules moins mobiles

Tous les solides ne sont pas adaptés à l'analyse de leur composition et/ou structure par RMN HRMAS. Seuls les semi-solides qui jouissent d'un certain degré de liberté sont appropriés. Ils sont qualifiés de solides « mous », par opposition aux solides rigides dont le degré de liberté est quasi nul ou nul. La liste des solides mous pouvant être rapidement analysés par des expériences de RMN HRMAS est longue : résines gels, polymères, catalyseurs, aliments, plantes, organes, tissus, etc.^[155]

Application de la RMN HRMAS en chimie, biologie, médecine et agroalimentaire

La RMN HRMAS trouve son plus grand intérêt en chimie organique pour l'étude de la synthèse de molécules sur support solide (résines gels ou billes de polymère). La synthèse organique sur support solide permet la production de composés purs au moyen de synthèses multi-étapes complexes. L'analyse des produits obtenus par RMN en phase liquide nécessite le clivage des molécules synthétisées du substrat. Dans certains cas, une étape de purification peut être nécessaire. La RMN HRMAS contourne ce problème en proposant l'analyse des molécules synthétisées directement sur le support solide. Stöver et Fréchet (1989) ont été les pionniers dans ce domaine en obtenant plusieurs spectres de haute résolution de l'éphédrine ancrée sur des chaînes de polystyrène.^[156]

Depuis, la RMN HRMAS a permis l'étude de nombreux composés greffés sur des résines, de la caractérisation de molécules de synthèse issues de réactions organiques « classiques »,^[157-161] jusqu'à la compréhension moléculaire de catalyseurs hétérogènes bien définis.^[162-164]

La RMN HRMAS est largement employée en biologie et en médecine. La technique est utilisée dans l'étude structurale des systèmes membranaires de cellules bactériennes. Elle a ainsi permis la compréhension de l'agencement des polysaccharides, des lipides et des peptides au sein de la

membrane cellulaire.^[165,166] En étudiant ces mêmes composants membranaires directement à la surface de bactéries vivantes, la RMN HRMAS a montré son fort potentiel quant à l'analyse *in vivo* de cellules.^[167-169] La technique a également été utilisée pour la caractérisation *in situ* de métabolites présents dans différents types cellulaires. Peuvent être cités en ce sens des travaux effectués sur des cellules sanguines humaines,^[170] ou ceux réalisés sur des cellules gliales isolées de cerveaux de rats.^[171] D'une manière générale, toutes ces études ont permis de montrer la stabilité au cours du temps des échantillons analysés.

En 1996, les travaux de Cheng *et al.* ont étendu l'utilisation de la RMN HRMAS à l'étude de tissus biologiques. La première expérience de ce type a été réalisée sur des modules lymphatiques.^[172] Compte tenu de la forte teneur en graisse des échantillons, les auteurs ont été dans l'obligation de réaliser une séquence CPMG (Carr-Purcell-Meibool-Gill) permettant l'atténuation des signaux en fonction de leur temps de relaxation et l'obtention de spectres 1D du proton bien résolus. En 1997, les mêmes auteurs ont effectué pour la première fois l'analyse qualitative et quantitative de métabolites contenus dans des tissus malades, démontrant ainsi l'existence d'un lien entre les constatations histopathologies et les données recueillies par RMN HRMAS.^[173]

Les recherches de Cheng *et al.* ont été suivies par de nombreux travaux sur divers tissus et organes. Le cerveau, la prostate, le foie, les reins, le cœur, l'utérus, l'œil et différents muscles ont vu leur métabolome étudié par RMN HRMAS.^[174] Ces travaux ont contribué au développement de la métabolomique,^[175] une science très récente qui étudie l'ensemble des métabolites (sucres, acides aminés, acides gras, etc.) présents dans une cellule, un organe ou un organisme. Depuis quelques années, la métabolomique est devenu un outil précieux pour la recherche en cancérologie.^[176,177] De nombreux exemples viennent témoigner de l'utilisation de la RMN HRMAS en métabolomique comme outil de diagnostic des pathologies oncologiques.^[178,179] Cependant, son utilisation a également soulevé de nombreuses critiques en raison d'inconvénients sur les plans logistique, sanitaire et analytique.^[180]

Traditionnellement, la RMN des mélanges s'est concentrée sur l'étude de solutions. Mais étant donné que la majorité des produits de consommation agroalimentaire sont à l'état solide, la possibilité de les analyser directement dans cette forme, sans passer par une étape d'extraction préalable, est naturellement attrayante.

Ainsi, en 1989, Rutar adopte la technique MASS (magic angle sample spinning) pour étudier la composition lipidiques de graines de tournesols et de haricots.^[181] Depuis, de nombreux travaux ont été réalisés. Nous pouvons citer comme exemples l'observation des changements de la composition des mangues pendant leur murissement,^[182] la caractérisation métabolique de viandes d'agneau permettant leur traçabilité,^[183] l'étude de saumons fumés,^[184] de poivrons^[185] ou encore de

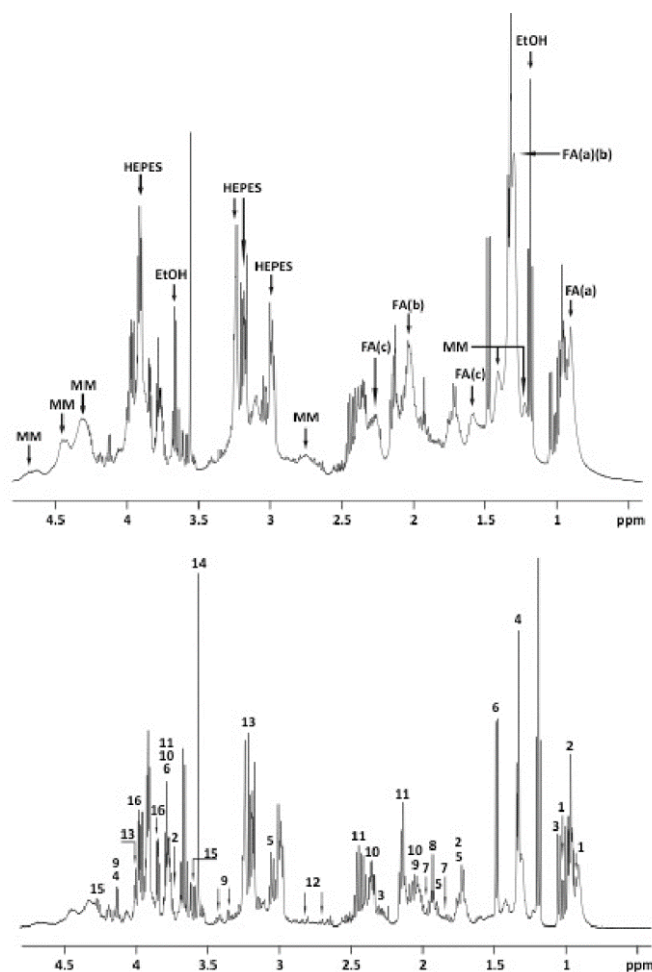
tomates.^[186] Les fromages italiens ne sont pas en reste avec la publication de travaux sur la constitution du parmigiano reggiano (parmesan)^[187] et de la célèbre mozzarella di bufala campana.^[188] La liste des produits de consommation alimentaire pouvant être analysés par RMN HRMAS est longue.^[189]

Qu'ils soient appliqués à la chimie, à la biologie, à la médecine ou à l'agroalimentaire, les travaux précédemment cités montrent que la RMN HRMAS est une technique d'analyse polyvalente, de pointe, qui trouve des applicables dans des domaines divers et variés.

IV. Le modèle RHE de SkinEthic® en RMN HRMAS

En 2013, Elbayed *et al.* se sont intéressés à l'étude du modèle RHE de SkinEthic® par RMN HRMAS. Ce modèle est le seul commercialisé sous la forme d'échantillons suffisamment grands (4 cm²) permettant d'avoir une quantité de matière suffisante pour mener à bien les analyses par RMN du solide. Des expériences HRMAS ont été effectuées sur plusieurs échantillons d'épidermes reconstruits provenant chacun de lots différents. Les spectres RMN 1D et 2D ont été jugés quantitativement et qualitativement comme très semblables. Les résultats ont montré que les effets de centrifugation (dus à la rotation rapide de l'échantillon) et ceux de changement de température (de -80 °C dans le congélateur à 3 °C dans le spectromètre) n'altéraient en rien la qualité des échantillons. Cette observation n'est pas triviale. En effet, d'autres organes soumis eux aussi à des analyses par RMN HRMAS ont vu leur qualité changer.^[190,191] La stabilité des échantillons RHE au cours de leur analyse est indispensable à la garantie d'études RMN fiables et reproductibles.

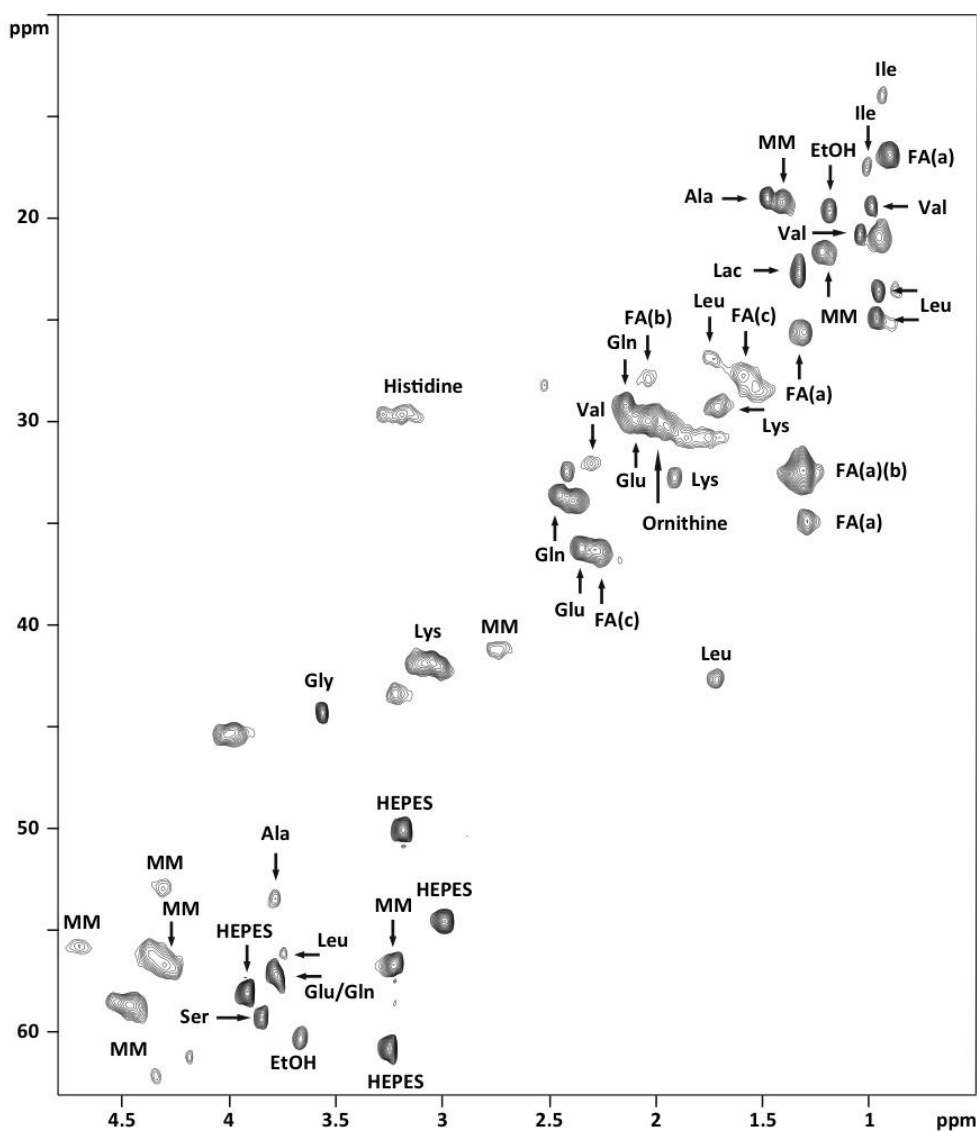
La figure ci-après représente les spectres One Pulse et CPMG d'un échantillon RHE (**Figure 5**).



Source : Elbayed *et al.*^[19]

Figure 5. Spectres One pulse (haut) et CMPG (bas)
de référence (échantillon « blanc ») d'un épiderme reconstruit RHE

Les métabolites observés ont été attribués au moyen de tables de déplacements chimiques disponibles dans la littérature.^[192–194] Leur attribution a été confirmée grâce à des expériences de corrélations homonucléaires ^1H - ^1H (DIPSI) et hétéronucléaires ^1H - ^{13}C (HSQC) (**Figure 6**).



Source : Elbayed et al. [19]

Figure 6. Spectre HSQC du modèle RHE « blanc »

Le tableau qui suit répertorie et classe les déplacements chimiques proton et carbone des différents métabolites identifiés dans l'épiderme humain reconstruit RHE de SkinEthic® (**Tableau 1**).

	Composés	Groupements	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	Isoleucine	δCH_3	0,94	13,99
		γCH_3	1,01	17,45
2	Leucine	δCH_3	0,96	23,62
		$\delta'\text{CH}_3$	0,97	24,88
		γCH	1,72	42,64
		βCH_2	1,73	26,93
		αCH	3,74	56,09
3	Valine	γCH_3	0,99	19,44
		$\gamma'\text{CH}_3$	1,04	20,77
		βCH	2,30	32,06
4	Lactate	CH_3	1,33	22,70
		CH	4,13	71,31
5	Lysine	γCH_2	1,40	23,00
		δCH_2	1,71	29,30
		βCH_2	1,91	32,76
		εCH_2	3,05	41,82
6	Alanine	βCH_3	1,48	19,01
		αCH	3,78	53,42
7	Ornithine	γCH_2	1,85	25,53
		βCH_2	1,95	30,25
8	Acétate	CH_3	1,92	25,86
9	Proline	γCH_2	2,01	26,80
		δCH_2 (u)	3,33	48,99
		δCH_2 (d)	3,41	48,98
		αCH	4,13	64,30
10	Glutamate	βCH_2	2,04	29,98
		γCH_2	2,35	36,22
		αCH	3,78	57,09
11	Glutamine	βCH_2	2,14	29,23
		γCH_2	2,45	33,62
		αCH	3,78	57,09
12	Acide aspartique	βCH_2 (u)	2,70	-
		βCH_2 (d)	2,80	-
13	Histidine	CH_2	3,19	29,67
		αCH	4,00	58,74
		CH -arom.	7,22	12,12
		CH -arom.	8,38	13,04
14	Glycine	αCH_2	3,56	44,31
15	Thréonine	αCH	3,60	63,30
		βCH	4,26	68,98
16	Sérine	αCH	3,85	59,26
		βCH_2	3,97	63,06
17	Tyrosine	CH 3,5	6,89	118,55
		CH 2,6	7,19	133,52
18	Phénylalanine	CH 2,6	7,32	132,17

		CH 3,5	7,43	131,70
19	Arginine	γ CH ₂	1,73	26,71
		β CH ₂	1,95	30,03
		δ CH ₂	3,22	43,16
FA(a)	Acides gras (a)	CH ₃	0,91	16,90
		(2) CH ₂	1,29	34,89
		(1) CH ₂	1,31	25,59
		(n) CH ₂	1,31	32,40
FA(b)	Acides gras (b)	(n) CH ₂	1,31	32,40
		(2) CH ₂	2,04	27,92
		(2) CH	5,33	13,42
FA(c)	Acides gras (c)	(2) CH ₂	1,59	27,74
		(1) CH ₂	2,29	36,30
MM	Macromolécules	CH ₃	0,88	23,52
		CH ₃	1,41	19,20
		CH ₂	2,73	41,24
		CH	3,23	56,69
		CH	4,30	56,69
		CH	4,31	52,93
		CH	4,46	58,64
		CH	4,70	55,76
EtOH	Ethanol	CH ₃	1,19	19,65
		CH ₂ OH	3,66	60,33
HEPES	HEPES	CH ₂	2,99	54,55
		CH ₂	3,01	50,07
		CH ₂	3,17	54,31
		CH ₂	3,18	50,05
		CH ₂	3,25	60,78
		CH ₂	3,91	58,01

(u) = up-field ; (d) = down-field.

Source: Elbayed *et al.*^[19]

Tableau 1 : Métabolites présents dans le modèle RHE
ainsi que leurs déplacements chimiques ¹H et ¹³C

La vingtaine d'acides aminés répertoriée dans l'épiderme reconstruit témoigne de la richesse du modèle RHE de SkinEthic®. La plupart des métabolites identifiés sont communs à d'autres organes précédemment étudiés tels que le cerveau,^[195] le côlon,^[196] le pancréas,^[197] le poumon,^[198] la prostate^[199] ou le sein.^[200] L'éthanol et l'HEPES figurent également dans le tableau. Evidemment, ce ne sont pas des métabolites de l'épiderme. L'HEPES est contenu dans la solution tampon employée pour diluer la Dipase II et l'éthanol permet le nettoyage du matériel utilisé. L'ornithine semble être spécifique des épidermes reconstruits puisqu'aucune trace de ce métabolite n'a pu être retrouvée dans

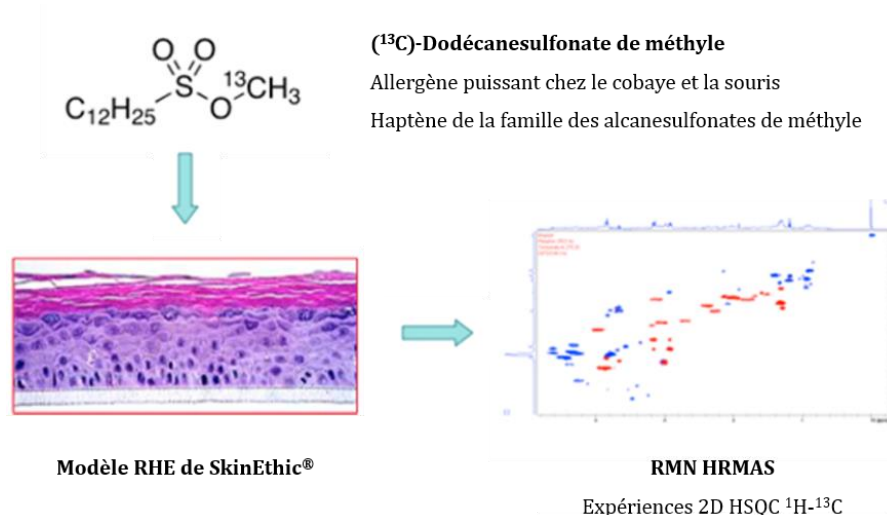
d'autres organes étudiés par RMN HRMAS. *A contrario*, la taurine et le myo-inositol, généralement présents dans les biopsies humaines, sont absents du modèle RHE.

Le protocole décrit par Piotto *et al.* permet la quantification par RMN HRMAS de certains métabolites d'organes.^[201] Les auteurs se basent sur l'intégration des aires sous les signaux des spectres 1D ^1H . Ainsi, la concentration de certains métabolites présents au sein des épidermes reconstruits a pu être déterminée. Ces dernières sont variables : de 0,6 $\mu\text{mol/mg}$ pour la phénylalanine, jusqu'à près de 5,5 $\mu\text{mol/mg}$ pour la sérine. La concentration en lipide calculée par HRMAS est quant à elle plutôt limitée et en accord avec les études histologiques réalisées.^[142] Ce taux lipidique moindre est expliqué par l'absence de glandes sébacées et d'adipocytes respectivement présents dans le derme et l'hypoderme de la peau humaine.

Enfin, l'intensité des signaux correspondant à l'HEPES et aux macromolécules est comparable à celles des signaux des métabolites. Ces signaux, ordinairement grands, ont été atténués par la séquence CPMG. Cette dernière permet l'obtention rapide de spectre 1D ^1H de haute qualité, sans aucune déformation de la ligne de base.

V. La technique RHE/RMN HRMAS pour l'étude des interactions haptènes-protéines

En 2013, Elbayed *et al.* ont ainsi développé un nouveau modèle d'étude de l'allergie de contact. En combinant l'utilisation d'épidermes humains reconstruits (modèle RHE de SkinEthic®) avec la RMN HRMAS (expériences 2D HSQC ^1H - ^{13}C), les auteurs ont pu observer la fixation d'un haptène, le dodécanesulfonate de méthyle, sur les protéines épidermiques. La formation d'adduits est illustrée par l'apparition de nouvelles taches de corrélation en RMN HRMAS et témoigne des interactions entre l'haptène et les protéines (**Figure 7**).



Source : Elbayed *et al.*^[19]

Figure 7. Etude de réactivité du (13C)-dodécanesulfonate de méthyle vis-à-vis du modèle RHE de SkinEthic®

Une des conditions nécessaires à l'observation de ces adduits en RMN HRMAS est la substitution isotopique au carbone 13 du carbone 12 de la position réactive de l'haptène. La substitution au carbone 13 du site réactif permet d'augmenter l'abondance de l'isotope 13, le seul visible en RMN. En conséquence, la visibilité et la résolution des signaux souhaités sont accrues. L'interprétation des résultats est facilitée puisque les autres carbones non substitués au carbone 13 sont « muets » en RMN ¹³C. Il est à noter que certaines molécules sensibilisantes possèdent plusieurs sites réactifs. Dans ce cas, la substitution au carbone 13 de plusieurs positions peut être nécessaire.

Suivant le protocole décrit par Elbayed *et al.*, d'autres haptènes ont été testés avec succès.^[202] L'ensemble de ces travaux a démontré la validité de la technique RHE/RMN HRMAS dans l'étude des interactions haptène-protéine et a posé les premières pierres d'un nouveau modèle *in situ* représentatif des phénomènes intrinsèques à l'allergie de contact.

VI. Objectifs du travail de thèse

Le travail de thèse ici présenté se propose d'aller un cran plus loin en s'intéressant à la réactivité de pro-haptènes. Dans une volonté de comprendre *in situ* les interactions haptènes-protéines qui régissent l'allergie de contact, il se base sur l'utilisation conjointe du modèle d'étude RHE de SkinEthic® et de la technique d'analyse RMN HRMAS. Son objectif est l'étude non-invasive sur des épidermes

reconstruits du métabolisme de xénobiotiques allergisants et des mécanismes réactionnels qui aboutissent à la formation d'entités antigéniques responsable de l'allergie cutanée.

Autrement dit, il s'agit si possible :

- **d'observer l'activation des pro-haptènes**
Métabolisation des pro-haptènes en haptènes par des biotransformations enzymatiques
- **de suivre les réactions via la formation d'intermédiaires**
Formation de métabolites issus du métabolisme de phase I ou II
- **d'identifier la nature des adduits formés**
Observation des interactions entre haptènes réactifs et protéines épidermiques

Une des conditions *sine qua non* à l'observation de modifications des épidermes reconstruits par les pro-haptènes est la métabolisation par voie enzymatique de ces derniers. Les enzymes de biotransformations de la peau, responsables de la métabolisation des xénobiotiques, sont nombreux et variés. Les pro-haptènes retenus pour nos travaux ne couvrent pas tous les enzymes de métabolisation mais répondent à des problématiques cliniques. Pour ce faire, trois familles de molécules ont été choisies : la famille des dérivés de type *para*-alkylphénol, celle des corticostéroïdes et celle des dérivés de type acétate de phényle. Le choix des molécules qui composent ces familles n'est pas arbitraire puisque les études précédemment réalisées sur des modèles *in vitro* nous renseignent quant à leur comportement et leur réactivité. De plus, ces molécules présentent un intérêt clinique de par l'apparition de symptômes chez les patients sensibilisés.

Ci-dessous, les différentes familles de molécules choisies font l'objet d'une rapide description. Chacune de ces familles vise l'étude d'une classe d'enzymes particulière présente dans le modèle d'épidermes humains reconstruits RHE de SkinEthic®.

Le créosol, l'eugénol et l'isoeugénol composent la famille des dérivés de type *para*-alkylphénol (**Figure 8**). Les *para*-alkylphénols, essentiellement rencontrés en parfumerie et en cosmétiques, sont connus pour être de bons substrats des peroxydases. Sous l'action de ces dernières, ils sont capables de s'oxyder en dérivés de type *para*-méthylène quinone très réactifs. Cependant, une prise en charge enzymatique de ces trois molécules par les cytochromes P450 via une réaction de O-désalkylation n'est pas à exclure. Contrairement au créosol et à l'eugénol, l'isoeugénol est catalogué comme étant un pré-haptène. Son application sur les peaux permettra d'appuyer ou non cette considération.

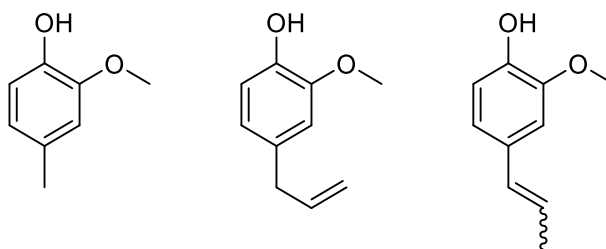


Figure 8. Crésol (à gauche), eugénol (au centre) et isoeugénol (à droite)

La cortexolone et la 16-méthylcortexolone sont les deux pro-haptènes qui constituent la deuxième famille de molécules étudiée, celle de corticostéroïdes (**Figure 9**). Les corticostéroïdes sont connus pour leurs propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives. Ils sont utilisés dans le traitement des maladies pulmonaires, des réactions inflammatoires et paradoxalement dans le traitement de l'allergie de contact. Il est aujourd'hui acté que la réactivité des corticostéroïdes vis-à-vis des protéines épidermiques est due au motif α -cétoaldéhyde, lui-même obtenu par oxydation enzymatique du motif α -hydroxycétone. Cette oxydation enzymatique est réalisée par une alcool déshydrogénase (ADH). La famille des corticostéroïdes se propose donc de mettre en avant l'activité enzymatique des alcools déshydrogénases dans les épidermes reconstruits. Comparativement à la cortexolone, la 16-méthylcortexolone possède un encombrement stérique au niveau du site réactif. Les études *in vitro* ont montré que sa réactivité s'en trouve modifiée. La 16-méthylecortexolone étant moins allergisante que son analogue non méthylé, son étude sur les épidermes reconstruits permettra ou non de faire le lien entre réactivité et pouvoir allergisant.

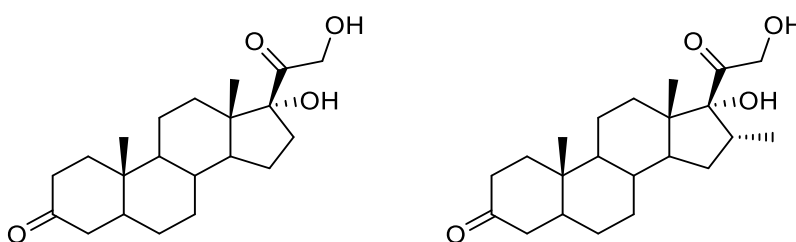


Figure 9. Cortexolone (à gauche) et 16-méthylcortexolone (à droite)

Enfin, la famille des acétates de phényle est composée de deux molécules : l'acétate d'eugénol et celui d'isoeugénol (**Figure 10**). Les acétates d'eugénol et d'isoeugénol ne sont pas, d'après les tests de sensibilisation chez l'animal, des molécules allergisantes. Néanmoins, ils provoquent chez les patients sensibilisés à l'eugénol et à l'isoeugénol des réactions d'allergie cutanée. La question de l'hydrolyse des

acétates d'eugénol et d'isoeugénol, respectivement en eugénol et isoeugénol, sur les épidermes reconstruits se pose donc. Cette éventuelle hydrolyse peut être réalisée soit par voie « chimique », soit par voie enzymatique via l'action d'estérases. Les acétates d'eugénol et d'isoeugénol apparaissent ainsi comme des potentiels candidats des estérases.

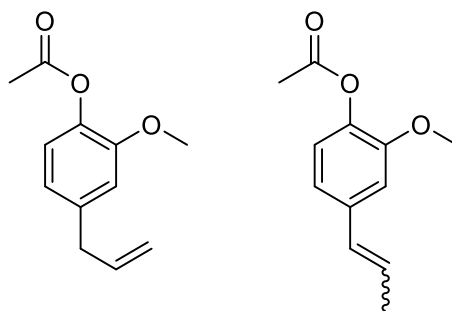


Figure 10. Acétate d'eugénol (à gauche) et acétate d'isoeugénol (à droite)

Ce manuscrit de thèse s'articule autour de trois grandes parties. Les deux premières, consacrées aux dérivés de type *para*-alkylphénol, s'intéressent à l'activité des peroxydases et/ou des cytochromes P450. La troisième, relative aux corticostéroïdes, se propose d'étudier l'activité des alcools déshydrogénases. Le cas des dérivés de type acétate de phényle, qui cherchent à observer l'activité des estérases, sera discuté dans les perspectives. Outre la volonté de mettre en évidence par RMN HRMAS les différents enzymes présents dans le modèle RHE, nous chercherons bien évidemment à identifier si possible et avec précisions la nature des interactions entre haptènes et protéines.

Chapitre II

Synthèse du créosol substitué au carbone 13
et étude de ses interactions avec un modèle
d'épiderme reconstruit

Chapitre II

Synthèse du créosol substitué au carbone 13 et étude de ses interactions avec un modèle d'épiderme humain reconstruit

Dans ce deuxième chapitre de thèse est décrite l'étude des interactions du créosol, un dérivé de type *para*-alkylphénol, avec le modèle RHE de SkinEthic®. Le créosol est un pro-haptène qui se présente comme un bon substrat des peroxydases. Cependant, une prise en charge par les mono-oxygénases à cytochrome P450 n'est pas à exclure. Les métabolites supposés être issus du métabolisme du créosol ont également été étudiés et les résultats obtenus viennent compléter les observations faites sur le modèle RHE. Ce second chapitre de thèse est aussi l'occasion de présenter le mode opératoire que nous avons systématiquement suivi pour mener à bien nos travaux. Enfin, outre l'étude de son comportement sur le modèle RHE, le créosol a été utilisé dans des tests de concentration visant à déterminer la concentration optimale en allergène à appliquer sur les épidermes humains reconstruits.

I. Le 2-méthoxy-4-méthylphénol ou créosol, modèle simplifié de l'eugénol

I.1. Généralités et postulat de départ

Après la mise au point du DPRA,^[17] Gerberick *et al.* se sont focalisés sur le développement du PPRA.^[110] Le PPRA inclut dans son protocole expérimental une étape d'oxydation enzymatique au moyen d'un système oxydant composé de peroxydases de raifort et d'eau oxygénée (HRP/P). Il autorise ainsi l'étude de pro-haptènes. La déplétion du peptide cystéine, le seul initialement utilisé dans le test du PPRA, après réaction avec des molécules (non allergisantes, pro-haptène et pré-haptènes) est reportée dans le tableau ci-dessous (**Tableau 1**).

	Molécules testées	Déplétion (%)	
		– HRP/P	+ HRP/P
Non sensibilisantes	Isopropanol	9.8	2.6
	(+/-) Acide lactique	9.1	4.5
	Butan-1-ol	2.2	4.8
Pro-haptènes	Géraniol	2.4	9.3
	Alcool cinnamique	1.2	10.4
	Aniline	5.5	28.4
	2-Aminophénol	13.1	41.3
	Naphth-1-ol	15.0	55.8
	Eugénol	13.0	67.9
	2-Méthoxy-4-méthylphenol	6.8	82.1
Pré-haptènes	Hydroquinone	45.4	40.4
	4-Amino- <i>m</i> -crésol	55.1	43.4
	3-Méthylcatéchol	80.3	73.6
	Isoeugénol	78.5	75.7
	Phénylène-1,4-diamine	72.2	76.0

Source : Gerberick *et al.*^[110]

Tableau 1. Déplétion du peptide cystéine dans le test du PPRA en absence (–) et en présence (+) du système oxydant HRP/P

D'après les données fournies par le tableau, nous constatons que le 2-méthoxy-4-méthylphénol, communément appelé crésol, se comporte comme un parfait pro-haptène. En effet, une forte déplétion du peptide cystéine est observée uniquement en présence du système oxydant HRP/P. Son comportement s'oppose à celui des pré-haptènes qui induisent une forte déplétion du peptide cystéine que ce soit en présence ou en absence du système HRP/P dans le milieu.

Le crésol est, d'après le test du LLNA, un allergène modéré.^[203] Isolé des goudrons de bois et plus particulièrement de ceux de hêtre, il trouve sa principale utilisation en parfumerie. Le crésol peut être considéré comme un modèle simplifié de l'eugénol.

Les peroxydases et les cytochromes P450 (CYP450) sont des oxydoréductases classées EC 1 dans la nomenclature EC (Enzyme Commission numbers, Commission des enzymes).^[204] Cette classification numérique des enzymes est basée sur les réactions chimiques qu'elles catalysent. Les peroxydases et les CYP450 sont des enzymes très présents dans la peau, capables de catalyser de nombreuses

transformations conduisant à l'apparition de fonction réactives sur le substrat de départ.^[65] Il a été montré que les *para*-alkylphénols dont fait partie le créosol **1**, sont capables sous l'action de peroxydases (EC 1.11) ou de CYP450 de former des *para*-méthylène quinones très réactives et, par conséquent, toxiques.^[205] Ces composés peuvent subir des additions nucléophiles 1,6 par les chaînes latérales nucléophiles des acides aminés.^[206,207] Le mécanisme d'oxydation d'un dérivé *para*-alkylphénol en dérivé *para*-méthylène quinone par une peroxydase ou un CYP450 est connu.^[208,209] Il s'agit d'une succession de deux oxydations à un électron. La première oxydation génère un radical phénoxy alors que la seconde conduit à la formation de la *para*-méthylène quinone (**Figure 1**).

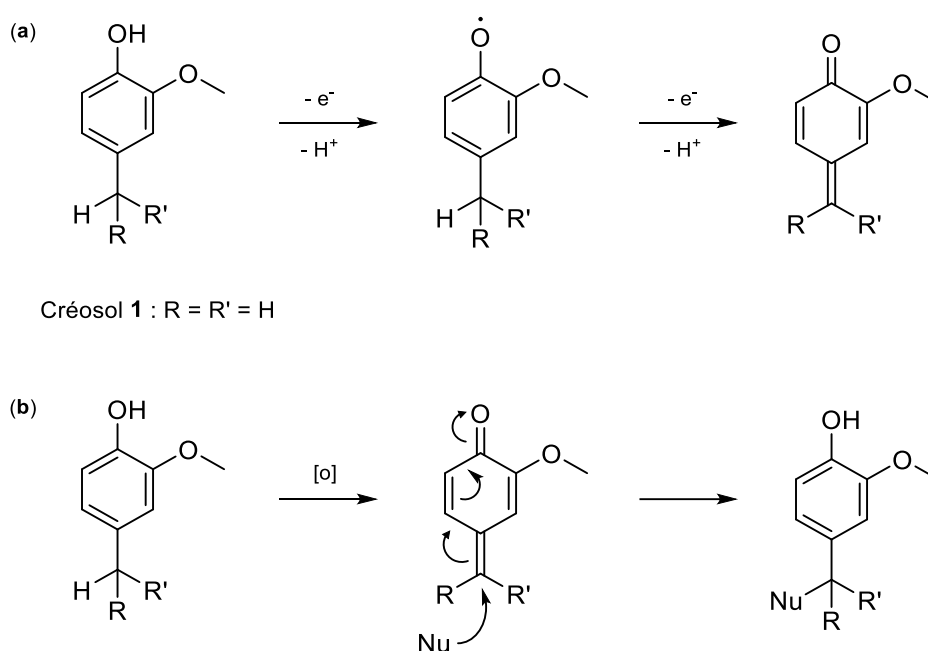


Figure 1. Mécanisme d'oxydation des *para*-alkylphénols en *para*-méthylène quinones par une peroxydase ou un CYP 450 (a) et addition nucléophile 1,6 (b)

En 2013, Merckel *et al.* sont venus appuyer cette hypothèse mécanistique. Leurs travaux sont basés sur l'étude par RMN en phase liquide du comportement du créosol vis-à-vis de peptides.^[210] Le protocole expérimental mise en place par les auteurs s'inspire des conditions du PPRA. Le créosol, dont le groupement méthylique est substitué au carbone 13, est oxydé enzymatiquement par le système HRP/P avant d'être mis en réaction, en solution dans un tube RMN, avec le peptide lysine (Pep-Lys), le peptide cystéine (Pep-Cys) ou le glutathion (GSH). Merckel *et al.* ont ainsi pu caractériser par spectroscopie RMN différents adduits résultant de la réaction entre de la *para*-méthylène quinone intermédiaire et chacun des trois peptides utilisés (**Figure 2**).

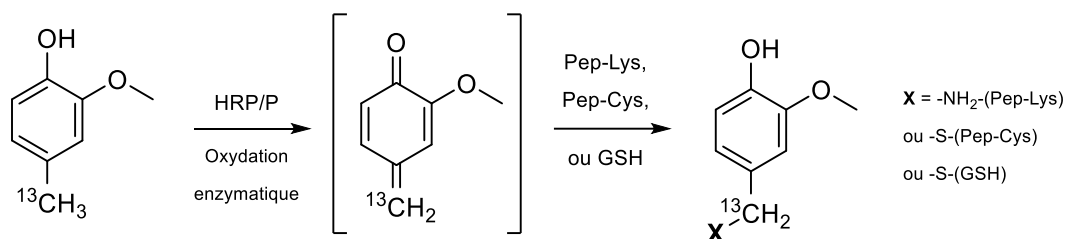


Figure 2. Réactivité du (^{13}C)-créosol dans les conditions du PPRA^[210]

Plusieurs éléments laissent supposer que le créosol est métabolisé par les peroxydases ou les cytochromes P450 sous la forme d'une *para*-méthylène quinone. Néanmoins, une autre voie de métabolisation peut être envisagée.

Les mono-oxygénases à cytochromes P450 (EC 1.14) sont des systèmes enzymatiques bien connus au niveau hépatique,^[211] mais elles sont également présentes dans de nombreux organes dont la peau.^[65] Les mono-oxygénases à CYP450 sont des hémoprotéines (enzymes à noyau hème) capables de catalyser entre autres des réactions d'hydroxylation sur des positions aliphatiques de substrats organiques. La transformation enzymatique est réalisée par l'oxygène moléculaire au moyen de trois cofacteurs, la FAD (Flavine Adénine Dinucléotide), la FMN (Flavine Mononucléotide) et le NAD(P)H (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate). Les groupements prosthétiques FAD et FMN appartiennent à une flavoprotéine NAD(P)H-dépendante (**Figure 3**).^[212-214]

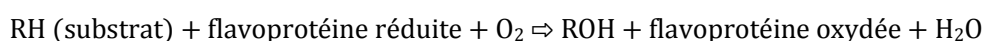


Figure 3. Réaction d'hydroxylation catalysée par les mono-oxygénases à CYP450

D'une manière générale, l'hydroxylation des éthers phénoliques suivi de l'hydrolyse du produit obtenu conduit à la formation du phénol correspondant.^[215,216] Appliqué au créosol, cette réaction de O-désalkylation (ou O-déméthylation) conduirait à la formation du catéchol correspondant (**Figure 4**).

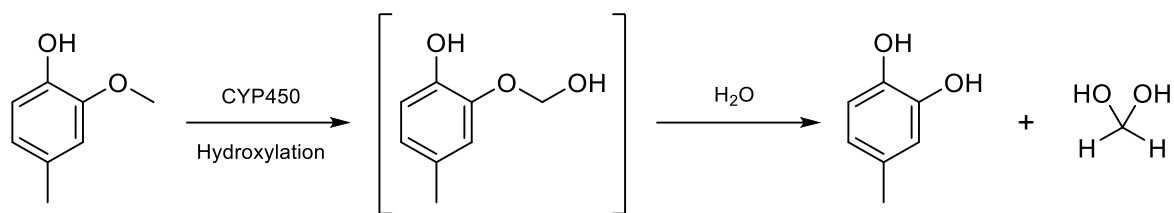


Figure 4. Réaction de O-déméthylation du créosol conduisant à la formation d'un catéchol

In vivo, les dérivés de type catéchol sont facilement oxydés en *ortho*-benzoquinones (ou *ortho*-quinones, écrit orthoquinone). L'oxydation peut être réalisée au moyen d'une tyrosinase (EC 1.10, catéchol oxydase),^[217] ou plus simplement par une peroxydase (EC 1.11) (**Figure 5**).^[218] Les quinones, qu'elles soient *ortho*, *méta* ou *para*, sont très présentes à l'état naturel. Leur forte réactivité les incrimine dans bon nombre de cas d'allergie de contact.^[219,220] Elles réagissent avec les acides aminés des protéines épidermiques via des additions nucléophiles 1,4 ou 1,6.^[30]

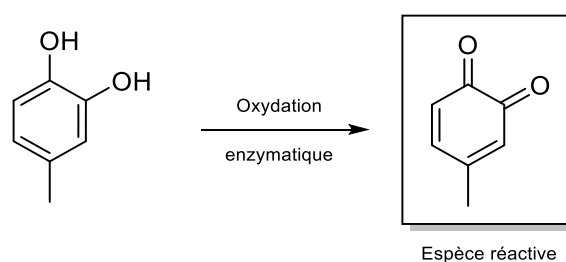


Figure 5. Formation d'une orthoquinone réactive par oxydation enzymatique du 4-méthylcatéchol

Au final, l'application du créosol sur les épidermes reconstruits nous laisse supposer deux voies de métabolisation. La première passe par l'activation du pro-haptène sous la forme d'une *para*-méthylène quinone au moyen d'une oxydation enzymatique réalisée par une peroxydase. La seconde propose une prise en charge du créosol par une mono-oxygénase à cytochromes P450 via une réaction de O-déméthylation. Le catéchol ainsi obtenu pourrait être oxydé en orthoquinone réactive (**Figure 6**).

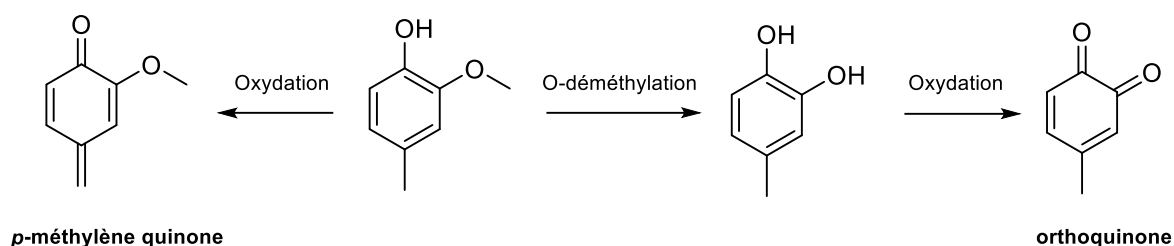


Figure 6. *para*-méthylène quinone *versus* orthoquinone :
quelle est l'espèce réactive ?

I.2. Synthèse en série substituée au carbone 13 et application sur le modèle RHE

I.2.A. Protocole expérimental : quatre étapes clés

Le protocole expérimental suivi pour étudier, par RMN HRMAS, le métabolisme et la réactivité du créosol dans le modèle RHE est composée de quatre étapes clés. Ce protocole, présenté de façon générale ci-après, a été suivi pour l'ensemble des pro-haptènes étudiés (**Figure 7**).

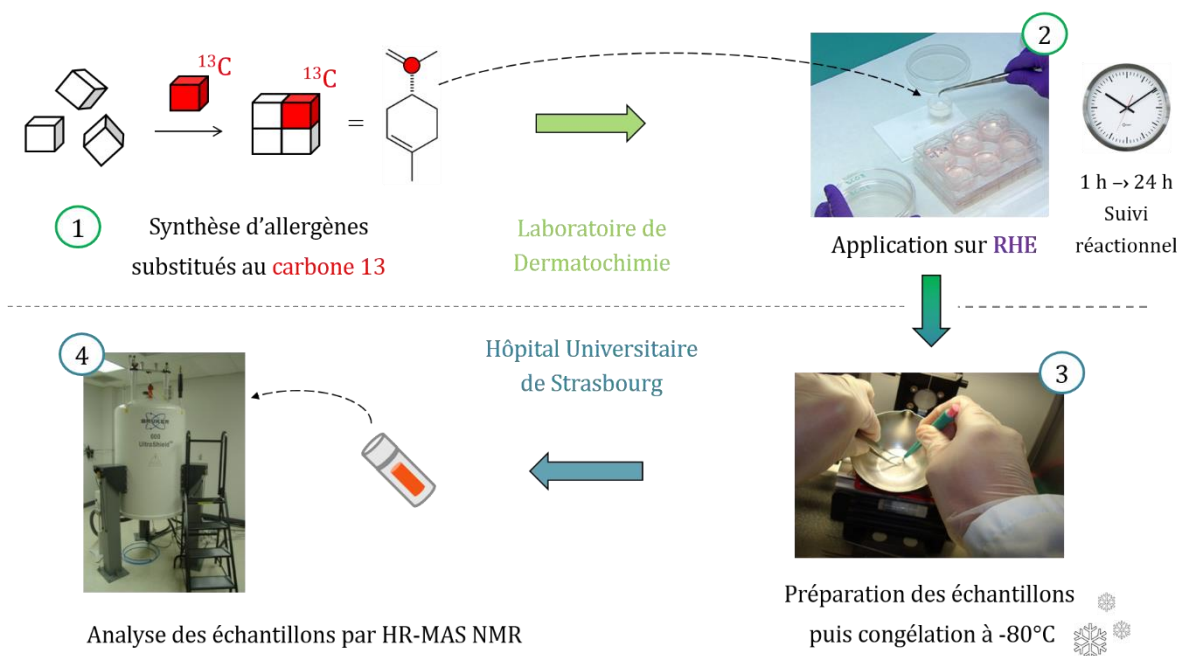


Figure 7. Schéma général du mode opératoire utilisé pour l'analyse des épidermes reconstruits

Etape 1. Synthèse des molécules substituées au carbone 13

Les études précédemment réalisées au laboratoire de Dermatochimie ont montré la nécessité de l'enrichissement au carbone 13 du ou des site(s) potentiellement réactif(s) dans l'étude par spectroscopie RMN ^{13}C de la réactivité entre haptènes et modèles (acides aminés, protéines, etc.). La substitution isotopique au carbone 13 d'un allergène sur une ou plusieurs position(s) réactive(s) stratégiquement choisie(s) est réalisée au moyen d'une synthèse organique, généralement multi-étapes, préalablement élaborée. Les synthons commerciaux substitués au carbone 13 sont peu nombreux et leur prix est élevé. En conséquence, le nombre de voies de synthèse est plutôt limité et, pour des raisons évidentes de coût, la mise au point des synthèses est réalisée préalablement en série non substituée. Bien évidemment, une introduction tardive du synthon substitué au carbone 13 dans la synthèse d'une molécule permet la réduction de son coût. Les synthèses des pro-haptènes réalisées au cours de nos travaux prennent l'ensemble de ces paramètres en compte.

Etape 2. Application sur les épidermes reconstruits

Concernant l'application des allergènes substitués au carbone 13 sur les épidermes reconstruits de type SkinEthic® et l'analyse de ces derniers par RMN HRMAS, nous avons systématiquement procédé de la même manière. Les épidermes RHE de SkinEthic® d'une largeur de 4 cm² nous sont envoyés après 17 jours de culture. Lors de l'envoi, ils sont conditionnés, dans un milieu stérile refroidi, sous la forme de plaquettes de six puits contenant chacun un épiderme reconstruit et du gel d'agarose qui assure leur nutrition tout au long du transport (**Figure 8**).



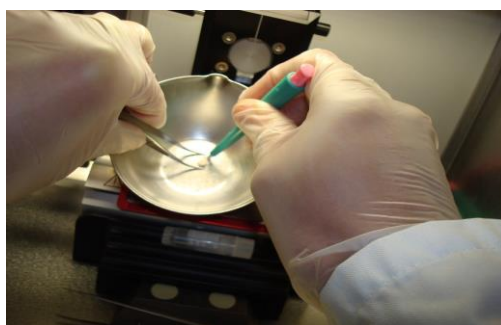
Source : skinethic.com

Figure 8. Epidermes RHE conditionnés dans des puits posés sur un gel d'agarose

A leur arrivé au laboratoire, les épidermes reconstruits sont déballés sous une hotte à flux laminaire assurant le maintien des conditions stériles. Les puits sont ensuite retirés du support et l'excès de gel d'agarose est enlevé délicatement à l'aide d'une compresse stérile. Les puits contenant les épidermes humains reconstruits sont remis en culture dans des boîtes de Pétri. Passé un délai de 2 heures, les pro-haptènes sont appliqués dans l'acétone à une concentration de 0,4 M sur les épidermes reconstruits. L'acétone est un solvant adapté qui assure, dans la plupart des cas, une bonne solubilité et une pénétration satisfaisante aux molécules testées. De plus, l'acétone n'engendre aucune modification au modèle RHE et est, en raison de sa forte volatilité, rapidement éliminé après quelques minutes d'incubation (≈ 10 min). Dans le but de suivre cinétiquement les réactions des pro-haptènes au sein des épidermes reconstruits, chaque molécule étudiée est appliquée séparément sur plusieurs échantillons d'épiderme. Pour un même pro-haptène, les échantillons d'épidermes utilisés diffèrent par leur temps d'incubation. En modulant les temps d'incubation, de quelques minutes jusqu'à plusieurs jours, et en stoppant les réactions par congélation, il devient possible de suivre cinétiquement les réactions. Une fois les temps d'incubation voulus écoulés, les épidermes sont décollés du filtre en polycarbonate qui compose le fond de chaque puit, puis congelés. Outre le fait de stopper toute évolution des réactions entre pro-haptènes et épidermes reconstruits, la congélation assure la bonne conservation des échantillons en attendant leur analyse par RMN HRMAS.

Etape 3. Préparation des échantillons

Maintenus dans un milieu froid, les échantillons d'épidermes reconstruits sont transférés à l'Hôpital Universitaire de Strasbourg en vue d'être préparés. Dans un cryostat, chaque échantillon d'épiderme est carotté à l'aide d'un emporte-pièce. L'opération est réalisée à basse température afin de limiter la décongélation des échantillons. De plus, les échantillons d'épiderme sont mous à température ambiante et il serait impossible de les carotter convenablement (**Figure 9**).



Source : Bruker, Wissembourg

Figure 9. Préparation des échantillons
à basse température

Chaque échantillon prélevé est ensuite introduit dans un insert jetable et de l'eau deutérée y est ajoutée. Elle permet le verrouillage du système champ-fréquence (ou « lock » en anglais) lors des expériences HRMAS. Les spectres obtenus sont généralement calibrés sur le lactate, un métabolite stable présent dans les épidermes reconstruits et dont le déplacement chimique est connu. Cependant, pour certains échantillons, une goutte de TSP est ajoutée en tant que standard externe. L'insert est scellé hermétiquement avec un bouchon conique et conservé à froid en attendant son analyse. Au moment de l'acquisition par RMN HRMAS, l'insert est placé dans un rotor scellé par un bouchon à ailettes. Ce dernier joue le rôle de turbine en permettant, sous flux d'air comprimé, la rotation de l'échantillon.

Etape 4. Analyse : acquisition des données par RMN HRMAS

Les analyses RMN HRMAS sont réalisées à l'aide d'un spectromètre Avance Bruker III 500 MHz équipé d'une sonde de résonance HRMAS double gradient ^1H et ^{13}C . La température au sein du spectromètre, 4 °C, assure la stabilité métabolique de l'échantillon lors de l'acquisition. L'échantillon est mis en rotation, à grande vitesse, afin de garder les bandes latérales de rotation hors de la région spectrale considérée. Les séries de séquences utilisées pour l'enregistrement des données RMN HRMAS varient selon l'expérience choisie.

Pour une expérience 1D ^{13}C , la série de séquences utilisée est la suivante :

- 1. Séquence 1D ^1H « One pulse »
- 2. Séquence 1D ^1H CPMG
- 3. Séquence 1D ^{13}C « Power Gated Decoupling »

Pour une expérience 2D de type HSQC ^1H - ^{13}C , la série de séquences utilisée est :

- 1. Séquence 1D ^1H « One pulse »
- 2. Séquence 1D ^1H CPMG
- 3. Séquence 2D ^1H - ^{13}C hétéronucléaire HSQC

D'une manière générale, les séquences 1D sont couplées à une suppression/présaturation de l'eau par une méthode inspirée du Watergate.^[221] La séquence CPMG permet une meilleure observation des signaux d'intérêt en filtrant ceux des lipides et des macromolécules. L'acquisition d'un spectre CPMG avec présaturation est effectuée en début et en fin de chaque série de séquences. Elle permet le contrôle de la qualité de l'échantillon avant et après expérience.

Pour chaque série d'études sur un même lot d'épidermes RHE, un échantillon témoin nommé « blanc » est analysé. Le traitement de cet échantillon est en tout point identique à celui des autres échantillons issus du même lot, à la différence qu'aucune molécule n'est appliquée à sa surface. L'analyse HRMAS de cet échantillon blanc permet de faciliter l'interprétation des résultats obtenus en discriminant rapidement les signaux RMN appartenant aux métabolites natifs de l'épiderme de ceux qui traduisent la formation de nouveaux produits et/ou adduits haptène-protéines. Dans la pratique, le spectre 1D ou 2D de l'échantillon blanc est superposé à celui correspondant à l'épiderme reconstruit ayant subi des modifications. Après soustraction, l'apparition de nouveaux signaux (1D) ou taches de corrélation (2D) est rapidement décelable.

Synthèse, application, préparation puis analyse par HRMAS, le protocole expérimentale suivi est systématiquement le même, quel que soit l'allergène étudié. Le créosol ne déroge pas à la règle. La synthèse en série substitué au carbone 13 de ce dernier est décrite ci-dessous.

1.2.B. Synthèse du créosol substitué au carbone 13

Dans le but d'étudier par RMN HRMAS la réactivité du créosol sur les épidermes reconstruits, le pro-haptène a été synthétisé en prenant soin d'introduire sélectivement un carbone 13 sur la position supposée réactive. En se basant sur les études de Merckel *et al.*, nous sommes partis du postulat que le créosol pourrait être métabolisé sur le modèle RHE par les peroxydases sous la forme d'une *para*-méthylène quinone réactive.^[210] D'après cette hypothèse mécanistique, la *para*-méthylène quinone intermédiaire subit l'attaque nucléophile 1,6 d'un résidu nucléophile sur sa position méthylénique. Ainsi, en s'inspirant de la synthèse mise au point par ces mêmes auteurs, nous avons synthétisé le créosol (¹³C)-**1** en substituant au carbone 13 le méthyle aromatique (**Figure 10**).

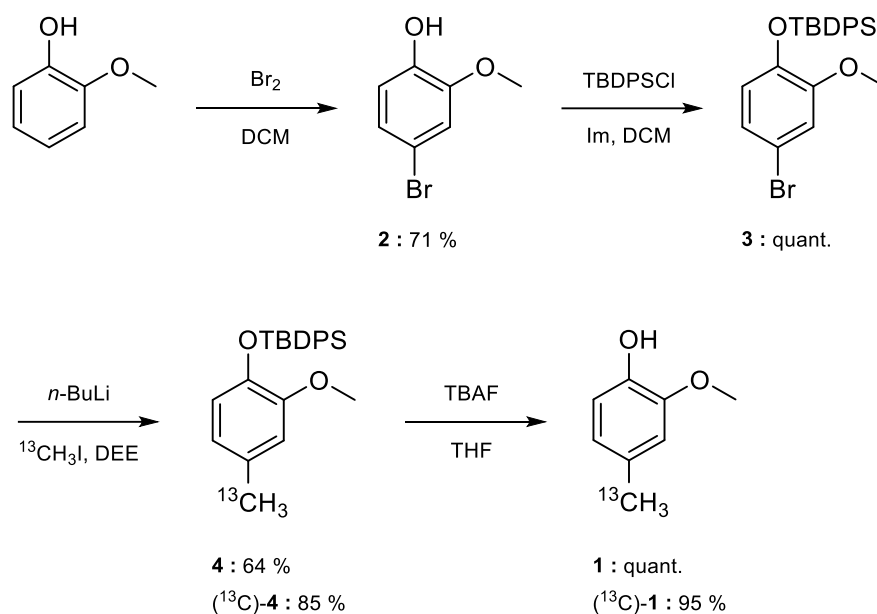


Figure 10. Synthèse du créosol (^{13}C)-1

La synthèse du (^{13}C)-créosol est réalisée en quatre étapes à partir du 2-méthoxyphénol commercial. Une première étape de bromation permet l'obtention du bromophénol **2**. Ce dernier est protégé sous la forme d'un éther silylé **3** au moyen de *tert*-butyldiphénylsilyle et d'imidazole. Une échange halogène-métal à l'aide de *n*-butyllithium suivi d'une alkylation par du (^{13}C)-iodométhane permet l'introduction du méthyle aromatique substitué au carbone 13. Le composé (^{13}C)-**4** est ainsi préparé avec un rendement de 85 %. Finalement, le créosol (^{13}C)-**1** est obtenu après déprotection de l'éther silylé en présence de fluorure de tétra-*n*-butylammonium.

1.2.C. Application sur le modèle RHE et premières observations

Le (^{13}C)-créosol a été appliqué sur 5 échantillons d'épidermes humains reconstruits. Les temps d'incubations choisis sont listés ci-après :

- 1 heure
- 2 heures
- 4 heures
- 8 heures
- 24 heures

Les échantillons d'épiderme reconstruit ont ensuite été analysés par RMN HRMAS au moyen d'expériences monodimensionnelles homonucléaires ^1H CPMG et bidimensionnelles hétéronucléaires HSQC ^1H - ^{13}C éditée. Les expériences HSQC ^1H - ^{13}C permettent de corrélérer sur une carte en deux dimensions chaque carbone avec le ou les hydrogènes qu'il porte. Le fait que les expériences HSQC ^1H - ^{13}C soient éditées permet de discriminer les signaux pairs (CH_2) de ceux impairs (CH et CH_3). La superposition du spectre HSQC de l'échantillon blanc avec ceux obtenus pour chacun des échantillons traités par le (^{13}C)-créosol permet d'identifier rapidement les modifications engendrées par le pro-haptène sur les épidermes humains reconstruits.

Le spectre 1D CPMG de l'échantillon blanc et ceux des échantillons traités par le créosol (^{13}C)-1 à des temps d'incubations de 1 heure et 24 heures sont superposés ci-dessous. Les spectres présentés ont été enregistrés avant les expériences 2D (**Figure 11**).

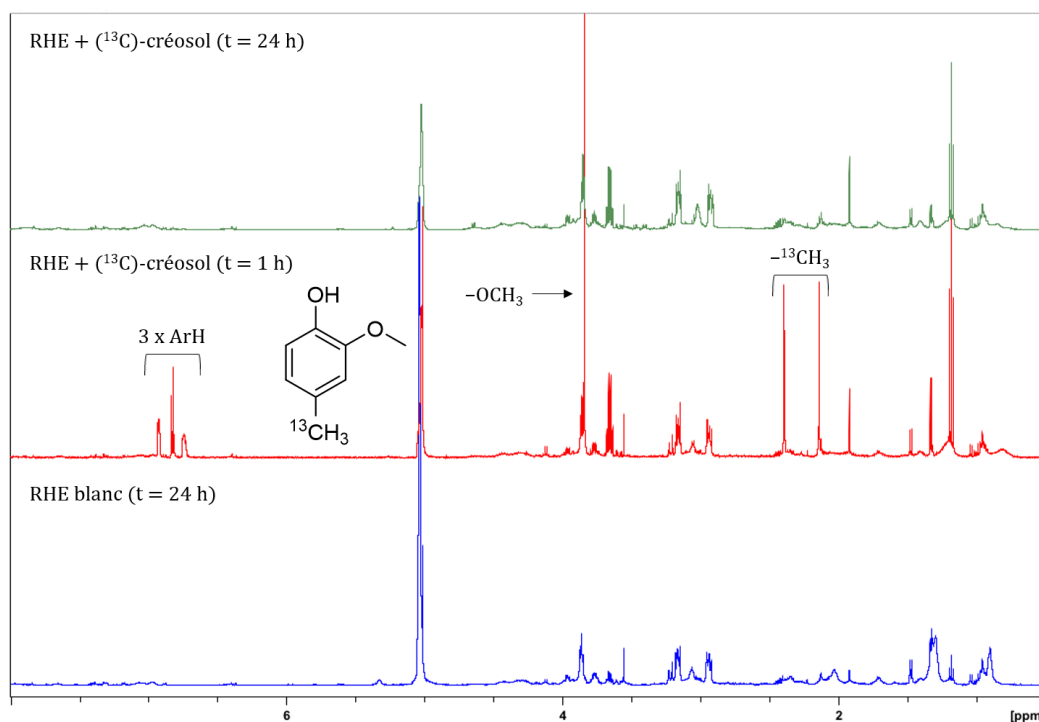


Figure 11. Superposition des spectres 1D CPMG de l'échantillon RHE blanc (bleu) et des échantillons RHE traités par le (^{13}C)-créosol à 1 h (rouge) et 24 h (vert)

La superposition des spectres est riche en informations. D'abord, le profil métabolique de l'échantillon blanc (spectre bleu) et celui des échantillons traités par le (^{13}C)-créosol sont quasi identiques. En effet, au regard des signaux correspondants aux métabolites du modèle RHE, seules d'infimes variations sont à souligner. Le spectre RHE traité à 1 h (spectre rouge) montre clairement la

présence du pro-haptène. Le dédoublement du signal des protons portés par le carbone substitué est dû à l'existence d'une forte constante de couplage 1J (de l'ordre de 120 Hz) entre les protons méthyliques et le carbone ^{13}C . Après 24 h d'incubation, les signaux correspondant à la molécule de départ ne sont plus visibles (spectre vert). Cette disparition souligne une prise en charge du pro-haptène par les épidermes reconstruits.

Sur la figure suivante sont présentés les superpositions des spectres issus des expériences HSQC ^1H - ^{13}C édités des échantillons à 1 h et 24 h avec le celui de l'échantillon blanc (**Figure 12**). Les expériences 2D ont été réalisées sur des fenêtres spectrales allant de 0 à 14 ppm en proton, et de 0 à 240 ppm en carbone. Pour des raisons pratiques, les spectres présentés sont des « zooms » (ou agrandissements) des zones spectrales d'intérêt.

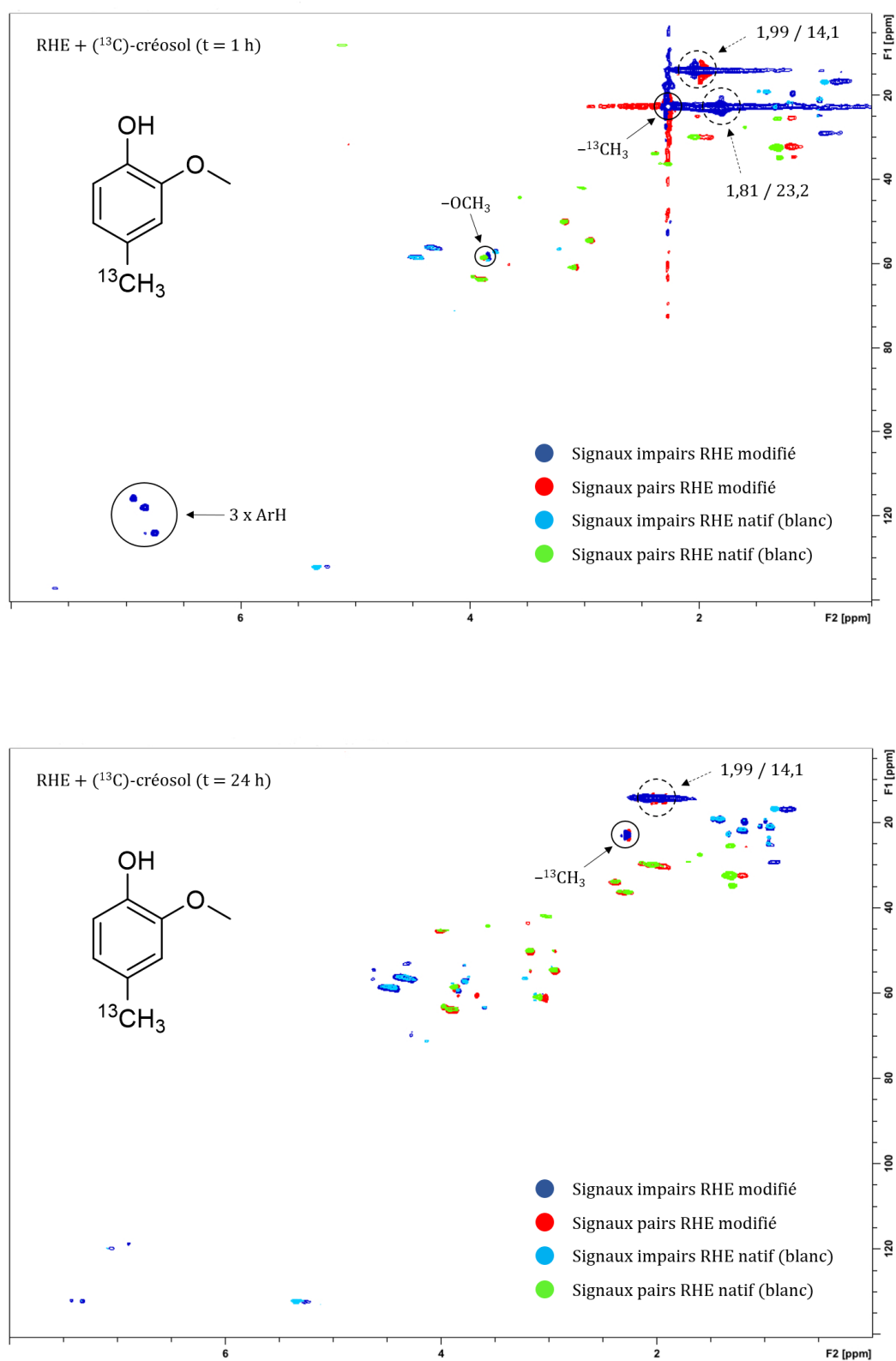


Figure 12. Spectres HSQC édités (superposés au blanc) des épidermes à 1 h (haut) et 24 h (bas) traités par ^{13}C -(1) Corrélations molécule de départ : cercles et flèches pleines ($\rightarrow \odot$) ; nouvelles corrélatons : cercles et flèches en pointillés ($\rightarrow \odot$) ; les déplacements chimiques $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ des nouvelles corrélatons sont exprimés en ppm

A l'instar des spectres CPMG, nous pouvons observer sur les spectres HSQC, après une 1 h d'incubation, l'ensemble des signaux correspondant au (^{13}C)-créosol de départ. Après 24 h, seul le carbone correspondant à la position substitué (δ 2,27/22,6 ppm) est encore visible.

Les deux spectres HSQC sont marqués par l'absence de nouvelles taches de corrélation paires. En conséquence, nous pouvons estimer que l'hypothèse mécanisme selon laquelle le (^{13}C)-créosol serait pris en charge par les peroxydases sous la forme d'une *para*-méthylène quinone ne s'applique pas au modèle RHE (**Figure 13**).

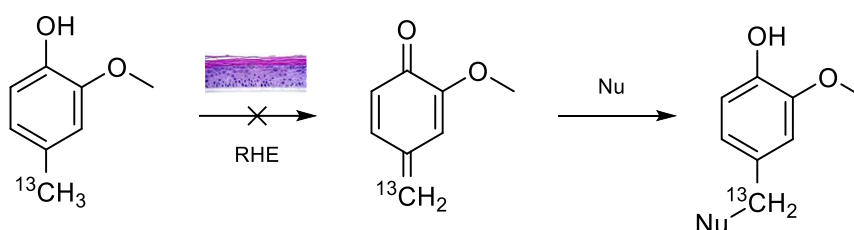


Figure 13. Modèle RHE : le (^{13}C)-créosol n'est pas pris en charge sous la forme d'une *para*-méthylène quinone

Après 1 h d'incubation, nous constatons l'apparition de deux nouvelles taches de corrélation impaires. Leurs déplacements chimiques $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ sont respectivement 1,99/14,1 ppm et 1,81/23,2 ppm. Au vu de leur parité et de la région spectrale dans laquelle elles se situent, nous avons attribué ces deux corrélations à des résidus méthyles $\text{R}-^{13}\text{CH}_3$.

Après 24 h d'incubation, une des deux nouvelles taches de corrélation qui était présente à 1 h a disparue. Effectivement, si la corrélation à 1,99/14,1 ppm est encore bien présente et semble s'intensifier au cours du temps, celle à 1,81/23,2 ppm n'est plus visible. Entre 1 h et 24 h, le système a donc évolué. La corrélation à 1,99/14,1 ppm illustre la formation d'une entité stable. Au contraire, celle à 1,81/23,2 ppm témoigne de la formation d'une espèce intermédiaire.

1.2.D. Hypothèse de travail : passage par une orthoquinone

L'ensemble des observations faites suite à l'application du (^{13}C)-créosol sur le modèle RHE nous pousse à penser que le pro-haptène pourrait être pris en charge par les mono-oxygénases à cytochrome P450. Selon cette voie métabolique, le (^{13}C)-créosol pourrait subir une réaction de O-déméthylation (hydroxylation suivie d'une hydrolyse) qui engendrerait la libération de formaldéhyde. Le catéchol obtenu serait ensuite oxydé au moyen d'une peroxydase ou d'une

tyrosinase, et la 4-méthyl-orthoquinone formée alkylée par un ou plusieurs résidus nucléophiles des protéines épidermiques (**Figure 14**).^[222] L'oxydation du catéchol en orthoquinone réactive est inspirée de la bio-activation du *p*-crésol,^[223] un produit naturel retrouvé dans de nombreux aliments, huiles et goudrons, mais également du mécanisme d'action de l'urushiol,^[224] un haptène végétal qui provoque des allergies cutanées extrêmement sévères.

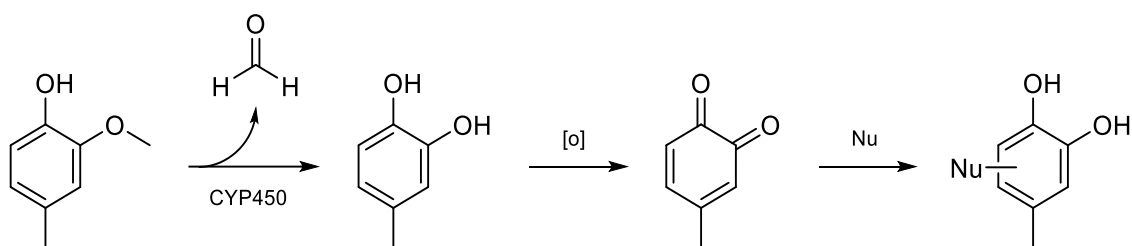


Figure 14. Hypothèse mécanistique : prise en charge du (¹³C)-crésol par les mono-oxygénases à CYP450

Cette hypothèse réactionnelle permettrait d'expliquer l'intermédiaire (δ 1,81/23,2 ppm) et l'adduit stable (δ 1,99/14,1 ppm) formés. En effet, une substitution nucléophile aromatique permettrait au carbone substitué au carbone 13 de conserver sa parité (impaire) tout en affectant son déplacement chimique. L'adduit obtenu pouvant à son tour être oxydé en orthoquinone, la possibilité d'observer plusieurs substitutions nucléophiles aromatiques n'est pas à exclure (**Figure 15**).

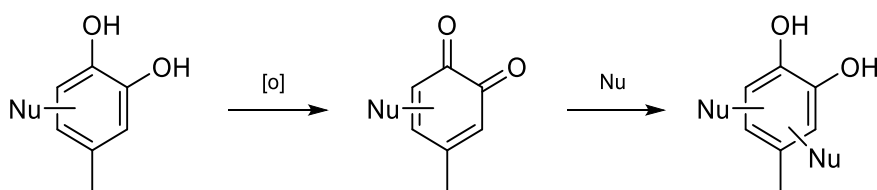


Figure 15. L'oxydation d'un adduit formé peut conduire à une seconde substitution nucléophile aromatique

D'après la littérature, d'autres xénobiotiques sont pris en charge chez l'homme et l'animal suivant cette même voie métabolique. Nous pouvons citer comme exemples l'acide férulique (plantes),^[225] le safrole (savons et parfums),^[226] la paroxétine (antidépresseur),^[227] le rémoxipride (antipsychotique),^[228] l'étoposide (anticancéreux),^[229] l'ecstasy (ou MDMA, stupéfiant)^[230] ou encore l'hydroxyanisole butylé (ou BHA, antioxydant).^[231] Ces composés sont de bons substrats des CYP450. Par une ou plusieurs réaction(s) de O-désalkylations, ils peuvent être transformés

en 2- ou 4-hydroxyphénols. L'oxydation des dérivés hydroxyphénols conduit à la formation de benzoquinones réactives potentiellement toxiques.

Dans le but de valider notre hypothèse concernant le comportement du (^{13}C)-créosol sur les épidermes reconstruits, deux approches complémentaires peuvent être suivies. La première consiste à étudier sur des modèles, par RMN du liquide, la réactivité de l'orthoquinone intermédiaire avec différents acides aminés et peptides. Les résultats obtenus pourront être confrontés aux observations faite sur le modèle RHE. Cette comparaison ouvrira peut-être une voie vers la compréhension des taches de corrélation observées par RMN HRMAS. La seconde approche repose sur la substitution au carbone 13 de la position méthoxylique du créosol. En effet, si le créosol est bel et bien pris en charge par les mono-oxygénases à CYP450, nous devrions observer sur les épidermes reconstruits la formation de formaldéhyde, le métabolite issu de la réaction de O-déméthylation.

Ces deux approches ont été suivies et sont présentées dans les pages qui suivent. Nous commencerons par présenter les études consacrées à la réactivité de l'orthoquinone intermédiaire avec des acides aminés et des peptides. Suivrons les études sur le modèle RHE du créosol synthétisé en série doublement substituée au carbone 13.

I.3. 4-méthyl-orthoquinone intermédiaire : synthèse et réactivité avec des acides aminés et des peptides

L'interprétation par RMN HRMAS du système (^{13}C)-créosol/modèle RHE peut être facilitée en réalisant des mesures de référence en RMN du liquide. L'orthoquinone réactive a ainsi été synthétisée en série substituée au carbone 13 avant d'être mise en réaction, en solution, avec des acides aminés et des modèles de peptides. Les analyses de RMN en phase liquide, complétées par des analyses de spectrométrie de masse, permettent de dresser une base de données qui contient les déplacements chimiques des adduits formés entre l'orthoquinone et chacun des acides aminés et des peptides choisis. La comparaison de cette base de données avec la RMN HRMAS ouvre une voie vers la compréhension des mécanismes mis en jeu au sein des épidermes reconstruits.

I.3.A. Synthèse et oxydation chimique du (^{13}C)-4-méthylcatéchol

La (^{13}C)-4-méthyl-orthoquinone intermédiaire réactive est obtenue par oxydation chimique du (^{13}C)-4-méthylcatéchol, lui-même synthétisé à partir du créosol (^{13}C)-1 (**Figure 16**).

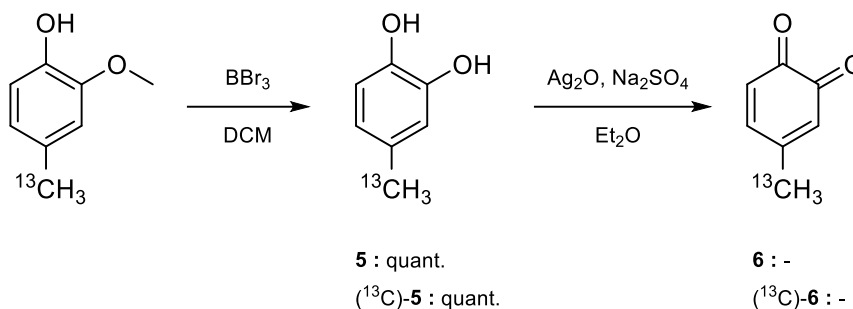


Figure 16. Synthèse de la (^{13}C)-4-méthyl-orthoquinone

Une réaction de O-déméthylation réalisée sur le (^{13}C)-créosol en présence de tribromure de bore conduit à la formation du (^{13}C)-4-méthylcatéchol avec un rendement quantitatif. La 4-méthyl-orthoquinone (^{13}C)-6 est obtenue par oxydation chimique du catéchol (^{13}C)-5 au moyen d'hydroxyde d'argent. L'orthoquinone (^{13}C)-6 formée étant très instable, elle sera rapidement utilisée en l'état, sans purification supplémentaire, dans les études de réactivité.

I.3.B. Réactivité en milieu organique

Compte tenu de la faible stabilité des quinones en milieu aqueux, les études de réactivité entre l'orthoquinone (^{13}C)-6 et les acides aminés ont tout d'abord été menées en milieu organique. Bien que très hygroscopique, le DMSO est un solvant organique qui assure une bonne solubilité des acides aminés employés. Cependant, il ne permet pas de solubiliser les peptides. Ces derniers n'ont pas pu être utilisés dans ces conditions.

Dans la pratique, le catéchol (^{13}C)-5 est oxydé en orthoquinone (^{13}C)-6. Rapidement, cette dernière est solubilisée dans du DMSO deutéré (DMSO- d_6 , 150 μL) et disposée dans un tube RMN. L'acide aminé testé, également solubilisé dans du DMSO deutéré (450 μL), est introduit dans le même tube. Les tests sont réalisés à raison d'un équivalent d'orthoquinone (^{13}C)-6 pour dix équivalents d'acide aminé. Après une brève agitation, la réaction entre l'orthoquinone (^{13}C)-6 et l'acide aminé testé est suivie par RMN au moyen d'expériences 1D ^{13}C . Un premier spectre est enregistré à un temps initial considéré

comme $t = 0$, puis d'autres acquisitions sont réalisées à raison d'une tous les jours sur une période de sept jours. D'une manière générale, passé ce délai, plus aucune évolution significative n'est observée. Des expériences HSQC ^1H - ^{13}C éditées et HMBC ^1H - ^{13}C sont alors réalisées. L'observation des corrélations ^1H - ^{13}C à courtes (HSQC) et longues (HMBC) distances permet de caractériser avec précision la nature des adduits formés. Le milieu réactionnel présent dans le tube RMN est ensuite récupéré et analysé par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS, ou liquid chromatography-mass spectrometry). Les analyses LC-MS viennent appuyer et compléter les informations obtenues en RMN du liquide (**Figure 17**).

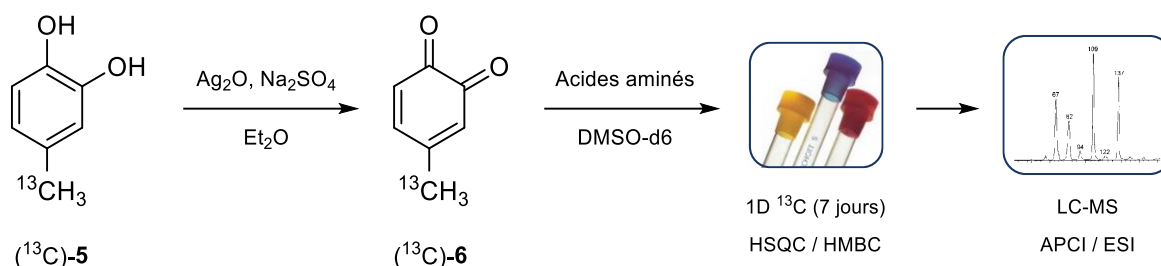


Figure 17. Protocole expérimental suivi pour les études de réactivité

Une tube témoin contenant uniquement l'orthoquinone (^{13}C) -6 en solution dans le DMSO deutéré a également été préparé. Il permet d'étudier le comportement de l'espèce réactive en l'absence d'acide aminé.

Les analyses par LC-MS ont été réalisées sur un appareil Agilent 1200 au moyen de colonnes C18 (Poroshell 98 et Hypersil Gold) couplées à une détection UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$). Le gradient utilisé pour l'élution et la séparation des composés est, sauf cas particuliers, un mélange eau/acétonitrile, 98:2. Concernant le spectromètre de masse, la source d'ionisation utilisée est double de type Electrospray/Atmospheric Pressure Chemical Ionization (MM ESI/APCI, mode positif et mode négatif). L'analyseur basse résolution est quant à lui quadripolaire (Agilent 5973B).

Les acides aminés employés lors des études en solution ont été sélectionnés pour leur faculté à interagir avec les molécules xénobiotiques. Tous possèdent un groupement nucléophile capable de réagir sur les sites électrophiles des haptènes. Ainsi, neuf acides aminés protéinogènes connus pour leur réactivité ont été retenus (**Figure 18**).

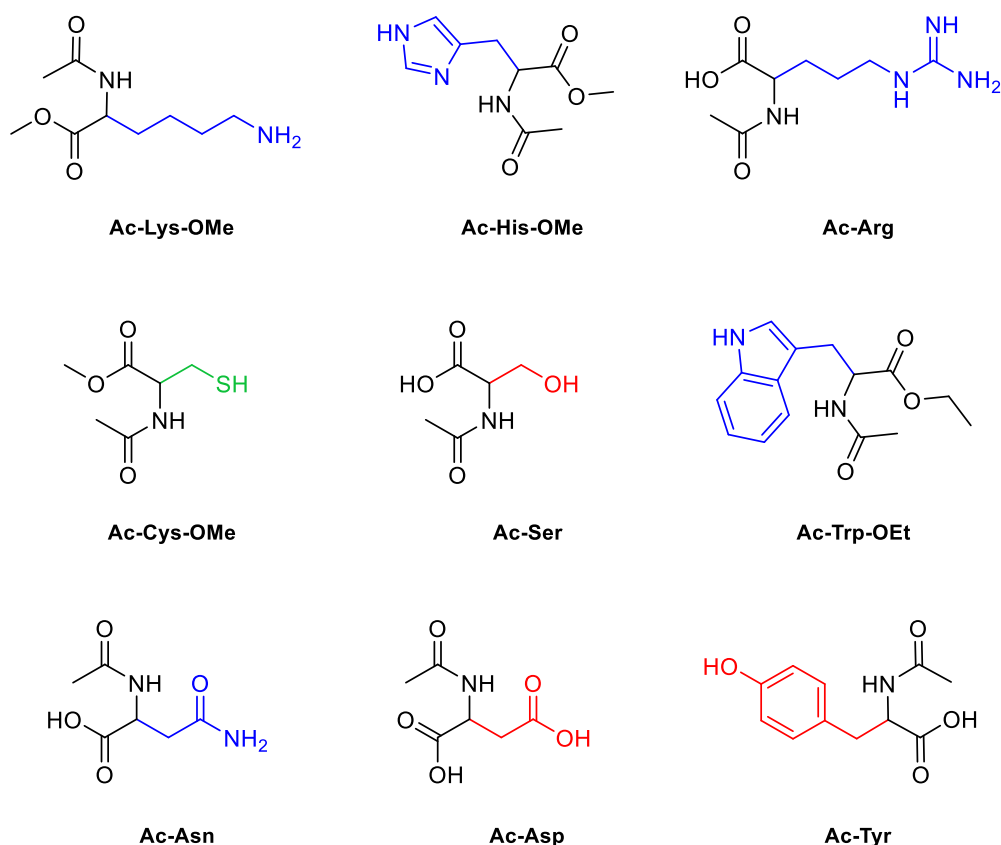


Figure 18. Les neuf acides aminés utilisés dans les études *in vitro* de réactivité possédant chacun un résidu nucléophile aminé (bleu), soufré (vert) ou oxygéné (rouge)

Ac = N α -acétyle ; OMe = ester méthylique ; OEt = ester éthylique ; Lys = Lysine ; His = Histidine ; Arg = Arginine ; Cys = Cystéine ; Ser = Sérine ; Trp = Tryptophane ; Asn = Asparagine ; Asp = Acide aspartique ; Tyr = Tyrosine

Les extrémités N- et C-terminales des acides aminés utilisés sont respectivement acétylées et, dans la mesure du possible, estérifiées. Ces protections des fonctions terminales permettent de prévenir leur réactivité et d'éviter la dégradation de Strecker. En effet, la dégradation de Strecker décrit la conversion des acides α -aminés en aldéhyde par les dérivés α -dicarbonyles.^[232] D'une manière générale, les acides aminés employés possédant un résidu nucléophile aminé (bleu), oxygéné (rouge) ou soufré (vert) réagissent avec les orthoquinones par des réactions d'additions 1,4 ou 1,6. Cependant, les acides aminés possédant dans leur structure une amine primaire peuvent également former des bases de Schiff (**Figure 19**).^[222]

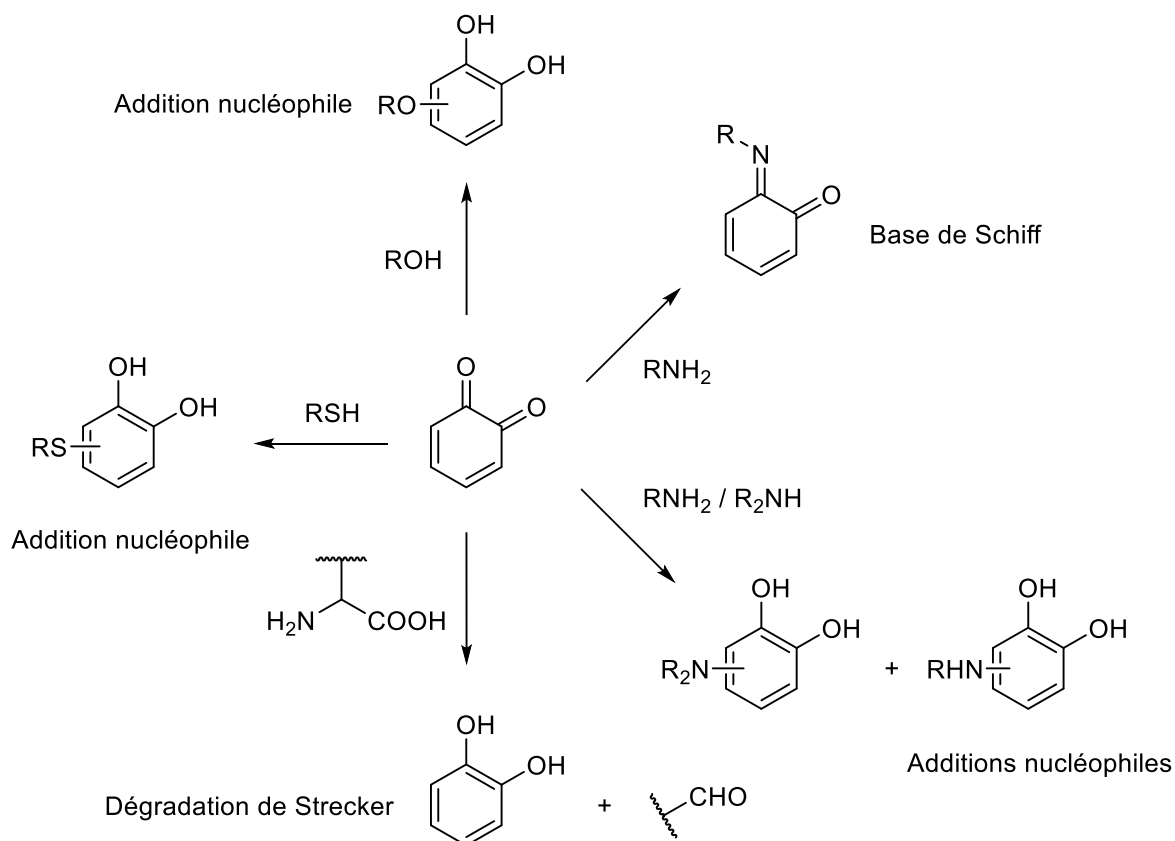


Figure 19. Réactions possibles quand une orthoquinone rencontre les acides aminés

Parmi les neuf acides aminés sélectionnés, seuls trois présentent une réactivité significative en milieu organique. Il s'agit de la lysine, de l'histidine et de la cystéine. Les résultats obtenus pour le tube témoin et chacun de ces trois acides aminés sont présentés ci-après.

Comportement de l'orthoquinone (^{13}C)-6 en milieu organique (tube témoin)

Dans le DMSO, et en l'absence d'acide aminé dans le milieu, l'orthoquinone (^{13}C)-6 évolue vers la formation de nouvelles espèces (**Figure 20**).

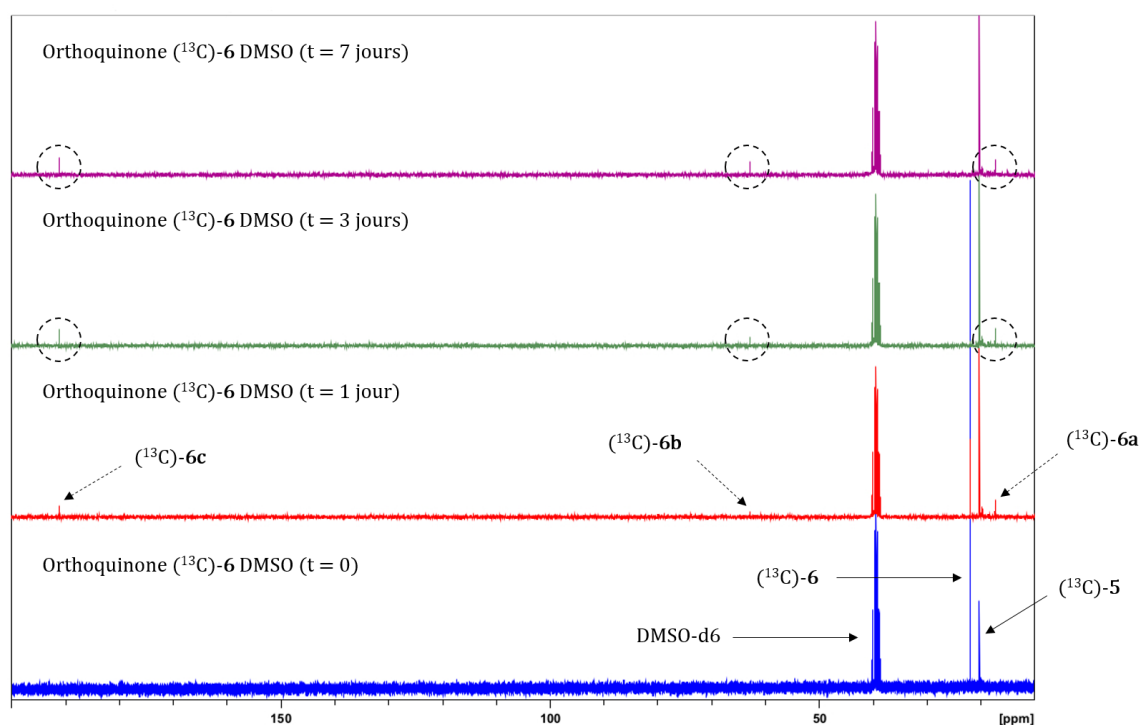


Figure 20. Comportement de l'orthoquinone (^{13}C)-6 dans le DMSO

Au temps initial (t = 0), l'orthoquinone (^{13}C)-6 (forme oxydée, $\delta -^{13}\text{CH}_3 = 22,0$ ppm), largement majoritaire, est en équilibre avec le catéchol (^{13}C)-5 (forme réduite, $\delta -^{13}\text{CH}_3 = 20,4$ ppm). Après un jour, nous observons une forte diminution du signal de la forme oxydée au profit de celui de la forme réduite. Trois signaux correspondant à la formation de trois nouveaux composés nommés (^{13}C)-6a, (^{13}C)-6b et (^{13}C)-6c sont également apparus. Ils ont pour déplacements chimiques respectifs 17,4, 62,9 et 191,1 ppm. Après trois jours, le signal de l'orthoquinone (^{13}C)-6 n'est plus visible sur le spectre 1D ^{13}C , contrairement de celui du catéchol (^{13}C)-5 qui a fortement augmenté. L'intensité des signaux des nouveaux produits a elle aussi augmenté. Au bout de sept jours, le système semble s'être stabilisé. Ainsi, l'orthoquinone (^{13}C)-6 est relativement peu stable en milieu organique. Si à l'instant t = 0 elle est en équilibre avec sa forme réduite, au bout de trois jours elle a complètement disparu.

Les nouveaux produits formés (^{13}C)-**6a**, (^{13}C)-**6b** et (^{13}C)-**6c** ont été caractérisés à l'aide d'expériences RMN bidimensionnelles (**Tableau 2**).

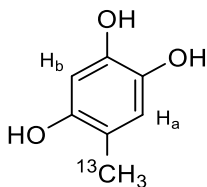
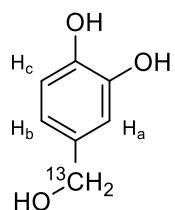
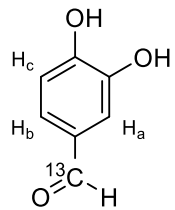
	δ (ppm) ^{13}C	δ (ppm) ^1H HSQC	δ (ppm) ^1H HMBC	Structure proposée
(^{13}C)- 6a	17,4 ($^{-13}\text{CH}_3$)	2,19 ($^{-13}\text{CH}_3$)	6,66 (H_a) 6,31 (H_b)	
(^{13}C)- 6b	62,9 ($^{-13}\text{CH}_2\text{OH}$)	4,29 ($^{-13}\text{CH}_2\text{OH}$)	6,53 (H_a) 6,71 (H_b) 6,83 (H_c)	
(^{13}C)- 6c	191,1 (^{-13}CHO)	9,70 (^{-13}CHO)	7,23 (H_a) 7,27 (H_b) 6,73 (H_c)	

Tableau 2. Caractérisation des composés (^{13}C)-**6a**, (^{13}C)-**6b** et (^{13}C)-**6c**

Les analyses LC-MS ont permis de confirmer la présence des composés ci-dessus dans un mélange plus que complexe dont seuls les ions moléculaires d'intérêt ont été retenus. Les ions moléculaires détectés, leur rapport masse sur charge (m/z) et leur temps de rétention (à titre indicatif) associés sont présentés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 3**).

Ion moléculaire	m/z trouvé (ESI/APCI)	Temps de rétention (min)
$[(^{13}\text{C})\text{-6a} - \text{H}^+]\cdot$	140	0,38 ou 0,49
$[(^{13}\text{C})\text{-6b} - \text{H}^+]\cdot$	140	0,38 ou 0,49
$[(^{13}\text{C})\text{-6c} - \text{H}^+]\cdot$	138	0,61

Tableau 3. Résultats LC-MS : ions moléculaires correspondant aux composés (^{13}C)-**6a**, (^{13}C)-**6b** et (^{13}C)-**6c**

Le DMSO étant très hygroscopique, les composés (^{13}C)-**6a**, (^{13}C)-**6b** et (^{13}C)-**6c** sont issus de la réaction d'hydrolyse de l'orthoquinone (^{13}C)-**6** par l'eau présente (**Figure 21**).

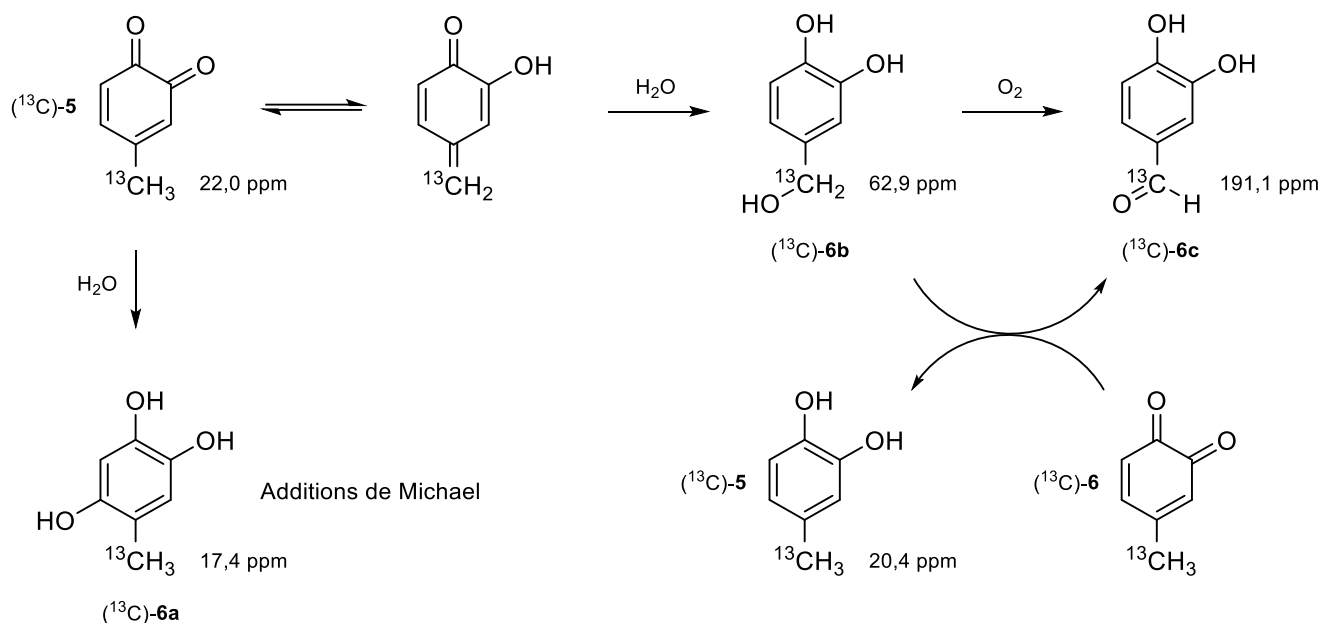


Figure 21. Mécanisme proposé pour la dégradation de l'orthoquinone (^{13}C)-**6** par hydrolyse

Le composé (^{13}C)-**6a** est formé par addition de Michael (addition 1,4) d'une molécule d'eau sur l'orthoquinone (^{13}C)-**6**. Cette dernière est également en équilibre tautomérique avec sa forme *para*-méthylène quinone. Ce type de réarrangement a déjà été mis en évidence sur d'autres dérivés de type *para*-alkylphénols.^[226] La *para*-méthylène quinone est sujette à l'attaque d'une molécule d'eau formant ainsi l'alcool (^{13}C)-**6b**. L'oxydation de l'alcool (^{13}C)-**6b** en aldéhyde (^{13}C)-**6c** pourrait être réalisée, soit directement par le dioxygène de l'air, soit par l'orthoquinone (^{13}C)-**6** qui est une espèce oxydante. Ceci permettrait d'expliquer en partie la tendance de l'orthoquinone (^{13}C)-**6** à se réduire en catéchol (^{13}C)-**5**.

Outre la formation des composés (^{13}C)-**6a**, (^{13}C)-**6b** et (^{13}C)-**6c**, nous observons également par LC-MS la formation de plusieurs ions moléculaires ayant pour m/z 158 (en mode positif) et 247 (en mode négatif). Les ions moléculaires de m/z 158 peuvent résulter de la double hydroxylation de l'orthoquinone (^{13}C)-**6** (**Figure 22**). Il est à noter que les structures détectées uniquement par LC-MS illustrent un comportement chimique mais ne représentent pas nécessairement des intermédiaires significatifs.

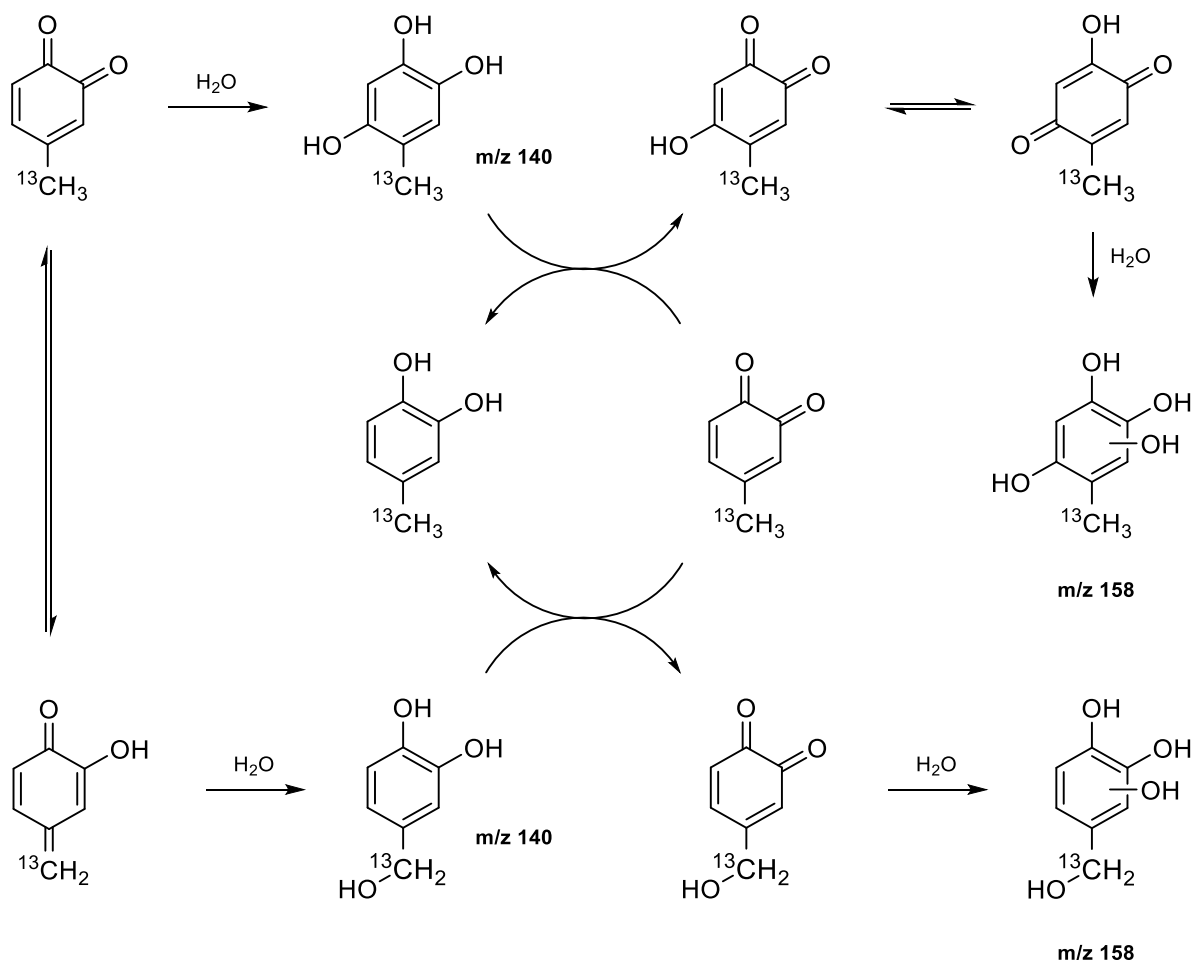


Figure 22. Mécanisme proposé pour la formation des composés correspondant aux ions moléculaires de m/z 158

Yamada *et al.* ont montré la capacité des orthoquinones à subir une addition d'eau en position 4 ou 5 suivie d'une nouvelle oxydation en *para*-méthylène quinone.^[233]

Les ions moléculaires de m/z 247 semblent quant à eux correspondre à des dimères formés entre l'orthoquinone (^{13}C)-6 et son homologue réduit, le catéchol (^{13}C)-5 (**Figure 23**). Amplement rapportée dans la littérature, cette dimérisation n'est pas surprenante.^[234,235]

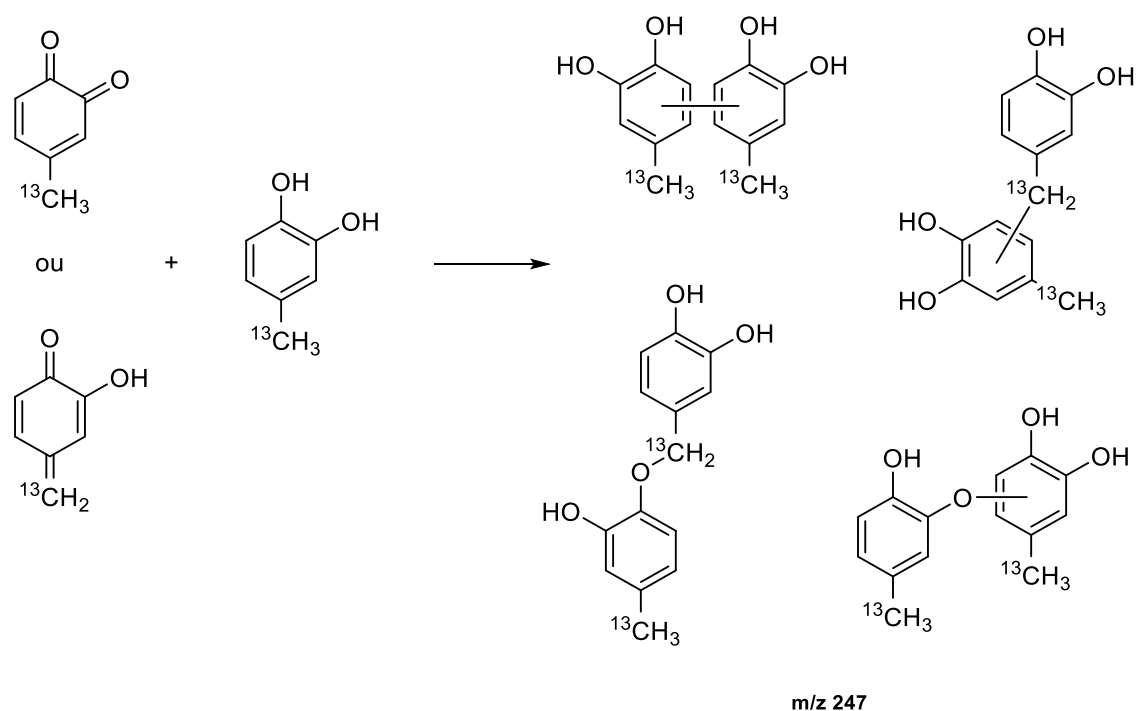


Figure 23. Formation de dimères correspondant aux ions moléculaires de m/z 247

En solution dans le DMSO, l'orthoquinone (^{13}C)-**6** possède un temps de vie relativement court. Cette instabilité est illustrée, d'une part, en RMN du liquide par sa tendance à se réduire en catéchol et par la formation de produits de dégradation et, d'autre part, sa dimérisation.

Réactivité de l'orthoquinone (^{13}C)-**6** avec la lysine en milieu organique

Outre la formation des composés (^{13}C)-**6a**, (^{13}C)-**6b** et (^{13}C)-**6c** déjà observée en l'absence d'acide aminé, la réaction de l'orthoquinone (^{13}C)-**6** avec la lysine se caractérise par l'apparition d'un signal à 50,1 ppm sur le spectre RMN ^{13}C (**Figure 24**). Les expériences HSQC ^1H - ^{13}C éditée et HMBC ^1H - ^{13}C ont permis d'identifier la nature exacte de l'adduit (^{13}C)-**6d** formé (**Tableau 4**).

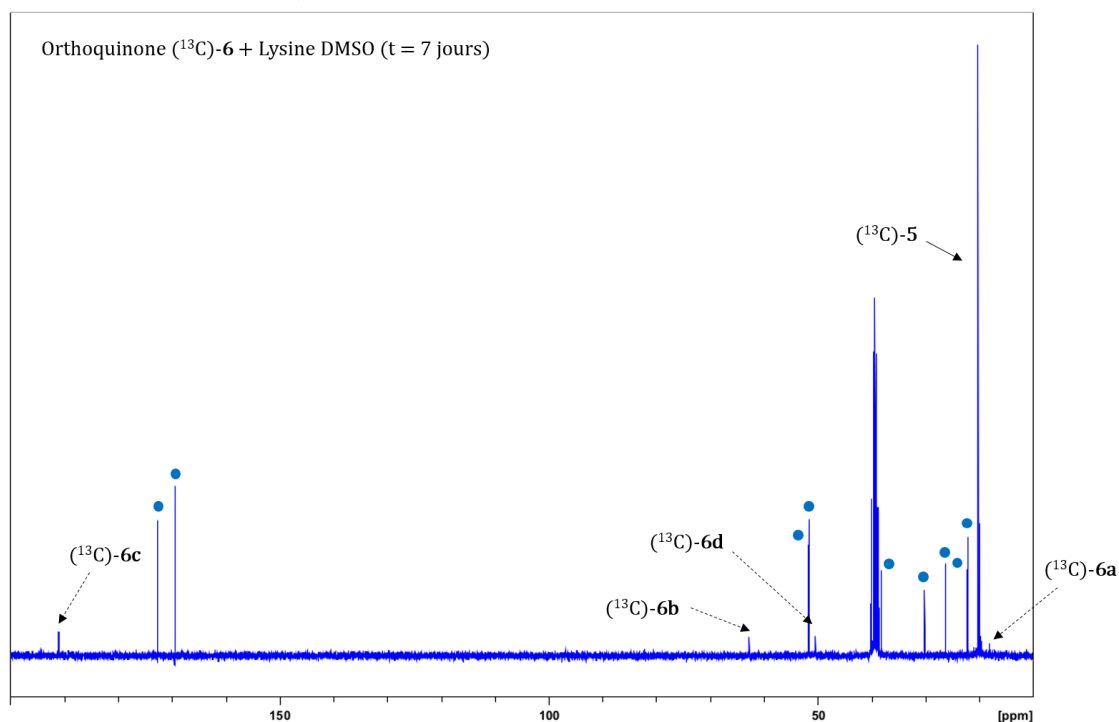


Figure 24. Réactivité de l'orthoquinone (^{13}C)-6 vis-à-vis de la lysine : spectre à sept jours

Les signaux correspondant à la lysine non modifiée sont marqués d'un rond bleu (•)

	δ (ppm) ^{13}C	δ (ppm) ^1H HSQC	δ (ppm) ^1H HMBC	Structure proposée
(^{13}C)-6d	50,1 ($^{-13}\text{CH}_2\text{NH-}$)	2,19 ($^{-13}\text{CH}_2\text{NH-}$)	7,05 (H_a) 6,66 (H_b) 6,46 (H_c)	

Tableau 4. Déplacements chimiques de l'adduit (^{13}C)-6d

L'orthoquinone (^{13}C)-6 étant en équilibre avec sa forme méthylène quinone, la formation de l'adduit (^{13}C)-6d peut être expliquée par l'addition 1,6 de la lysine sur la position méthylénique de la *para*-méthylène quinone (Figure 25).

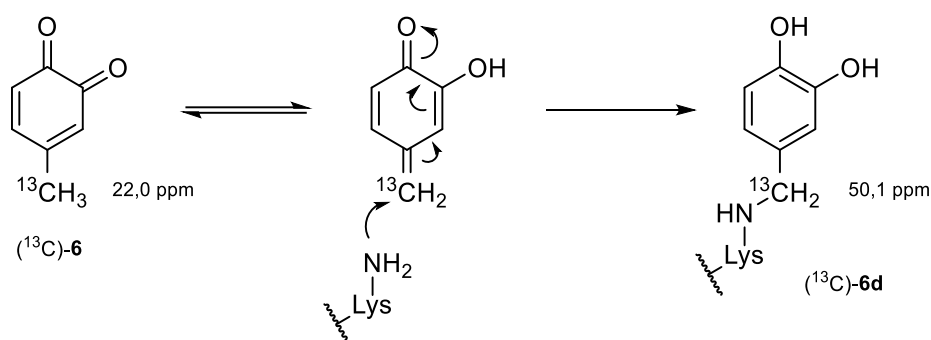


Figure 25. Mécanisme proposé pour la formation de l'adduit $(^{13}\text{C})\text{-6d}$: addition nucléophile 1,4

La formation de l'adduit $(^{13}\text{C})\text{-6d}$ a été confirmée par LC-MS puisqu'un ion moléculaire de rapport m/z 324 en mode négatif a été détecté.

Il est intéressant de constater qu'en présence de lysine dans le milieu, l'orthoquinone $(^{13}\text{C})\text{-6}$ se réduit très rapidement. En effet, dans le tube témoin, en l'absence de lysine, le signal RMN 1D ^{13}C de l'orthoquinone $(^{13}\text{C})\text{-6}$ est encore observé après un jour. *A contrario*, en présence de lysine, après le même laps de temps, ce signal n'est plus visible. La réduction de l'orthoquinone $(^{13}\text{C})\text{-6}$ en catéchol $(^{13}\text{C})\text{-5}$ semble donc être accélérée en présence de lysine.

Une hypothèse a été formulée par Khasis et Abul-Hajj pour expliquer un phénomène analogue observé lors de la réaction entre la 3,4-estrogène-orthoquinone et la n-propylamine (**Figure 26**).^[236] Une addition 1,2 de la propylamine a lieu sur le carbonyle en C3 et une prototropie aboutit à l'obtention du catéchol de la propylimine.

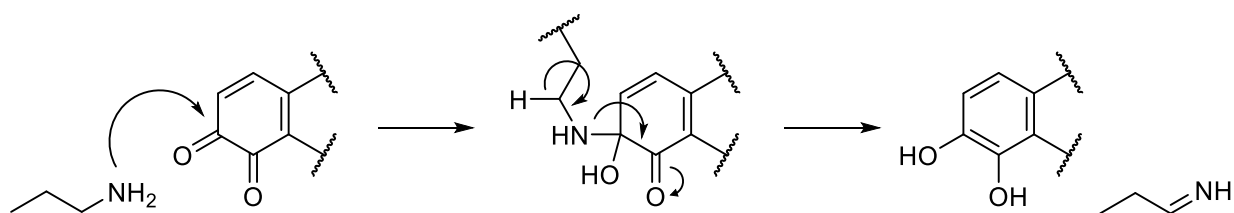
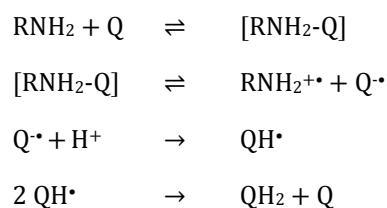


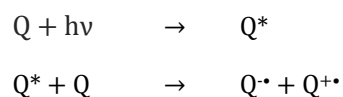
Figure 26. Réduction d'un dérivé *o*-quinone par la n-propylamine

Quelques mois plus tard, la même équipe a proposé un autre mécanisme.^[237] Il implique un transfert mono-électronique à partir de l'amine via un complexe de transfert de charge, conduisant à

la formation du radical-cation amine et du radical-anion quinone qui peut se protoner et se dismuter pour former un catéchol (QH₂) et une quinone (Q).



Il est également possible que le radical-anion quinone soit issu d'une réaction photochimique impliquant une quinone excitée à l'état singulet (Q*) En effet, même en l'absence d'amine, la quinone est réduite et le catéchol « régénéré ».



Réactivité de l'orthoquinone (¹³C)-**6** avec l'histidine en milieu organique

L'étude par RMN de la réactivité de l'orthoquinone (¹³C)-**6** avec l'histidine en milieu organique a montré la formation de deux adduits : un premier (¹³C)-**6e**, majoritaire, montrant un signal à 16,1 ppm, et un second (¹³C)-**6f**, minoritaire, illustré par un signal à 21,1 ppm (**Figure 27**).

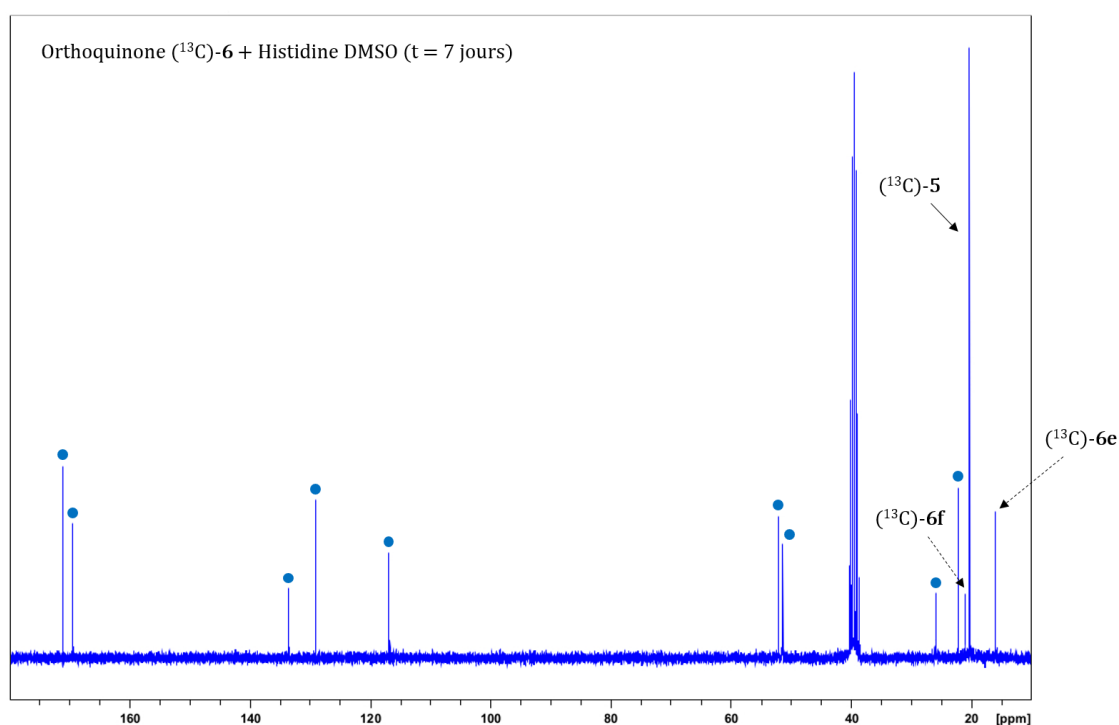


Figure 27. Réactivité de l'orthoquinone- ^{13}C vis-à-vis de l'histidine : spectre à sept jours
Les signaux correspondant à l'histidine non modifiée sont marqués d'un rond bleu (•)

Les adduits ont été caractérisés par RMN à l'aide d'expériences bidimensionnelles (**Tableau 5**).

	δ (ppm) ^{13}C	δ (ppm) ^1H HSQC	δ (ppm) ^1H HMBC	Structure proposée
(^{13}C) -6e	16,1 ($^{-13}\text{CH}_3$)	1,94 ($^{-13}\text{CH}_3$)	6,80 (H_a) 6,75 (H_b)	
(^{13}C) -6f	21,1 ($^{-13}\text{CH}_3$)	2,18 ($^{-13}\text{CH}_3$)	6,86 (H_a) 6,71 (H_b)	

Tableau 5. Déplacements chimiques des adduits formés par réaction de la (^{13}C) -orthoquinone avec l'histidine

La nature de ces adduits a été confirmée par spectrométrie de masse grâce à l'utilisation de la LC-MS. Ainsi, deux composés de rapports m/z identiques (333 en mode négatif et 335 en mode positif) ayant des temps de rétention proches ont été détectés (**Figure 28**).

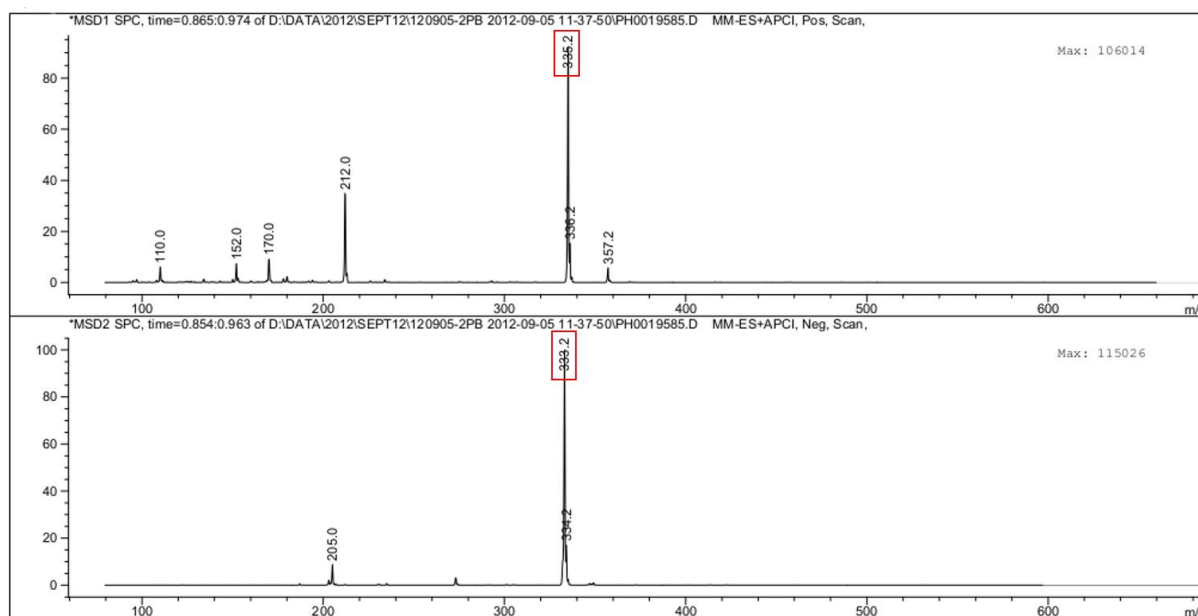


Figure 28. Spectres +APCI/ESI-SM (haut) et -APCI/ESI-SM (bas) pour des temps de rétention de 0,85 à 0,96 min

Les adduits (^{13}C)-**6e** et (^{13}C)-**6f** sont respectivement formés par addition nucléophile 1,4 et 1,6 du noyau imidazole de l'histidine en position 5 et 6 de l'orthoquinone- ^{13}C (**Figure 29**).

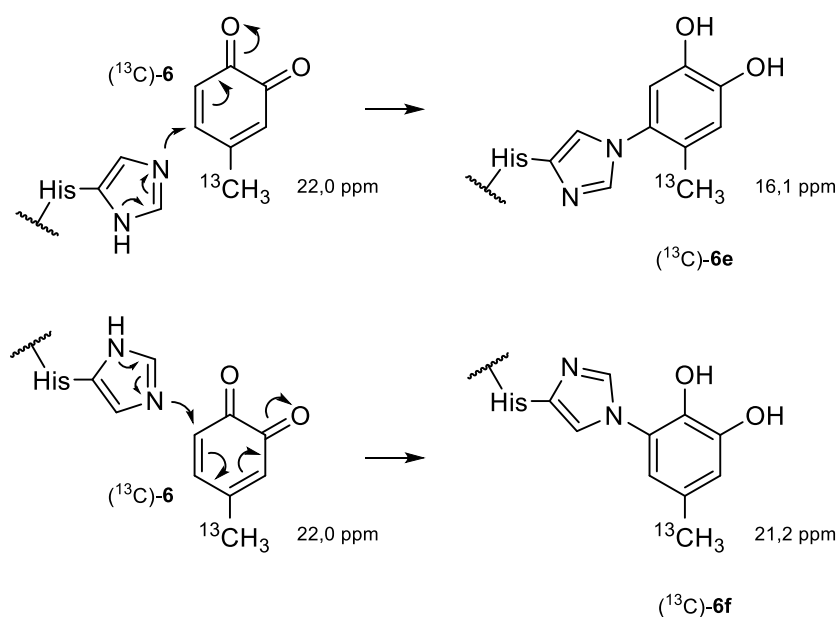


Figure 29. Formation des adduits $(^{13}\text{C})\text{-6e}$ et $(^{13}\text{C})\text{-6f}$ par addition nucléophile 1,4 en position 5 (en haut) et 1,6 en position 6 (en bas)

Notons que l'histidine est ici liée au catéchol par son azote en position 3. Cependant, une réaction entre l'orthoquinone $(^{13}\text{C})\text{-6}$ et l'histidine via son azote en position 1 n'est pas à exclure

D'après les signaux observés sur le spectre RMN 1D ^{13}C , l'adduit $(^{13}\text{C})\text{-6e}$ est majoritaire par rapport à l'adduit $(^{13}\text{C})\text{-6f}$. L'histidine réagit donc préférentiellement avec l'orthoquinone $(^{13}\text{C})\text{-6}$ en position 5 ou 6 influence le déplacement chimique (δ) du méthyle aromatique du catéchol $(^{13}\text{C})\text{-5}$. Initialement, la valeur du δ du méthyle du catéchol $(^{13}\text{C})\text{-5}$ est de 20,4 ppm. Lorsque le catéchol est oxydé sous sa forme orthoquinone $(^{13}\text{C})\text{-6}$, le signal est décalé vers les champs faibles à 22,0 ppm. Quand l'addition nucléophile est réalisée en position 5, le δ est de 16,1 ppm. Le signal est significativement décalé vers les champs forts ($\Delta \delta = 4,3$ ppm). *A contrario*, lorsque la substitution nucléophile a lieu en position 6, le δ du méthyle aromatique de l'adduit obtenu est de 22,1 ppm. Dans ce cas, le signal est donc déplacé vers les champs faibles ($\Delta \delta = 1,7$ ppm).

Nous remarquons également en spectrométrie de masse la présence d'un composé de rapport m/z 456 (en mode négatif) et 458 (en mode positif) résultant de la formation d'un adduit entre un dimère du catéchol $(^{13}\text{C})\text{-5}$ et une histidine (**Figure 30**). Ce résultat est intéressant puisqu'il laisse supposer une réactivité de l'histidine avec un un des dimères précédemment identifiés (**Figure 31**). Toutefois, la présence de ces structures dimériques mise en évidence par LC-MS ne l'a pas été par RMN du liquide.

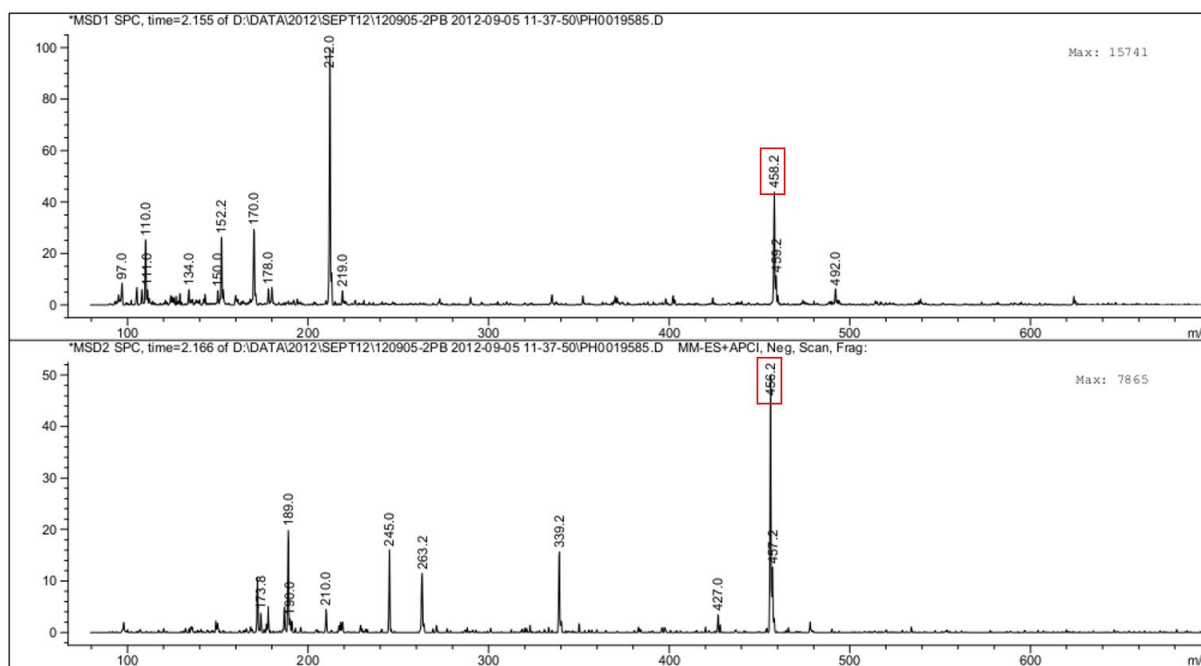


Figure 30. Spectres +APCI/ESI-SM (haut) et -APCI/ESI-SM (bas) pour un temps de rétention de 2,16 min

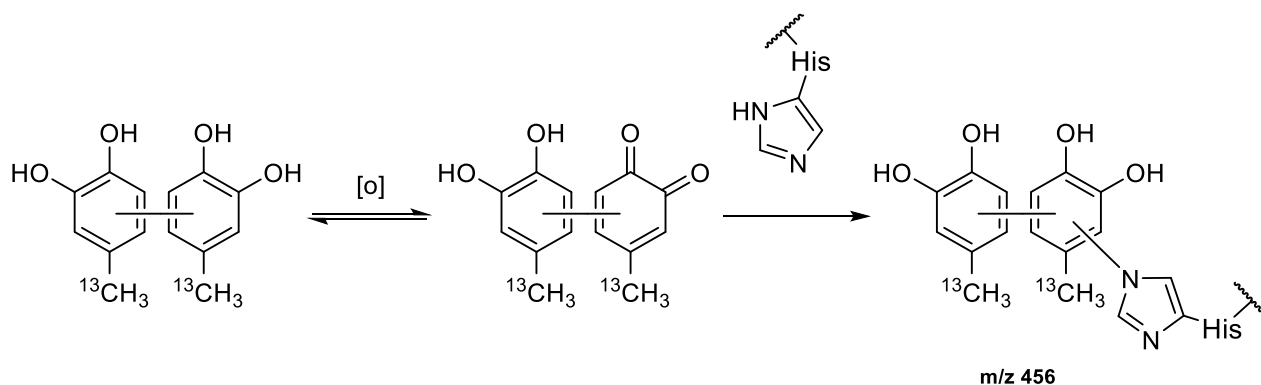


Figure 31. Mécanisme proposé : réactivité entre un des dimères du catéchol (^{13}C)-5 et l'histidine

Réactivité de l'orthoquinone (^{13}C)-6 avec la cystéine en milieu organique

L'étude de la réaction menée entre l'orthoquinone (^{13}C)-6 et la cystéine est riche en informations. Celle-ci a conduit à l'observation de trois adduits, (^{13}C)-6g, (^{13}C)-6h et (^{13}C)-6i (**Figure 32**).

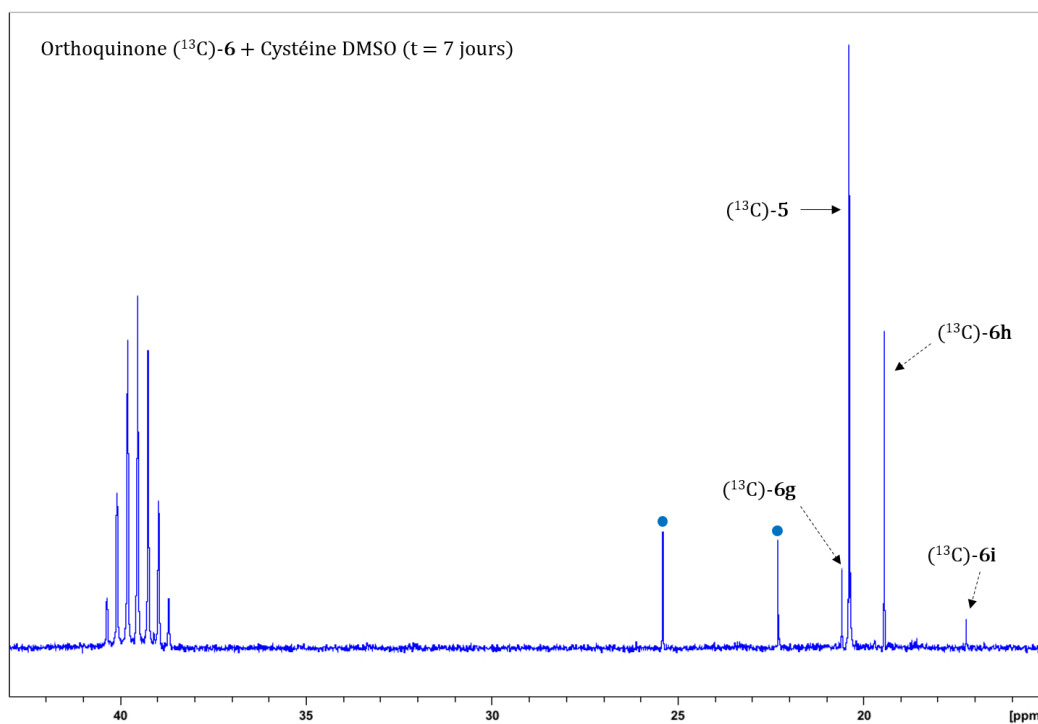


Figure 32. Réactivité de l'orthoquinone- ^{13}C avec la cystéine : spectre à 7 jours

Les signaux correspondant la cystéine non modifiée sont marqués d'un rond bleu (•)

Là encore, les adduits ont été caractérisés par RMN du liquide au moyen d'expériences bidimensionnelles (**Tableau 6**), et confirmés par analyse LC-MS (**Figure 33**).

	δ (ppm) ^{13}C	δ (ppm) ^1H HSQC	δ (ppm) ^1H HMBC	Structure proposée
(^{13}C)-6g	20,6 ($^{-13}\text{CH}_3$)	2,14 ($^{-13}\text{CH}_3$)	6,70 (H_a) 6,52 (H_b)	
(^{13}C)-6h	19,4 ($^{-13}\text{CH}_3$)	2,18 ($^{-13}\text{CH}_3$)	6,63 (H_a) 6,66 (H_b)	

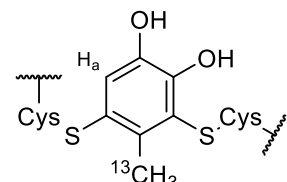
	δ (ppm) ^{13}C	δ (ppm) ^1H HSQC	δ (ppm) ^1H HMBC	Structure proposée
$(^{13}\text{C})\text{-6i}$	17,2 ($^{-13}\text{CH}_3$)	2,11 ($^{-13}\text{CH}_3$)	6,38 (H_a)	

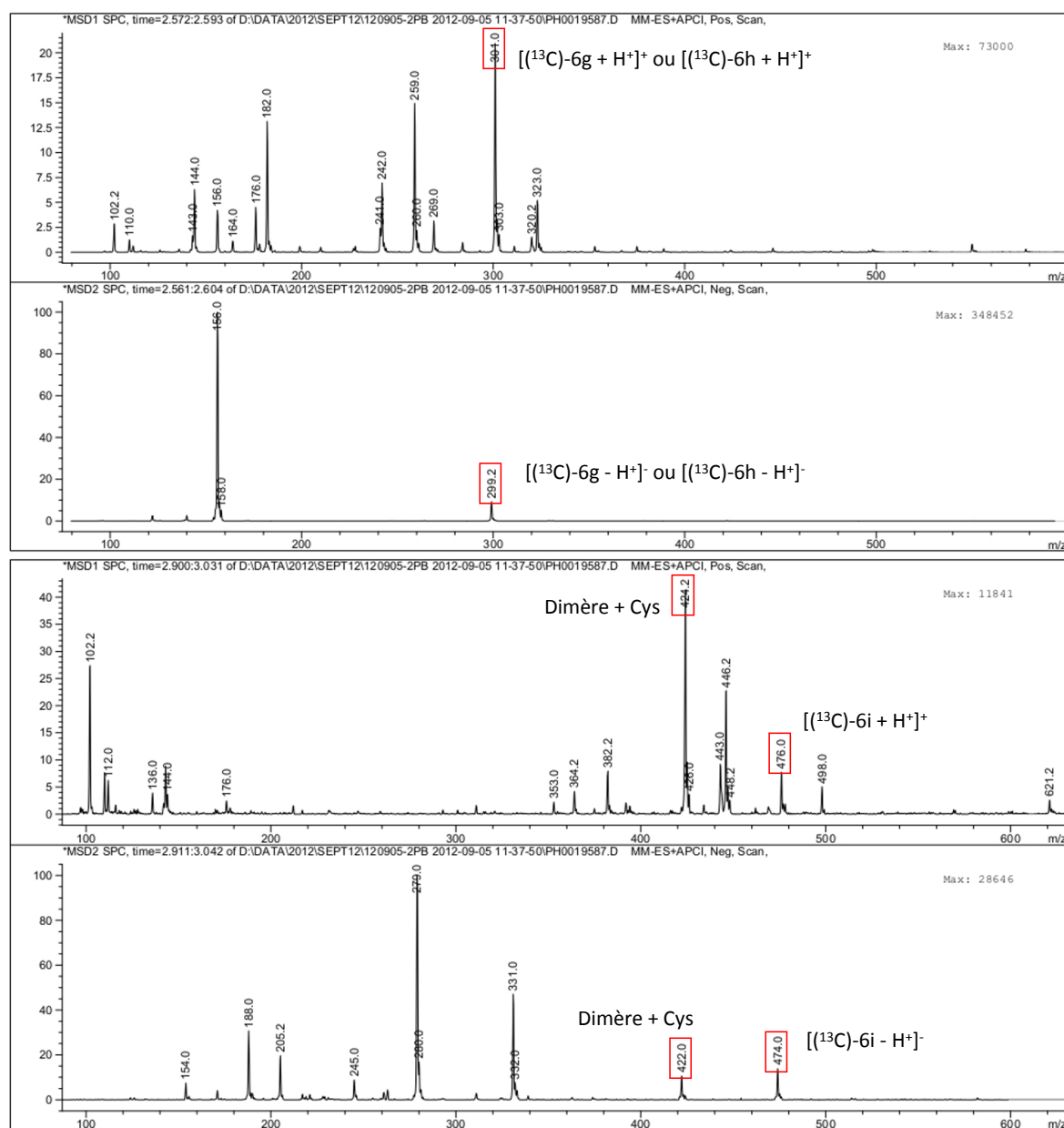
Tableau 6. Déplacements chimiques des adduits $(^{13}\text{C})\text{-6g}$, $(^{13}\text{C})\text{-6h}$ et $(^{13}\text{C})\text{-6i}$ 

Figure 33. Spectre +APCI/ESI-SM (haut) et -APCI/ESI-SM (bas) pour des temps de rétention de 2,56 à 3,04 min

La nature des adduits (^{13}C)-**6g** et (^{13}C)-**6h** montre que la cystéine réagit sur les positions 3 et 6 de l'orthoquinone (^{13}C)-**6** par des additions nucléophiles 1,6. L'adduit (^{13}C)-**6h** étant majoritaire, la cystéine s'additionne préférentiellement en position 3 (**Figure 34**).

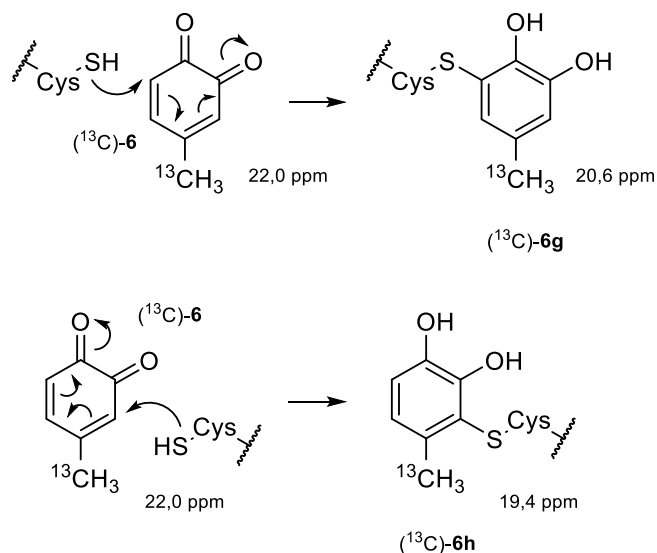


Figure 34. Formation des adduits (^{13}C)-**6g** et (^{13}C)-**6h** : addition nucléophile 1,6 en position 6 (haut) et en position 3 (bas)

Le composé (^{13}C)-**6i** est un double adduit. En effet, deux cystéines ont réagi avec une seule et même orthoquinone (^{13}C)-**6**. Le mécanisme peut être expliqué comme suit : l'orthoquinone (^{13}C)-**6** est sujette à une première addition nucléophile 1,6 de la part d'une cystéine. L'adduit (^{13}C)-**6h** formé est à nouveau oxydé sous la forme d'une orthoquinone. Cette oxydation peut être réalisée par le dioxygène environnant ou par une autre orthoquinone proche. L'orthoquinone ainsi formée subit une seconde addition nucléophile 1,4 de la part d'une cystéine formant ainsi le double adduit (^{13}C)-**6i** (**Figure 35**).

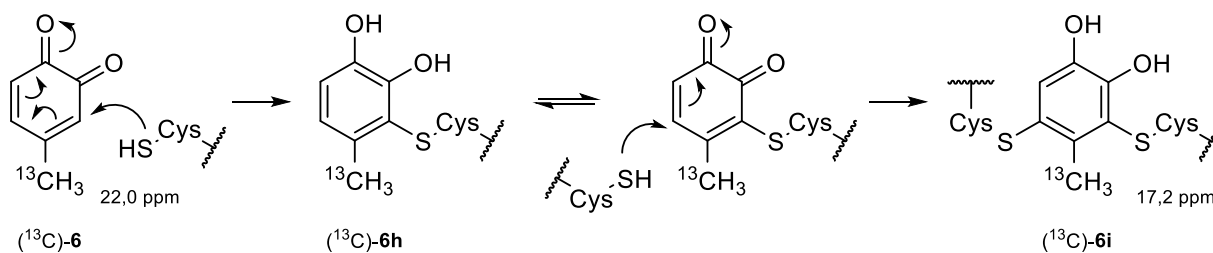


Figure 35. Formation du double adduit (^{13}C)-**6i**

L'addition nucléophile d'un résidu thiol sur l'orthoquinone (^{13}C)-**6** en position 3, 5 ou 6 influence naturellement le déplacement chimique (δ) du méthyle aromatique du catéchol (^{13}C)-**5**. Pour rappel, la valeur de δ du méthyl du catéchol (^{13}C)-**5** est initialement de 20,4 ppm ; celle de l'orthoquinone (^{13}C)-**6** est de 22,0 ppm. Lorsque la cystéine s'additionne en position 3, le δ est de 19,4 ppm. Le signal est légèrement décalé vers les champs forts ($\Delta \delta = 1$ ppm). Cette tendance est accentuée lorsque les positions 3 et 5 sont simultanément substituées par des résidus thiols. C'est le cas du double adduit (^{13}C)-**6i**. Le δ est significativement déplacé vers les champs forts (17,2 ppm, $\Delta \delta = 3,2$ ppm). Si l'addition nucléophile est réalisée en position 6, la variation de δ n'est que très faible (de 20,4 à 20,6 ppm, $\Delta \delta = 0,2$ ppm).

A l'instar de l'histidine, il semblerait que la cystéine soit réactive avec l'un des dimères du catéchol (^{13}C)-**5**. En effet, un composé de rapport m/z 422 (en mode négatif) et 424 (en mode positif) est détecté lors de l'analyse par LC-MS. Ce résultat tend à confirmer qu'un ou plusieurs des dimères du catéchol (^{13}C)-**5** sont capables de réagir avec des acides aminés (**Figure 36**).

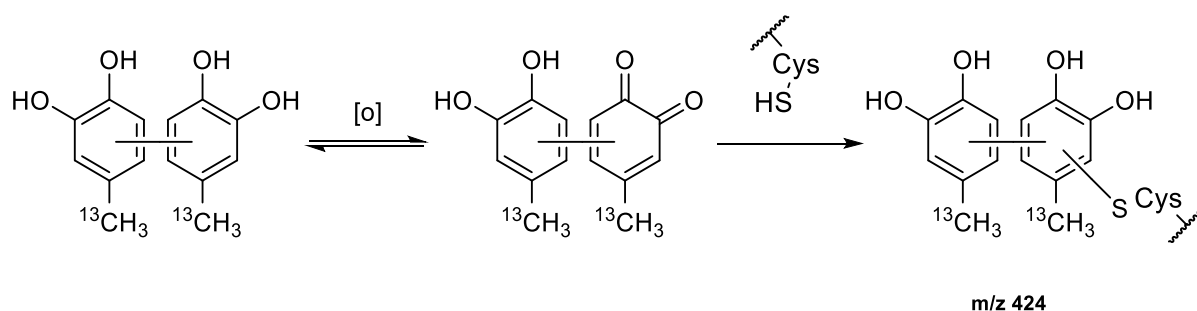


Figure 36. Réactivité du dimère catéchol (^{13}C)-**5** avec un résidu thiol d'une cystéine

En outre, nous observons par spectrométrie de masse la formation de cystine (deux unités de cystéine liées par un pont disulfure) ayant pour m/z 351 (en mode négatif) et 353 (en mode positif). Si en solution la cystéine tend naturellement à s'oxyder pour former de la cystine, cette réaction peut être accélérée par la présence de l'orthoquinone (^{13}C)-**6** dans le milieu (**Figure 37**).^[238,239]

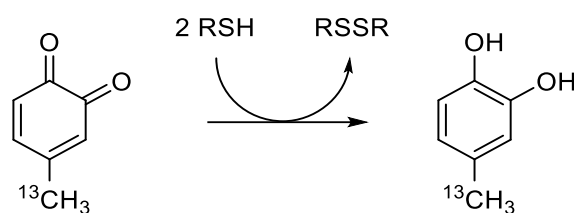


Figure 37. Dimérisation de la cystéine en cystine par action réductrice de l'orthoquinone (^{13}C)-6

Finalement, les tests de réactivité menés en milieu organique ont révélé plusieurs points d'intérêt. Ils ont montré que l'orthoquinone (^{13}C)-6 possède un temps de vie relativement court. Dans le DMSO, seules la lysine, l'histidine et la cystéine présentent de réelles interactions avec l'orthoquinone (^{13}C)-6. Ces trois acides aminés diffèrent de par leur mode d'action. Si la lysine réagit uniquement sur la position méthylénique de la *para*-méthylène quinone, ce n'est pas le cas de l'histidine et de la cystéine qui réagissent directement sur l'orthoquinone (^{13}C)-6 via des additions nucléophiles 1,4 et 1,6. L'histidine, dont le groupement nucléophile est une amine, est plus sélective de la position 5. Quant à la cystéine, dont le groupement nucléophile est un thiol, elle est plus sélective de la position 6. Cette sélectivité des positions attaquées en fonction de la nature de l'hétéroatome impliqué est connue.^[238] Nous pouvons citer à ce sujet les travaux de l'équipe du professeur N. Castagnoli qui fut la première à s'intéresser à la chimie de l'urushiol, et plus particulièrement à celle du pentadécylcatéchol, ou PDC.^[240] Leurs études ont montré que le PDC est un pro-haptène qui doit être oxydé en orthoquinone avant de pouvoir réagir avec les résidus nucléophiles des protéines. Tous les nucléophiles ne réagissent pas sur cette orthoquinone sur la même position. En effet, les résidus amines, nucléophile « dur », attaquent sélectivement en position 5 par un mécanisme d'attaque 1,4, alors que les dérivés thiols, nucléophile « mou », attaquent uniquement en position 6, par un mécanisme 1,6 (**Figure 38**). La régiosélectivité démontrée est parfaitement en accord avec la théorie des acides et des bases de Lewis « durs » et « mous » (Hard and Soft Acids and Bases, HSAB).^[241]

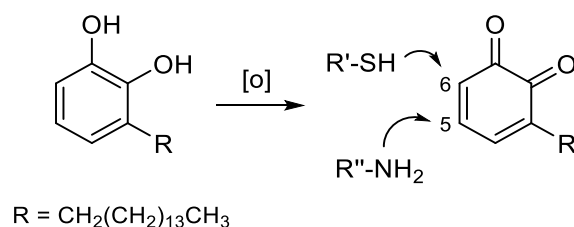


Figure 38. Régiosélectivité des additions sur la forme oxydée du PDC en fonction de la nature des nucléophiles

Qu'elle soit réalisée en position 3, 5 ou 6, par une amine ou par un thiol, la substitution aromatique du catéchol (^{13}C)-**5** influence nécessairement le déplacement chimique du méthyle aromatique. D'une manière générale, nous avons vu que la substitution par un hétéroatome, N ou S, dans les positions 3 et 5, décale le δ vers les champs forts. A l'inverse, la substitution en position 6 déplace le δ vers les champs plus faibles. Notons que dans le cas où la substitution est réalisée par un atome d'azote (amine de l'histidine), les effets répercutés sur le δ du groupement méthyle sont plus importants.

Enfin, l'orthoquinone (^{13}C)-**6** n'est pas la seule espèce réactive en solution. En effet, nous avons observé par RMN du liquide que l'adduit (^{13}C)-**6h** formé entre l'orthoquinone (^{13}C)-**6** et la cystéine pouvait être oxydé et réagir avec une autre cystéine pour donner le double adduit (^{13}C)-**6i**. De plus, les analyses LC-MS ont montré qu'un ou plusieurs des dimères du catéchol (^{13}C)-**5** s'avérai(en)t être réactif(s) vis-à-vis de l'histidine et de la cystéine. Concernant la cystéine, ces constatations ne sont pas réellement surprenantes puisque Nikolantonaki et Waterhouse ont déjà démontré, par HPLC couplée à la spectrométrie de masse haute résolution, ces réactivités entre le 4-méthylcatéchol oxydé et des dérivés nucléophiles soufrés (dioxyde de soufre, méthionine, glutathion, etc.) présents dans le vin.^[235] Si nous supposons qu'un des dimères du catéchol (^{13}C)-**5** est capable de réagir avec l'histidine ou la cystéine, il est raisonnable de garder à l'esprit que la réactivité d'un adduit catéchol-Nu (ou orthoquinone-Nu) avec une autre orthoquinone (ou un autre catéchol) conduirait au même type d'adduit dimère-Nu (**Figure 39**)

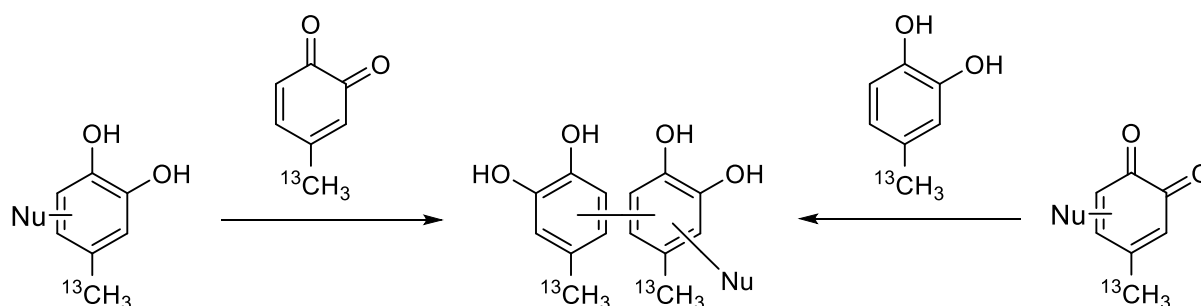


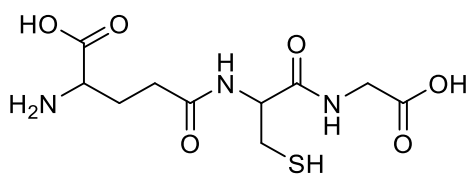
Figure 39. Autres possibilités pour la formation d'adduits entre un des dimères du catéchol (^{13}C)-**5** et les acides aminés (histidine et cystéine)

1.3.C. Réactivité en milieu aqueux

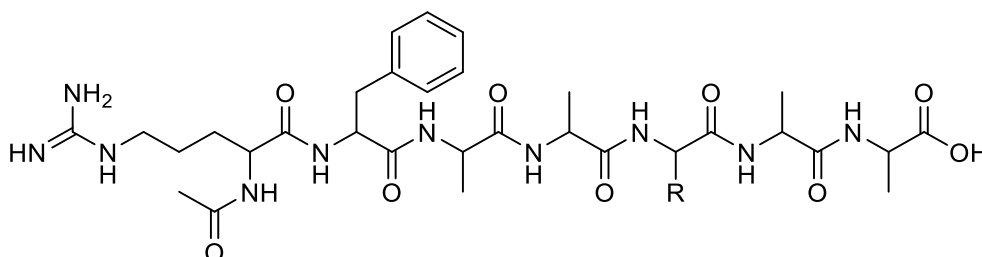
Les tests de réactivité menés dans l'eau se veulent, comparativement à ceux menés en milieu organique, plus proches des phénomènes observés sur le modèle RHE. En outre, l'eau permet l'utilisation de peptides.

Le protocole expérimental suivi est le même que celui utilisé pour l'étude de la réactivité de l'orthoquinone (^{13}C)-**6** avec les acides aminés dans le DMSO. Seule différence, le DMSO est remplacé par un mélange composé d'acétonitrile deutéré (CD_3CN) et d'une solution tampon phosphate ayant un pH égal à 7,4 (STP 7,4). L'orthoquinone (^{13}C)-**6**, obtenue par oxydation du catéchol (^{13}C)-**5**, est solubilisée dans 150 μL de CD_3CN , alors que les acides aminés et peptides sont dissous dans 450 μL de STP 7,4. Comme précédemment, la réactivité est suivie quotidiennement par RMN et, après une semaine, les échantillons sont analysés par LC-MS.

Les neuf acides aminés employés lors des études en milieu aqueux sont identiques à ceux testés en milieu organique. A cela viennent s'ajouter trois peptides utilisés dans le test du DPRA,^[17] le glutathion, le peptide lysine et le peptide cystéine, et un peptide composé de vingt acides aminés (**Figure 40**). Ce dernier, déjà utilisé au laboratoire de Dermatochimie,^[242,243] est constitué d'un exemplaire de chaque acide aminé naturel excepté la cystéine, retirée afin d'éviter des problèmes de dimérisation.



Glutathion



Peptide cystéine R =

Peptide lysine R =

H₂N-Val-Leu-Ser-Pro-Ala-Asp-Lys-Thr-Asn-Trp-Gly-His-Glu-Tyr-Arg-Met-Phe-Gln-Ile-Gly-COOH

Séquence du peptide modèle de 20 acides aminés

Figure 40. Les quatre peptides utilisés dans les études de réactivité en solution

Les tests en présence des peptides sont réalisés à raison d'un équivalent d'orthoquinone (¹³C)-**6** pour deux équivalents de chaque peptide. Exception faite pour le peptide modèle : en raison de sa faible solubilité, les expériences sont conduites dans les conditions stoechiométriques. Le comportement de l'orthoquinone (¹³C)-**6** en milieu aqueux, ainsi que les résultats obtenus pour les acides aminés et les peptides sont présentés ci-après.

Comportement de l'orthoquinone (¹³C)-**6** en milieu aqueux (tube témoin)

Dans le mélange CD₃CN/STP 7,4, et en l'absence d'acide aminé dans le milieu, l'orthoquinone (¹³C)-**6** est très rapidement réduite en catéchol (¹³C)-**5**. Le spectre RMN 1D ¹³C au temps initial témoigne de ce flagrant manque de stabilité (**Figure 41**).

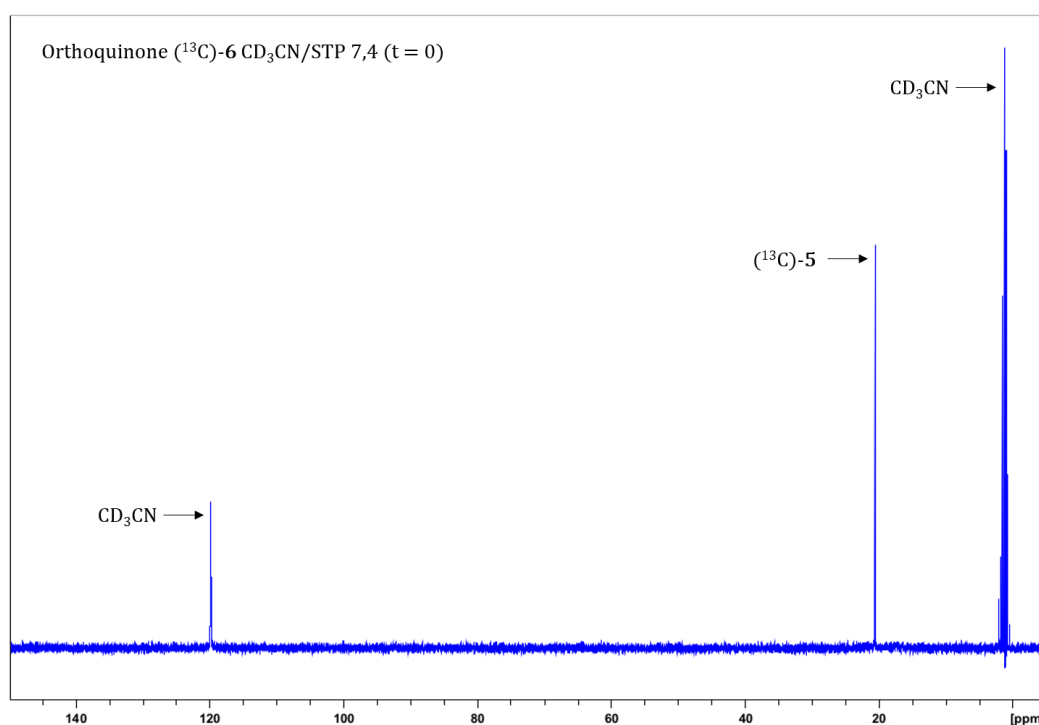


Figure 41. Comportement de l'orthoquinone- ^{13}C dans l'eau : spectre à sept jours

En effet, au temps initial ($t = 0$), seul un signal est visible. Il s'agit du signal du catéchol (^{13}C)-5. En moins de quelques minutes (temps nécessaire pour faire l'acquisition du premier spectre), l'orthoquinone (^{13}C)-6 est totalement réduite. Le système est figé dans cet état puisqu'aucune évolution n'est à noter les jours suivants.

Les analyses par LC-MS ont tout de même montré la présence, en faibles quantités, de nombreux produits issus de la dégradation par hydrolyse de l'orthoquinone (^{13}C)-6. Les composés (^{13}C)-6a, (^{13}C)-6b et (^{13}C)-6c ont notamment été retrouvés. Nous observons également la formation de plusieurs dimères, et de nombreuses molécules de rapports m/z élevés (supérieur à 400) résultant de la polymérisation de l'orthoquinone (^{13}C)-6.

Réactivité de l'orthoquinone (^{13}C)-6 avec les acides aminés en milieu aqueux

La réactivité en milieu aqueux de l'orthoquinone (^{13}C)-6 avec les acides aminés étant relativement proche de celle observée en milieu organique, les résultats sont présentés plus succinctement dans le tableau ci-dessous (**Tableau 7**).

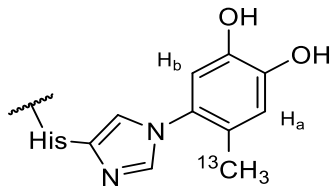
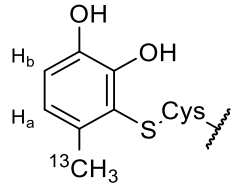
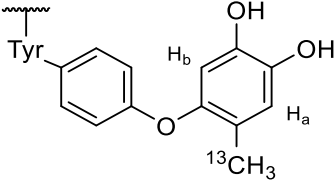
		δ (ppm) ^{13}C	δ (ppm) ^1H HSQC	δ (ppm) ^1H HMBC	Structure proposée
H I S T I D I N E	$(^{13}\text{C})\text{-6e}$	16,7 ($^{-13}\text{CH}_3$)	1,89 ($^{-13}\text{CH}_3$)	6,75 (H_a) 6,70 (H_b)	
C Y S T E I N E	$(^{13}\text{C})\text{-6h}$	20,2 ($^{-13}\text{CH}_3$)	1,95 ($^{-13}\text{CH}_3$)	6,69 (H_a) 6,64 (H_b)	
T Y R O S I N E	$(^{13}\text{C})\text{-6j}$	15,4 ($^{-13}\text{CH}_3$)	1,90 ($^{-13}\text{CH}_3$)	6,70 (H_a) 6,43 (H_b)	

Tableau 7. Déplacements chimiques des adduits formés par réaction de l'orthoquine (^{13}C)- avec les acides aminés

L'analyse des échantillons par spectrométrie de masse a permis de confirmer la présence de ces adduits (**Tableau 8**).

Ion moléculaire	m/z trouvé (ESI/APCI)	Temps de rétention (min)
$[(^{13}\text{C})\text{-6e} - \text{H}^+]^-$ $[(^{13}\text{C})\text{-6e} + \text{H}^+]^+$	333 335	1,79
$[(^{13}\text{C})\text{-6h} - \text{H}^+]^-$	299	2,55
$[(^{13}\text{C})\text{-6j} - \text{H}^+]^-$ $[(^{13}\text{C})\text{-6j} + \text{H}^+]^+$	345 347	2,88

Tableau 8. Résultats LC-MS des ions moléculaires correspondant aux composés (^{13}C)-**6e**, (^{13}C)-**6h** et (^{13}C)-**6j**

Nous constatons qu'en solution aqueuse, l'histidine, la cystéine et la tyrosine réagissent avec l'orthoquinone (^{13}C)-**6**. Contrairement aux études menées en milieu organique, la lysine ne l'est plus, sans doute pour des raisons de protonation de la lysine à pH 7,4.

L'histidine réagit uniquement avec l'orthoquinone (^{13}C)-**6** en position 5 via une addition nucléophile 1,4. Cette attaque sélective influence bien entendu le déplacement chimique (δ) du méthyl du catéchol. Initialement à 20,5 ppm, il est décalé vers les champs forts à 16,7 ppm.

Concernant la cystéine, seul l'adduit (^{13}C)-**6h** a été identifié. Si dans le DMSO, la cystéine attaquait les positions 3, 5 et 6 de l'orthoquinone- ^{13}C , ce n'est pas le cas en milieu aqueux puisque seule la position 3 est sujette à l'attaque nucléophile du groupement thiol. Encore une fois, le δ du méthyl du catéchol est influencé. Ce dernier est légèrement déplacé vers les champs forts (de 20,5 à 20,2 ppm, $\Delta \delta = 0,3$ ppm). S'il n'est pas visible en RMN, le double adduit (^{13}C)-**6i** a été détecté par spectrométrie de masse.

Il est fort intéressant de constater que la tyrosine réagit avec l'orthoquinone (^{13}C)-**6** en position 5 au moyen d'une addition nucléophile 1,4. Sa réactivité dans l'eau est donc identique à celle de l'histidine. La substitution nucléophile du catéchol en position 5 par une tyrosine a une grande répercussion sur le δ du méthyl du catéchol (^{13}C)-**5**. En effet, il est après réaction décalé de plusieurs ppm vers les champs forts (de 20,5 à 15,7 ppm, $\Delta \delta = 4,8$ ppm).

En outre, les analyses LC-MS ont également montré la réactivité d'un ou plusieurs des dimères de l'orthoquinone (^{13}C)-**6** avec chacun des trois acides aminés (**Tableau 9**).

Ion moléculaire	m/z trouvé (ESI/APCI)	Temps de rétention (min)
$[\text{QH}_2\text{-His} - \text{H}^+]\cdot$	508	1,44
$[\text{QH}_2\text{-Cys} - \text{H}^+]\cdot$	474	2,21
$[\text{QH}_2\text{-Tyr} - \text{H}^+]\cdot$	520	2,51

Tableau 9. Résultats LC-MS des ions moléculaires correspondant aux adduits de type dimère-Nu

$\text{QH}_2 = (^{13}\text{C})\text{-4-méthylcatéchol}$; His = Histidine ; Cys = Cystéine ; Tyr = Tyrosine

Réactivité de l'orthoquinone (^{13}C)-6 avec les peptides en milieu aqueux

Que ce soit avec le peptide lysine, le peptide cystéine, le glutathion ou le peptide modèle composé de vingt acides aminés, aucun adduit n'a pu être détecté par RMN du liquide. Néanmoins, la spectrométrie de masse, plus sensible, nous apporte quelques informations.

Concernant le peptide lysine, il a été retrouvé, par LC-MS, sous sa forme native (m/z 774, mode négatif). Il semblerait donc qu'il n'ait aucune interaction avec l'orthoquinone (^{13}C)-6.

A propos du peptide cystéine, celui-ci n'a pas été retrouvé sous sa forme native. Sa disparition est attribuée à sa dimérisation par formation de ponts disulfures (m/z 1498, mode négatif). Si en solution le peptide cystéine tend naturellement à se réduire, cette rapide dimérisation est peut-être accélérée par la présence de l'orthoquinone (^{13}C)-6 dans le milieu.

L'orthoquinone (^{13}C)-6 n'est pas réactive avec le glutathion. Ce n'est cependant pas le cas du dimère du catéchol (^{13}C)-5. Les analyses LC-MS laissent entrevoir la formation d'un adduit entre un des dimères du catéchol et le glutathion (m/z 552, mode négatif ; m/z 554, mode positif) (**Figure 42**).

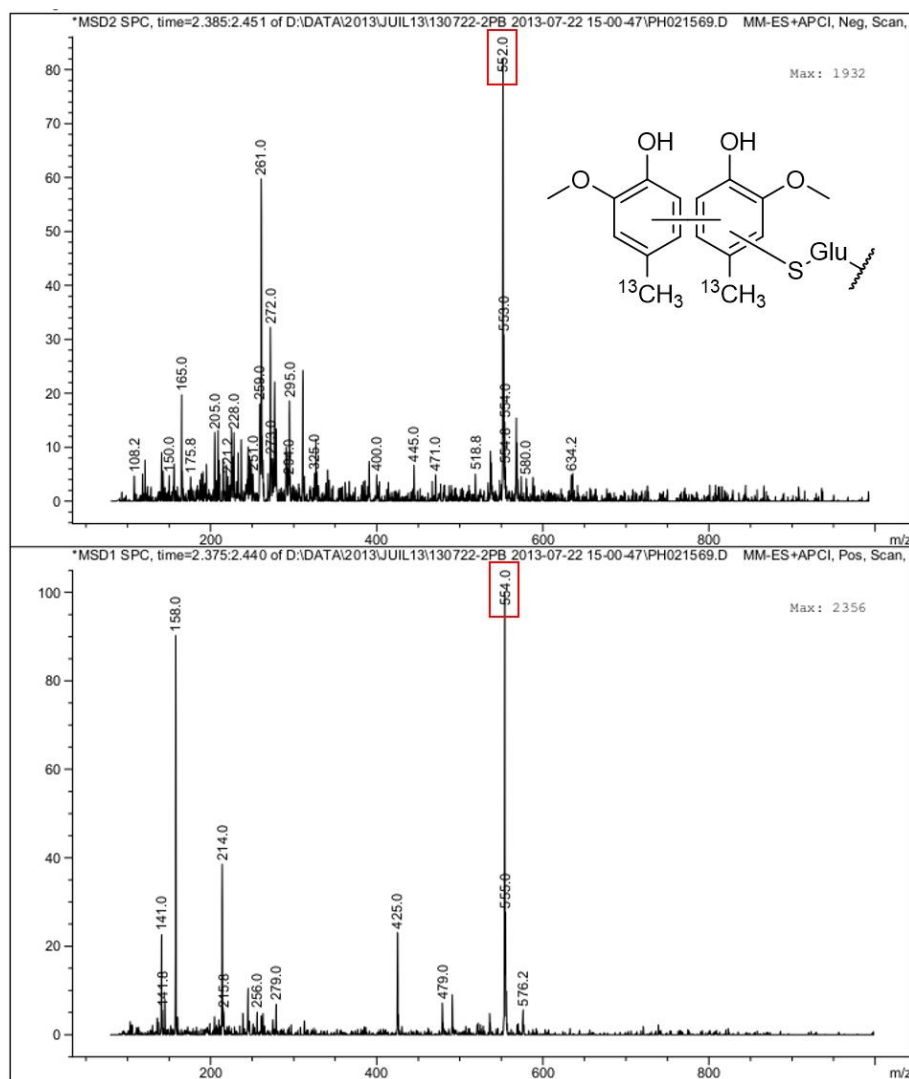


Figure 42. Spectre +APCI/ESI-SM (haut) et -APCI/ESI-SM (bas) pour des temps de rétention de 2,38 à 2,45 min

La spectrométrie de masse ne permet de pas déterminer la structure exacte de l'adduit dimère-glutathion formé. Cependant, en extrapolant les résultats obtenus pour la réactivité de la cystéine en milieu aqueux, nous pouvons supposer que l'addition du glutathion sur le dimère est réalisée en position 6.

Enfin, que ce soit par spectroscopie RMN ou par spectrométrie de masse, aucun adduit n'a été observé entre l'orthoquinone (^{13}C)-**6** et le peptide modèle composé de vingt acides aminés. Nous observons uniquement la réduction de l'orthoquinone (^{13}C)-**6** en catéchol (^{13}C)-**5**. Le peptide modèle est quant à lui retrouvé par LC-MS sous sa forme native.

En définitive, en raison de sa faible stabilité en présence d'eau, l'orthoquinone (^{13}C)-**6** est moins réactive en milieu aqueux qu'en milieu organique. Si trois adduits ont été caractérisés par RMN du

liquide avec les acides aminés, ce n'est pas le cas avec les peptides. La réactivité de l'orthoquinone (^{13}C)-**6** observée en milieu aqueux avec l'histidine, la cystéine et la tyrosine va dans le sens de celle observée dans le DMSO. En effet, les résidus amine de l'histidine et alcool de la tyrosine sont des nucléophiles « durs » qui réagissent sélectivement en position 5 de l'orthoquinone (^{13}C)-**6** par des additions nucléophiles 1,4. Le résidu thiol de la cystéine est un nucléophile « mou » qui réagit uniquement en position 3 via une addition nucléophile 1,6. Cette régiosélectivité est en accord avec la théorie des acides et des bases de Lewis « durs » et « mous ».[241]

II.4.D. Comparaison des résultats avec la RMN HRMAS

Les résultats obtenus lors de la réaction de l'orthoquinone (^{13}C)-**6** avec les acides aminés en solution peuvent être extrapolés et comparés aux observations faites sur les épidermes humains reconstruits. Pour rappel, deux tâches de corrélation à 1,99/14,1 et 1,81/23,2 ppm ont été observées sur le modèle RHE. Si la première semble devenir plus importante au cours du temps, la seconde a disparu après 24 heures. En considérant que le créosol (^{13}C)-**1** est pris en charge par les cytochromes P450 via une réaction de O-déméthylation, et que le catéchol résultant est oxydé sous la forme d'une orthoquinone réactive, les deux tâches de corrélation pourraient être expliquées comme suit (Figure 43).

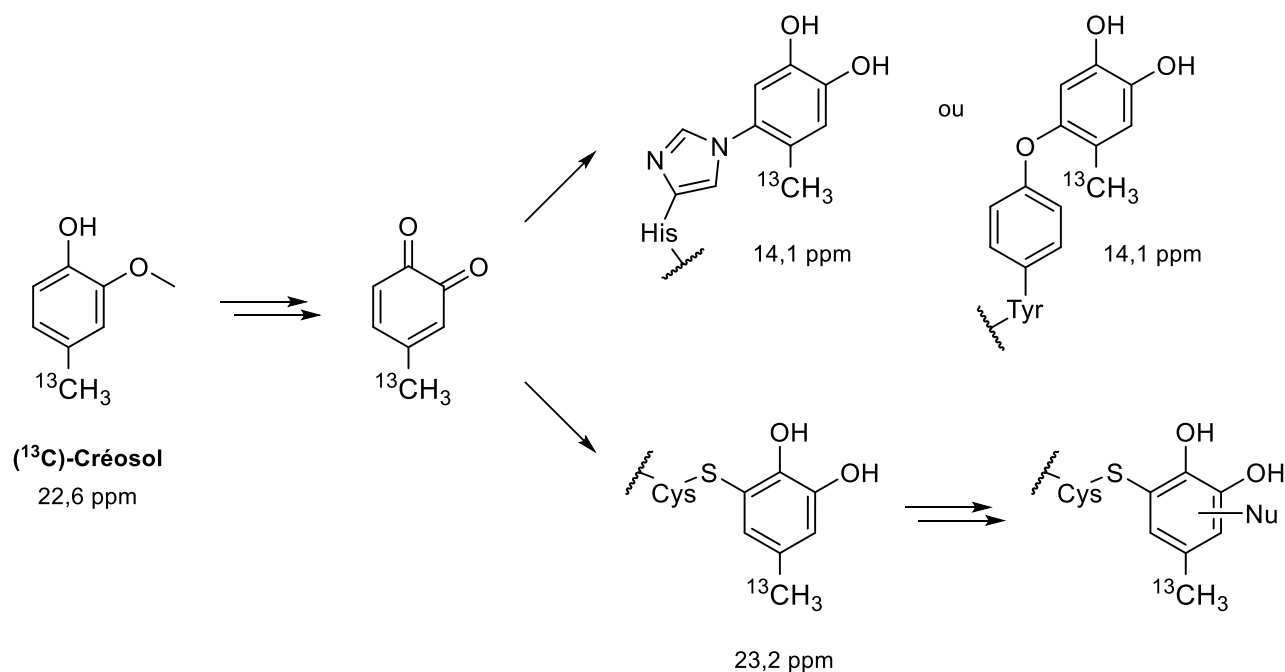


Figure 43. Explication des tâches de corrélation observées sur le modèle RHE : proposition d'adduits

Par rapport au δ du méthyl du créosol (^{13}C)-1 (22,6 ppm), le δ carbone de la première tache de corrélation se situe dans des champs nettement plus faibles. Autrement dit, le δ du carbone substitué est nettement plus « blindé » (14,1 ppm). D'après les tests réalisés en solution, il pourrait s'agir d'une addition nucléophile 1,4 de la part d'une amine (histidine), d'un alcool (tyrosine), ou plus généralement d'un hétéroatome N ou O sur la position 5 de l'orthoquinone (^{13}C)-6 intermédiaire supposée.

Le δ carbone de la seconde tache de corrélation (23,2 ppm) est très proche du δ du méthyl du créosol (^{13}C)-1 (22,6 ppm). En effet, il n'est que très légèrement « déblindé » (c'est-à-dire décalé vers les champs plus faibles). Ceci nous pousse à croire qu'il pourrait s'agir d'une addition nucléophile 1,6 d'un résidu thiol (cystéine ou glutathion par exemple) sur la position 6 de l'orthoquinone (^{13}C)-6 intermédiaire supposée. L'oxydation de l'adduit formé en orthoquinone, et sa réactivité avec un second résidu nucléophile engendrerait la disparition au cours du temps de la tache de corrélation à 1,81/23,2 ppm. Le fait que cette disparition ne s'accompagne pas de l'apparition d'une ou plusieurs nouvelle(s) autre(s) tache(s) de corrélation peut être expliqué par la ou les concentration(s) trop faible(s) du ou des adduits formés.

I.4. Synthèse en série doublement substituée au carbone 13 et application sur le modèle RHE

I.4.A. Synthèse du créosol doublement substitué au carbone 13

La confirmation de notre hypothèse mécanistique suivant laquelle le créosol serait métabolisé sur le modèle RHE par les mono-oxygénases à CYP450 via une réaction de O-déméthylation passe par l'observation de la libération de formaldéhyde en RMN HRMAS. Pour ce faire, le créosol a été synthétisé en introduisant une substitution au carbone 13 en positions méthylique et méthoxylique (**Figure 44**).

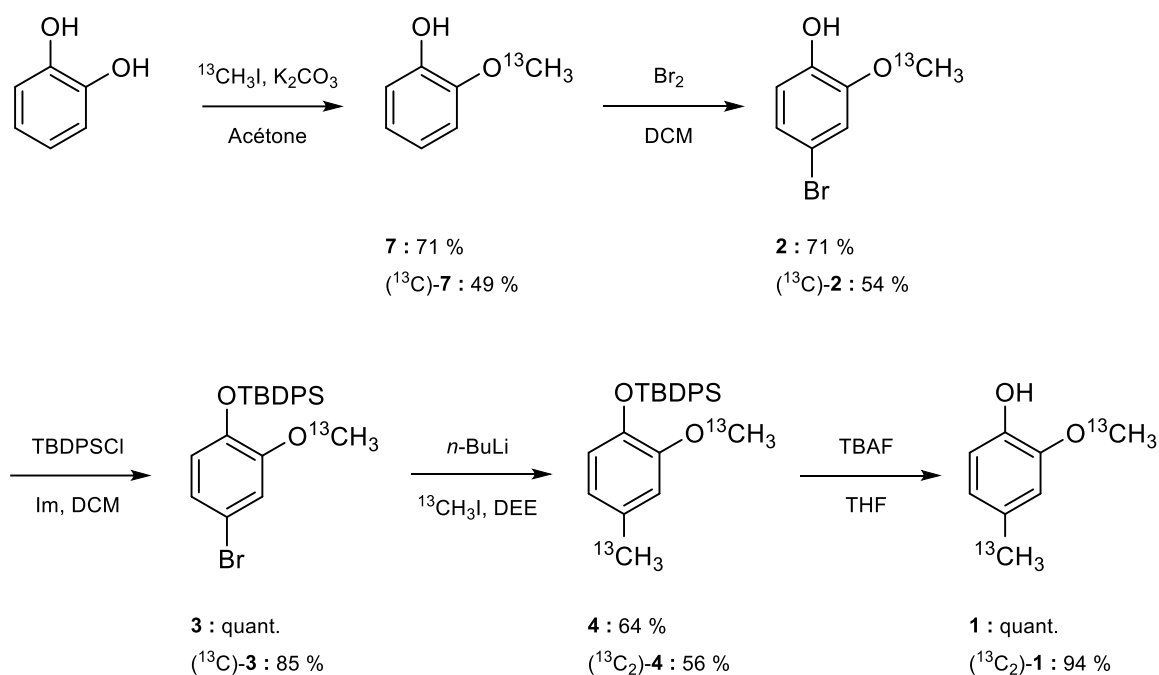


Figure 44. Synthèse du créosol ($^{13}\text{C}_2$)-1

La synthèse du créosol ($^{13}\text{C}_2$)-1 doublement substitué au carbone 13 est identique à celle du créosol (^{13}C)-1 à la seule différence qu'elle débute par une étape de monométhylation du pyrocatechol commercial. Réalisée avec un rendement de 49 %, cette première étape permet l'introduction au moyen de (^{13}C)-iodométhane du carbone 13 sur le groupement méthoxy. Suivant la synthèse du composé (^{13}C)-1, le 2-(méthoxy- ^{13}C)phénol est ensuite bromé, et le bromophénol (^{13}C)-2 obtenu protégé sous la forme d'un éther silylé. Le second carbone 13 est introduit sur la position méthylque via un échange halogène-métal suivi d'une alkylation par du (^{13}C)-iodométhane. Le composé ($^{13}\text{C}_2$)-4 est ainsi préparé avec un rendement de 56 %. Pour finir, le créosol ($^{13}\text{C}_2$)-1 est obtenu par déprotection de l'éther silylé correspondant.

D'une manière générale, nous constatons (et constaterons) que le rendement des étapes réalisées en série non substituée diffèrent des rendements des étapes réalisées en série substituée au carbone 13. Cette constatation pourrait être due à « l'effet isotopique ».^[244] La substitution au sein d'une molécule d'un de ses carbones 12 par un carbone 13 peut influencer la cinétique des réactions dans laquelle la molécule est engagée. La tendance générale montre que le rendement des réactions réalisées en série substituée au carbone 13 est plus faible de celui des réactions réalisées en série non substituée, même si dans certains cas le rendement s'avère être meilleur.

I.4.B. Application sur le modèle RHE et nouvelles observations

Le créosol ($^{13}\text{C}_2$)-1 a été appliqué sur cinq échantillons du modèle RHE. Les temps d'incubation utilisés sont listés ci-après :

- 1 heure
- 2 heures
- 4 heures
- 8 heures
- 24 heures

Les échantillons d'épiderme reconstruit ont été analysés par RMN HRMAS au moyen d'expériences 1D ^1H (CPMG) et 2D HSQC ^1H - ^{13}C éditées. Ci-après est présentée la superposition du spectre issu de l'expérience HSQC ^1H - ^{13}C éditée de l'échantillon 1 h avec celui de l'échantillon blanc. Pour des raisons pratiques, le spectre présenté est un zoom de la zone spectrale d'intérêt (**Figure 45**).

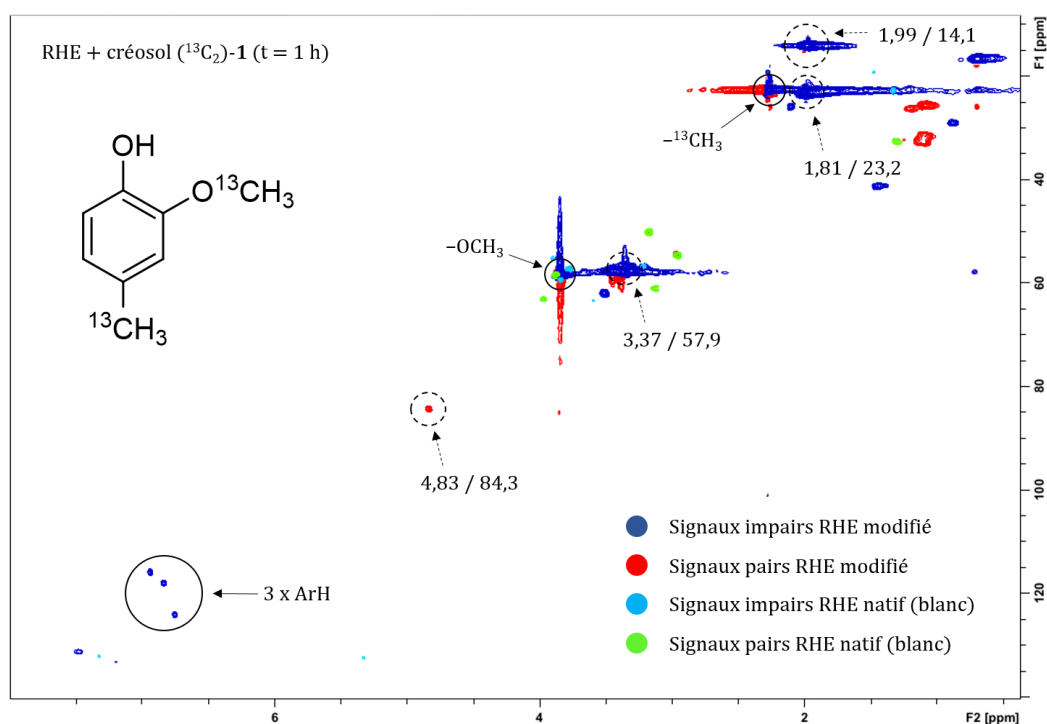


Figure 45. Spectre HSQC édité (superposé au blanc) de l'épiderme 1 h traité par le créosol (^{13}C)-1
Corrélations molécule de départ : cercles et flèches pleines ($\rightarrow \odot$) ; nouvelles corrélations : cercles et flèches en pointillés ($\rightarrow \odot$) ; les déplacements chimiques $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ des nouvelles corrélations sont exprimés en ppm

Après 1 h d'incubation, les deux taches de corrélation à 1,99/14,1 ppm et 1,81/23,2 ppm précédemment observées sur le spectre HSQC de l'épiderme à 1 h traité par le créosol (^{13}C)-1 sont visibles. En plus de ces deux signaux, nous constatons la présence de deux autres taches de corrélation : une première impaire à 3,37/57,9 ppm typique d'un groupement méthoxy $\text{R}-\text{O}-^{13}\text{CH}_3$, et une seconde paire à 4,83/84,3 ppm témoignant de la formation d'un résidu $\text{R}-\text{CH}_2-\text{R}'$ relativement « déblindé » (δ proton et carbone). Non présentes lors de l'application du créosol (^{13}C)-1, ces deux taches de corrélation résultent de la substitution au carbone 13 de la position méthoxylique du crésol ($^{13}\text{C}_2$)-1. Tout comme le signal à 1,81/23,2 ppm, la tache de corrélation à 3,37/57,9 ppm a complètement disparu après 24 heures d'incubation. Si celle à 4,83/84,3 ppm est encore visible au bout de 24 heures, elle a perdu en intensité.

I.4.C. Confirmation de l'hypothèse de travail

En nous basant sur les tables de déplacements chimiques disponibles dans la littérature, nous avons attribué la tache de corrélation paire à 4,83/84,3 ppm au méthanediol, le produit d'hydratation du formaldéhyde. Cette observation est capitale puisqu'elle confirme notre hypothèse mécanistique selon laquelle le créosol serait pris en charge, sur les épidermes humains reconstruits, par les mono-oxygénases à CYP450 par une réaction de O-déméthylation (**Figure 46**).

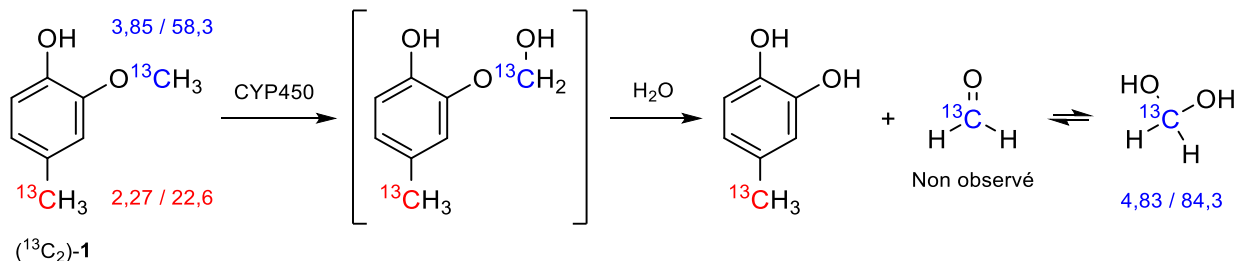


Figure 46. Modèle RHE : activation du créosol ($^{13}\text{C}_2$) par les mono-oxygénase à CYP450

Compte tenu des informations dont nous disposons à la suite de l'application du créosol (^{13}C)-1 sur les épidermes reconstruits, nous avons attribué les taches de corrélation à 1,99/14,1 et 1,81/23,2 ppm à des adduits issus de substitutions aromatiques dans différentes positions du (^{13}C)-4-méthylcatéchol. Si cette attribution est toujours valable pour la tache de corrélation à 1,99/14,1 ppm, les nouvelles informations apportées par l'application du créosol ($^{13}\text{C}_2$)-1 penchent pour la formation d'un dimère du créosol. Ainsi, les deux taches de corrélation à 1,81/23,2 et 3,37/57,9 ppm pourraient

correspondre à un dimère ($^{13}\text{C}_4$)-créosol symétrique formé via un mécanisme radicalaire discuté ci-dessous (**Figure 47**).

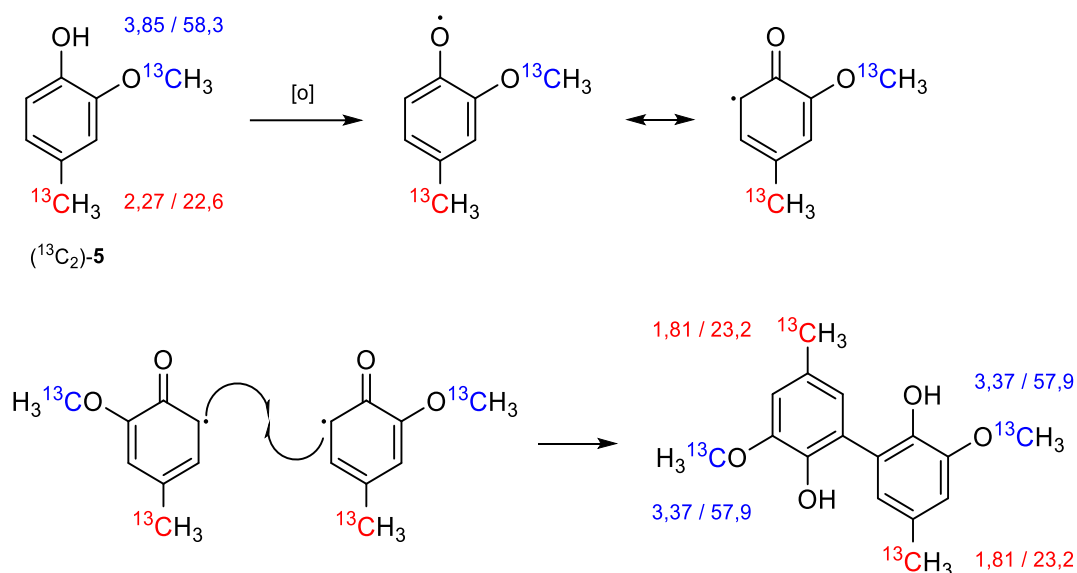


Figure 47. Formation du dimère ($^{13}\text{C}_4$)-créosol

Une première étape d'oxydation conduirait à un radical phénoxy. Cette oxydation peut naturellement être réalisée par le dioxygène de l'air environnant, mais compte tenu de la vitesse de formation du dimère, il semble plus raisonnable de penser qu'elle est effectuée par une peroxydase (EC 1.11). En effet, les peroxydases sont connues pour catalyser *in vivo* et *in vitro* la polymérisation des dérivés phénoliques.^[245,246] Seules deux taches de corrélation sont visibles ; le dimère formé semble donc être symétrique. Dans le cas d'un dimère non symétrique, un total de quatre taches de corrélation aurait été observé. La structure proposée pour le dimère ($^{13}\text{C}_4$)-créosol s'appuie sur le fait que le radical phénoxy peut être délocalisé pour former un radical carboné relativement stable.^[247]

Afin d'appuyer notre idée, nous avons cherché à synthétiser le dimère du créosol d'intérêt puis nous avons comparé ses déplacements chimiques (δ) avec ceux du monomère. La synthèse du dimère en série non substitué s'inspire d'une stratégie d'oxydation d'écrite dans la littérature (**Figure 48**).^[248]

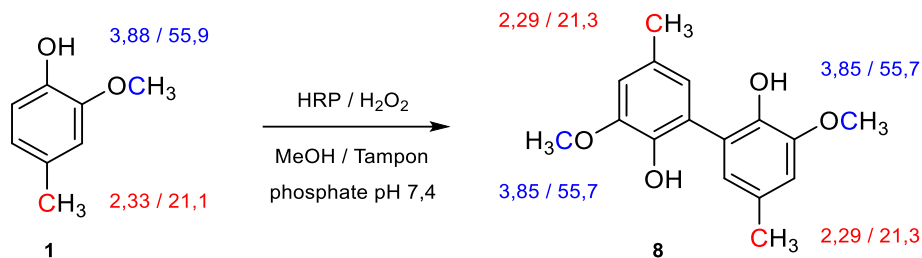


Figure 48. Synthèse du dimère **8**

Les δ des protons et carbones d'intérêt sont exprimés en ppm (en solution, CDCl₃)

L'addition lente d'eau oxygénée (H₂O₂) à une solution méthanol/tampon phosphate pH = 7,4 contenant le créosol et de la peroxydase de raifort permet d'obtenir avec un rendement de 26 % le dimère **8**. Ce modeste rendement est expliqué par la formation d'autres dimères.

La comparaison des δ en solution du monomère du créosol **1** avec ceux de son dimère **8** va dans le sens des observations faites sur le modèle RHE. En effet, le δ proton du méthyle aromatique est légèrement « blindé ». *A contrario*, le δ carbone est « déblindé ». Concernant le groupement méthoxy, la dimérisation décale le δ proton vers les champs plus forts. Il en est de même pour le δ carbone. Bien entendu, ces constatations ne constituent pas une preuve absolue de la formation du dimère (¹³C₄)-créosol sur les épidermes reconstruits. Néanmoins, elles apportent un argument qui soutient l'hypothèse de la dimérisation.

Finalement, l'application du créosol (¹³C₂)-**1** sur modèle RHE a permis d'observer une activité significative des mono-oxygénases à cytochrome P450 (EC 1.14). En effet, le créosol est métabolisé via une réaction de O-déméthylation. Cette réaction conduit à la formation de formaldéhyde et du catéchol correspondant. Le catéchol est ensuite probablement oxydé en orthoquinone, et cette dernière substituée en son centre par un ou plusieurs résidus nucléophiles des protéines épidermiques. Le schéma réactionnel qui suit synthétise l'ensemble de nos observations (**Figure 49**).

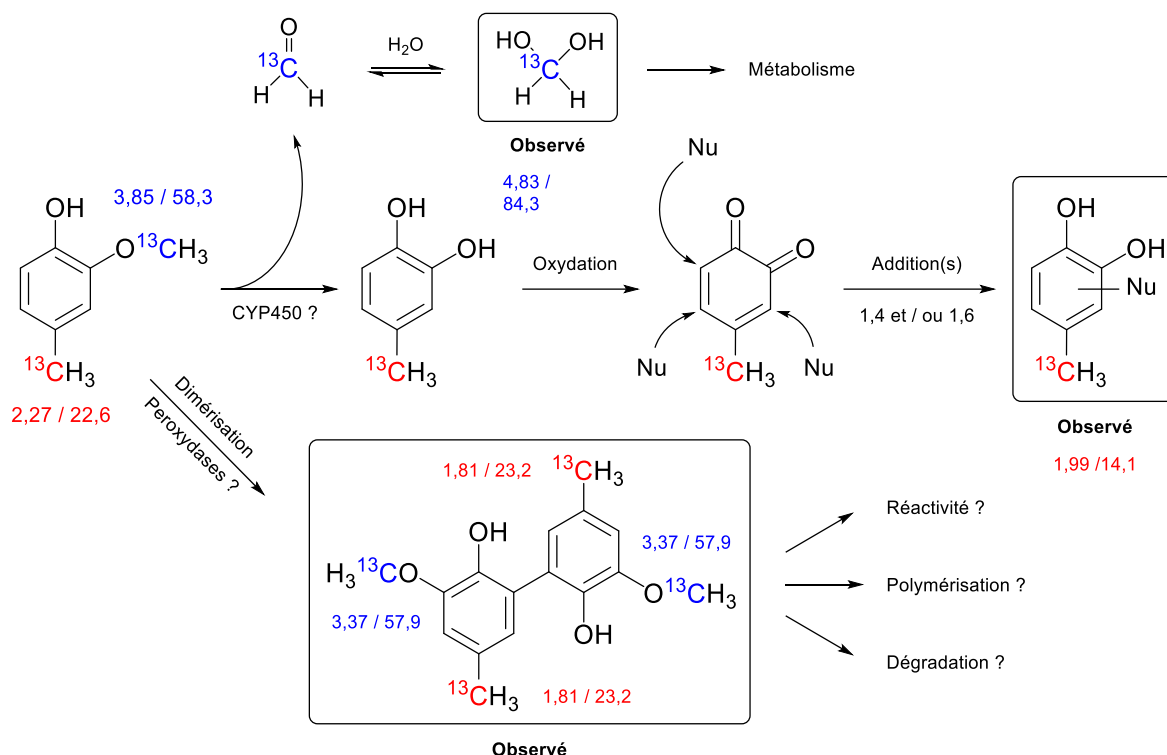


Figure 49. Prise en charge du créosol- $^{13}\text{C}_2$ par le modèle RHE de SkinEthic®

La nature exacte de l'adduit formé (δ 1,99/14,1 ppm) ne peut pas être déterminée uniquement par des expériences HSQC ^1H - ^{13}C . La mise au point et l'utilisation d'expériences HMBC ^1H - ^{13}C (couplages à longue distance) complémentaires permettrait de surmonter ce problème. Toutefois, compte tenu de nos observations sur les modèles (acides aminés et peptides), une variation de δ de 8,5 ppm (22,6 ppm $\rightarrow$ 14,1 ppm) pourrait résulter d'un adduit catéchol-histidine/tyrosine en position 5.

Compte tenu de la forte réactivité du formaldéhyde, la disparition progressive de la tache de corrélations attribuée au méthannediol (δ 4,83/84,3 ppm) n'est pas surprenante. La métabolisation du formaldéhyde sera discutée dans une future partie qui lui est consacrée (cf. Le formaldéhyde, premier métabolite du créosol et de l'eugénol).

Sur le modèle RHE, nous soupçonnons également la formation d'un dimère du créosol (deux corrélation à 1,81/23,1 et 3,37/57,9 ppm). Sa disparition au fil du temps peut être expliquée par sa réactivité avec un ou plusieurs résidu(s) nucléophile(s), par sa polymérisation, ou plus simplement par sa dégradation.

I.5. Créosol appliqué sur le modèle RHE : à quelle concentration travailler ?

Outre l'étude de son comportement sur les épidermes reconstruits, le créosol a été utilisé dans des tests de concentration. Les tests de concentration visent à déterminer la quantité optimale de créosol, et plus généralement d'allergène, à appliquer sur le modèle RHE.

Lors de leurs premiers travaux sur le modèle RHE de SkinEthic®, Elbayed *et al.* ont appliqué les haptènes testés dans l'acétone à une concentration de 0,6 M.^[19] En raison de problèmes liés à la saturation des signaux en RMN HRMAS, cette concentration fut diminuée à 0,4 M. La diminution de la concentration en produit appliqué permet donc de limiter la saturation des taches de corrélation des expériences HSQC ^1H - ^{13}C . De plus, compte tenu du prix élevé des produits substitués au carbone 13 utilisés dans nos synthèses, il est évident que cette diminution permettrait de faire des économies non négligeables. Par exemple, en supposant qu'il soit possible de travailler à une concentration de 0,2 M, nous serions en mesure d'économiser 50 % de l'allergène substitué au carbone 13 testé. Néanmoins, la quantité d'allergène appliqué ne doit pas être trop faible sous peine de ne pas observer la formation de nouveaux métabolites/adduits. La question de la concentration optimale se pose donc.

Pour répondre à cette question, nous avons utilisé le créosol (^{13}C)-**1**. Ce dernier a été appliqué dans l'acétone sur 4 échantillons du modèle RHE (incubés chacun 24 heures) en faisant varier la concentration. Les concentrations choisies sont listées ci-après :

- 0,4 M
- 0,2 M
- 0,1 M
- 0,05 M

Après avoir été préparés, les cinq échantillons d'épiderme reconstruit ont été analysés par RMN au moyen d'expériences HSQC ^1H - ^{13}C . Les spectres issus des expériences HSQC des échantillons traités par le créosol (^{13}C)-**1** à des concentrations respectives de 0,4 M, 0,2 M, 0,1 M et 0,05 M sont présentés ci-dessous (**Figure 50** et **Figure 51**).

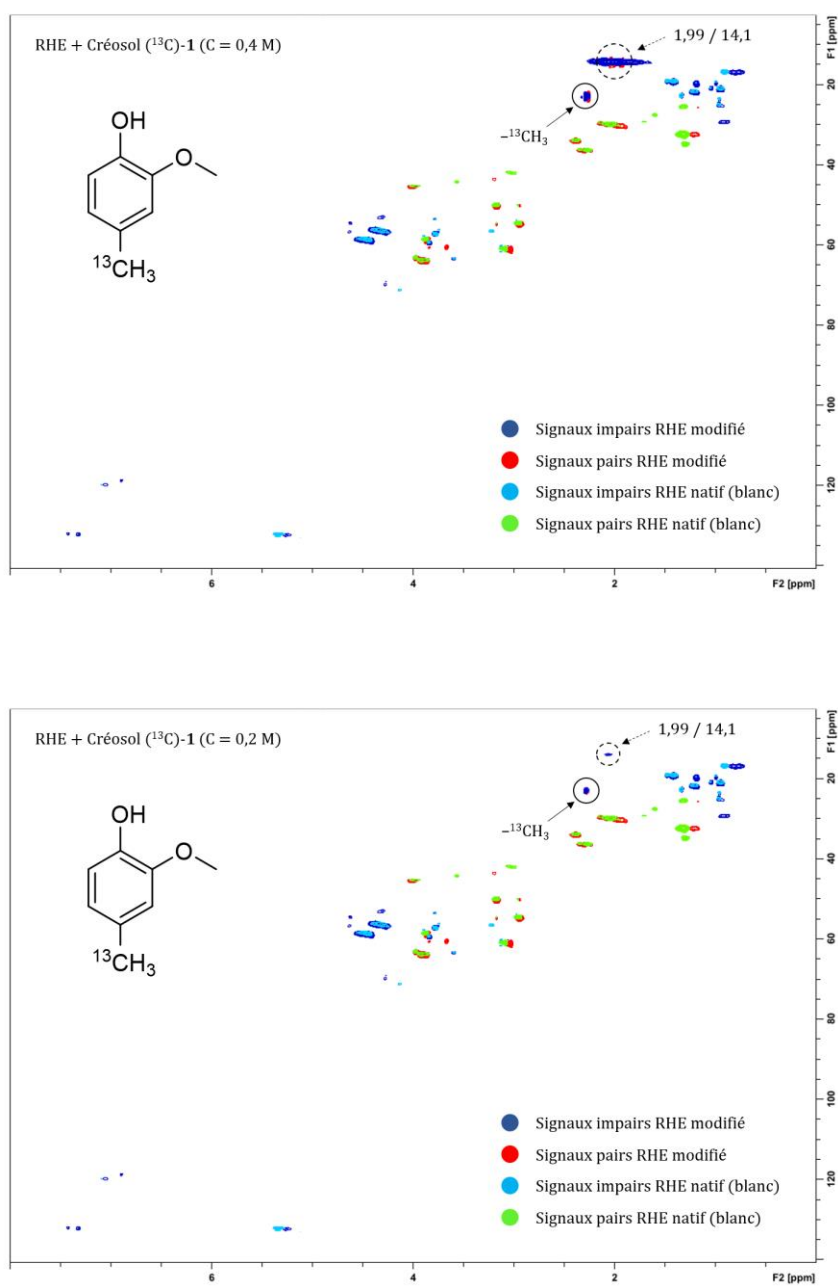


Figure 50. Spectres HSQC édités des épidermes à 24 heures d'incubation pour des concentrations de 0,4 M (haut) et 0,2 M (bas)

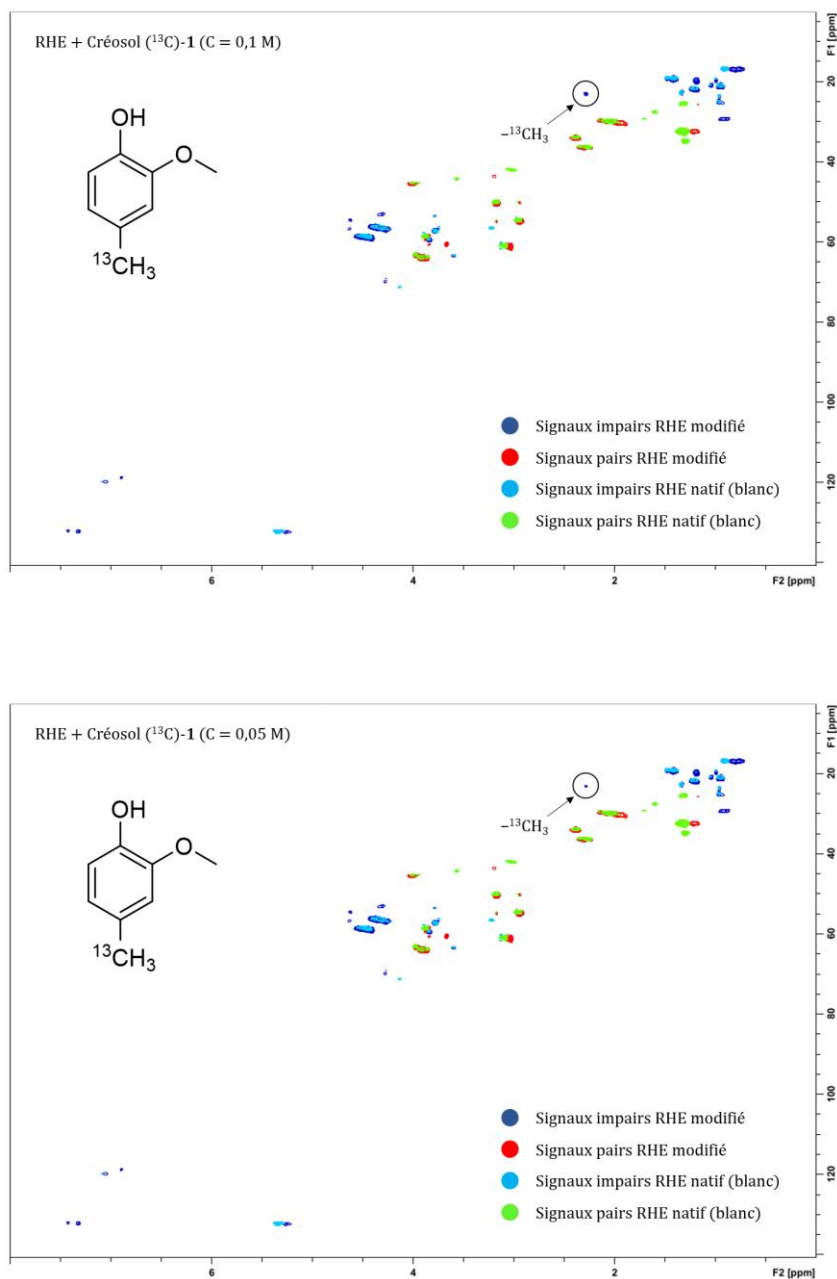


Figure 51. Spectres HSQC édités des épidermes à 24 heures d'incubation pour des concentrations de 0,1 M (haut) et 0,05 M (bas)

Comparativement au spectre HSQC de l'épiderme traité par le (^{13}C)-crésol dans l'acétone à une concentration de 0,4 M, le spectre HSQC 0,2 M montre très clairement une diminution de l'intensité des signaux correspondant au crésol (^{13}C)-1 (δ 2,27/22,6 ppm) et à l'adduit formé (δ 1,99/14,1 ppm). En effet, ce dernier n'est quasiment plus visible. Sur les spectre HSQC 0,1 M et 0,05 M, seule la tache de corrélation du pro-haptène sous sa forme non modifiée est encore faiblement discernable. Le signal de l'adduit formé n'est plus détecté.

En conclusion, si une concentration de 0,2 M permet d'éviter les effets de saturation des signaux en RMN HRMAS, l'intensité des taches obtenues est tout de même relativement faible. Une concentration de 0,4 M semble être le juste milieu entre une non-saturation et une bonne détection des taches de corrélation. Cette concentration sera donc systématiquement utilisée dans nos prochaines études.

II. Le formaldéhyde, premier métabolite du créosol

II.1. Généralités et postulat de départ

Le formaldéhyde étant le premier métabolite issu du métabolisme du créosol dans les épidermes reconstruits, nous nous sommes intéressés à son devenir dans le modèle RHE.

Le formaldéhyde est un composé chimique très utilisé en raison de ses propriétés bactéricides et fongicides.^[249] Il est présent dans des applications de type médical, alimentaire et dans des agents nettoyants. Le formaldéhyde trouve sa place dans une large gamme de produits cosmétiques en tant qu'agent conservateur. Il est notamment retrouvé dans les « libérateurs de formaldéhyde », des ingrédients qui libèrent de façon lente de petites quantités de formaldéhyde.^[250] Le formaldéhyde est également présent dans divers produits de la vie quotidienne (tabac, meubles, matériaux de construction, adhésifs, tapis, peintures, désinfectants). En conséquent, les sources d'exposition au formaldéhyde sont multiples. Pourtant, au niveau cutané, le formaldéhyde possède un pouvoir irritant élevé.^[251] D'après le test du LLNA, c'est un allergène puissant.^[203]

Le formaldéhyde est assez rapidement dégradé par l'organisme en s'associant avec le glutathion.^[252,253] Le S-hydroxyméthylglutathion ainsi formé est oxydé en S-formylglutathion sous l'action d'une alcool déshydrogénase (ADH), la S-hydroxyméthylglutathion déshydrogénase (EC 1.1.1.284). Le S-formylglutathion est ensuite transformé par une hydrolase, la S-formylglutathion hydrolase (EC 3.1.2.12), en formiate pouvant être éliminé par voie urinaire. Au moyen d'une formiate déshydrogénase (FDH), le formiate peut également être transformé en dioxyde de carbone éliminable par voie respiratoire. La formiate déshydrogénase mise en jeu est NAD⁺- (EC 1.2.1.2) ou cytochrome-dépendante (EC 1.2.2.1). La prise en charge du formaldéhyde par une aldéhyde déshydrogénase (ALDH), la formaldéhyde déshydrogénase (EC 1.2.1.46), conduisant directement à la formation de formiate peut également être envisagée. (**Figure 52**).

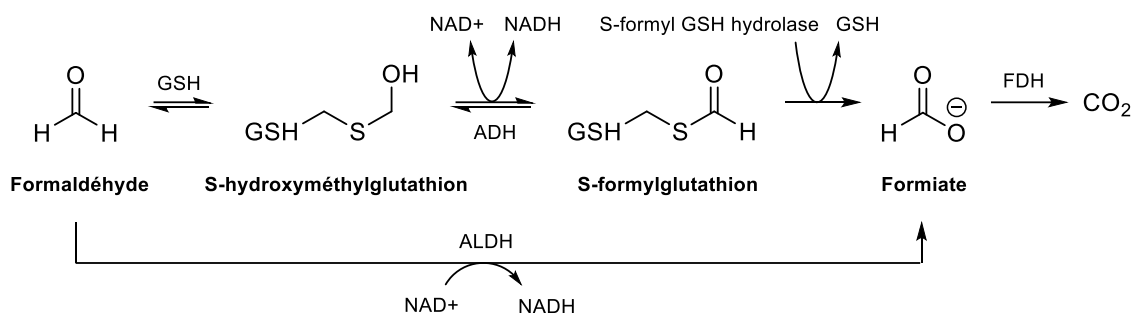


Figure 52. Voie de métabolisation *in vivo* du formaldéhyde

La toxicité du formaldéhyde est due à sa forte réactivité vis-à-vis des amines (primaires et secondaires), des thiols et des alcools présents dans la structure des protéines.^[254] Cette réactivité conduit la formation de dérivés N-, S- et O-méthylols (**Figure 53**).^[255]

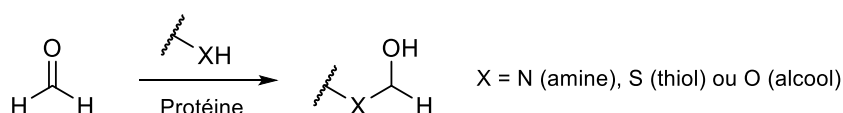


Figure 53. Formation de dérivés N-, S- et O- méthylols

Cependant, puisque le formaldéhyde est très rapidement métabolisé par l'organisme (moins d'une minute pour des analyses de plasma sanguin faites chez le rat),^[256] il semblerait que la contribution de ses métabolites à sa toxicité ne soit pas négligeable.^[257]

L'application de formaldéhyde sur le modèle RHE permettra le cas échéant d'observer, par RMN HRMAS, sa métabolisation et sa réactivité vis-à-vis des protéines épidermiques conduisant à la formation d'un ou plusieurs adduit(s) pouvant être à l'origine de sa toxicité.

II.2. Application en série substituée au carbone 13 sur le modèle RHE

II.2.A. Application sur le modèle RHE et observations

Du (^{13}C)-formaldéhyde commercial, nommé pour le besoin (^{13}C)- **9**, a été appliqué sur 2 échantillons d'épidermes humains reconstruits respectivement incubés 1 heure et 24 heures.

Conformément au protocole expérimental, un échantillon blanc, non traité, a également été préparé. Les trois échantillons d'épiderme reconstruit ont été préparés puis analysés par RMN HRMAS au moyen d'expériences 1D ^1H (CPMG) et 2D HSQC ^1H - ^{13}C édités. Le spectre HSQC de l'échantillon à 24 h (superposé au spectre de l'échantillon blanc) est présenté ci-dessous (**Figure 54**).

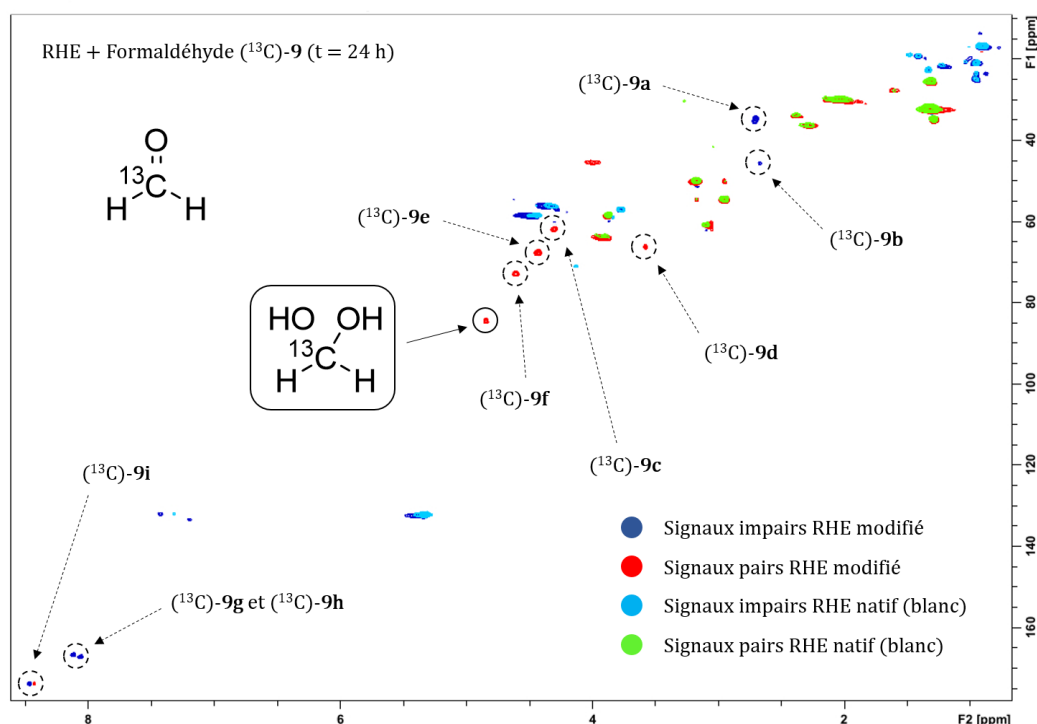


Figure 54. Spectre HSQC édité (superposé au blanc) de l'épiderme 24 h traité par (^{13}C)-19
Corrélations molécule de départ : cercles et flèches pleines ($\rightarrow \odot$) ; nouvelles corrélations : cercles et flèches en pointillés ($\rightarrow \odot$) ; les déplacements chimiques $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ des nouvelles corrélations sont exprimés en ppm

Si à 1 heure la tache de corrélation correspondant au méthanediol (δ 4,83/84,3 ppm) est bien présente, après 24 heures elle a nettement diminué au profit de nombreuses autres taches de corrélation. Les déplacements chimiques des nouvelles taches de corrélation, ainsi que la (les) structure(s) proposée(s) pour chacune d'entre elles sont référencés dans le tableau qui suit (**Tableau 10**). L'attribution des taches de corrélation est basée sur de précédentes études réalisées au laboratoire dans lesquelles la réactivité en solution du (^{13}C)-formaldéhyde vis-à-vis d'acides aminés a été suivie par RMN du carbone 13.^[258]

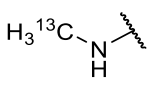
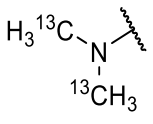
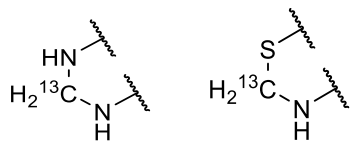
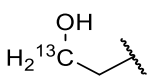
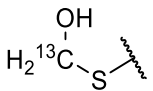
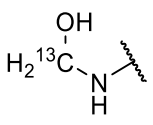
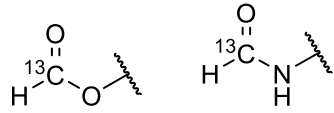
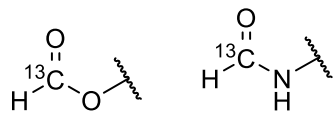
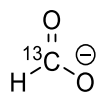
	δ (ppm) ^{13}C	δ (ppm) ^1H	Structures proposées
$(^{13}\text{C})\text{-9a}$	2,69 ($^{-13}\text{CH}_3$)	34,6 ($^{-13}\text{CH}_3$)	
$(^{13}\text{C})\text{-9b}$	2,61 ($^{-13}\text{CH}_3$)	45,4 ($^{-13}\text{CH}_3$)	
$(^{13}\text{C})\text{-9c}$	4,28 ($^{-13}\text{CH}_2\text{-}$)	61,6 ($^{-13}\text{CH}_2\text{-}$)	
$(^{13}\text{C})\text{-9d}$	3,55 ($^{-13}\text{CH}_2\text{-}$)	65,9 ($^{-13}\text{CH}_2\text{-}$)	
$(^{13}\text{C})\text{-9e}$	4,40 ($^{-13}\text{CH}_2\text{-}$)	67,4 ($^{-13}\text{CH}_2\text{-}$)	
$(^{13}\text{C})\text{-9f}$	4,59 ($^{-13}\text{CH}_2\text{-}$)	72,5 ($^{-13}\text{CH}_2\text{-}$)	
$(^{13}\text{C})\text{-9g}$	8,10 ($^{-13}\text{CH-}$)	166,3 ($^{-13}\text{CH-}$)	
$(^{13}\text{C})\text{-9h}$	8,04 ($^{-13}\text{CH-}$)	166,9 ($^{-13}\text{CH-}$)	
$(^{13}\text{C})\text{-9i}$	8,44 ($^{-13}\text{CH-}$)	173,4 ($^{-13}\text{CH-}$)	

Tableau 10. Formaldéhyde ($^{13}\text{C})\text{-9}$ sur le modèle RHE : déplacements chimiques des taches de corrélation observées et structures proposées

III.2.B. Métabolisation et réactivité au sein du modèle RHE

La formation des adduits observés est illustrée dans la figure qui suit (**Figure 55**).

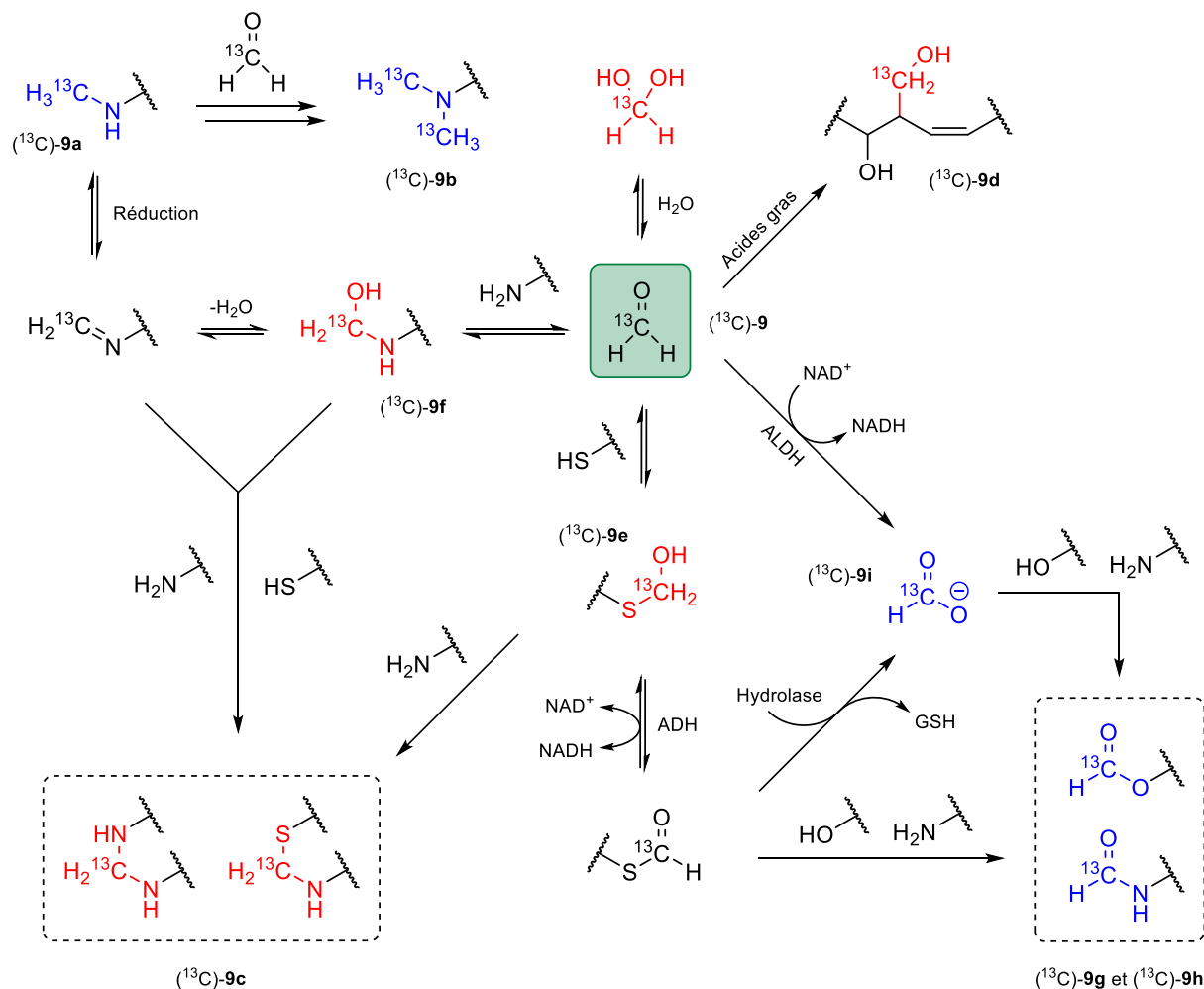


Figure 55. Modèle RHE : métabolisation et réactivité du formaldéhyde (^{13}C)-19

Les adduits pairs ($-\text{CH}_2-$) et impairs ($-\text{CH-/-CH}_3$) observés sont représentés en couleur

Au sein du modèle RHE, le formaldéhyde $9\text{-}(^{13}\text{C})$ est métabolisé sous la forme de formiate (^{13}C)-9i. Compte tenu des informations en notre possession, deux voies d'accès peuvent être proposées. La première passe par la conjugaison du formaldéhyde avec un thiol. L'adduit (^{13}C)-9e semble illustrer cette conjugaison puisqu'il résulte de l'attaque nucléophile d'un résidu thiol sur le (^{13}C)-formaldéhyde. Au moyen d'une alcool déshydrogénase (EC 1.1), le S-hydroxyméthylthiol pourrait être réduit en S-formylthiol, et ce dernier transformé en formiate par une hydrolase (EC 3), en particulier une estérase (EC 3.1) ou thioestérase (EC 3.1.2). Selon la seconde voie, le formiate pourrait être formé par oxydation du formaldéhyde au moyen d'une aldéhyde déshydrogénase (EC 1.2). La prise en charge du

formaldéhyde dans les épidermes reconstruits résulte très certainement de la combinaison de ces deux voies de métabolisation.

La forte réactivité du (^{13}C)-formaldéhyde dans le modèle RHE est illustré par la formation des adduits (^{13}C)-**9a**, (^{13}C)-**9b**, (^{13}C)-**9c**, (^{13}C)-**9d**, et (^{13}C)-**9f**. L'attaque nucléophile d'un résidu aminé conduit à la formation du dérivé méthylol (^{13}C)-**9f**. Ce dernier peut réagir directement, de façon intra- ou intermoléculaire, avec un second résidu nucléophile (amine ou thiol) pour conduire à l'adduit (^{13}C)-**9c**. L'adduit (^{13}C)-**9c** peut également résulter de la réactivité du S-hydroxyméthylglutathion (^{13}C)-**9e** avec une amine.^[259] La déshydratation du dérivé méthylol (^{13}C)-**9f** conduit à la formation d'une imine rapidement réduite en amine (^{13}C)-**9a**. La réactivité de cette amine avec un second équivalent de formaldéhyde (^{13}C)-**9** donne lieu, selon le même processus, à la formation de l'amine tertiaire (^{13}C)-**9b**. L'adduit (^{13}C)-**9d** témoigne quant à lui de la réactivité du formaldéhyde avec les acides gras insaturés.^[260] Les deux adduits (^{13}C)-**9g** et (^{13}C)-**9h** correspondent à la formation d'un ester et d'une amine. Ces derniers sont formés par réaction d'un des métabolites du formaldéhyde avec un alcool ou une amine d'une protéine épidermique via une réaction d'addition-élimination d'un alcool/d'une amine sur le S-formylglutathion ou par une réaction de condensation entre un alcool/une amine et le formiate (**Figure 56**). Les taches de corrélation correspondant aux adduits (^{13}C)-**9g** et (^{13}C)-**9h** étant très proches, il est impossible de les discriminer.

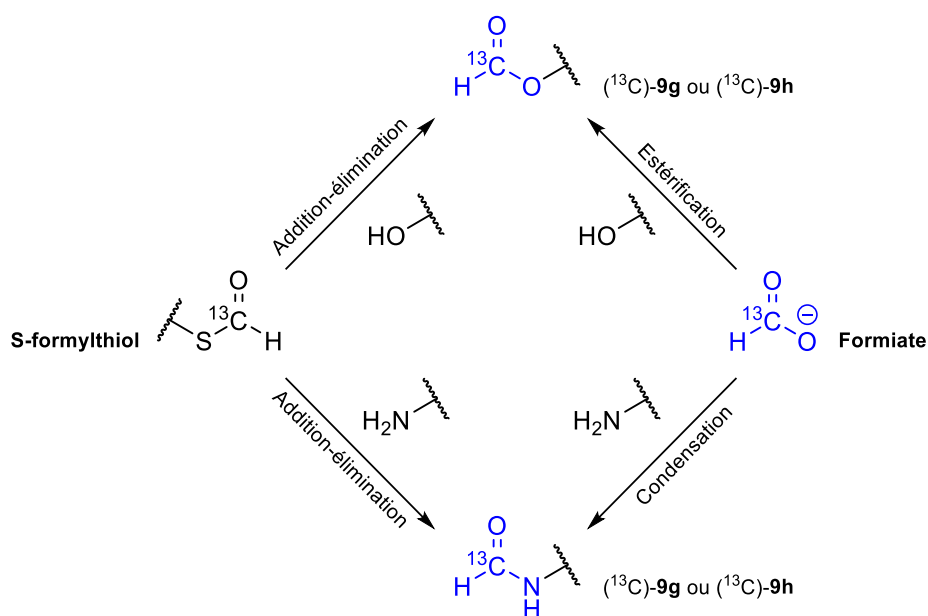


Figure 56. Formation des adduits (^{13}C)-**9g** et (^{13}C)-**9h**

Finalement, l'application du (^{13}C)-formaldéhyde sur les épidermes reconstruits a permis d'observer sa métabolisation en formiate. Si les informations recueillies ne permettent pas de déterminer précisément les enzymes responsables de cette métabolisation, elles viennent tout de même appuyer l'idée que le modèle RHE possède un système enzymatique de métabolisation complet. De nombreux adduits issus de la réactivité des résidus nucléophiles avec le formaldéhyde et ses métabolites ont été détectés et identifiés. Leur formation est très certainement à l'origine du phénomène d'allergie de contact au formaldéhyde chez l'Homme. D'autre part, le formaldéhyde étant libéré en quantité importante lors de la métabolisation du créosol, il est raisonnable de penser que le formaldéhyde libéré peut contribuer de façon non négligeable à la réponse allergique dans le cas d'une exposition au pro-haptène.

III. Conclusion

L'étude des interactions du créosol avec le modèle RHE de SkinEthic® est riche en informations. D'emblée, nous sommes partis du postulat que le créosol est, en accord avec les études menées dans les conditions du PPRA, un bon substrat des peroxydases capables de l'oxyder sous la forme d'une *para*-méthylène quinone réactive. Toutefois, nous n'avons jamais observé d'adduits résultant de l'alkylation de la *para*-méthylène quinone correspondante. Nous avons néanmoins détecté la formation de dimères du créosol qui pourrait résulter d'une étape d'oxydation à un électron. Parallèlement, l'application du créosol en série doublement marquée a clairement montré la formation de méthanediol, le monohydrate du formaldéhyde. Cette observation est capitale puisqu'elle met en évidence que le pro-haptène est généralement métabolisé par les mono-oxygénases à cytochrome P450 (EC 1.14) via une réaction de O-déméthylation. La réaction conduit à la formation d'un catéchol facilement oxydé en orthoquinone réactive. De plus, la détection de méthanediol confirme la présence de cytochromes P450 actifs au sein du modèle RHE à des niveaux d'activité permettant l'activation du pro-haptène.

En tant que premier métabolite du créosol, le formaldéhyde a également été appliqué sur le modèle RHE. Les résultats montrent que le formaldéhyde est métabolisé *in situ* en formiate. Si les voies métaboliques qui mènent au formiate n'ont pas pu être clairement définies, nos résultats montrent que le formaldéhyde se conjugue avec un thiol avant d'être oxydé, par une alcool déshydrogénase (EC 1.1), puis hydrolysé, au moyen d'une hydrolase (EC 3.1), en formiate. Compte tenu de la forte réactivité du formaldéhyde et de ses métabolites au sein des épidermes reconstruits, il convient de garder à l'esprit que sa contribution dans le phénomène d'allergie de contact au créosol n'est peut-être pas négligeable.

Chapitre III

Synthèse de dérivés de type *para*-alkylphénol
substitués au carbone 13 et étude de leurs
interactions avec un modèle d'épiderme reconstruit

Chapitre III

Synthèse de dérivés de type *para*-alkylphénol substitués au carbone 13 et étude de leurs interactions avec un modèle d'épiderme humain reconstruit

Dans ce troisième chapitre de thèse est décrite l'étude des interactions de l'eugénol et de l'isoeugénol, deux dérivés de type *para*-alkylphénol, avec le modèle RHE de SkinEthic®. Structuralement, l'eugénol et l'isoeugénol sont des isomères. Pourtant, si le premier est un pro-haptène classé comme un allergène faible, le second est un pré-haptène qui possède un pouvoir sensibilisant modéré. L'origine de cette disparité est probablement liée à leur comportement respectif au sein de l'épiderme. L'eugénol et l'isoeugénol sont des analogues du créosol et se présentent comme de bons substrats des peroxydases. Cependant, à l'instar du créosol, une prise en charge par les mono-oxygénases à cytochrome P450 peut également être envisagée.

I. L'eugénol,

comportement *in situ* identique à celui du créosol ?

I.1. Généralités et postulat de départ

L'eugénol est un composé naturel présent en grande quantité dans le clou de girofle. De par sa forte odeur il fait partie des composés les plus utilisés en parfumerie, en cosmétique ou dans les arômes.^[55] L'eugénol est fréquemment utilisé en odontologie pour ses propriétés analgésiques et antiseptiques. En présence d'oxyde de zinc, il peut être utilisé comme pansement provisoire, destiné à faciliter la cicatrisation d'une dent cariée, ou de pâte pour obturer les racines d'une dent dévitalisée.^[261]

D'après le test du LLNA, l'eugénol est un sensibilisant faible.^[203] D'après celui du DPRA, il se comporte comme un pro-haptène.^[110] En outre, l'eugénol est un constituant du « Fragrance Mix I ». ^[79] Des tests cutanés réalisés au département de dermatologie de Modène en Italie ont montré que 1,3 % des 1754 patients testés déclenchait une réponse positive à l'eugénol.^[262]

Le créosol est un modèle simplifié de l'eugénol. D'un point de vue du métabolisme, les modes de prise en charge envisagés pour le créosol sont naturellement applicables à l'eugénol. En tant que dérivé

de type *para*-alkylphénol, l'eugénol **10** peut subir, sous l'action d'une peroxydase (EC 1.11), une double oxydation à un électron conduisant à la formation d'une *para*-méthylène quinone (**Figure 1**).^[263]

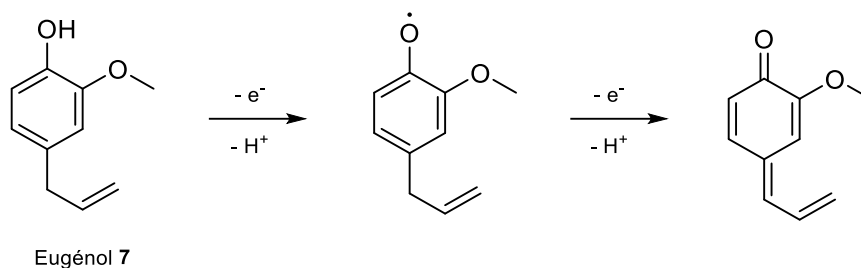


Figure 1. Mécanisme d'oxydation de l'eugénol **10** en *para*-méthylène quinone

La *para*-méthylène quinone ainsi formée est essentiellement réactive au niveau de sa chaîne latérale.^[264] Elle est sujette aux additions nucléophiles de type 1,6 et 1,8 (**Figure 2**). L'addition 1,6 conduit à la formation du produit cinétique ; celle de type 1,8 au produit thermodynamique.

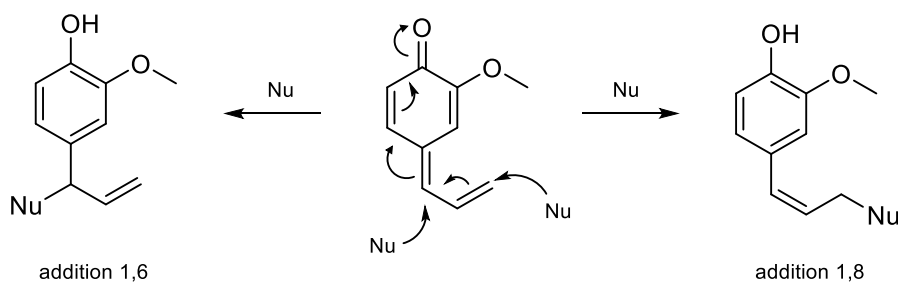


Figure 2. Additions nucléophiles 1,6 et 1,8 sur la chaîne latérale de la *para*-méthylène quinone

Récemment, des études menées au laboratoire se sont intéressées à la réactivité de l'eugénol dans les conditions du PPRA.^[265] L'eugénol, dont la position terminale de chaîne latérale est substituée au carbone 13, est oxydé par le système HRP/P avant d'être mis en réaction avec le peptide lysine, le peptide cystéine ou le glutathion. La caractérisation des adduits formés par spectrométrie RMN a montré que la réactivité a essentiellement lieu sur le carbone anciennement benzylique. Les additions nucléophiles de type 1,6 sont donc favorisées (**Figure 3**).

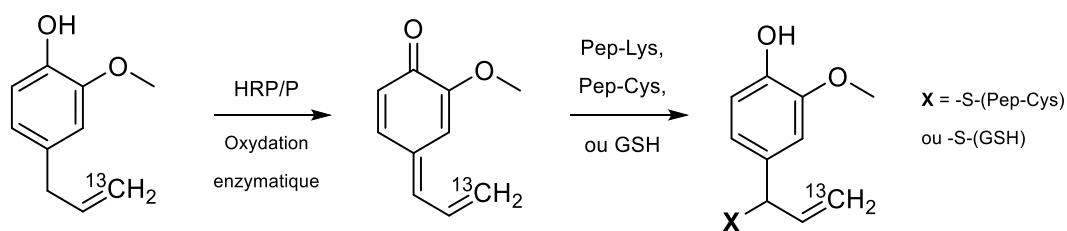


Figure 3. Réactivité du (^{13}C)-eugénol dans les conditions du PPRA^[265]

Aucune réactivité n'a été observée avec le peptide lysine

En conduisant dans les années 90 des études sur le safrole, Bolton *et al.* avaient également observé que l'attaque 1,6 était plus favorisée que l'attaque 1,8.^[226] Une des explications fournies consiste à dire qu'une charge partielle sur le carbone benzylique secondaire est plus favorisée qu'une charge partielle sur le carbone allylique primaire (**Figure 4**).^[266]

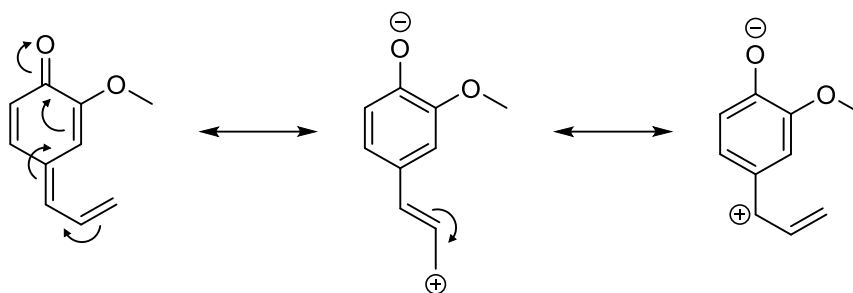


Figure 4. Délocalisation des électrons dans la *para*-méthylène quinone

A l'instar du créosol, l'eugénol peut également être pris en charge par les mono-oxygénases à cytochrome P450 (EC 1.14). Cette voie de métabolisation fut proposée pour l'eugénol en 1992 par Barratt et Basketter pour expliquer le fait que l'eugénol soit moins sensibilisant que l'isoeugénol.^[267] En 1997, les travaux de Bertrand *et al.* sont venus appuyer cette hypothèse mécanistique. Après avoir testé des dérivés de l'eugénol dans le test du LLNA, les auteurs ont suggéré que l'eugénol serait susceptible de subir une O-déméthylation enzymatique suivie d'une oxydation, également par voie enzymatique, conduisant à la formation d'une orthoquinone réactive.^[268] L'orthoquinone formée serait alors susceptible de se réarranger en une *para*-méthylène quinone encore plus réactive (**Figure 5**).^[226]

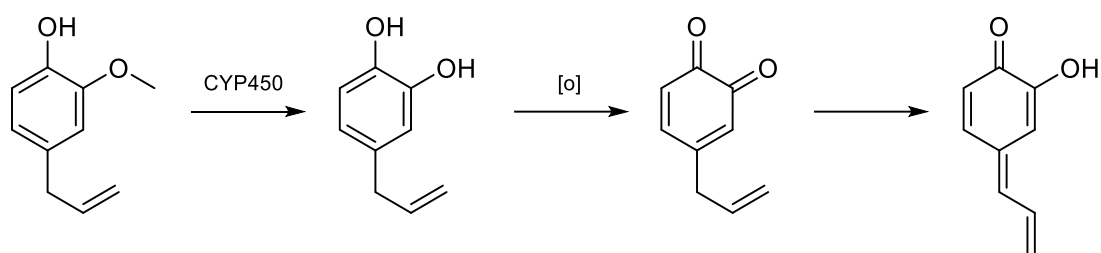


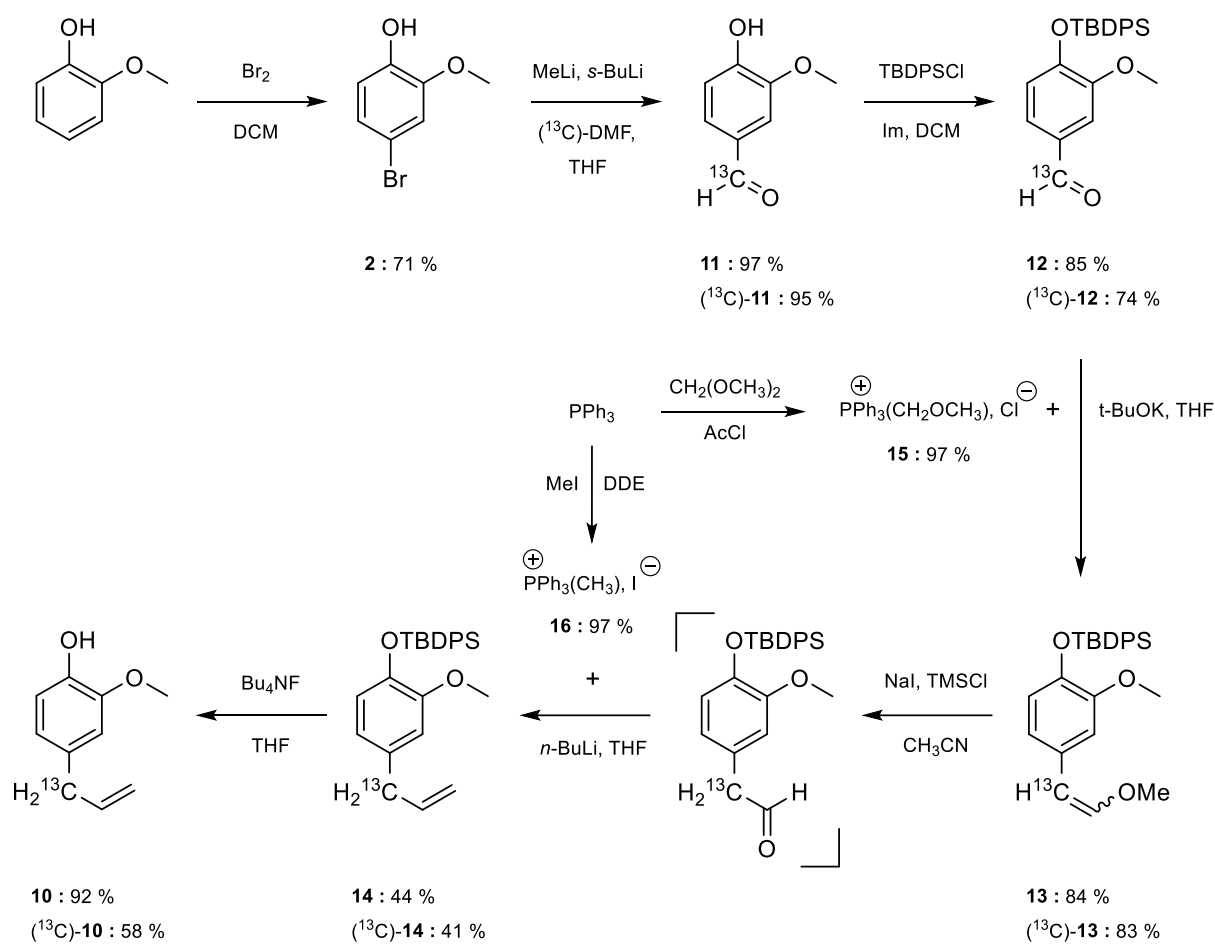
Figure 5. Voie possible pour la métabolisation de l'eugénol : prise en charge par les CYP450

En définitive, deux voies de métabolisation sont à envisager pour l'eugénol. La première passe par l'activation du pro-haptène sous la forme d'une *para*-méthylène quinone au moyen d'une oxydation. La seconde propose une prise en charge par les mono-oxygénases à CYP450. Le catéchol ainsi obtenu pourrait être oxydé en orthoquinone réactive capable de se réarranger en *para*-méthylène quinone, ou d'être directement alkylée.

I.2. Synthèse en série substituée au carbone 13 et application sur le modèle RHE

I.2.A. Synthèse de l'eugénol substitué au carbone 13

Dans le but d'étudier par RMN HRMAS la réactivité de l'eugénol sur le modèle RHE, le pro-haptène a été synthétisé en prenant soin d'introduire sélectivement et stratégiquement un carbone 13 sur une position réactive prédéfinie. Pour tester l'hypothèse d'une prise en charge par les peroxydases, nous avons synthétisé l'eugénol (^{13}C)-**10** en substituant au carbone 13 la position benzylique (**Figure 6**). En effet, d'après la littérature et les travaux réalisés au laboratoire, la *para*-méthylène quinone intermédiaire serait préférentiellement sujette aux attaques nucléophiles 1,6.

Figure 6. Synthèse de l'eugénol (^{13}C)-10

La synthèse du (^{13}C)-eugénol est réalisée en sept étapes à partir du 2-méthoxyphénol commercial. Une première étape de bromation permet l'obtention du bromophénol **2**. Un échange halogène-métal à l'aide de *n*-butyllithium suivi d'une formylation avec du formaldéhyde- ^{13}C permet l'introduction, avec un très bon rendement, du carbone benzylique substitué au carbone 13. L'aldéhyde phénolique **11** obtenu est protégé sous la forme d'un éther silylé **12** au moyen de *tert*-butyldiphénylsilyle et d'imidazole. Le composé **12** est engagé dans une première réaction de Wittig réalisée en présence du sel d'alkyltriphenylphosphonium **15**, lui-même obtenu à partir de triphénylphosphine. Cette réaction conduit à la formation de l'éther d'énol **13** sous la forme d'un mélange de deux diastéréoisomères (E/Z, 58:42) avec un rendement supérieur à 80 %. L'éther d'énol **13** est ensuite déprotégé selon la méthode décrite par Kamal *et al.*, par du iodure de triméthylsilyle généré *in situ*.^[269] L'aldéhyde obtenu étant très difficile à purifier, il est engagé en l'état dans une seconde réaction de Wittig. Cette dernière est menée en présence du sel de phosphonium **16** préalablement préparé au moyen de triphénylphosphine et d'iodométhane et conduit à la formation de l'allyle **14**. Finalement, l'eugénol (^{13}C)-**10** est obtenu par déprotection de l'éther silylé en présence de TBAF.

1.2.B. Application sur le modèle RHE et premières observations

L'eugénol (^{13}C)-**10** a été appliqué sur 3 échantillons d'épidermes humains reconstruits. Les temps d'incubation choisis sont listés ci-après :

- 1 heure
- 8 heures
- 24 heures

Conformément au protocole expérimental, un échantillon blanc non traité par l'eugénol (^{13}C)-**10** a aussi été préparé. Les échantillons d'épiderme reconstruit ont ensuite été analysés par RMN HRMAS au moyen d'expériences 1D ^1H (CPMG) et 2D HSQC ^1H - ^{13}C édités. Le spectre 1D de l'échantillon blanc et ceux des échantillons traités par le (^{13}C)-eugénol pour des temps d'incubation de 1 heure et 24 heures sont présentés ci-après. Les spectres présentés ont été enregistrés avant les expériences 2D (**Figure 7**).

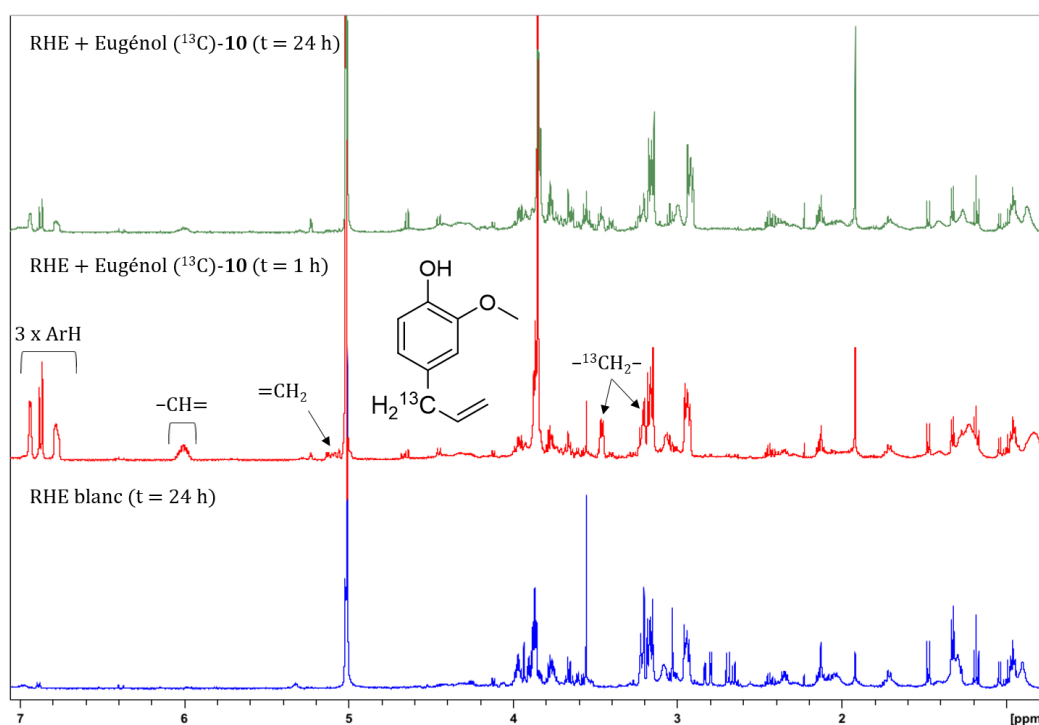


Figure 7. Superposition des spectres 1D CPMG de l'échantillon RHE blanc (bleu) et des échantillons RHE traités par l'eugénol (^{13}C)-**10** à 1 h (rouge) et 24 h (vert)

Le profil métabolique de l'échantillon blanc (en bleu) et celui des échantillons traités par l'eugénol (^{13}C)-**10** sont quasi-identiques. Seule différence notable, nous remarquons, au cours du temps, et en présence du pro-haptène, une forte diminution du signal correspondant à la glycine (δ 3,56 ppm, singulet). L'origine de cette diminution reste pour l'heure inconnue. Sinon, tous les signaux des protons appartenant à l'eugénol (^{13}C)-**10** sont visibles sur le spectre CPMG de l'échantillon traité à 1 h (rouge). Après 24 h d'incubation, s'ils sont encore présents, leur intensité a nettement diminué (vert). Cette évolution souligne une prise en charge, du moins partielle, du (^{13}C)-eugénol par le modèle RHE.

Les superpositions des spectres issus des expériences 2D des échantillons 1 h et 24 h avec celui de l'échantillon blanc sont présentés ci-après (**Figure 8**).

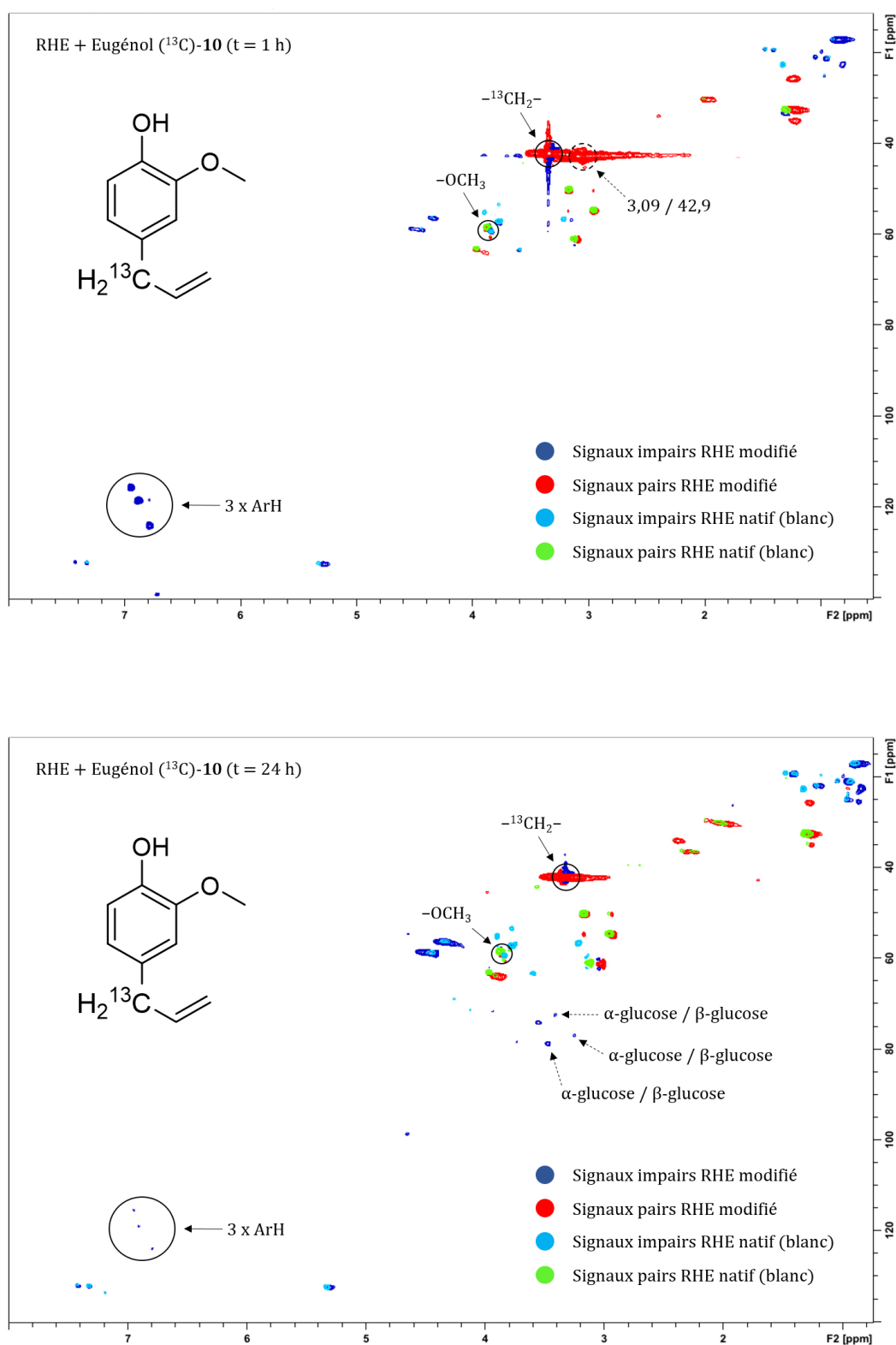


Figure 8. Spectres HSQC édités (superposés au blanc) des épidermes 1 h (haut) et 24 h (bas) traités par (^{13}C)-10

Corrélations molécule de départ : cercles et flèches pleines ($\rightarrow \odot$) ; nouvelles corrélations : cercles et flèches en pointillés ($\rightarrow \odot$) ; les déplacements chimiques $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ des nouvelles corrélations sont exprimés en ppm

Après 1 heure d'incubation, tous les signaux correspondant au (^{13}C)-eugénol de départ ne sont pas présents sur le spectre 2D HSQC édité. Alors que la corrélation du carbone substitué ($^{-13}\text{CH}_2-$, δ 3,34/42,2 ppm), celle du groupement méthoxy ($-\text{OCH}_3$, δ 3,85/59,0 ppm) et celles des protons et carbones aromatiques ($\text{Ar}-\text{H}$) sont clairement identifiables, les corrélations correspondantes aux protons et carbones allyliques de la chaîne latérale ($-\text{CH}=\text{CH}_2$) ne sont pas visibles. Les corrélations observées à 1 h le sont encore au bout de 24 h. Cependant, leur intensité a nettement diminué. Cette constatation est en accord avec les spectres 1D CPMG : l'eugénol est pris en charge, du moins partiellement, par les épidermes reconstruits.

A 1 h, nous constatons l'apparition d'une nouvelle tache de corrélation paire à 3,09/42,9 ppm. Au vu de sa parité et de la région spectrale dans laquelle elle se situe, nous avons attribué cette corrélation à un carbone benzylique $\text{Ph}-^{13}\text{CH}_2-\text{R}$, où « Ph » est un groupement phényle et « R » une chaîne latérale potentiellement substituée. Entre 1 h et 24 h, le système a évolué puisque cette tache de corrélation paire n'est plus présente. Elle témoigne donc de la formation d'une espèce intermédiaire. A 24 h, trois nouvelles corrélations impaires apparaissent. D'après les tables de déplacements chimiques, elles correspondent à la formation de glucose (α - et β -glucose). L'origine de cette apparition reste encore inconnue.

En l'absence de nouvelles taches de corrélation impaire pouvant être attribuées au carbone substitué au carbone 13, nous pouvons estimer que l'hypothèse mécanistique selon laquelle l'eugénol (^{13}C)-**10** serait oxydé sous la forme d'une *para*-méthylène quinone réactive ne s'applique pas au modèle RHE (**Figure 9**).

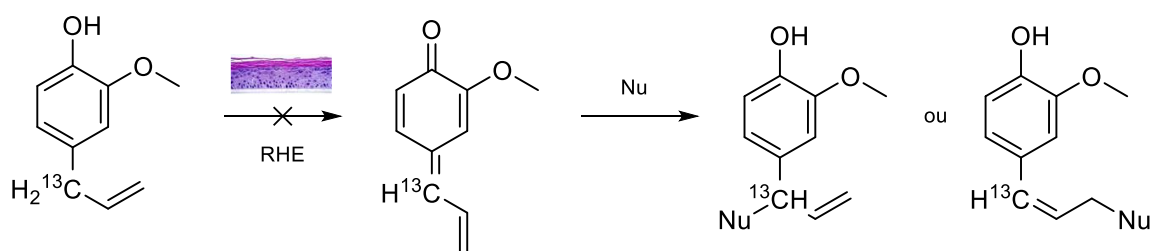


Figure 9. Modèle RHE : l'eugénol (^{13}C)-**10** n'est pas pris en charge sous la forme d'une *para*-méthylène quinone

1.2.C. Hypothèse de travail : prise en charge par une mono-oxygénase à CYP450

L'ensemble des observations faites suite à l'application de l'eugénol (^{13}C)-**10** sur le modèle RHE nous laissent penser que la voie de métabolisation de l'eugénol suivrait celle du créosol. Ainsi l'eugénol pourrait subir une réaction de O-déméthylation (hydroxylation suivie d'une hydrolyse) réalisée par

une mono-oxygénase à CYP450. Cette réaction engendrerait, comme discuté dans le cas du créosol, la libération de formaldéhyde. Le catéchol obtenu serait ensuite oxydé par voie enzymatique (par une peroxydase ou une tyrosinase) ou non (par le dioxygène), et la 4-allyl-orthoquinone résultante, en équilibre avec sa forme *para*-méthylène quinone, alkylée par un ou plusieurs résidus nucléophiles des protéines épidermiques (**Figure 10**). La forme orthoquinone est plus à même de subir une attaque nucléophile sur le cycle que la forme *para*-méthylène quinone qui est généralement sujette aux additions nucléophiles 1,6 voire 1,8 via sa chaîne latérale.

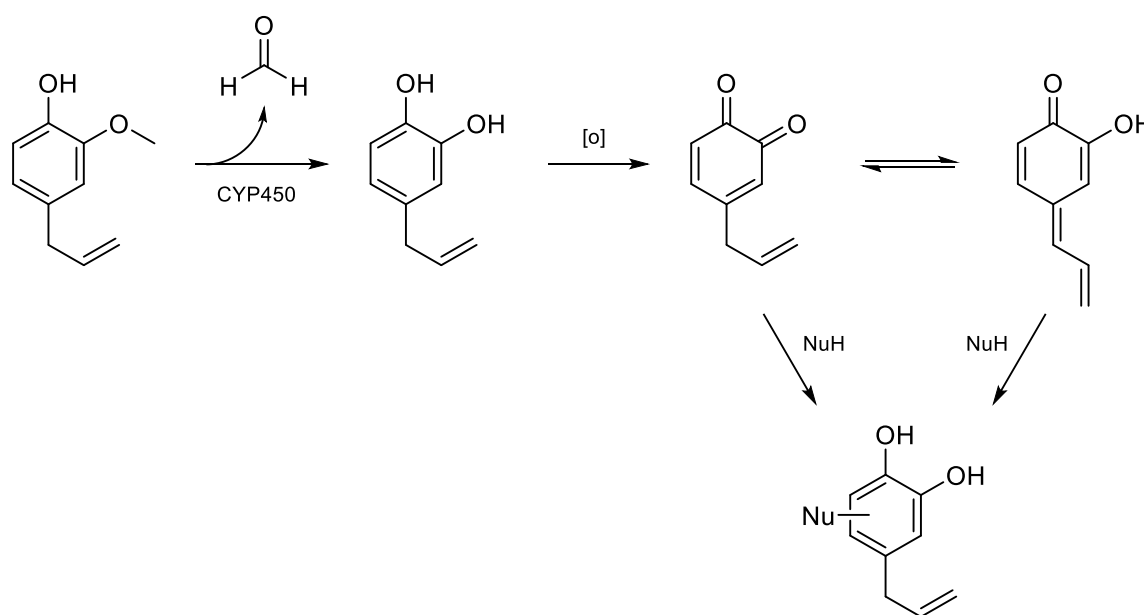


Figure 10. Hypothèse mécanistique : prise en charge de l'eugénol (^{13}C)-**10** par les mono-oxygénases à CYP450 suivie d'une addition nucléophile sur le cycle d'une des deux quinones réactives

Cette hypothèse réactionnelle permettrait d'expliquer la nouvelle tache de corrélation (δ 3,09/42,9 ppm) observée à 1 heure. En effet, une substitution nucléophile aromatique permettrait au carbone substitué de conserver sa parité (paire) tout en affectant son déplacement chimique. Compte tenu des observations faites dans le cas du créosol, cette corrélation paire pourrait également appartenir à un dimère de l'eugénol instable au cours du temps.

Dans le but d'explorer cette hypothèse concernant le comportement de l'eugénol (^{13}C)-**10**, deux approches maintenant connues ont été suivies.

D'un côté, l'orthoquinone intermédiaire a été mise en réaction avec des acides aminés et des peptides, en milieu organique puis en milieu aqueux. Par extrapolation, les résultats obtenus par RMN du liquide sont comparés aux observations faites en RMN HRMAS.

D'un autre côté, la position méthoxylique de l'eugénol a été substituée au carbone 13 dans le but d'observer, par RMN HRMAS sur les épidermes humains reconstruits, l'éventuelle formation de méthanediol (monohydrate du formaldéhyde).

Les deux approches sont présentées dans les pages qui suivent. Nous commencerons par présenter les études consacrées à la réactivité de l'orthoquinone intermédiaire. Suivrons les études sur les épidermes reconstruits de l'eugénol doublement substitué au carbone 13.

I.3. 4-allyl-orthoquinone intermédiaire : synthèse et réactivité avec des acides aminés et des peptides

La 4-allyl-orthoquinone a été synthétisée en série substituée au carbone 13 avant d'être mise en réaction, en solution, avec différents acides aminés et modèles de peptides. Les réactions ont été suivies par spectroscopie RMN en phase liquide puis analysées par spectrométrie de masse.

I.3.A. Synthèse et oxydation chimique du (^{13}C)-4-allylcatéchol

La (^{13}C)-4-allyl-orthoquinone est obtenue par oxydation chimique du (^{13}C)-4-allylcatéchol, lui-même synthétisé à partir de l'eugénol (^{13}C)-10 (Figure 11).

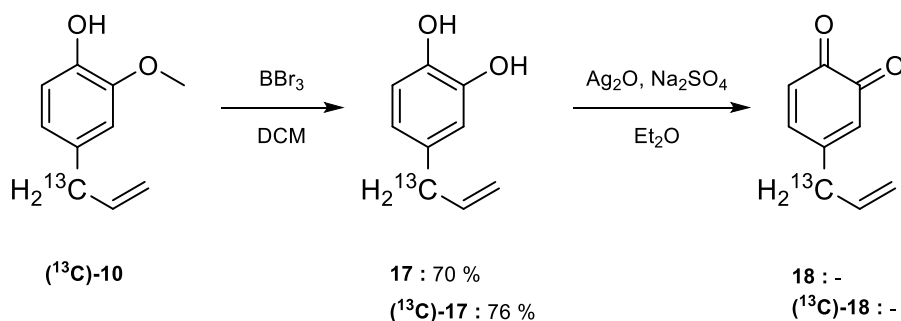


Figure 11. Synthèse de l'orthoquinone (^{13}C)-18

Une réaction de O-déméthylation réalisée sur l'eugénol (^{13}C)-**10** en présence de tribromure de bore donne lieu à la formation du 4-allylcatéchol (^{13}C)-**17**. La 4-allyl-orthoquinone (^{13}C)-**18** est obtenue par oxydation chimique du catéchol (^{13}C)-**17** au moyen d'hydroxyde d'argent. L'orthoquinone (^{13}C)-**18** étant relativement instable en solution, elle sera rapidement utilisée telle quelle, sans purification supplémentaire.

1.3.B. Réactivité en milieu organique

Les tests de réactivité entre l'orthoquinone (^{13}C)-**18** et les acides aminés ont d'abord été menés en milieu organique dans le DMSO. Dans la pratique, le catéchol (^{13}C)-**17** est rapidement oxydé en orthoquinone (^{13}C)-**18**. Son comportement en solution (tube témoin), ainsi que sa réactivité vis-à-vis d'acides aminés, sont suivis quotidiennement par RMN du liquide. Passé un délai d'une semaine, les échantillons sont analysés par LC-MS.

Les acides aminés employés pour les études de réactivité sont au nombre de sept (**Figure 12**). Peu réactifs lors des réactions menées en solution avec l'orthoquinone (^{13}C)-**6**, l'asparagine et le tryptophane n'ont pas été retenus.

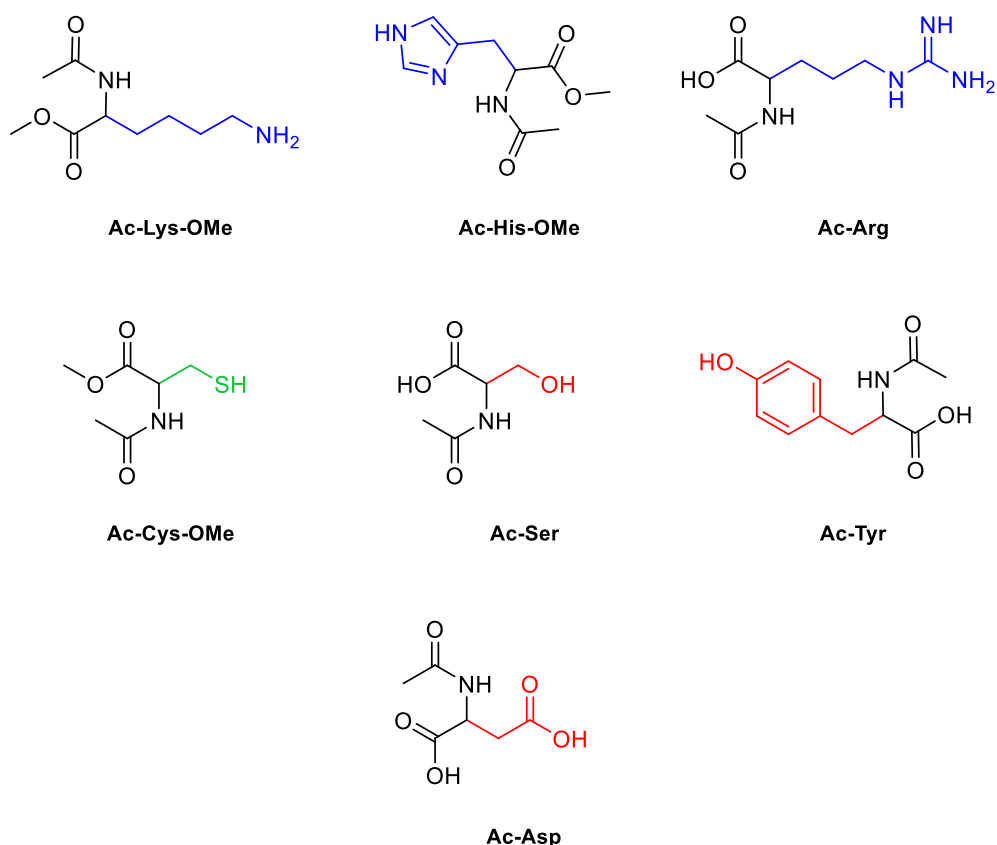


Figure 12. Les sept acides aminés utilisés dans les études de réactivité en solution possédant chacun un résidu nucléophile aminé (bleu), soufré (vert) ou oxygénés (rouge)
 Ac = α -acétyle ; OMe = ester méthylique ; OEt = ester éthylique ; Lys = Lysine ; His = Histidine ;
 Arg = Arginine ; Cys = Cystéine ; Ser = Sérine ; Asp = Acide aspartique ; Tyr = Tyrosine

Parmi les sept acides aminés sélectionnés, cinq présentent une réactivité significative envers l'orthoquinone (^{13}C)-**18** en milieu organique. Il s'agit de la lysine, de l'histidine, de la cystéine, de la sérine et de la tyrosine. Les résultats obtenus pour le tube témoin et chacun de ces cinq acides aminés sont présentés ci-après.

Comportement de l'orthoquinone (^{13}C)-**18** en milieu organique (tube témoin)

Dans le DMSO- d_6 , et en l'absence d'acide aminé dans le milieu, l'orthoquinone (^{13}C)-**18** évolue rapidement vers sa forme *para*-méthylène quinone (^{13}C)-**18a**. Les spectres RMN du liquide ^{13}C illustrent ce réarrangement quasi-instantané (**Figure 13**).

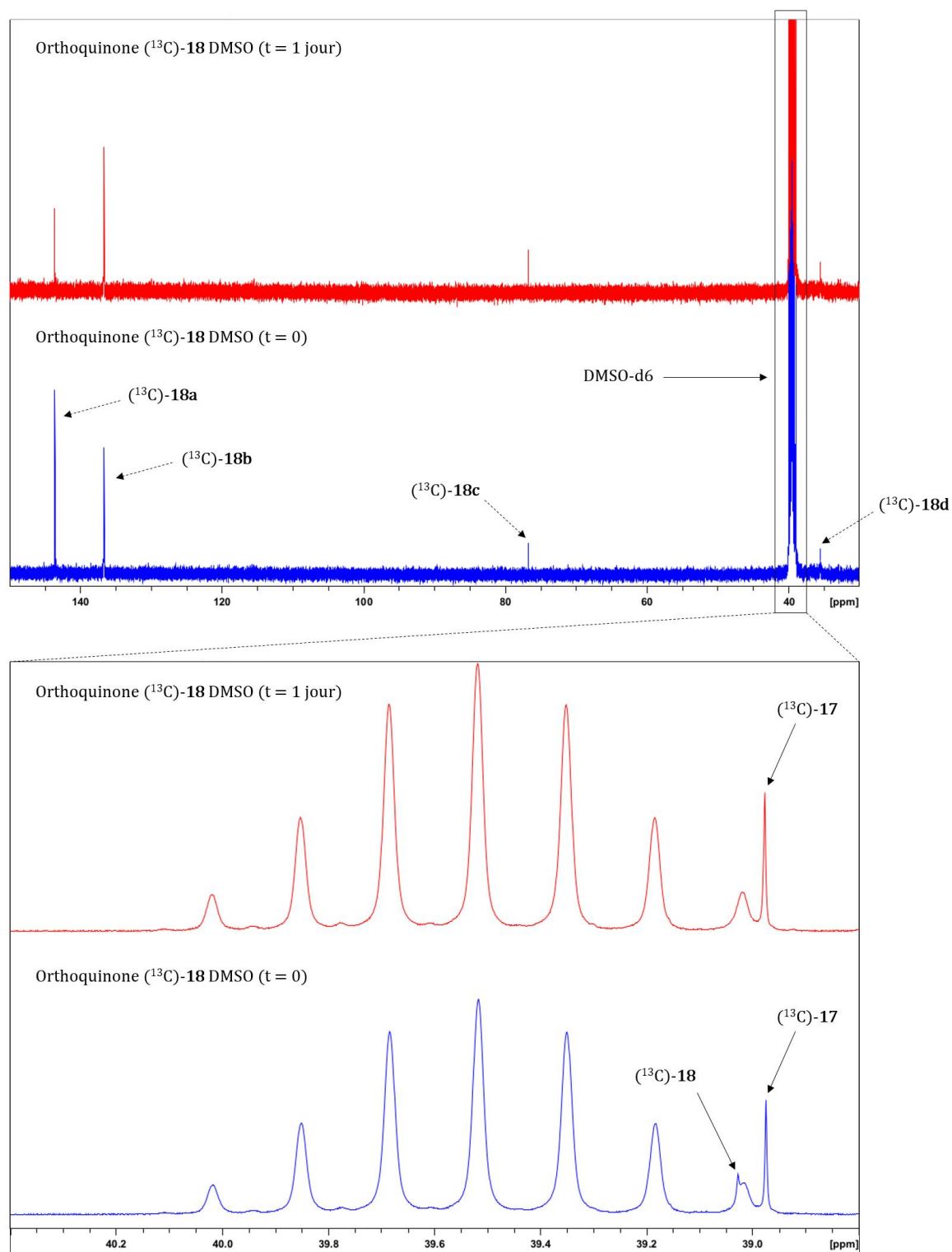


Figure 13. Comportement de l'orthoquinone (^{13}C)-18 dans le DMSO : superposition de spectres

Au temps initial ($t = 0$), l'orthoquinone (^{13}C)-**18** (forme oxydée, $\delta -^{13}\text{CH}_2- = 39,0$ ppm) n'est quasiment plus présente dans le milieu. Cette disparition rapide est expliquée par sa réduction en catéchol (^{13}C)-**17** (forme réduite, $\delta -^{13}\text{CH}_2- = 38,9$ ppm), et par son réarrangement en *para*-méthylène quinone (^{13}C)-**18a** ($\delta -^{13}\text{CH}- = 143,7$ ppm). Trois autres signaux correspondant à la formation de trois autres nouveaux composés (^{13}C)-**18b**, (^{13}C)-**18c** et (^{13}C)-**18d** sont également apparus. Après un jour, le signal de l'orthoquinone (^{13}C)-**18** a complètement disparu. S'il est encore bien présent, celui correspondant à la *para*-méthylène quinone (^{13}C)-**18a** tend à diminuer au profit de celui des composés (^{13}C)-**18b**, (^{13}C)-**18c** et (^{13}C)-**18d**. A partir de cet instant, et jusqu'à sept jours, le système évoluera dans ce sens, c'est-à-dire vers la formation des composés (^{13}C)-**18b**, (^{13}C)-**18c** et (^{13}C)-**18d**.

La *para*-méthylène quinone (^{13}C)-**18a** ainsi que les composés (^{13}C)-**18b**, (^{13}C)-**18c** et (^{13}C)-**18d** ont été caractérisés à l'aide d'expériences bidimensionnelles, HSQC ^1H - ^{13}C éditées et HMBC ^1H - ^{13}C (Tableau 1).

	δ (ppm) ^{13}C	δ (ppm) ^1H HSQC	δ (ppm) ^1H HMBC	Structure proposée
(^{13}C)- 18a	143,7 ($-^{13}\text{CH}-$)	6,96 ($-^{13}\text{CH}-$)	6,55 (H_a) 5,72 (H_b) 6,41 (H_c) 7,27 (H_d) 6,75 (H_e)	
(^{13}C)- 18b	136,7 ($-^{13}\text{CH}-$)	6,41 ($-^{13}\text{CH}-$)	5,77 (H_a) 4,63 (H_b) 7,12 (H_c) 6,80 (H_d) 6,72 (H_e)	
(^{13}C)- 18c	76,8 ($-^{13}\text{CH}-$)	5,53 ($-^{13}\text{CH}-$)	5,46 (H_a) 5,17 (H_b) 6,65 (H_c) 6,58 (H_d) 6,68 (H_e)	

	δ (ppm) ^{13}C	δ (ppm) ^1H HSQC	δ (ppm) ^1H HMBC	Structure proposée
$(^{13}\text{C})\text{-18d}$	35,6 ($^{-13}\text{CH}_2\text{-}$)	3,31 ($^{-13}\text{CH}_2\text{-}$)	5,85 (H_a) 5,01 (H_b) 6,68 (H_c) 6,42 (H_d)	

Tableau 1. Déplacements chimiques des composés $(^{13}\text{C})\text{-18a}$, $(^{13}\text{C})\text{-18b}$, $(^{13}\text{C})\text{-18c}$ et $(^{13}\text{C})\text{-18d}$

Les analyses LC-MS ont permis de valider la présence des composés $(^{13}\text{C})\text{-18b}$, $(^{13}\text{C})\text{-18c}$ et $(^{13}\text{C})\text{-18d}$ à travers la détection de plusieurs composés de rapport m/z 166 (en mode négatif). La *para*-méthylène quinone $(^{13}\text{C})\text{-18a}$ n'a malheureusement pas pu être identifiée. Cette dernière, dont la concentration a déjà fortement diminué après une semaine et visiblement peu stable en présence d'eau, a dû rapidement se dégrader dans le solvant utilisé pour l'élution en chromatographie en phase liquide (mélange mélange eau/acétonitrile, 98:2).

La présence d'eau dans le DMSO étant inévitable, les composés $(^{13}\text{C})\text{-18b}$, $(^{13}\text{C})\text{-18c}$ et $(^{13}\text{C})\text{-18d}$ sont issus de la dégradation par hydrolyse de l'orthoquinone $(^{13}\text{C})\text{-18}$, mais aussi et surtout de la *para*-méthylène quinone $(^{13}\text{C})\text{-18a}$ (**Figure 14**).

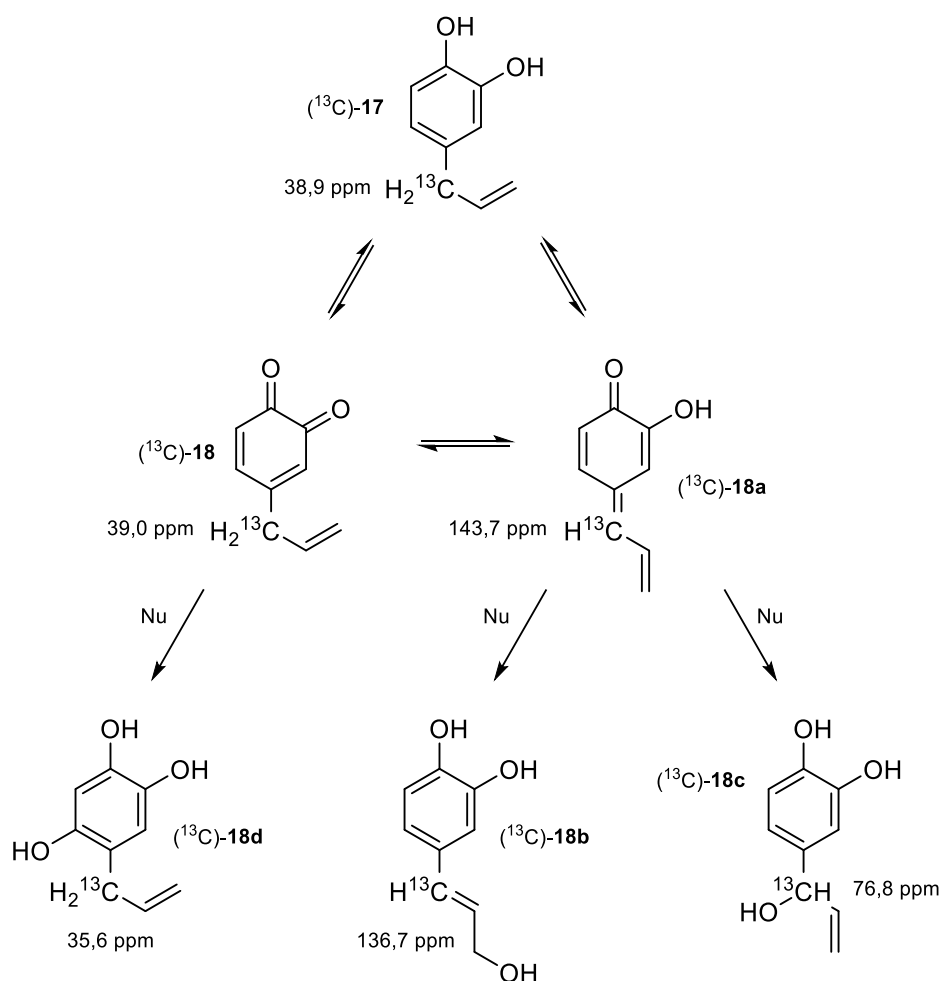


Figure 14. Mécanisme proposé : dégradation de l'orthoquinone (¹³C)-18 par hydrolyse

Le composé (¹³C)-18d est formé par addition de Michael (addition 1,4) d'une molécule d'eau sur l'orthoquinone (¹³C)-18. Cette dernière se réarrange très rapidement en *para*-méthylène quinone (¹³C)-18a plus électrophile. Ce réarrangement, en accord avec les travaux de Bolton *et al.*,^[226] permet d'expliquer la formation du composé (¹³C)-18a. La *para*-méthylène quinone (¹³C)-18a est, via sa chaîne latérale, sujette aux additions nucléophiles 1,6 et 1,8. L'addition nucléophile 1,6 conduit à la formation (¹³C)-18c, celle 1,8 au composé (¹³C)-18b. Le composé (¹³C)-18b étant largement majoritaire par rapport au composé (¹³C)-18c, l'eau s'additionne préférentiellement sur la *para*-méthylène quinone (¹³C)-18a via une addition nucléophile 1,8.

Nous observons également par LC-MS la formation d'ions moléculaires ayant des rapports m/z élevés résultant de l'oligomérisation de l'orthoquinone (¹³C)-18 (Tableau 2).^[270] Toutefois, ces produits sont vraisemblablement peu significatifs.

Ion moléculaire	m/z trouvé (ESI/APCI)	Ion moléculaire	m/z trouvé (ESI/APCI)
$[Q-Q + H^+]^+$	297	$[QH_2-QH_2-Q-OH + H^+]^+$	464
$[QH_2-Q + H^+]^+$	299	$[QH_2-QH_2-QH_2-Q + H^+]^+$	597
$[QH_2-QH_2-OH - H^+]^-$	315	$[QH_2-QH_2-QH_2-Q-OH + H^+]^+$	613
$[QH_2-QH_2-Q + H^+]^+$	448	$[QH_2-QH_2-QH_2-QH_2-Q + H^+]^+$	746

Tableau 2. Résultats LC-MS : ions moléculaires illustrant la polymérisation de l'orthoquinone (^{13}C)-**18**

$QH_2 = (^{13}\text{C})$ -4-allylcatéchol et $Q = (^{13}\text{C})$ -4-allyl-orthoquinone

L'orthoquinone (^{13}C)-**18** est instable en solution puisqu'elle se réarrange très rapidement en *para*-méthylène quinone (^{13}C)-**18a**, elle-même réactive et sujette aux additions nucléophiles 1,6 et 1,8 de l'eau sur sa chaîne latérale. En outre, les deux formes quinoniques tendent naturellement à se réduire en catéchol (^{13}C)-**17**.

Réactivité de l'orthoquinone (^{13}C)-**18** avec les acides aminés en milieu organique

La réactivité en milieu organique de l'orthoquinone (^{13}C)-**18** avec les acides aminés est résumée dans le tableau qui suit (**Tableau 3**).

		δ (ppm) ^{13}C	δ (ppm) ^1H HSQC	δ (ppm) ^1H HMBC	Structure proposée
L Y S I N E	(^{13}C)- 18e	63,2 ($^{-13}\text{CH-}$)	4,53 ($^{-13}\text{CH-}$)	5,16-5,43 (H_a) 5,67 (H_b) 6,62 (H_c) 6,69 (H_d) 6,83 (H_e) 2,76 (H_f) 1,60 (H_g)	

		δ (ppm) ^{13}C	δ (ppm) ^1H HSQC	δ (ppm) ^1H HMBC	Structure proposée
H I S T I D I N E	$(^{13}\text{C})\text{-18f}$	34,9 ($^{-13}\text{CH}_2\text{-}$)	3,54 ($^{-13}\text{CH}_2\text{-}$)	5,05 (H_a) 6,04 (H_b)	
	$(^{13}\text{C})\text{-18g}$	62,6 ($^{-13}\text{CH-}$)	5,19 ($^{-13}\text{CH-}$)	5,42-5,38 (H_a) 6,30 (H_b) 7,19 (H_c) 7,27 (H_d) 6,89 (H_e) 6,85 (H_f) 7,31 (H_g)	
	$(^{13}\text{C})\text{-18h}$	127,5 ($^{-13}\text{CH-}$)	6,48 ($^{-13}\text{CH-}$)	6,54 (H_a) 4,45 (H_b) 7,00 (H_c) 7,10 (H_d) 6,72 (H_e)	
C Y S T E I N E	$(^{13}\text{C})\text{-18i}$	37,7 ($^{-13}\text{CH}_2\text{-}$)	3,44 ($^{-13}\text{CH}_2\text{-}$)	5,98 (H_a) 5,08 (H_b)	
	$(^{13}\text{C})\text{-18j}$	54,1 ($^{-13}\text{CH-}$)	5,09 ($^{-13}\text{CH-}$)	4,62-5,04 (H_a) 5,72 (H_b) 6,68 (H_c) 6,51 (H_d) 6,75 (H_e) 2,83 (H_f)	

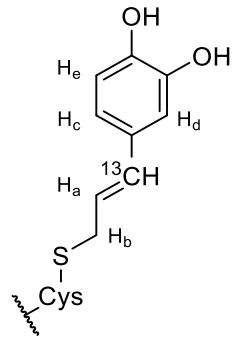
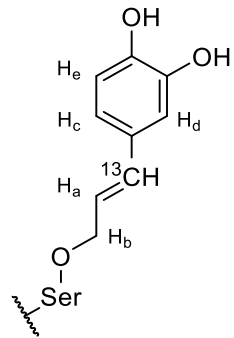
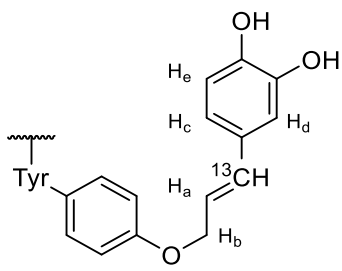
		δ (ppm) ^{13}C	δ (ppm) ^1H HSQC	δ (ppm) ^1H HMBC	Structure proposée
	$(^{13}\text{C})\text{-18k}$	137,5 ($^{-13}\text{CH-}$)	6,38 ($^{-13}\text{CH-}$)	6,17 (H_a) 3,42 (H_b) 6,92 (H_c) 7,00 (H_d) 6,98 (H_e)	
S E R I N E	$(^{13}\text{C})\text{-18l}$	132,3 ($^{-13}\text{CH-}$)	6,59 ($^{-13}\text{CH-}$)	6,15 (H_a) 4,15 (H_b) 6,81 (H_c) 7,13 (H_d) 6,72 (H_e)	
T Y R O S I N E	$(^{13}\text{C})\text{-18m}$	133,4 ($^{-13}\text{CH-}$)	6,68 ($^{-13}\text{CH-}$)	6,31 (H_a) 4,66 (H_b) 6,81 (H_c) 7,14 (H_d) 6,71 (H_e)	

Tableau 3. Déplacements chimiques des adduits formés par réaction de l'orthoquinone $(^{13}\text{C})\text{-18}$ avec les acides aminés dans le DMSO

L'analyse des échantillons par spectrométrie de masse a permis de conforter la présence des adduits (**Tableau 4**).

Ion moléculaires	m/z trouvé (ESI/APCI)
$[(^{13}\text{C})\text{-18e} - \text{H}^+]\text{-}$	350
$[(^{13}\text{C})\text{-18f} - \text{H}^+]\text{-}$, $[(^{13}\text{C})\text{-18g} - \text{H}^+]\text{-}$, $[(^{13}\text{C})\text{-18h} - \text{H}^+]\text{-}$	359

Ion moléculaires	m/z trouvé (ESI/APCI)
$[(^{13}\text{C})\text{-18i} - \text{H}^+]\text{-}$, $[(^{13}\text{C})\text{-18j} - \text{H}^+]\text{-}$, $[(^{13}\text{C})\text{-18k} - \text{H}^+]\text{-}$	325
$[(^{13}\text{C})\text{-18l} - \text{H}^+]\text{-}$	295
$[(^{13}\text{C})\text{-18m} - \text{H}^+]\text{-}$	371

Tableau 13. Résultats LC-MS des ions moléculaires correspondant aux composés $(^{13}\text{C})\text{-18e-m}$

Il ressort de de ces investigations que l'orthoquinone $(^{13}\text{C})\text{-18}$ réagit en milieu organique avec cinq des sept acides aminés testés : la lysine, l'histidine, la cystéine, la sérine et la tyrosine.

Concernant la lysine, seul un adduit a clairement pu être caractérisé. Il correspond à l'addition nucléophile 1,6 d'une lysine sur la chaîne latérale de la *para*-méthylène quinone $(^{13}\text{C})\text{-18a}$.

Si l'histidine réagit avec les deux formes quinoniques du catéchol $(^{13}\text{C})\text{-17}$, elle interagit principalement avec la *para*-méthylène quinone $(^{13}\text{C})\text{-18a}$. L'adduit $(^{13}\text{C})\text{-18f}$ résulte de l'addition nucléophile 1,4 ou 1,6 de l'histidine sur le cycle de l'orthoquinone $(^{13}\text{C})\text{-18}$. La concentration de l'adduit dans le milieu étant faible, il n'a pu être caractérisé avec précision. Il nous est donc impossible de connaître la position cyclique attaquée. Les adduits $(^{13}\text{C})\text{-18g}$ et $(^{13}\text{C})\text{-18h}$ sont respectivement issus des additions nucléophiles 1,6 et 1,8 de l'histidine sur la chaîne latérale de la *para*-méthylène quinone $(^{13}\text{C})\text{-18a}$. L'adduit $(^{13}\text{C})\text{-18h}$ étant largement majoritaire, il semblerait que l'addition nucléophile 1,8 soit privilégiée.

La cystéine propose le même type d'adduits que l'histidine. Ainsi, le composé $(^{13}\text{C})\text{-18i}$ résulte de l'addition nucléophile d'une cystéine, 1,4 ou 1,6, sur le cycle de l'orthoquinone $(^{13}\text{C})\text{-18}$. Mais, encore une fois, la concentration de l'adduit en solution ne permet pas de le caractériser convenablement. Il nous est donc impossible de connaître la position du cycle attaquée. Les adduits $(^{13}\text{C})\text{-18j}$ et $(^{13}\text{C})\text{-18k}$ découlent respectivement des additions nucléophiles 1,6 et 1,8 de la cystéine sur la chaîne latérale de la *para*-méthylène quinone $(^{13}\text{C})\text{-18a}$. Cependant, contrairement à l'histidine, il semblerait que l'addition 1,6 soit privilégiée. En effet, le signal RMN correspondant à l'adduit $(^{13}\text{C})\text{-18j}$ est nettement plus intense que celui du composé $(^{13}\text{C})\text{-18k}$.

La sérine et la tyrosine sont quant à elles uniquement réactives avec de la *para*-méthylène quinone (^{13}C)-**18a**. Elles interagissent avec cette dernière selon des d'additions nucléophiles 1,8 formant ainsi les adduits (^{13}C)-**18l** et (^{13}C)-**18m**.

Puisque l'orthoquinone (^{13}C)-**18** se réarrange rapidement en *para*-méthylène quinone (^{13}C)-**18a**, les acides aminés réagissent préférentiellement sur la chaîne latérale de cette dernière via des additions nucléophiles 1,6 et 1,8 (**Figure 15**). Il semble cependant difficile de trouver une corrélation entre le type d'attaque réalisée (1,6 ou 1,8) et la nature de l'hétéroatome impliqué (N, S ou O).

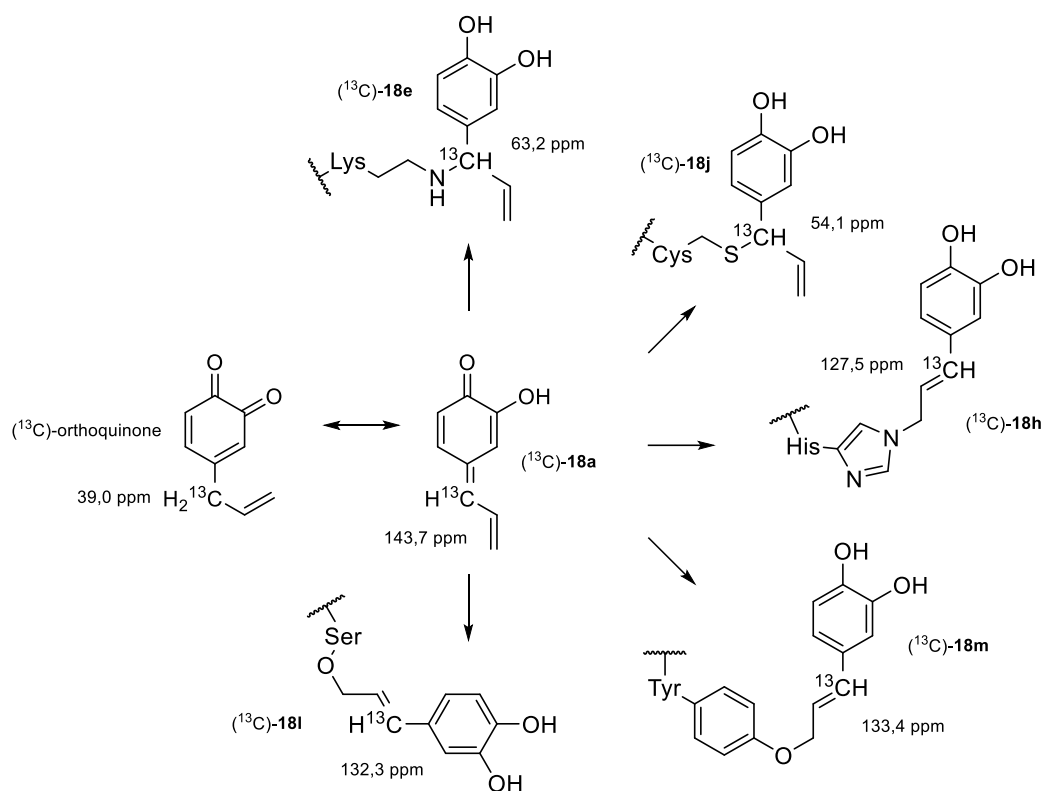


Figure 15. Principaux adduits issus de la réactivité de l'orthoquinone (^{13}C)-**18** avec les acides aminés

Il est fort intéressant de constater par spectrométrie de masse que la lysine, l'histidine, la cystéine et la tyrosine sont également réactives avec un des dimères du catéchol (^{13}C)-**17** (**Tableau 5**).

Ion moléculaires	m/z trouvé (ESI/APCI)
$[\text{QH}_2\text{-QH}_2\text{-Lys} - \text{H}^+]\text{-}$	499
$[\text{QH}_2\text{-QH}_2\text{-His} + \text{H}^+]\text{+}$	510
$[\text{QH}_2\text{-QH}_2\text{-Cys} - \text{H}^+]\text{-}$	474
$[\text{QH}_2\text{-QH}_2\text{-Tyr} + \text{H}^+]\text{+}$	522

Tableau 14. Résultats LC-MS des ions moléculaires correspondant aux adduits de type dimère-Nu
 $\text{QH}_2 = (^{13}\text{C})\text{-4-allylcatéchol}$; His = Histidine ; Cys = Cystéine ; Tyr = Tyrosine

1.3.C. Réactivité en milieu aqueux

Malgré la faible stabilité de la $(^{13}\text{C})\text{-4-allyl-orthoquinone } (^{13}\text{C})\text{-18}$ en présence d'eau, cette dernière a été mise en réaction en milieu aqueux avec les sept acides aminés précédemment testés en milieu organique, mais également avec quatre peptides : le peptide lysine, le peptide cystéine, le glutathion et le peptide modèle composé de vingt acides aminés.

Le protocole expérimental suivi est encore une fois le même. Seule différence, le DMSO est remplacé par le mélange $\text{CD}_3\text{CN}/\text{STP}$ 7,4 (150/450 μL). Le $(^{13}\text{C})\text{-4-allylcatéchol } (^{13}\text{C})\text{-17}$ est rapidement oxydé avant d'être placé dans un tube RMN en présence de l'acide aminé (10 équivalents) ou du peptide (2 équivalents, 1 équivalent pour peptide modèle) à tester. Les différentes solutions sont ensuite quotidiennement analysées par RMN du liquide puis, passé un délai de sept jours, soumises à une analyse LC-MS.

Comportement de l'orthoquinone $(^{13}\text{C})\text{-18}$ en milieu aqueux (tube témoin)

Dans le mélange $\text{CD}_3\text{CN}/\text{TSP}$ 7,4, et en l'absence d'acide aminé dans le milieu, l'orthoquinone $(^{13}\text{C})\text{-18}$ est très rapidement réduite en catéchol $(^{13}\text{C})\text{-17}$. Les spectres RMN 1D ^{13}C témoignent de cette grande instabilité (**Figure 16**).

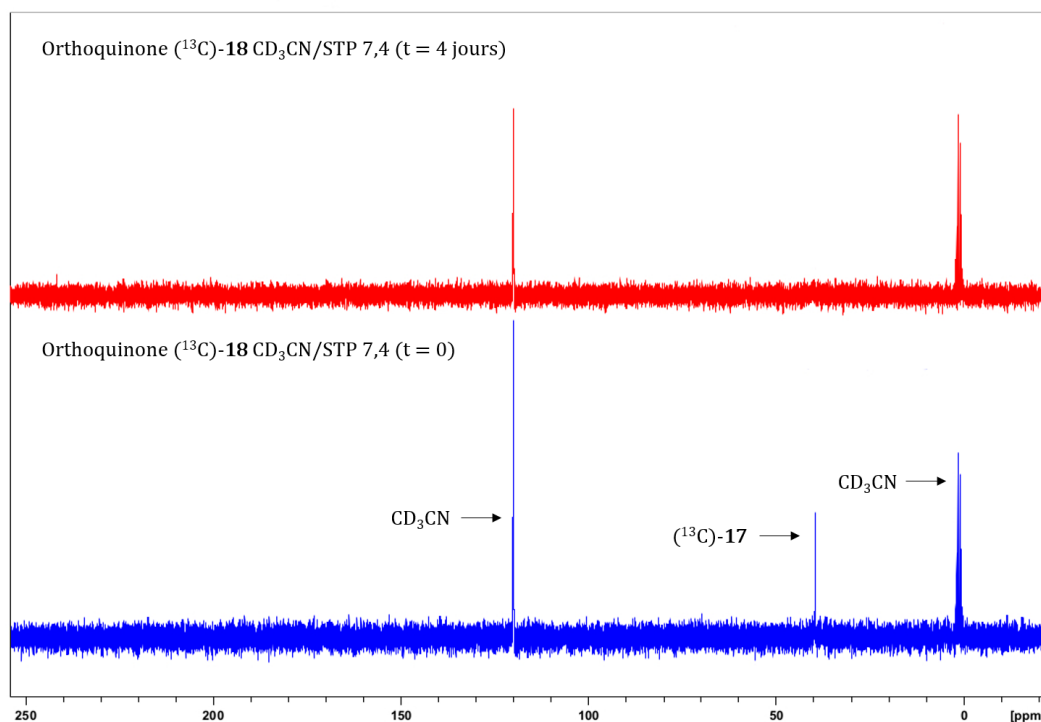


Figure 16. Comportement de l'orthoquinone (^{13}C)-**18** dans l'eau : superposition de spectres

Au temps initial ($t = 0$), seul le signal correspondant au catéchol (^{13}C)-**17** est visible en RMN ^{13}C . Ainsi, en moins de quelques minutes, l'orthoquinone (^{13}C)-**18** n'est plus observée. Si au bout d'un jour le signal du catéchol (^{13}C)-**17** est encore faiblement discerné, ce n'est plus le cas après quatre jours. La disparition de tout signal peut être expliquée par la dégradation du catéchol (^{13}C)-**17** en une multitude de produits dont les concentrations, trop faibles, ne permettent pas de les observer par RMN du liquide.

D'une meilleure sensibilité, la spectrométrie de masse apporte des éléments de réponse. De nombreux produits de dégradation par hydroxylation et polymérisation ont été détectés (**Tableau 6**).

Produits d'hydroxylation			
Ion moléculaire	m/z trouvé (ESI/APCI)	Ion moléculaire	m/z trouvé (ESI/APCI)
$[Q-OH + H^+]^+$	166	$[HQ_2-(OH)_2 + H^+]^+$	182
$[QH_2-OH + H^+]^+$	168	$[QH_2-(OH)_2 - H^+]^-$	182
Dimères			
Ion moléculaire	m/z trouvé (ESI/APCI)	Ion moléculaire	m/z trouvé (ESI/APCI)
$[Q-Q + H^+]^+$	297	$[QH_2-Q + H^+]^+$	299
$[QH_2-QH_2 - H^+]^-$	300	$[QH_2-QH_2-OH - H^+]^-$	315
Polymères			
Ion moléculaire	m/z trouvé (ESI/APCI)	Ion moléculaire	m/z trouvé (ESI/APCI)
$[QH_2-QH_2-Q + H^+]^+$	448	$[QH_2-QH_2-QH_2-Q-OH + H^+]^+$	613
$[QH_2-QH_2-Q-OH + H^+]^+$	464	$[QH_2-QH_2-QH_2-QH_2-Q + H^+]^+$	746
$[QH_2-QH_2-QH_2-Q + H^+]^+$	597	$[(QH_2)_5-Q-OH + H^+]^+$	911

Tableau 6. Résultats LC-MS : ions moléculaires illustrant la dégradation du (^{13}C)-4-allylcatéchol

$QH_2 = (^{13}C)$ -4-allylcatéchol et $Q = (^{13}C)$ -4-allyl-orthoquinone

Des travaux précédemment réalisés au laboratoire de Dermatochimie avaient déjà mis en évidence la polymérisation de l'eugénol en solution.^[265] Initialement, ils avaient pour objectif l'étude, par RMN du liquide et dans les conditions du PPRA, de la réactivité de l'eugénol vis-à-vis de peptides. Malheureusement, la rapide polymérisation de l'eugénol avait rendu difficile la détection d'adduits par spectroscopie RMN.

Réactivité de l'orthoquinone (^{13}C)-**18** avec les acides aminés et les peptides en milieu aqueux

Que ce soit avec les acides aminés ou avec les peptides, aucun adduit n'a pu être détecté par RMN en phase liquide. Nous pouvons néanmoins nous appuyer sur la spectrométrie de masse pour obtenir des informations (**Tableau 7**).

Acides aminés			
Ion moléculaire	m/z trouvé (ESI/APCI)	Ion moléculaire	m/z trouvé (ESI/APCI)
$[\text{QH}_2\text{-Lys} - \text{H}^+]\cdot$	350	$[\text{QH}_2\text{-QH}_2\text{-Lys} + \text{H}^+]\cdot$	501
$[\text{QH}_2\text{-His} + \text{H}^+]\cdot$	361	$[\text{QH}_2\text{-QH}_2\text{-His} + \text{H}^+]\cdot$	510
$[\text{QH}_2\text{-Cys} + \text{H}^+]\cdot$	327	$[\text{QH}_2\text{-QH}_2\text{-Cys} + \text{H}^+]\cdot$	476
$[\text{QH}_2\text{-(Cys)}_2 - \text{H}^+]\cdot$	500	$[\text{QH}_2\text{-Ser} - \text{H}^+]\cdot$	295
$[\text{QH}_2\text{-Tyr} - \text{H}^+]\cdot$	371	-	-
Peptides			
Ion moléculaire	m/z trouvé (ESI/APCI)	Ion moléculaire	m/z trouvé (ESI/APCI)
$[\text{QH}_2\text{-Glu} + \text{H}^+]\cdot$	457	$[\text{QH}_2\text{-QH}_2\text{-Glu} + \text{H}^+]\cdot$	606

Tableau 7. Résultats LC-MS : ions moléculaires détectés lors des études de réactivité menées en milieu aqueux entre l'orthoquinone (^{13}C)-**18** et les acides aminés et peptides
 $\text{QH}_2 = (^{13}\text{C})\text{-4-allylcatéchol}$ et $\text{Q} = (^{13}\text{C})\text{-4-allyl-orthoquinone}$

Nous constatons que la plupart des ions moléculaires détectés en milieu organique le sont également en milieu aqueux. Concernant les acides aminés, des adduits avec la lysine, l'histidine, la cystéine, la sérine et la tyrosine ont été identifiés. La spectrométrie de masse ne permettant pas la résolution structurale des adduits formés, ils nous est malheureusement impossible de connaître les positions de l'orthoquinone (^{13}C)-**18** et/ou de la *para*-méthylène quinone (^{13}C)-**18a** attaquées.

Il semblerait que la réactivité du dimère ne soit pas négligeable puisque ce dernier semble réagir avec quatre acides aminés (lysine, histidine, cystéine et tyrosine) (**Figure 17**).

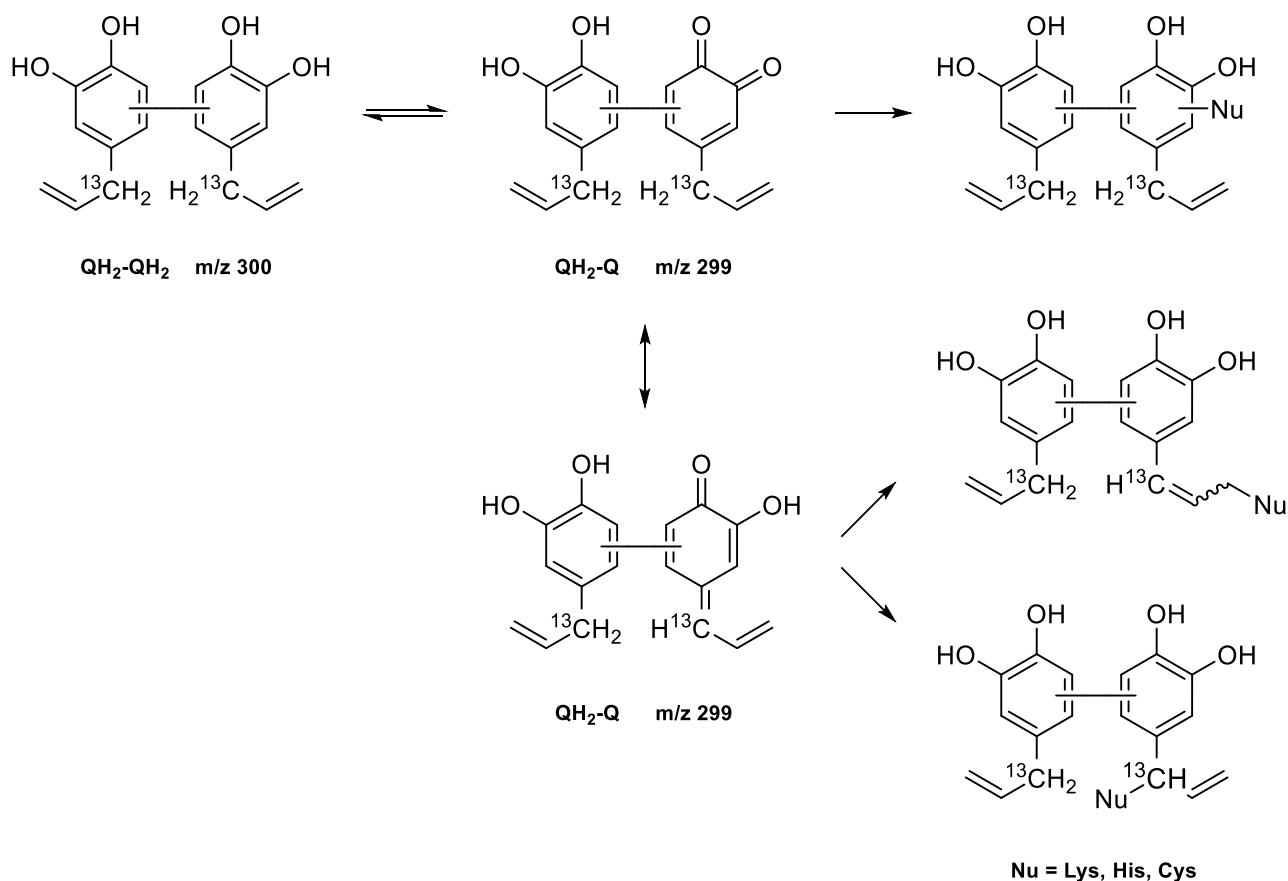


Figure 17. Voies d'accès possibles à la formation des adduits $\text{QH}_2\text{-Nu}$

Parmi les quatre peptides testés, seul le glutathion présente une réactivité avec une des deux formes quinoniques du (^{13}C) -4-allylcatéchol. En ce sens, un ion moléculaire m/z 604 (mode négatif) correspondant à la réactivité d'un des dimères avec le glutathion a été détecté.

1.3.D. Comparaison des résultats obtenus avec la RMN HRMAS

Les résultats obtenus par action de l'orthoquinone (^{13}C) -**18** sur les acides aminés et peptides en solution peuvent être extrapolés et comparés aux observations faites sur le modèle RHE. Pour rappel, une tache de corrélation paire à 3,09/42,9 ppm a été observée sur les épidermes reconstruits. Si cette tache de corrélation correspond bel et bien à un adduit, une hypothèse mécanistique passant par

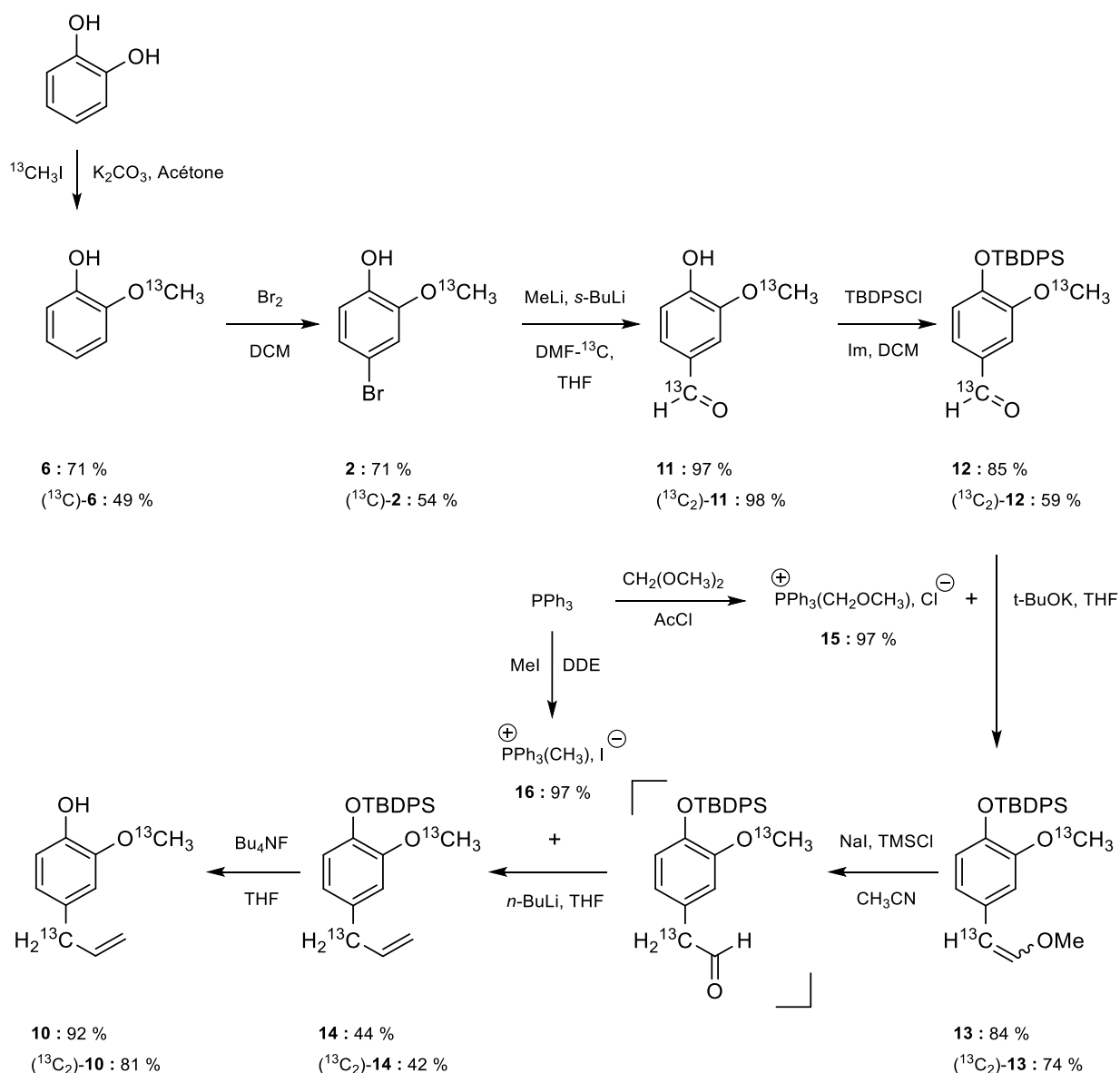
l'addition nucléophile d'un ou plusieurs résidu(s) nucléophile(s) d'acides aminés sur le centre de l'orthoquinone (^{13}C)-**18** permettrait d'expliquer son observation.

Cependant, les études de réactivité en solution ont montré que l'orthoquinone (^{13}C)-**18** se réarrangeait quasi-spontanément en *para*-méthylène quinone (^{13}C)-**18a**, très réactive au niveau de sa chaîne latérale. Les seuls adduits identifiés en RMN du liquide correspondant à l'attaque d'acides aminés (histidine et cystéine) sur le noyau de l'orthoquinone (^{13}C)-**18** n'ont pu être caractérisés convenablement en raison de leur trop faible concentration. Les analyses par spectrométrie de masse nous ont permis d'observer la formation d'un ou plusieurs dimères pouvant réagir avec les acides aminés et le glutathion. De plus, l'entité correspondant à la tache de corrélation à 3,09/42,9 ppm est instable sur le modèle RHE puisqu'elle disparaît après 24 heures d'incubation. L'ensemble de ces observations nous pousse à penser que la tache de corrélation observée sur le modèle RHE pourrait correspondre à la formation d'un dimère du catéchol (^{13}C)-**17** instable puisque potentiellement réactif vis-à-vis des protéines épidermiques. L'application sur les épidermes reconstruits de l'eugénol synthétisé en série doublement substituée au carbone 13 permettra de répondre à cette question.

I.4. Synthèse en série doublement substituée au carbone 13 et application sur le modèle RHE

I.4.A. Synthèse de l'eugénol doublement substitué au carbone 13

La deuxième hypothèse mécanistique suivant laquelle l'eugénol serait métabolisé sur le modèle RHE par les mono-oxygénases à CYP450 via une réaction de O-déméthylation passe par l'observation de formaldéhyde en RMN HRMAS. Pour ce faire, l'eugénol a été synthétisé en introduisant une substitution au carbone 13 en positions méthylque et méthoxylique (**Figure 18**).

Figure 18. Synthèse de l'eugénol ($^{13}\text{C}_2$)-10

La synthèse du ($^{13}\text{C}_2$)-eugénol, ($^{13}\text{C}_2$)-10, en série doublement substituée au carbone 13 est identique à celle de l'eugénol (^{13}C)-10 à l'unique différence qu'elle débute par une étape de monométhylation du pyrocatechol commercial. Cette première étape permet l'introduction au moyen de (^{13}C)-iodométhane du carbone 13 substitué sur la position méthoxylique. Suivant la synthèse du composé (^{13}C)-10, la bromation du 2-(méthoxy- ^{13}C)phénol conduit au bromophénol (^{13}C)-2. Le second carbone 13 est introduit en position benzylique au moyen d'un échange halogène-métal à l'aide de *n*-butyllithium suivi d'une formylation avec du (^{13}C)-formaldéhyde. L'aldéhyde phénolique ($^{13}\text{C}_2$)-11 obtenu est ensuite protégé sous la forme d'un éther silylé ($^{13}\text{C}_2$)-12 au moyen de *tert*-butyldiphénylsilyle et d'imidazole. Le composé ($^{13}\text{C}_2$)-13 est engagé dans une première réaction de Wittig réalisée en présence du sel d'alkyltriphenylphosphonium 15, lui-même obtenu à partir de

triphénylphosphine. Cette réaction conduit à la formation de l'éther d'énol ($^{13}\text{C}_2$)-**13** sous la forme d'un mélange de deux diastéréoisomères (E/Z, 58:42) avec un rendement supérieur à 80 %. L'éther d'énol ($^{13}\text{C}_2$)-**13** est ensuite déprotégé selon la méthode décrite par Kamal *et al.*, par de l'iodure de triméthylsilyle généré *in situ*.^[269] L'aldéhyde obtenu étant très difficile à purifier, il est engagé sans purification dans une seconde réaction de Wittig. Cette dernière est menée en présence du sel de phosphonium **16** préalablement préparé au moyen de triphénylphosphine et de iodométhane et conduit à la formation de l'allyl ($^{13}\text{C}_2$)-**14**. Finalement, l'eugénol ($^{13}\text{C}_2$)-**10** est obtenu par déprotection de l'éther silylé en présence de TBAF.

1.4.B. Application sur le modèle RHE et nouvelles observations

L'eugénol (^{13}C)-**10** a été appliqué sur 3 épidermes humains reconstruits. Les temps d'incubation utilisés sont listés ci-après :

- 1 heure
- 8 heures
- 24 heures

Les échantillons d'épiderme reconstruit ont été préparés et analysés par RMN HRMAS au moyen d'expériences 1D ^1H (CPMG) et 2D HSQC ^1H - ^{13}C éditée. Encore une fois, la superposition du spectre HSQC de l'échantillon blanc avec ceux obtenus pour chacun des échantillons traités par l'eugénol ($^{13}\text{C}_2$)-**10** a permis d'identifier rapidement les modifications engendrées par le pro-haptène. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure qui suit (**Figure 19**).

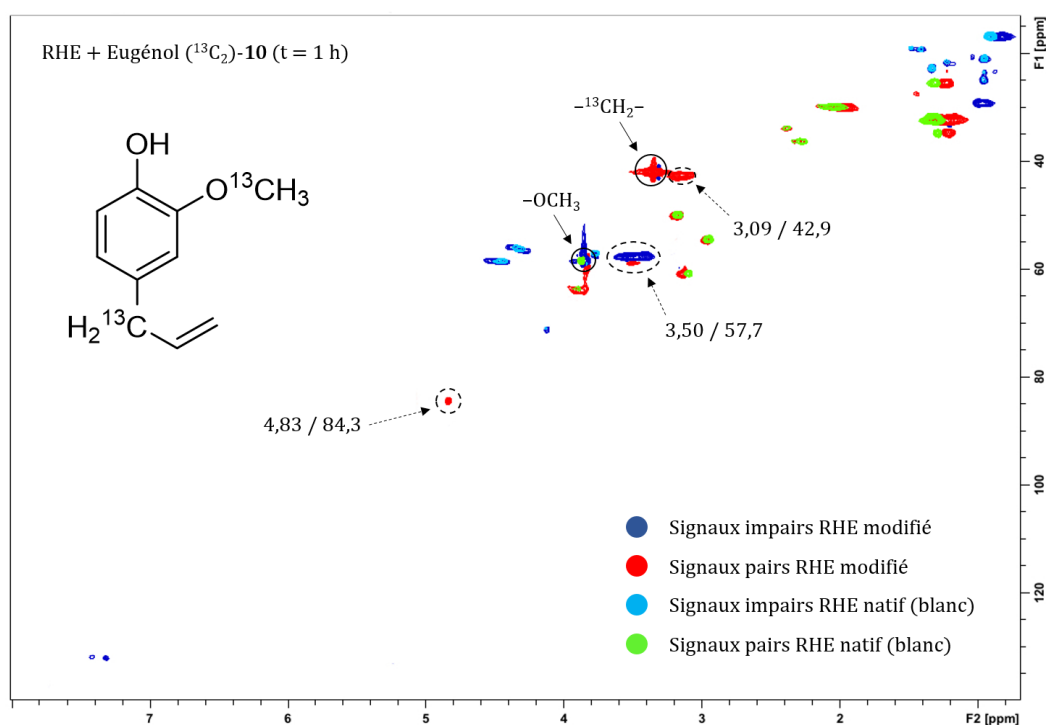


Figure 19. Spectre HSQC édité (superposé au blanc) de l'épiderme 1 h traité par ($^{13}\text{C}_2$)-**10**

Corrélations molécule de départ : cercles et flèches pleines ($\rightarrow \odot$) ; nouvelles corrélations : cercles et flèches en pointillés ($\cdots \odot$) ; les déplacements chimiques $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ des nouvelles corrélations sont exprimés en ppm

Après 1 heure d'incubation, la tache de corrélation à 3,09/42,9 ppm précédemment observée sur le spectre HSQC de l'épiderme à 1 heure traité par l'eugénol (^{13}C)-**10** est bien visible. En plus de ce signal, nous constatons l'apparition de deux nouvelles taches de corrélation : une première impaire à 3,50/57,7 typique d'un groupement méthoxy $\text{R}-\text{O}-^{13}\text{CH}_3$ et une seconde paire à 4,83/84,3 ppm. Absentes lors de l'application du (^{13}C)-eugénol sur le modèle RHE, ces deux taches de corrélation résultent de la substitution au carbone 13 de la position méthoxylique. Tout comme le signal à 3,09/42,9 ppm, la tache de corrélation à 3,50/57,7 ppm disparaît complètement après 24 heures d'incubation. Celle à 4,83/84,3 ppm est moins intense au bout de 24 heures.

1.4.C. Vers un comportement in situ similaire à celui du créosol

Déjà observée lors de l'application du ($^{13}\text{C}_2$)-créosol sur le modèle RHE, la tache de corrélation paire à 4,83/84,3 ppm peut être attribuée sans aucun doute à la formation de méthanediol, le produit d'hydratation du formaldéhyde. Cette observation vient appuyer l'hypothèse mécanistique suivant

laquelle l'eugénol est pris en charge sur les épidermes reconstruits par les mono-oxygénases à CYP450 via une réaction de O-déméthylation (**Figure 20**).

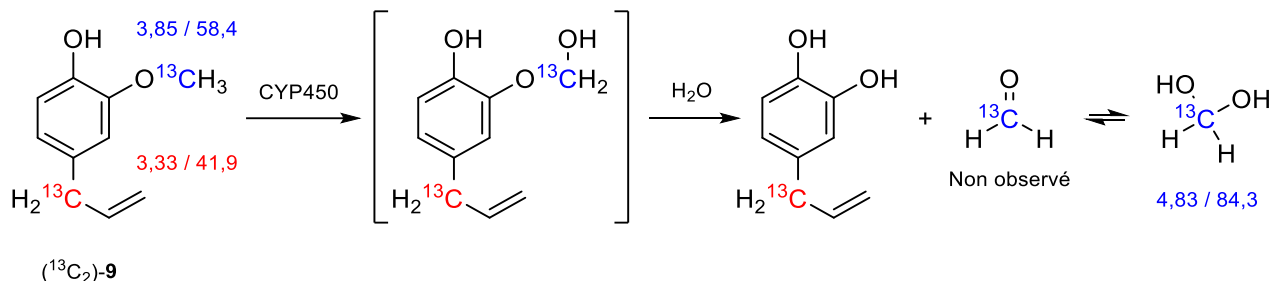


Figure 20. Modèle RHE : activation de l'eugénol (13C)-10 par les mono-oxygénases à CYP450

Compte tenu des informations dont nous disposons suite aux tests de réactivité réalisés en solution, nous avons supposé que la tache de corrélation paire à 3,09/42,9 ppm pouvait appartenir à un dimère de l'eugénol. L'application sur le modèle RHE de l'eugénol (13C₂)-10 a montré l'apparition d'une nouvelle tache de corrélation impaire à 3,50/57,7 typique d'un groupement méthoxy R-O-13CH₃ qui vient appuyer notre proposition. Ainsi, les deux taches de corrélation à 3,09/42,9 et 3,50/57,7 ppm pourraient être attribuées à la formation d'un dimère (13C₄)-eugénol symétrique formé via un mécanisme radicalaire illustré ci-après (**Figure 21**).

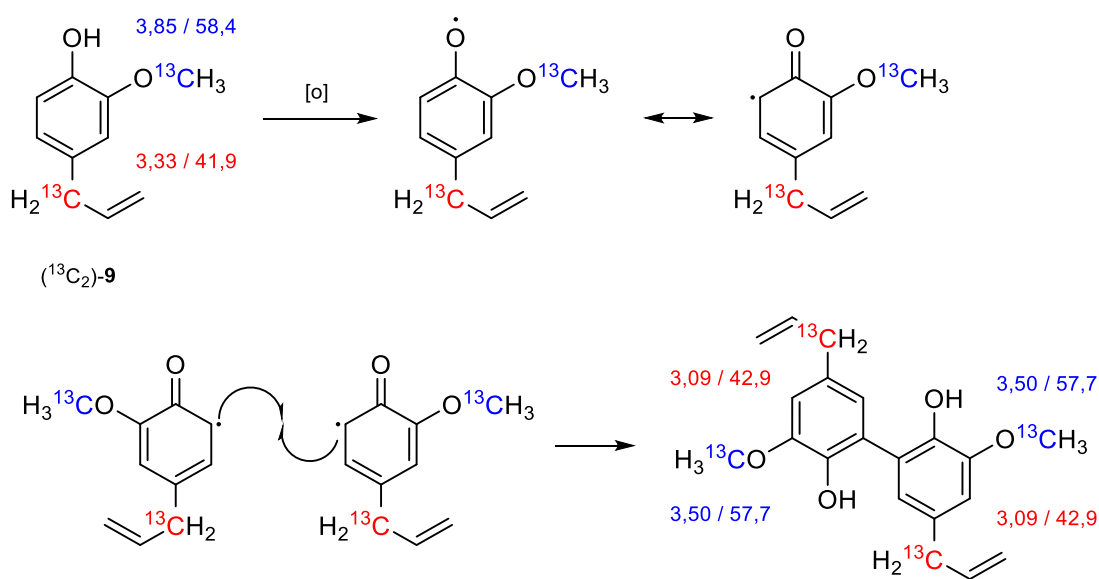


Figure 21. Formation du dimère (13C₄)-eugénol

A l'instar du dimère ($^{13}\text{C}_4$)-créosol, il semblerait que la formation rapide du dimère ($^{13}\text{C}_4$)-eugénol soit également réalisée par voie radicalaire au moyen d'une peroxydase. Ce mécanisme radicalaire conduisant à la formation de dimères de l'eugénol a récemment été proposé par Bortolomeazzi *et al.*^[271] Le dimère formé est nécessairement symétrique puisque seules deux taches de corrélation sont visibles.

Afin d'appuyer la structure proposée pour le dimère ($^{13}\text{C}_4$)-eugénol, nous avons cherché à synthétiser le dimère de l'eugénol d'intérêt puis nous avons comparé ces déplacements chimiques (δ) avec ceux du monomère. La synthèse du dimère est axée sur la même stratégie précédemment utilisée pour la synthèse du dimère du créosol.^[248] Ainsi, l'addition lente d'eau oxygénée (H_2O_2) à une solution méthanol/tampon phosphate pH = 7,4 contenant l'eugénol et de la peroxydase de raifort permet d'obtenir le dimère **19** avec un rendement de 71 % (Figure 22).

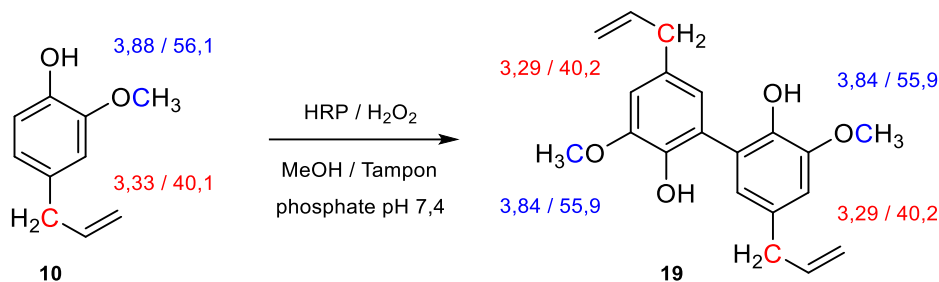


Figure 22. Synthèse du dimère de l'eugénol **19**

Les δ des protons et carbones d'intérêt sont exprimés en ppm (en solution, CDCl_3)

La comparaison des δ en solution du monomère de l'eugénol **10** avec ceux du dimère **19** va dans le sens des observations faites sur le modèle RHE. En effet, le δ proton du carbone benzylique est légèrement « blindé ». *A contrario*, le δ carbone est « déblindé ». Concernant le groupement méthoxy, la dimérisation décale le δ proton et carbone vers les champs plus fort. Encore une fois, ces constatations ne constituent pas une preuve absolue concernant la formation du dimère ($^{13}\text{C}_4$)-eugénol sur le modèle RHE. Néanmoins, elles apportent un argument qui soutient l'hypothèse de la dimérisation.

En résumé, l'application de l'eugénol (^{13}C)-**10** sur le modèle RHE a permis d'observer une activité significative des mono-oxygénases à CYP 450 (EC 1.14). En effet, *in situ* les épidermes reconstruits, l'eugénol est métabolisé via une réaction de O-déméthylation. Cette réaction conduit à la formation de formaldéhyde et du catéchol correspondant. A l'instar du créosol, le catéchol est ensuite très probablement oxydé en orthoquinone. Les études réalisées en solution ont montré que cette dernière

est capable à se réarranger très rapidement en *para*-méthylène quinone encore plus réactive (**Figure 23**).

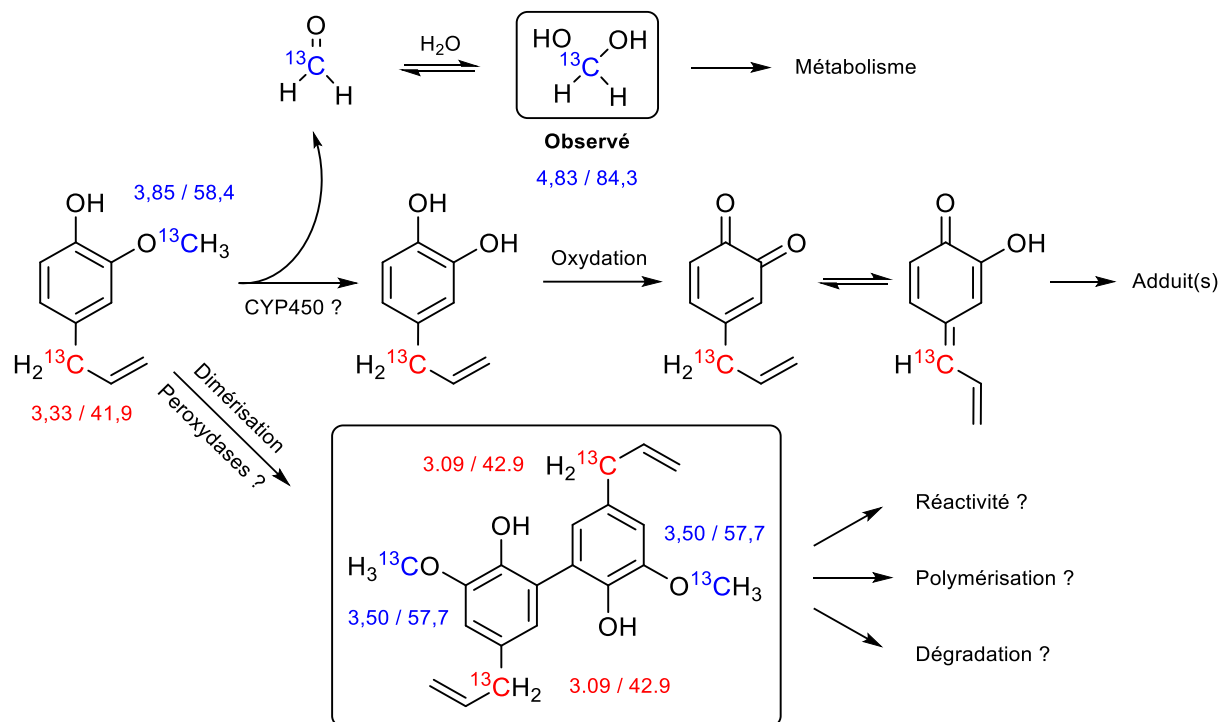


Figure 23. Métabolisation de l'eugénol ($^{13}\text{C}_2$)-10 sur le modèle RHE

Le fait qu'aucun adduit ne soit observé entre les espèces supposées réactives qui résultent du métabolisme de l'eugénol et les résidus nucléophiles des protéines épidermiques pourrait être expliqué par les points suivants.

Premièrement, contrairement au créosol, il semblerait que la prise en charge de l'eugénol par le modèle RHE ne soit pas complète. Les spectres 1D CPMG ont témoigné d'une concentration non négligeable d'eugénol après 24 heures d'incubation.

Deuxièmement, l'eugénol est réactif sous deux formes quinoniques possédant chacune plusieurs sites électrophiles sujets aux attaques nucléophiles. Le nombre d'adduits pouvant potentiellement être formés est donc important. Indéniablement, plus le nombre d'adduits formés est élevé, moins la concentration de chacun de ces adduits est importante. Une concentration trop faible des adduits ne permettrait malheureusement pas leur détection par RMN HRMAS.

Finalement, la non-détection d'adduits peut être expliquée par la rapide dimérisation de l'eugénol. Si cette dimérisation peut sembler anodine, il ne faut pas exclure le fait que le dimère puisse lui aussi être allergisant. Les études menées en solution par spectrométrie de masse ont montré la formation de nombreux adduits entre un dimère de l'eugénol et les acides aminés et peptides. De plus, le pouvoir allergisant des dimères de l'eugénol a été démontré.^[272] En ce sens, il est important de ne pas négliger la contribution des espèces dimériques dans l'explication du pouvoir sensibilisant de l'eugénol.

Compte tenu de sa forte réactivité, il n'est pas surprenant de voir la concentration en formaldéhyde diminuer au cours du temps. Le formaldéhyde étant également un allergène puissant, il contribue peut-être, d'une façon ou d'une autre, au pouvoir sensibilisant de l'eugénol.

II. L'isoeugénol, réel pré-haptène ?

II.1. Généralités et postulat de départ

Comme l'eugénol, l'isoeugénol est un composé présent dans le clou de girofle. A l'état naturel, l'isoeugénol se présente sous la forme d'un mélange de deux stéréoisomères Z et E dont les proportions sont variables. En revanche, l'isoeugénol commercial, obtenu par synthèse, est un mélange dans lequel la proportion de l'isomère Z est en général largement majoritaire. Dégageant également une forte odeur de clou de girofle, l'isoeugénol est incorporé en parfumerie et dans les produits cosmétiques. L'isoeugénol figure dans la composition du Fragrance Mix I.^[79]

Structuralement, l'isoeugénol et l'eugénol sont des isomères. L'isoeugénol se distingue de l'eugénol uniquement par la position de l'insaturation sur la chaîne latérale. Pourtant, si l'eugénol est un pro-haptène qui possède un pouvoir sensibilisant faible, l'isoeugénol est, d'après le test du PPRA,^[110] un pré-haptène activable par auto-oxydation (oxydation lente non enzymatique réalisée par le dioxygène) possédant un pouvoir sensibilisant modéré.^[203] Cette différence de pouvoir sensibilisant a été confirmée par des observations cliniques.^[55] Au courant des années 90, plusieurs études se sont intéressées aux mécanismes à l'origine de cette différence.^[267,273,274] En 1997, Bertrand *et al.* ont proposé que cette différence pourrait résulter de deux modes de prise en charge.^[268] D'après les auteurs, l'isoeugénol serait directement oxydé en *para*-méthylène quinone réactive. L'eugénol semble quant à lui être préférentiellement sujet à une réaction de O-déméthylation réalisée par une mono-oxygénase à cytochrome P450. Le catéchol ainsi obtenu serait alkylé par les protéines épidermiques via le « mécanisme de type poison ivy ». ^[224] Autrement dit, le catéchol serait oxydé en orthoquinone électrophile. Par isomérisation, l'orthoquinone peut naturellement se réarranger en *para*-méthylène

quinone également réactive (**Figure 26**).^[226,275] En calculant la valeur du potentiel redox de chacune des deux allergènes, Guha et Indira Priyadarsini ont mis en évidence que l'isoeugénol était plus facilement oxydable que l'eugénol.^[276] Cette constatation va dans le sens des propositions énoncées par Bertrand *et al.* puisqu'elle vient appuyer l'idée selon laquelle l'isoeugénol est plus facilement oxydé en *para*-méthylène quinone que l'eugénol

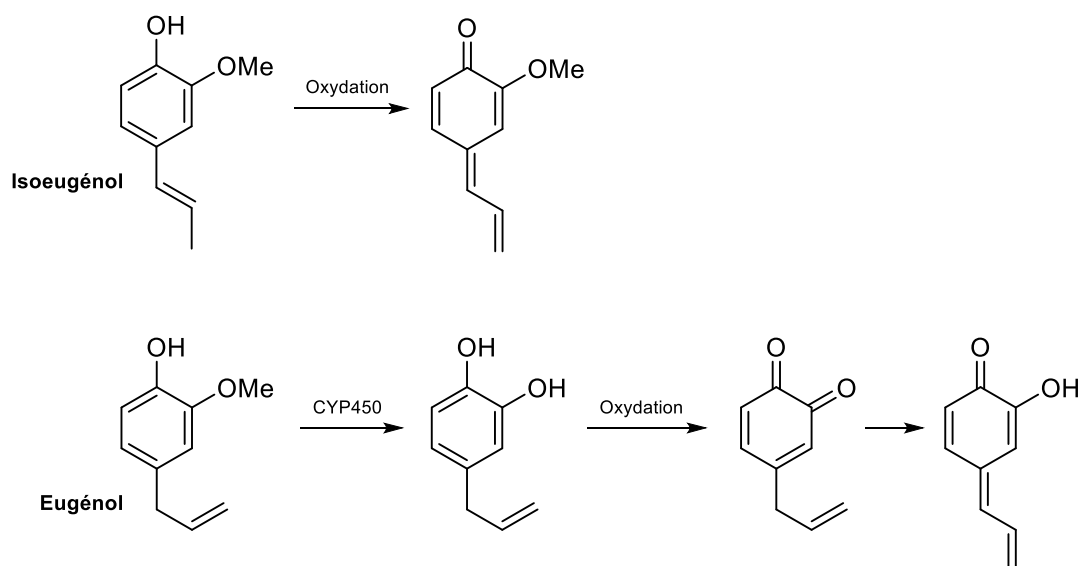


Figure 26. Voies de métabolisation proposées pour l'isoeugénol et l'eugénol

L'application de l'isoeugénol sur les épidermes reconstruits nous laisse supposer deux voies de métabolisation. La première, axée sur les travaux de Bertrand *et al.*, passe par l'oxydation (enzymatique ou non) de l'allergène sous la forme d'une *para*-méthylène quinone. La seconde propose, à l'instar du comportement de l'eugénol sur le modèle RHE, une prise en charge par une mono-oxygénase à cytochrome P450. Le catéchol obtenu pourrait être hapténisé suivant le « mécanisme de type poison ivy » (oxydation du catéchol en orthoquinone réactive sujette aux additions nucléophiles 1,4 et 1,6).

II.2. Synthèse en série substitué au carbone 13 et application sur le modèle RHE

II.2.A. Synthèse de l'isoeugénol substitué au carbone 13

Une des voies d'accès pour répondre rapidement à la question du métabolisme de l'isoeugénol sur le modèle RHE consiste à synthétiser le pré-haptène en substituant au carbone 13 sa position

méthoxylique. En effet, si l'isoeugénol est directement oxydé sous la forme d'une *para*-méthylène quinone, nous ne devrions pas observer la formation de méthanediol (monohydrate du formaldéhyde) sur les épidermes reconstruits. *A contrario*, si la voie métabolique de l'isoeugénol suit celle de l'eugénol (et du créosol), la formation de méthanediol devrait être constatée par RMN HRMAS.

Que ce soit à l'état naturel ou dans les produits d'usage courant, l'isoeugénol est généralement rencontré sous la forme d'un mélange de deux stéréoisomères dans lequel l'isomère E est majoritaire. Afin de se rapprocher au mieux du phénomène d'allergie de contact à l'isoeugénol, ce dernier a été synthétisé sous la forme d'un mélange Z/E composé essentiellement de l'isomère E. La mise au point des différentes étapes qui composent cette synthèse a été réalisée en série non substituée (**Figure 27**).

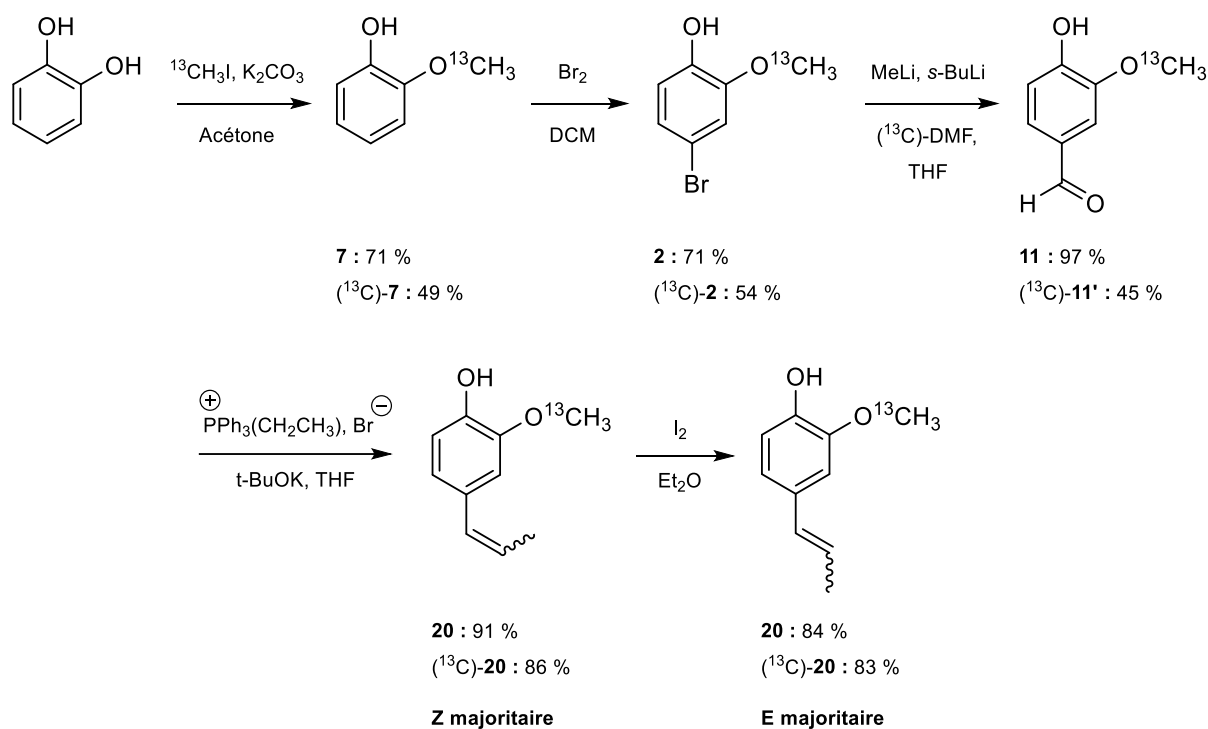


Figure 27. Synthèse de l'isoeugénol (^{13}C)-20

La synthèse de l'isoeugénol (^{13}C)-20, réalisée en 5 étapes à partir du 2-méthoxyphénol commercial, est en partie inspirée de celle de l'eugénol ($^{13}\text{C}_2$)-10. Une première étape de méthylation permet l'introduction au moyen de (^{13}C)-iodométhane du carbone 13 sur la position méthoxylique. Le bromophénol (^{13}C)-2 est préparé par bromation du méthoxyphénol (^{13}C)-7 précédemment obtenu. Ensuite, un échange halogène-métal à l'aide de *n*-butyllithium suivi d'une formylation avec du formaldéhyde conduit à l'aldéhyde (^{13}C)-11'. Une réaction de Horner-Wadsworth-Emmons menée en présence de bromure de méthyltriphénylphosphonium et de *tert*-butylate de potassium permet

l'obtention de l'isoeugénol (^{13}C)-**20** sous sa forme Z majoritaire avec un rendement de 86 %. Finalement, l'isoeugénol (^{13}C)-**20** sous la forme d'un mélange Z/E dans lequel l'isomère E est majoritaire, est obtenu par isomérisation cis-trans de l'alcène sous l'action catalytique de diiode.^[277]

II.2.B. Application sur le modèle RHE et observations

L'isoeugénol (^{13}C)-**20** a été appliqué sur 3 échantillons d'épiderme reconstruit. Les temps d'incubation utilisés sont listé-ci-après :

- 1 heure
- 8 heures
- 24 heures

Les échantillons ont été préparés et analysés par RMN HRMAS au moyen d'expériences 1D ^1H (CPMG) et 2D HSQC ^1H - ^{13}C éditées. La superposition du spectre HSQC de l'échantillon blanc avec celui obtenu pour l'échantillon traité par l'isoeugénol (^{13}C)-**20** à 1 h est présentée sur la figure qui suit (Figure 28).

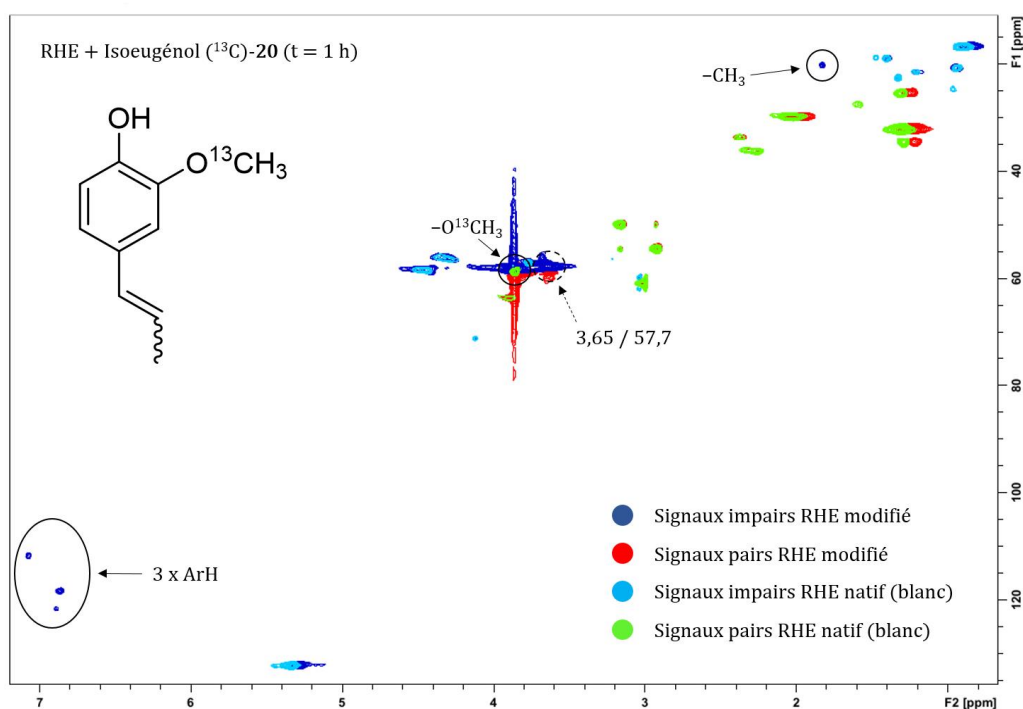


Figure 28. Spectre HSQC édité (superposé au blanc) de l'épiderme 24 h traité par (^{13}C)-**20**
Corrélations molécule de départ : cercles et flèches pleines ($\rightarrow \odot$) ; nouvelles corrélations : cercles et flèches en pointillés ($\rightarrow \odot$) ; les déplacements chimiques $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ des nouvelles corrélations sont exprimés en ppm

Après 1 d'incubation, tous les signaux correspondant au (^{13}C)-isoeugénol de départ ne sont pas visible sur le spectre 2D HSQC édité. Alors que la corrélation du carbone substitué ($-\text{O}^{13}\text{CH}_3$, δ 3,86/58,2 ppm), celle du méthyl terminal ($-\text{CH}_3$, δ 1,82/20,4 ppm) et celles des protons et carbones aromatiques (Ar-H) sont identifiées, les corrélations qui correspondent aux protons et carbones allyliques de la chaîne latérale ($-\text{CH}=\text{CH}-$) ne sont pas visibles. Les corrélations observées à 1 h le sont à 24 h. Néanmoins, leur intensité a nettement diminuée. Il semblerait donc que l'isoeugénol soit, du moins en partie, pris en charge par les épidermes reconstruits.

Dès 1 h d'incubation, nous constatons l'apparition d'une nouvelle tache de corrélation impaire à 3,65/57,7 ppm. Au vu de sa parité et de la région spectrale dans laquelle elle se situe, cette tache a été attribué à un carbone méthoxylique ($-\text{O}^{13}\text{CH}_3$). Après 24 h, cette tache, toujours bien présente, semble même s'intensifier.

II.2.C. Isoeugénol versus eugénol ou pré- versus pro-haptène

En l'absence de tache de corrélation paire pouvant être attribuée à la formation de formaldéhyde ou de méthanediol, nous pouvons estimer que, contrairement à l'eugénol, l'isoeugénol n'est pas pris en charge par une mono-oxygénase à cytochrome P450 sur le modèle RHE (**Figure 29**).

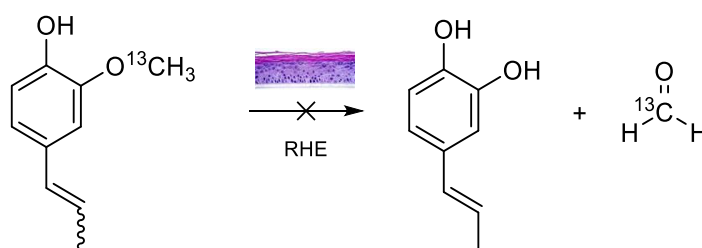


Figure 29. Modèle RHE : l'isoeugénol (^{13}C)-**20** n'est pas pris en charge par une mono-oxygénase à CYP450

Il est fort intéressant de constater que la voie métabolique de l'isoeugénol sur le modèle RHE diffère de celle de son isomère l'eugénol. Si le second est pris en charge par une mono-oxygénase à CYP450 via une réaction de O-déméthylation conduisant à un catéchol pouvant être oxydé en orthoquinone réactive, ce n'est pas le cas du premier puisque seule une nouvelle tache de corrélation impaire à 3,65/57,7 ppm est observée. En nous basant sur les travaux précédemment effectués sur le créosol et l'eugénol, deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer l'apparition de cette nouvelle tache de corrélation.

Hypothèse 1 : passage par une *para*-méthylène quinone réactive

L'isoeugénol pourrait être oxydé directement par voie enzymatique au moyen d'une peroxydase en *para*-méthylène quinone. Cette dernière, réactive vis-à-vis des protéines épidermiques, serait sujette par sa chaîne aux additions nucléophiles 1,6 ou 1,8. Le carbone substitué ($-O^{13}CH_3$) conserverait sa parité (impaire) mais verrait son déplacement chimique influencé (**Figure 30**).

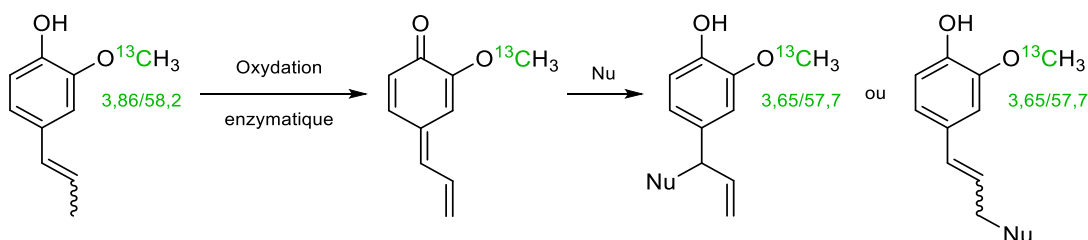


Figure 30. Hypothèse 1 : oxydation de l'isoeugénol (^{13}C)-**20** en *para*-méthylène quinone réactive

Hypothèse 2 : formation d'un dimère

L'action d'une peroxydase sur le (^{13}C)-isoeugénol pourrait conduire à la formation, par un mécanisme radicalaire, d'un dimère symétrique. Cette seconde hypothèse permettrait également au carbone substitué ($-O^{13}CH_3$) de conserver sa parité (impaire) tout en influençant la valeur de son déplacement chimique (**Figure 31**).

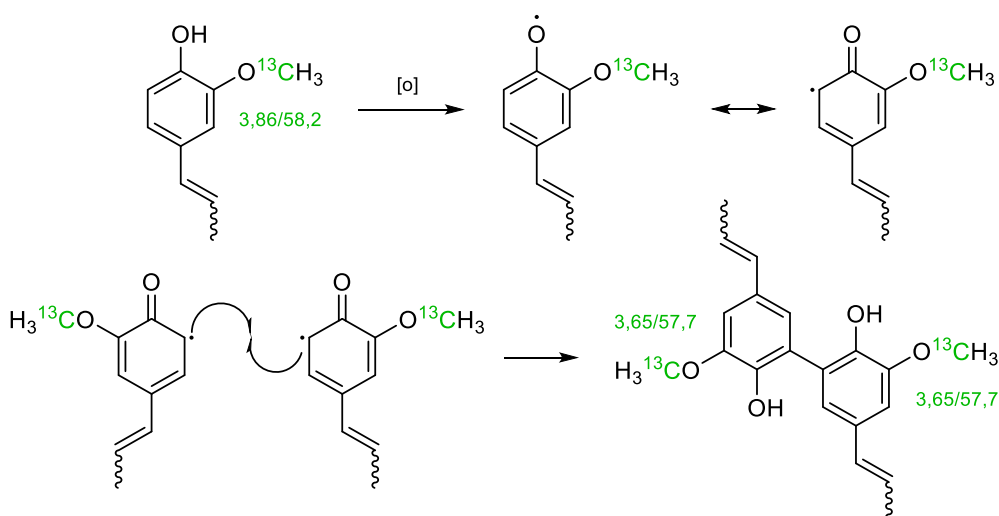


Figure 31. Hypothèse 2 : dimérisation de l'isoeugénol (^{13}C)-**20** sous l'action oxydant d'une peroxydase

La synthèse en série doublement substituée au carbone 13 de l'isoeugénol en substituant le carbone méthoxylique et le carbone benzylique, suivie de son application sur les épidermes reconstruits HRMAS permettrait de rapidement valider une des deux hypothèses. Cependant, faute de temps, cette synthèse n'a pas été réalisée.

Dans le but de comparer la réactivité des espèces intermédiaires supposées réactives dans le cas de l'application de l'eugénol et de l'isoeugénol sur le modèle RHE, nous avons cherché à synthétiser la *para*-méthylène quinone pouvant être formée par oxydation de l'isoeugénol. Une fois obtenue, cette *para*-méthylène quinone aurait été mise en réaction en solution avec différents modèles (acides aminés et peptides). Malheureusement, les tests d'oxydation menés en présence d'oxyde d'argent ont conduit exclusivement à la formation de deux dimères **20a** et **20b** de l'isoeugénol et, par conséquent, à l'impossibilité de mener à bien les tests de *in vitro* de réactivité (**Figure 32**).

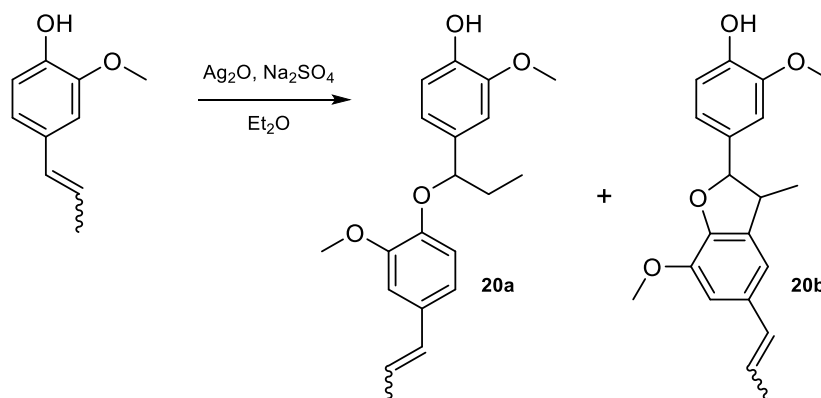


Figure 32. Oxydation de l'eugénol **20** conduisant à la formation des dimères **20a** et **20b**

Le mécanisme suivant permet d'expliquer la formation des dimères **20a** et **20b** (**Figure 33**).

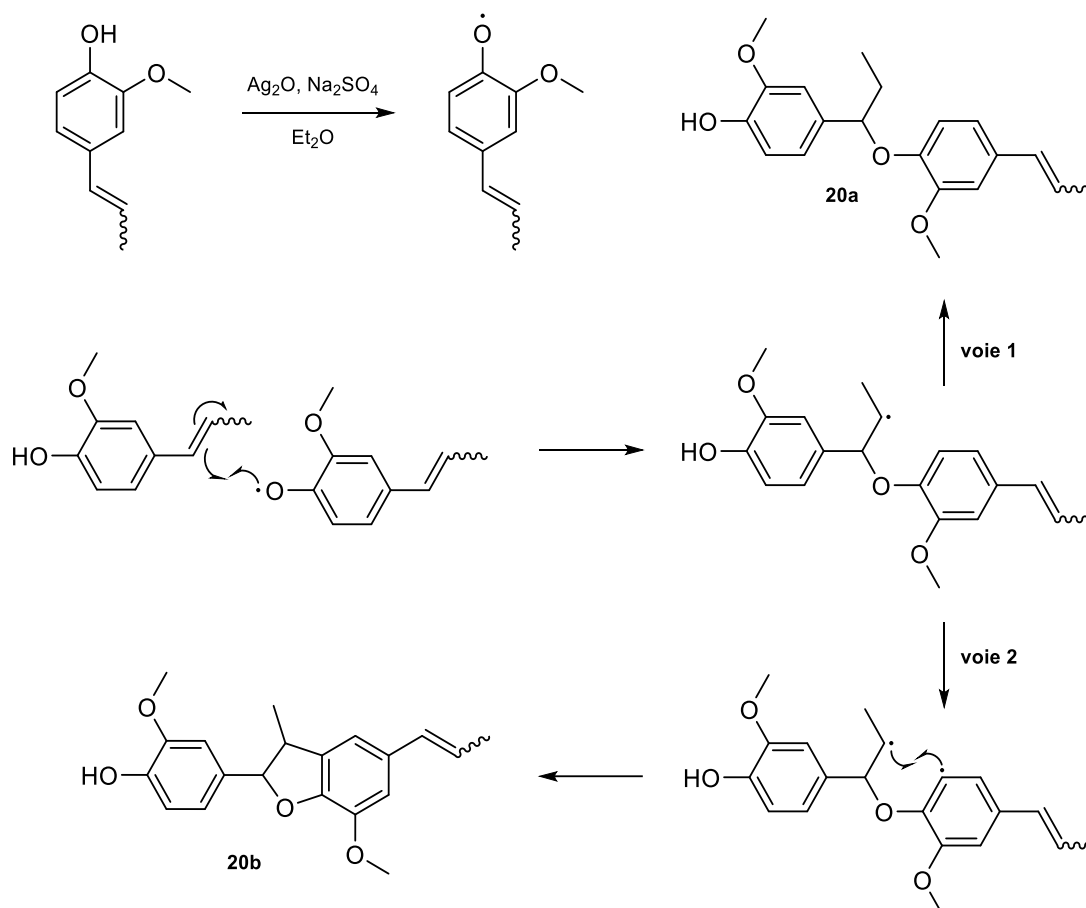


Figure 33. Mécanisme de formation des composés **20a** et **20b**

La première étape consiste en une oxydation à un électron conduisant à la formation d'un radical phénoxyle. Ce radical peut alors réagir avec la chaîne allylique de l'isoeugénol (^{13}C)-**20** et conduire au dimère **20a** (voie 1). L'abstraction d'un second hydrogène présent sur le cycle phénolique du dimère formé peut conduire à une espèce bis-radicalaire capable de réagir de manière intramoléculaire pour conduire au composé **20b** (voie 2). Suivant ce mécanisme, la para-méthylène quinone d'intérêt n'est à aucun moment formée. Cette dimérisation de l'isoeugénol n'est pas réellement surprenante puisque de précédentes études réalisées au laboratoire y font référence.^[265] Néanmoins, il semblerait qu'elle soit tout sauf anodine dans le phénomène d'allergie de contact à l'isoeugénol. En effet, le dimère **20b** a été évalué, d'après le GPMT et d'après une version modifiée du LLNA, comme étant un allergène modéré.^[278]

En conclusion, l'application de l'isoeugénol (^{13}C)-**20** sur le modèle RHE va dans le sens des propositions émises par Bertrand *et al.* En effet, si elle ne constitue pas une preuve absolue, l'absence de formaldéhyde (ou de méthannediol) conforte l'idée que l'isoeugénol n'est pas pris en charge *in situ* par une mono-oxygénase à cytochrome P450 via une réaction de O-déméthylation. Plus facilement

oxydable que son isomère l'eugénol, l'isoeugénol semble être préférentiellement métabolisé sous la forme d'une *para*-méthylène quinone. Cette idée est confortée par le fait que l'isoeugénol est un pré-haptène capable de subir une auto-oxydation par simple contact avec le dioxygène environnant. *A contrario*, l'oxydation de l'eugénol en *para*-méthylène quinone est plus difficile puisqu'elle passe obligatoirement par l'action enzymatique d'une peroxydase.^[110] Il s'ensuit nécessairement une compétition enzymatique entre, d'un côté, une peroxydase et, de l'autre, une mono-oxygénase à CYP450.

Concernant la seule tache de corrélation observée par RMN HRMAS, elle nous laisse imaginer deux possibilités. Selon la première, l'isoeugénol pourrait être oxydé (enzymatiquement ou non) en *para*-méthylène quinone réactive vis-à-vis des résidus nucléophiles des protéines épidermiques. D'après la seconde, l'isoeugénol dimériserait. Cette dimérisation rapide, également observée en solution, pourrait résulter ou non de l'action d'une peroxydase. Encore une fois, la contribution du dimère au phénomène d'allergie de contact à l'isoeugénol n'est certainement pas négligeable (**Figure 34**).

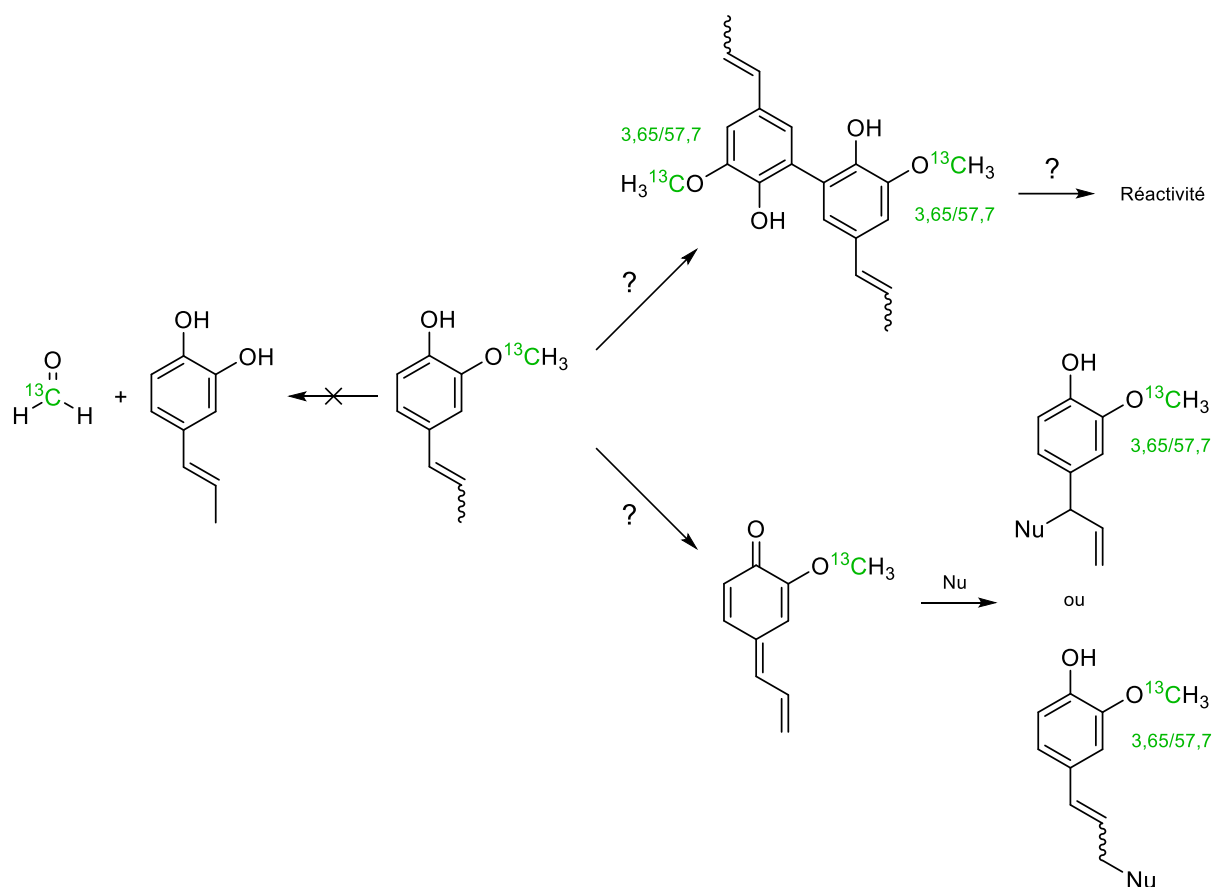


Figure 34. Prise en charge de l'isoeugénol (^{13}C)-**20** sur le modèle RHE

III. Conclusion

L'étude des interactions des dérivés *para*-alkylphénols, l'eugénol et l'isoeugénol, avec le modèle RHE de SkinEthic® est riche en enseignements. Initialement, nous sommes partis du postulat que ces dérivés sont de bons substrats des peroxydases capables de les activer sous la forme de *para*-méthylène quinones réactives vis-à-vis des protéines épidermiques. Cette affirmation paraît être vérifiée pour l'isoeugénol qui est un pré-haptène facilement oxydable, mais pas pour son isomère, l'eugénol, qui est un pro-haptène. En effet, la prise en charge de l'eugénol par les peroxydases semble aboutir à la formation d'un dimère. L'eugénol suivrait préférentiellement la voie de métabolisation du créosol puisque son application en série doublement substituée au carbone 13 a montré la formation de méthanediol. Cette observation met en évidence que le pro-haptène est métabolisé par une mono-oxygénase à cytochromes P450 (EC 1.14) via une réaction de O-déméthylation conduisant probablement à la formation d'un catéchol pouvant être oxydé en orthoquinone réactive. En outre, la détection de méthanediol confirme encore une fois l'activité importante des cytochromes P450 au sein du modèle RHE.

De manière très intéressante, l'isoeugénol ne semble pas suivre la même voie métabolique que son isomère l'eugénol. Ainsi, l'application de l'isoeugénol sur les épidermes reconstruits n'a pas montré la formation de méthanediol. Il semblerait donc que l'isoeugénol soit directement oxydé sous la forme d'une *para*-méthylène quinone réactive. Cette oxydation peut être réalisée par voie enzymatique au moyen d'une peroxydase (EC 1.11), ou par simple contact du pré-haptène avec le dioxygène environnant. Cette divergence au niveau du mode de prise en charge privilégié par chacun des deux allergènes est, à n'en point douter, à l'origine de leur différence de potentiel sensibilisant.

Chapitre IV

Synthèse de dérivés de type corticostéroïde
substitués au carbone 13 et étude préliminaire de leurs
interactions avec un modèle d'épiderme reconstruit

Chapitre IV

Synthèse de dérivés de type corticostéroïde substitués au carbone 13 et étude préliminaire de leurs interactions avec un modèle d'épiderme humain reconstruit

Dans ce quatrième et dernier chapitre de thèse est décrite l'étude des interactions de dérivés de type corticostéroïde (cortexolone et 16 α -méthylcortexolone) avec le modèle RHE de SkinEthic®. L'allergie cutanée aux corticostéroïdes est une réalité qui a longtemps été méconnue et qui pose un réel problème thérapeutique. En effet, les corticostéroïdes sont des molécules très efficaces pour soulager les patients atteints d'allergie de contact mais également sensibilisantes. Que faire donc quand le corticostéroïde nécessaire à une action thérapeutique est lui-même capable de provoquer une allergie de contact ? Une des réponses à cette question passe par la compréhension des mécanismes moléculaires qui régissent l'allergie de contact aux corticostéroïdes.

D'un point de vue chimique, les dérivés corticostéroïdiens choisis pour nos études sont des pro-haptènes dont l'activation semble être réalisée par oxydation au moyen d'une alcool déshydrogénase. Au laboratoire de Dermatochimie, leur réactivité en solution vis-à-vis de modèles a précédemment été étudiée. La technique de la RMN HRMAS se propose donc de s'intéresser à leur comportement *in situ* dans des épidermes reconstruits.

I. Les corticostéroïdes, naturels et de synthèse

I.1. Introduction et généralités

Les corticostéroïdes (ou corticoïdes) naturels sont une famille d'hormones stéroïdes synthétisées par la corticosurrénale, partie superficielle des glandes surrénales situées chez l'Homme au-dessus des reins. Ils jouent un rôle important dans le métabolisme protidique et glucidique (glucocorticostéroïdes), dans la régulation de l'eau et du sel (minéralocorticostéroïdes), et dans le développement du caractère sexuel (corticostéroïdes androgènes). Ils agissent également sur la circulation des cellules immunitaires comme les lymphocytes et altèrent l'intensité de leurs réponses immunitaires. Ainsi, les corticostéroïdes sont capables de prévenir ou de supprimer des inflammations

liées à différents *stimuli* en manifestant d'impressionnantes capacités anti-inflammatoires, immunosuppressive et antiprolifératives.^[279] Bien que les corticostéroïdes n'agissent pas directement sur les causes qui sont à l'origine de l'inflammation, ils sont capables de la réduire efficacement. Pour ces raisons, les corticostéroïdes se sont révélés être des substances actives cliniquement très intéressantes et souvent incontournables.

En 1952, une thérapie topique basée sur l'utilisation de glucocorticostéroïdes a constitué une révolution dans le traitement des maladies infectieuses.^[280] Son développement prit une vingtaine d'année entre l'obtention du premier stéroïde efficace, l'hydrocortisone, et la découverte en 1932 de la structure du cholestérol, précurseur de tous les stéroïdes (**Figure 1**). Cette avancée médicale dans le traitement des maladies inflammatoires s'est rapidement accompagnée de la synthèse de nouveaux dérivés de plus en plus actifs.^[281]

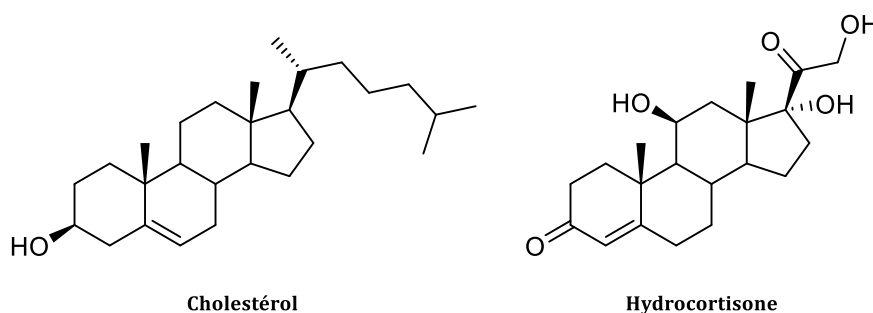


Figure 1. Précurseurs des corticostéroïdes synthétiques

De manière générale, les corticostéroïdes naturels et de synthèse dérivent tous du même stérol, le cholestérol. Chimiquement, ils sont constitués d'un squelette carboné tétracyclique, le cyclopentanophénanthrène, portant différentes fonctions, insaturations et/ou chaînes latérales. La numérotation utilisée est identique à celle utilisée pour le cholestérol. Un stéroïde de 19 carbones est communément nommé « androstane », et un stéroïde possédant 21 carbones est appelé « prégnane » (**Figure 2**).

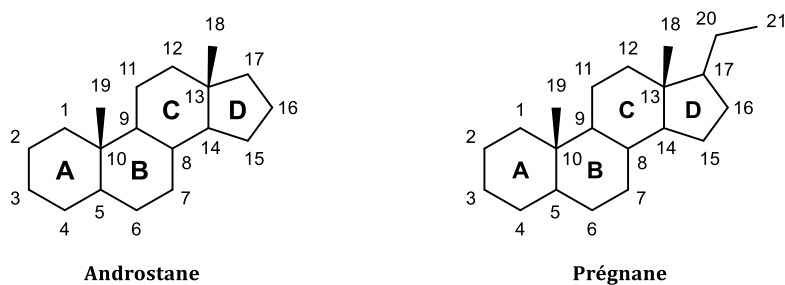


Figure 2. Numérotation des noyaux androstane et prégnane

La stéréochimie des corticostéroïdes est importante et ils possèdent deux faces distinctes α (alpha) et β (bêta) correspondant, respectivement, à la face située en dessous et au-dessus du plan médian (**Figure 3**).

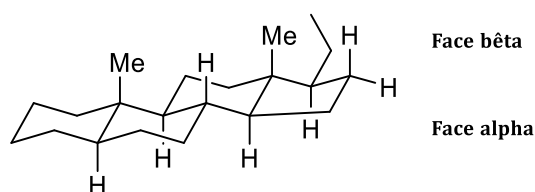


Figure 3. Stéréochimie des stéroïdes de type prégnane

I.2. Allergie et allergie croisée aux corticostéroïdes

La découverte de l'efficacité des corticostéroïdes a constitué une avancée thérapeutique majeure qui entraîna le développement et la commercialisation massive de ces composés anti-inflammatoires, en particulier sous la forme de préparations à application topique. L'activité pharmacologique des corticostéroïdes a été améliorée par l'arrivée de nouveaux dérivés synthétisés à partir de l'hydrocortisone. Au fur et à mesure de l'apparition de nouvelles molécules, un classement en fonction de leur efficacité a été établi.^[282] Ce classement est composé de quatre niveaux, allant du niveau I pour les composés à activité réduite, jusqu'au niveau IV pour les produits les plus puissants.^[283] Aujourd'hui, les glucocorticostéroïdes en application cutanée ont une place dans le traitement des affections prolifératives (psoriasis), auto-immunes (lupus érythémateux), tumorales (mycosis fongoïde) et inflammatoires (eczéma).^[284] Leur utilisation est malheureusement associée à l'apparition de nombreux effets secondaires indésirables (atrophie cutanée, rosacée, hypertrichose, vergetures, etc.). Paradoxalement, l'allergie de contact fait également partie intégrante de la liste des réactions secondaires.^[285,286]

Il faut remonter à 1959 pour trouver trace d'un des premiers cas d'allergie de contact aux corticostéroïdes suite à l'utilisation d'hydrocortisone par voie cutanée.^[287] Mais ce n'est qu'à partir de la fin des années 80 que le nombre de publications à propos du phénomène a fortement augmenté.^[288,289] Avant cette période, les réactions d'allergie cutanée causées par les corticostéroïdes étaient clairement négligées et parfois niées par les dermatologues. Il semblait en effet difficile de concevoir qu'une substance anti-inflammatoire, utilisée dans le traitement de l'allergie de contact, puisse elle-même être capable d'en induire une. De plus, du fait de leurs effets anti-inflammatoire, les signes cliniques de dermatite de contact aux corticostéroïdes sont rarement spectaculaires, souvent masqués et difficile à reconnaître.^[290] Si la lecture des tests épicutanés aux corticostéroïdes est complexe, on estime aujourd'hui entre 0,2 et 5 % le nombre de patients souffrant d'eczéma et sensibilisés aux dérivés corticostéroïdiens.^[291] Les corticostéroïdes s'inscrivent donc au rang des allergènes les plus courants et, en 2005, ils ont été reconnus comme allergènes de l'année par l'American Contact Dermatitis Society.^[292]

La plupart des patients allergiques aux corticostéroïdes présentent des réactions positives multiples à ces molécules. Il peut s'agir de réactions dites « concomitantes » chez des patients qui se sont appliqués plusieurs topiques corticostéroïdes et qui se sont successivement sensibilisés aux diverses molécules. Cependant, l'obtention de réactions positives vis-à-vis de corticostéroïdes qui ne sont pas encore commercialisés montre l'existence de réactions d'allergie croisées entre corticostéroïdes.^[293] En 1989, l'analyse statistique des résultats issus de tests épicutanés a abouti à une hypothèse selon laquelle les réactions croisées se produiraient principalement au sein de certains groupes de corticostéroïdes.^[294] Les auteurs ont ainsi distingué quatre groupes nommés par les lettres A, B, C et D.

- **Le groupe A** : de type hydrocortisone. Ce groupe comprend les stéroïdes qui présentent un groupement hydroxyle libre en position 17. Exemples : l'hydrocortisone et le pivalate de tixocortol (**Figure 4**).

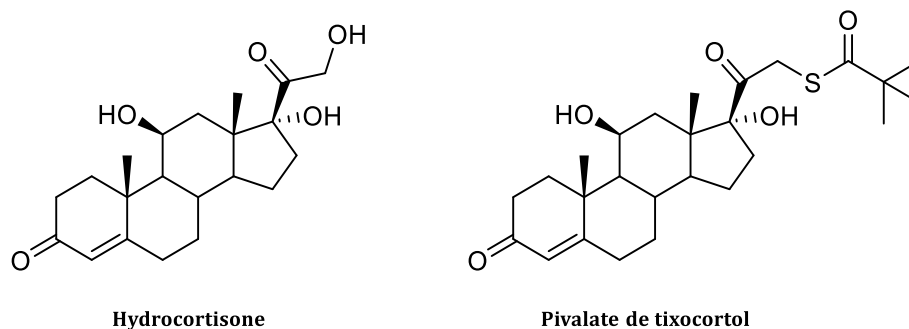


Figure 4. Exemples de molécules du groupe A

- **Le groupe B** : de type acétonide de triamcinolone. Les molécules appartenant à ce groupe possèdent un groupement cis-diol en position 16 et 17 α ponté par un acétal ou un cétal. Exemples : l'acétonide de triamcinolone et le budésonide (**Figure 5**).

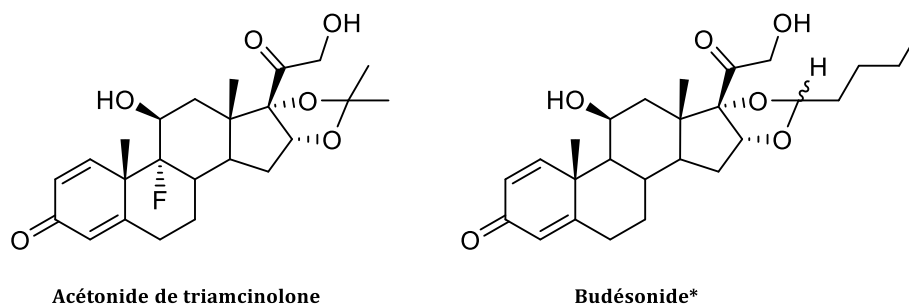


Figure 5. Exemples de molécules du groupe B

** Le budésonide fait partie du groupe B bien qu'il soit impliqué dans des allergies croisées avec des molécules du groupe D^[295]*

- **Le groupe C** : de type bétaméthasone. Ce groupe comprend les stéroïdes substitués en position 16 par un méthyle. Exemple : la bétaméthasone (**Figure 6**).

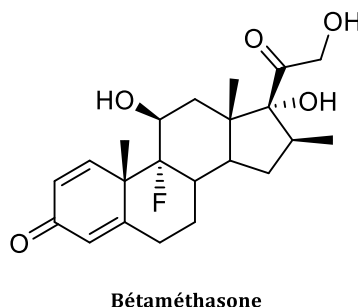


Figure 6. Exemple d'une molécule du groupe C

- **Le groupe D** : de type 17-butyrate d'hydrocortisone. Ce groupe contient les stéroïdes dont les alcools en position 17 et/ou 21 sont estérifiés. Exemples : la 17-valérate de bétaméthasone et la 17-butyrate d'hydrocortisone (**Figure 7**).

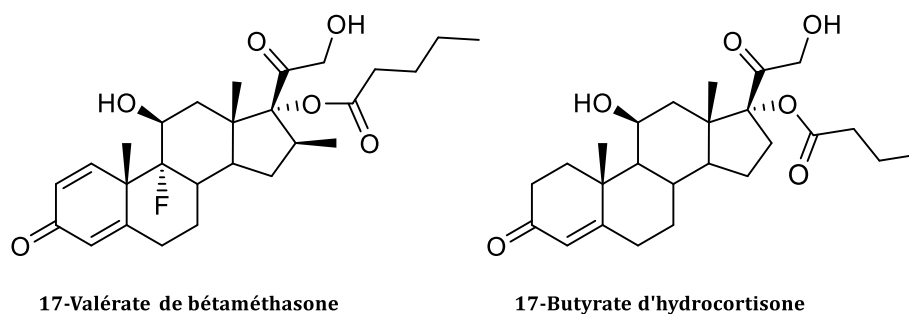


Figure 7. Exemples de molécules du groupe D

En 1995, ce modèle de classification a été appuyé par une analyse conformationnelle assistée par ordinateur.^[296] Cette étude a montré que les molécules d'un même groupe présentaient des structures similaires qui pouvaient expliquer leur réactivité commune. De plus, les différences de conformation des corticostéroïdes d'un groupe par rapport à l'autre confirment le peu de réactions croisées entre les classes A, B et D. Seul le groupe C semble différent puisque des corticostéroïdes le composant induisent peu d'eczéma de contact alors qu'ils ne diffèrent des molécules du groupe A que par le méthyle en position 16.

En 2000, Goossens *et al.* ont proposé une subdivision du groupe D en deux sous-catégories.^[297] La première, nommée D1, rassemble les composés substitués en position 16 et halogénés. La seconde, la D2, réunit les molécules non méthylées en position 16 et non halogénées. Ainsi, selon cette classification, le 17-valérate de bétaméthasone fait partie du groupe D1, tandis que le 17-butyrate d'hydrocortisone est classé dans le groupe D2.^[298] Cette classification des corticostéroïdes est aujourd'hui encore utilisée bien que des propositions d'ajustement aient été émises depuis.^[299]

I.3. Cortexolone, 16-méthylcortexolone et métabolisme

Aujourd'hui encore, les mécanismes impliqués dans le phénomène d'allergie de contact aux dérivés corticostéroïdiens restent obscures. Les corticostéroïdes possèdent généralement sur le cycle D un motif α -hydroxycétone potentiellement réactif. Néanmoins, il semblerait qu'ils réagissent préférentiellement via un motif α -cétoaldéhyde, généré par métabolisme, sur la chaîne latérale en position 17.^[289,300] Pour cette raison, les corticostéroïdes sont aujourd'hui considérés comme des pro-haptènes. Les corticostéroïdes possèdent sous leur forme oxydée, en raison du motif α -cétoaldéhyde, deux centres électrophiles (carbonyle en position 20 et aldéhyde en position 21) tous deux susceptibles de réagir avec les résidus nucléophiles des protéines épidermiques (Figure 8).

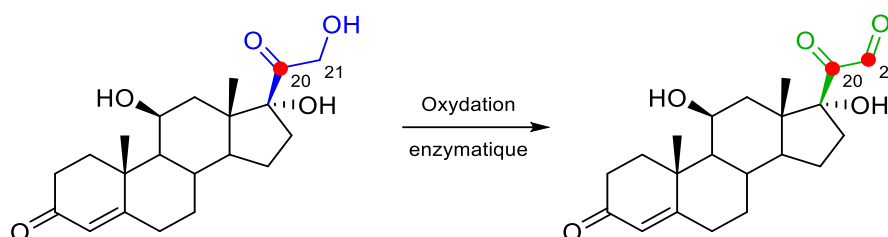
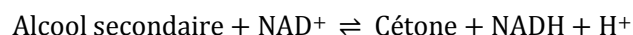
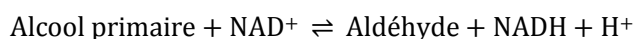


Figure 8. Métabolisation de l'hydrocortisone : oxydation du motif α -hydroxycétone en motif α -cétoaldéhyde

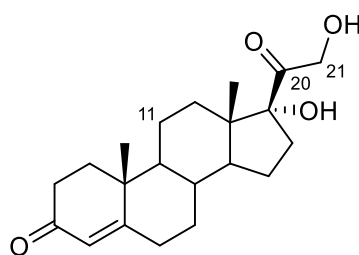
Les sites potentiellement réactifs sont signalés par un point rouge (•)

Les enzymes les plus à même de réaliser l'oxydation des corticostéroïdes sont sans nul doute les alcools déshydrogénases (EC 1.1.1.1). Les alcools déshydrogénases sont des oxydoréductases (EC 1), présentes dans de nombreux organes,^[301] notamment dans la peau,^[65,302] et responsables du métabolisme de nombreux xénobiotiques.^[80,303–305] NADH-dépendantes, elles catalysent la conversion des alcools primaires et secondaires en aldéhydes et cétones suivant les réactions ci-dessous.^[306]



Nous nous proposons d'étudier par la technique RHE/RMN HRMAS le comportement *in situ* de dérivés corticostéroïdiens dont les positions 20 ou 21 seront substituées au carbone 13. Il s'agit donc, dans un premier temps, d'observer la possible activation/oxydation des corticostéroïdes puis, dans un second, d'identifier la nature des adduits haptène-protéine formés et responsables du phénomène d'allergie de contact. Les alcools déshydrogénases, présentes et actives dans le modèle RHE,^[138] pourraient être en mesure de générer le motif α -cétoaldéhyde supposé réactif.

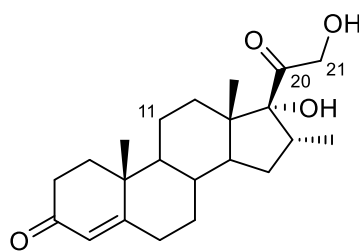
Concernant l'allergie de contact aux corticostéroïdes, l'hydrocortisone est, aujourd'hui encore, une molécule de référence. En effet, elle fut la première utilisée comme anti-inflammatoire à application topique, mais également la première à induire des eczémas de contact. De plus, elle présente l'avantage d'avoir une structure relativement simple par rapport aux autres dérivés corticostéroïdiens synthétisés par la suite. Cependant, de précédentes études menées au laboratoire ont montré que l'alcool en position 11 confère une certaine instabilité à ses intermédiaires de synthèse.^[307] Pour cette raison, sa synthèse en série substituée au carbone 13 est délicate. Nos travaux se basent donc sur la synthèse et l'étude d'un analogue très proche de l'hydrocortisone, la cortexolone. La cortexolone, également appelée 11-désoxycortisone ou 11-désoxycortisol, présente une synthèse simplifiée puisqu'elle ne possède pas de fonction hydroxyle en position 11 (**Figure 9**).



Cortexolone

Figure 9. Cortexolone, analogue de l'hydrocortisone

D'un autre côté, les tests épicutanés montrent clairement que les corticostéroïdes du groupe C induisent moins d'allergie de contact que ceux du groupe A.^[308] Afin d'en comprendre les raisons, nous nous sommes également intéressés au devenir, au sein des épidermes reconstruits, d'un analogue de la bétaméthasone, la 16 α -méthylcortexolone (**Figure 10**).

16 α -Méthylcortexolone**Figure 10.** 16 α -Méthylcortexolone, analogue de la bétaméthasone

Contrairement à la cortisolone, la 16 α -méthylcortexolone possède en position 16 un groupement méthyle qui induit un encombrement stérique au niveau du motif α -hydroxycétone/ α -cétoaldéhyde. Des études menées au laboratoire se sont intéressées à la réactivité des deux corticostéroïdes.^[309,310] Menées en solution sur des modèles (acides aminés et peptides) et suivies par RMN du liquide, les études ont montré, d'une part, que la forme oxydée de la cortisolone et celle de la 16 α -méthylcortexolone réagissaient préférentiellement avec les résidus nucléophiles aminés, notamment l'arginine. D'autre part, la présence du méthyle en position 16 influençait la réactivité des deux molécules. Ainsi, l'arginine réagit avec la cortisolone pour former un adduit cyclique stable. *A contrario*, cet adduit cyclique n'est pas identifié lorsqu'une arginine réagit avec le motif α -cétoaldéhyde issu de la 16 α -méthylcortexolone. L'attaque nucléophile est bien observée en position 21, mais l'hémiaminal formé reste en équilibre avec l'imine correspondante (**Figure 11**).

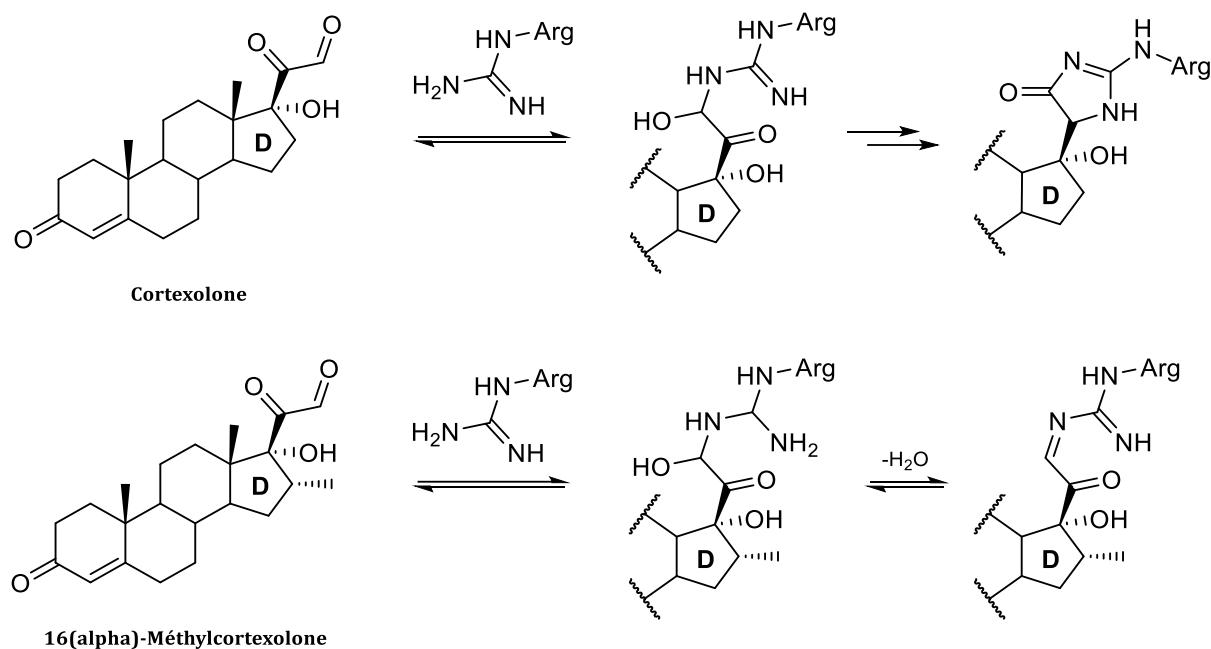


Figure 11. Réactivité en solution de la cortisolone et de la 16 α -méthylcortisolone sous leur forme oxydée vis-à-vis de l'arginine présente dans la structure de peptides

La comparaison de la réactivité de la cortisolone et de la 16 α -méthylcortisolone sur les épidermes reconstruit permettra de savoir, le cas échéant, si l'encombrement stérique sur le cycle D joue un rôle prédominant dans l'allergie de contact.

II. La cortisolone, dérivé de l'hydrocortisone

Dans le but d'étudier par RMN HRMAS le comportement de la cortisolone **21** sur les épidermes reconstruits, le corticostéroïde a été synthétisé en série substituée au carbone 13. Les positions 20 et 21 supposées réactives ont été substituées séparément. Ainsi, deux molécules, 20-(¹³C)-**21** et 21-(¹³C)-**21**, ont été préparées. La finalité est de pouvoir croiser les données recueillies en RMN HRMAS pour chacune des deux molécules afin d'obtenir le maximum d'informations sur la réactivité *in situ* de la cortisolone. La synthèse des deux molécules est directement inspirée de travaux précédemment publiés au laboratoire.^[311]

II.1. Synthèse en série substituée au carbone 13 en position 20

La synthèse de la cortéxolone substituée en position 20, nommée 20-(^{13}C)-**21**, est présentée ci-dessous (Figure 12).

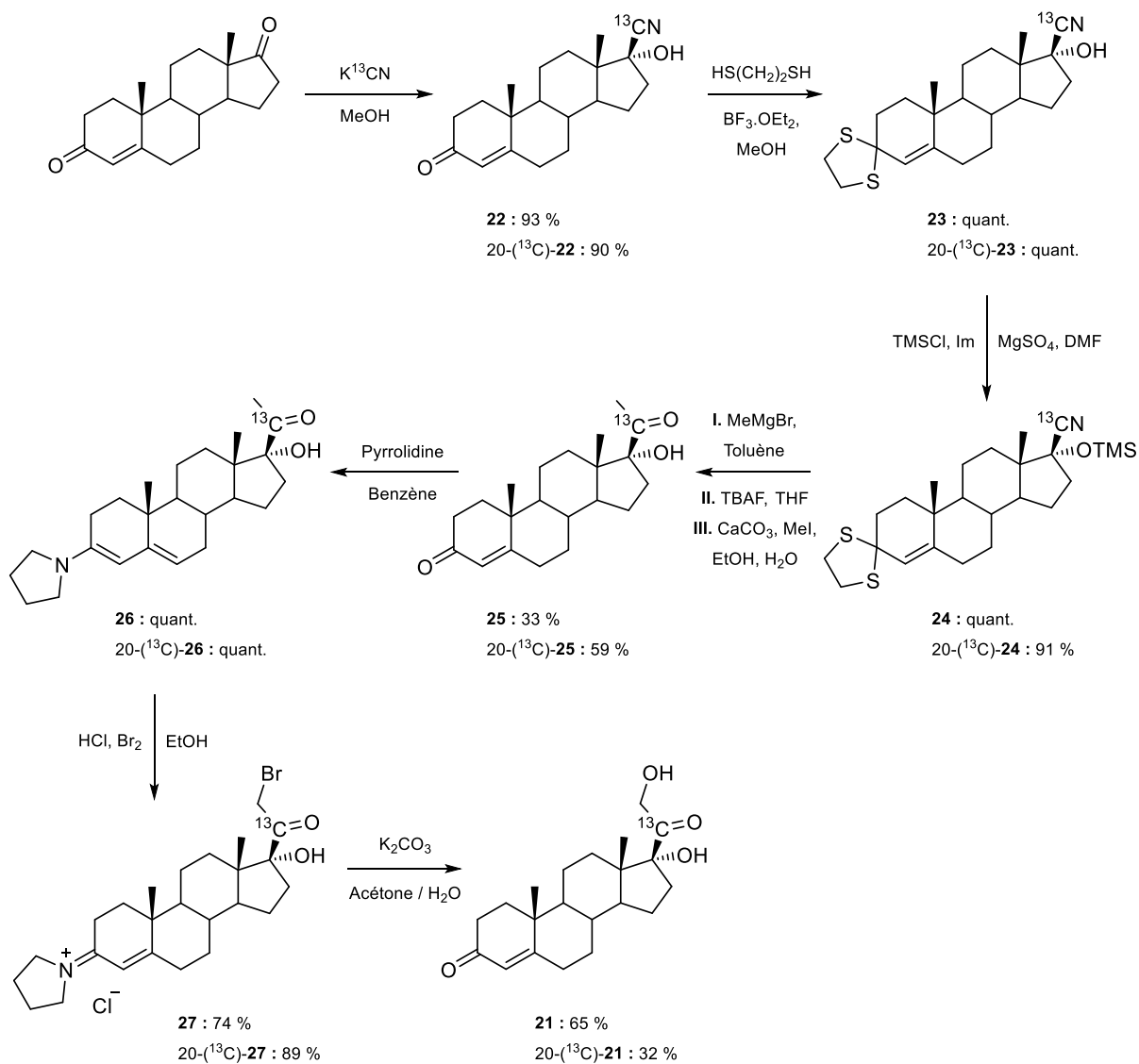


Figure 12. Synthèse de la cortéxolone 20-(^{13}C)-**21**

La synthèse de la cortexolone 20-(^{13}C)-**21** est réalisée en sept étapes à partir de l'androstènedione commerciale. La substitution au carbone 13 est introduite régiosélectivement en position 20 lors de la première étape grâce à une réaction de cyanation au moyen de (^{13}C)-cyanure de potassium. La cétone α,β -insaturée 20-(^{13}C)-**22** obtenue est protégée quantitativement sous la forme d'un dithioacétal cyclique 20-(^{13}C)-**23**. La fonction alcool du composé 20-(^{13}C)-**23** est également protégée en éther silylé via l'utilisation de chlorure de triméthylsilyle, d'imidazole et de sulfate de magnésium. La cyanhydrine diprotégée 20-(^{13}C)-**24** est obtenue avec un rendement de 91 %. Cette dernière est engagée dans une réaction de Grignard réalisée en présence de bromure de méthylmagnésium. Sans purification, le brut réactionnel est successivement traité par du fluorure de tétra-*n*-butylammonium, puis par du carbonate de calcium et de l'iodométhane, permettant ainsi la déprotection en chaîne des fonctions alcool et cétone. La méthylcétone 20-(^{13}C)-**25** résultante est ainsi générée avec un rendement, sur trois étapes, de 59 %. La cétone α,β -insaturée est ensuite protégée sous l'action de pyrrolidine en énamine 20-(^{13}C)-**26**. L'énamine est mise en réaction dans l'éthanol en présence d'acide chlorhydrique et de dibrome. Cette halogénéation conduit à la formation du sel de bromocétone 20-(^{13}C)-**27**. Finalement, le traitement du sel 20-(^{13}C)-**27** par un excès de carbonate de potassium dans un mélange acétone/eau (60/40) permet, « one-pot », d'assurer la déprotection de l'iminium tout en hydroxylant la position 21. La cortexolone 20-(^{13}C)-**21** est ainsi obtenue, lors de cette dernière étape de synthèse, avec un rendement de 32 %.

II.2. Synthèse en série substituée au carbone 13 en position 21

La synthèse de la cortexolone substituée en position 21, 21-(^{13}C)-**21**, également décrite dans la littérature,^[311] s'apparente fortement à celle de la cortexolone substituée en position 20 (**Figure 13**)

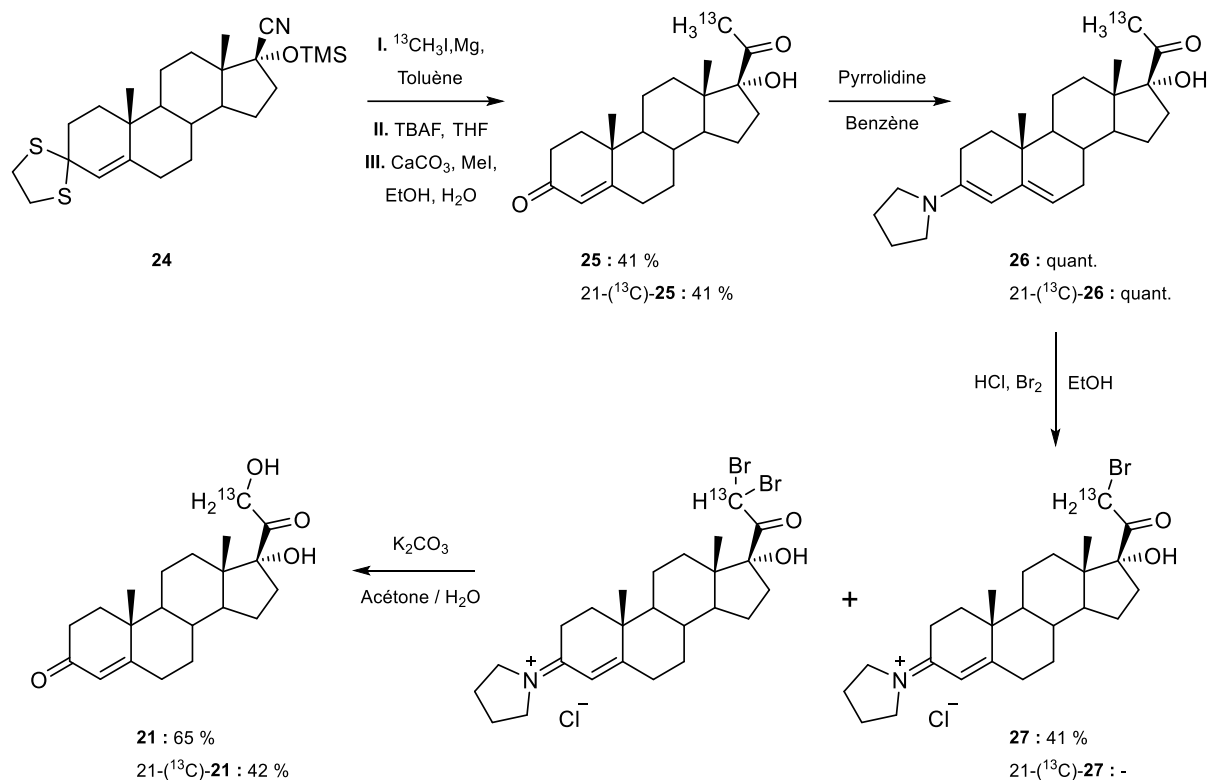


Figure 13. Synthèse de la cortexolone 21-(^{13}C)-21

Dans le cas de la substitution en position 21, la cyanhydrine diprotégée **24** est préparée comme précédemment. L'introduction du carbone 13 en position 21 est effectuée en utilisant un excès de iodure de méthylmagnésium substitué au carbone 13. Ce dernier est généré *in situ* grâce à des copeaux de magnésium, en suspension dans l'éther, auxquels est ajouté du (^{13}C)-iodométhane. Sans purification, le brut réactionnel est successivement traité par du fluorure de tétra-*n*-butylammonium, puis par du carbonate de calcium et du iodométhane, dans le but de déprotéger en chaîne les fonctions alcool et cétone. La méthylcétone 21-(^{13}C)-**25** résultante est ainsi générée avec un rendement, sur trois étapes, de 41 %. Bien que le (^{13}C)-iodométhane commercial utilisé soit enrichi au carbone 13 à hauteur de 99 %, il est intéressant de souligner que la méthylcétone 21-(^{13}C)-**25** n'est que partiellement substituée au carbone 13. Cette diminution de l'enrichissement peut être expliquée par un échange de méthyles entre l'organomagnésien $^{13}\text{CH}_3\text{MgI}$ et l'éther silylé $\text{R-O-Si}(\text{CH}_3)_3$ voisin lors de la réaction de Grignard qui conduit à la formation de la méthylcétone.^[312] La cétone α,β -insaturée 21-(^{13}C)-**25** est ensuite protégée en énamine 21-(^{13}C)-**26**, avant d'être mise en réaction dans l'éthanol en présence d'acide chlorhydrique et de dibrome. En série substituée, cette halogénéation conduit à la formation d'un mélange des sels α -mono- et α,α -dibromocétone difficilement purifiable. Le traitement de ce mélange par un excès de carbonate de potassium dans une solution acétone/eau (60/40) permet de récupérer la cortexolone 21-(^{13}C)-**21** avec un rendement de 42 %. La conversion de la

α,α -dibromocétone en α -hydroxycétone résulte d'une réaction cascade rapportée dans la littérature (**Figure 14**).^[313]

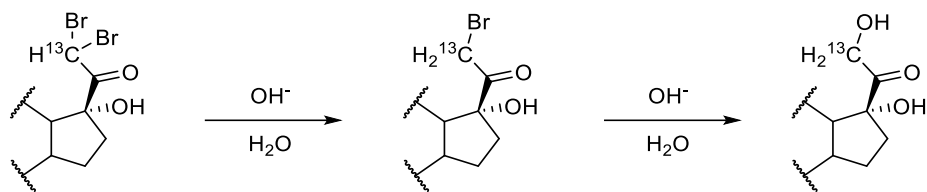


Figure 14. Réaction cascade conduisant à la formation de α -hydroxycétone au départ de la α,α -dibromocétone

II.3. Oxydation en 21-déhydrocorticostéroïde

Comme proposé en amont, il est aujourd'hui supposé que l'allergie de contact aux corticostéroïdes est en majeure partie due à la réactivité du motif α -cétoaldéhyde issu du métabolisme. Ainsi, dans le but d'être testé sur les épidermes reconstruits, le métabolite supposé réactif de la cortexolone, la 21-déhydrocortexolone **28**, a été synthétisé. Il est obtenu quantitativement par oxydation chimique à l'air de la cortexolone **21** au moyen d'acétate de cuivre (**Figure 15**).^[314]

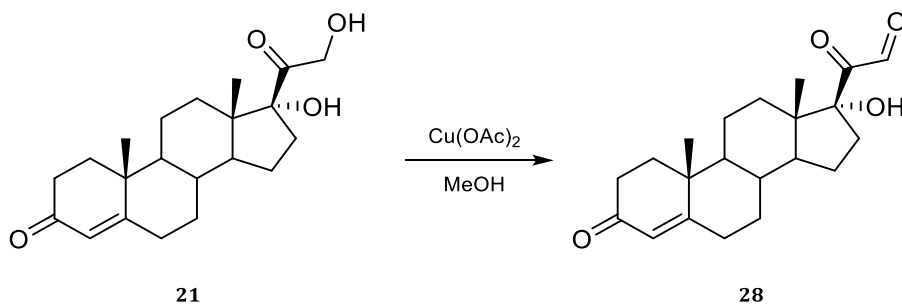


Figure 15. Oxydation chimique de la cortexolone en 21-déhydrocortexolone

En solution, dans le méthanol, la 21-déhydrocortexolone se présente en réalité sous la forme d'un dimère dont la structure est présentée sur la figure qui suit (**Figure 16**). La formation de cet hémiacétal dimérique peut être expliquée par un mécanisme simple où chacun des hydroxyles libres en position 17 réagit avec un des aldéhydes du motif α -cétoaldéhyde nouvellement formé.

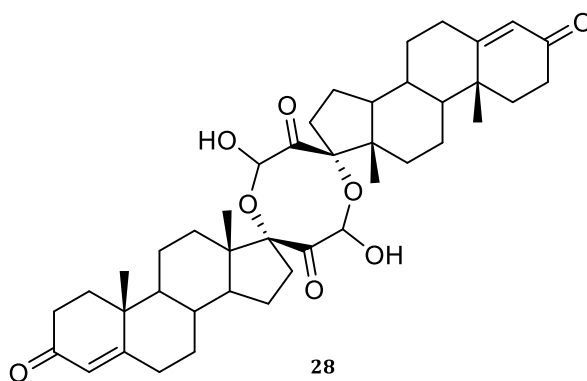


Figure 16. Dimère de la 21-déhydrocortisolone **28**

Les cortisolones substituées 20-(^{13}C)-**21** et 21-(^{13}C)-**21** ont à leur tour été oxydées, dans les mêmes conditions, en déhydrocortisolone (**Figure 17**).

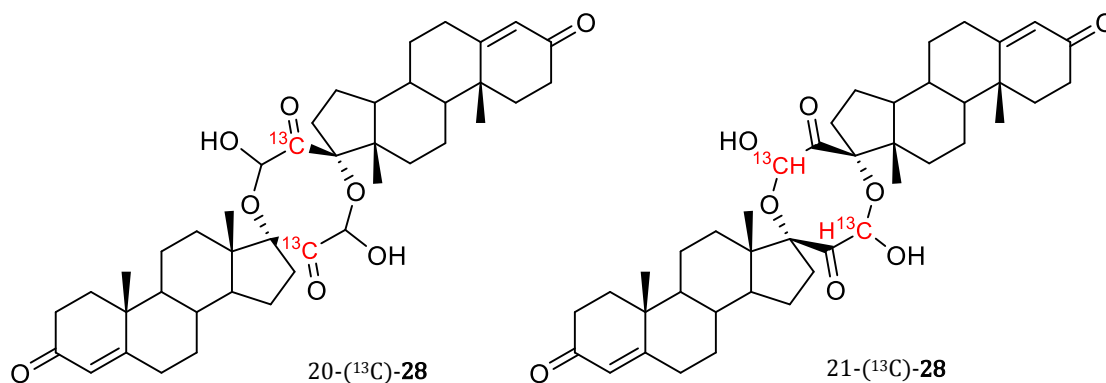


Figure 17. Dimères des 21-déhydrocortisolone 20-(^{13}C)-**28** et 21-(^{13}C)-**28**
obtenues toutes les deux avec des rendements quantitatifs

Toutefois, une étude menée en présence de 3-méthyl-2-benzotriazolinone (MTBH) a montré que, malgré cette structure, ces composés se comportent comme de parfaits aldéhydes.^[307,314] Ainsi, en utilisant un équivalent de dimère, la réaction mène à la formation de deux équivalents de l'hydrazone correspondante.

II.4. Applications sur le modèle RHE et premières observations

Les cortexolone 20-(^{13}C)-**21** et 21-(^{13}C)-**21** ont été appliquées sur le modèle RHE afin d'observer la possible activation/métabolisation de la cortexolone en 21-déhydrocortexolone. Dans le même temps, les dimères des déhydrocortexolones 20-(^{13}C)-**28** et 21-(^{13}C)-**28** ont également été appliqués sur les épidermes reconstruits dans le but d'observer l'éventuelle formation d'adduits entre le motif α -cétoaldéhyde et les protéines épidermiques. Ainsi, un total de quatre épidermes, tous incubés 24 heures, a été utilisé pour l'étude de la cortexolone et de son métabolite supposé :

- Cortexolone 20-(^{13}C)-**21**
- Cortexolone 21-(^{13}C)-**21**
- 21-Déhydrocortexolone 20-(^{13}C)-**28**
- 21-Déhydrocortexolone 21-(^{13}C)-**28**

Tous les composés ont été appliqués dans l'acétone à une concentration de 0,4 M. Conformément au protocole expérimental, un échantillon blanc non traité a également été préparé. Les échantillons ont été analysés par RMN HRMAS au moyen d'expériences monodimensionnelles ^1H CPMG et 1D ^{13}C . La superposition des spectres obtenus pour les échantillons traités par les cortexolones 20-(^{13}C)-**21** et 21-(^{13}C)-**21** avec le blanc est présentée ci-après (**Figure 18**).

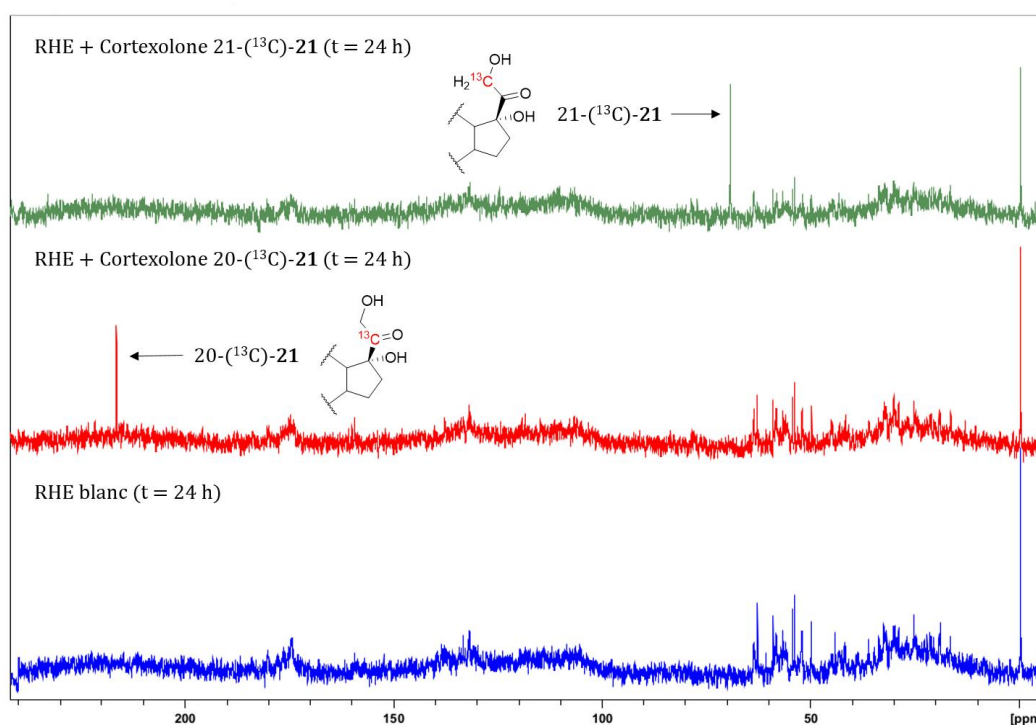


Figure 18. Superposition des spectres 1D ^{13}C de l'échantillon RHE blanc (bleu) et des échantillons RHE traités par les cortisolone 20-(^{13}C)-21 (rouge) et 21-(^{13}C)-21 (vert) à 24 h

La superposition des spectres 1D ^{13}C montre la présence, en relativement faible quantité, de la cortisolone de départ. Pour chacune des deux cortisolones, seul le signal correspondant à leur position initialement substituée au carbone 13 est visible. Ainsi, pour la cortisolone substituée en position 20, 20-(^{13}C)-21, nous détectons uniquement le signal du carbonyle R- $^{13}\text{C}(\text{O})\text{-CH}_2\text{OH}$ (δ 216,5 ppm). Pour la cortisolone substituée en position 21, 21-(^{13}C)-21, nous observons uniquement le signal de l'alcool primaire R-C(O)- $^{13}\text{CH}_2\text{OH}$ (δ 69,2 ppm). Les spectres 1D CPMG réalisés en début et en fin de chacune des deux expériences 1D ^{13}C sont marqués par l'absence totale de signaux pouvant être attribués aux cortisolones de départ. Très clairement, la concentration des produits au sein des épidermes reconstruits est faible.

Sur la figure qui suit est représentée la superposition des spectres obtenus pour les échantillons traités par les 21-déhydrocortisolones 20-(^{13}C)-28 et 21-(^{13}C)-28 avec le spectre du blanc (**Figure 19**).

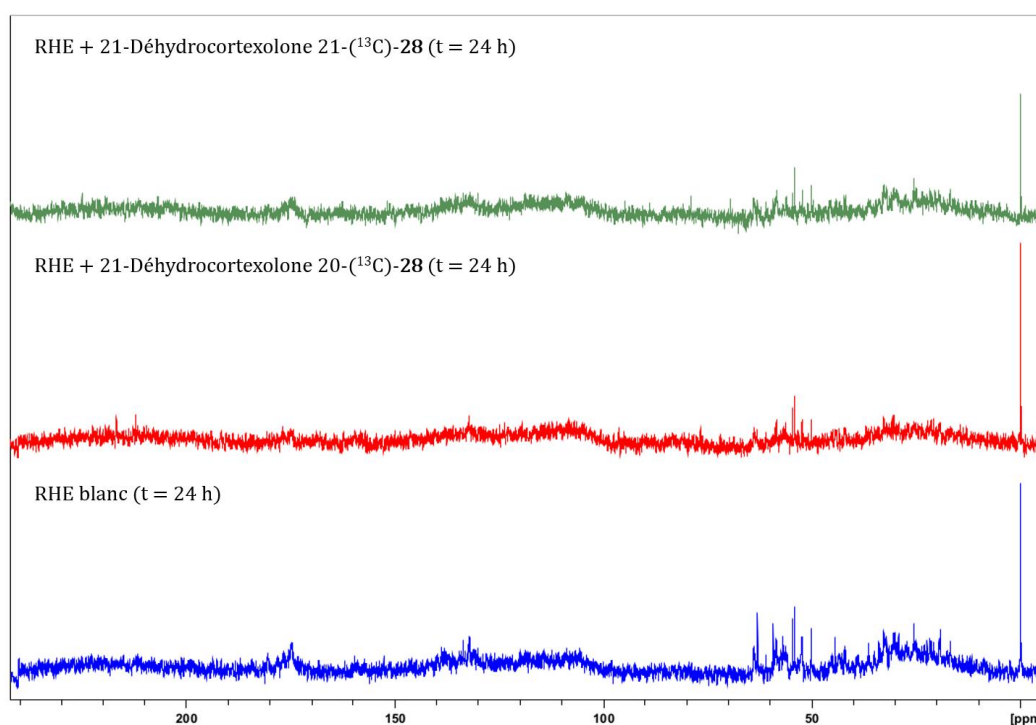


Figure 19. Superposition des spectres 1D ^{13}C de l'échantillon RHE blanc (bleu) et des échantillons RHE traités par les déhydrocortexolones 20- ^{13}C -**28** (rouge) et 21- ^{13}C -**28** (vert) à 24 h

La superposition des spectres 1D ^{13}C est dénuée de toute information puisqu'aucune différence n'est observée par rapport à l'échantillon RHE blanc non traité. Les spectres 1D CPMG n'apportent pas plus d'éléments car ils sont eux aussi marqués par l'absence des signaux pouvant correspondre, de près ou loin, à un quelconque dérivé corticostéroïdien. Encore une fois, la concentration des produits au sein des épidermes reconstruits semble tellement faible qu'elle ne permet pas leur détection par RMN HRMAS.

A ce stade, et compte tenu des informations en notre possession, il semblerait que les dérivés de type corticostéroïde, qu'il s'agisse des cortexolones 20- ^{13}C -**21** et 21- ^{13}C -**21** ou des déhydrocortexolones 20- ^{13}C -**28** et 21- ^{13}C -**28**, n'aient pas pénétré correctement dans les épidermes reconstruits. Cette impression est renforcée par la présence visuelle de dépôts solides en surface des épidermes reconstruits. Les corticostéroïdes sont connus pour pénétrer difficilement à travers la couche cornée. Ainsi, la négativité de certains tests épicutanés a été attribuée à cette faible pénétration épidermique.^[315] Même si les épidermes reconstruits possèdent une couche cornée moins efficace que le stratum corneum de l'épiderme,^[139,140] il semblerait qu'elle puisse néanmoins freiner la pénétration des corticostéroïdes dans les épidermes humains reconstruits. Pour confirmer cette hypothèse, et tenter de localiser les corticostéroïdes, nous nous sommes intéressés au modèle RHE dans sa globalité.

En cas de mauvaise pénétration, le produit appliqué pourrait être présent sur/dans le support en polycarbonate sur lequel repose l'épiderme (**Figure 20**). En effet il est envisageable qu'une partie du produit n'ayant pas pénétré se soit déposé au fond du puit lors du décollement de l'épiderme. Le produit pourrait également se trouver dans le milieu de culture dans lequel baigne le puit. Enfin, il est aussi possible que le produit ait été éliminé par action mécanique de l'eau lors du lavage de l'épiderme reconstruit. Chacune de ces hypothèses a été envisagée. Ainsi, les milieux de culture, les eaux de lavage et les supports au polycarbonate ont été étudiés au moyen de techniques d'analyse adaptées.

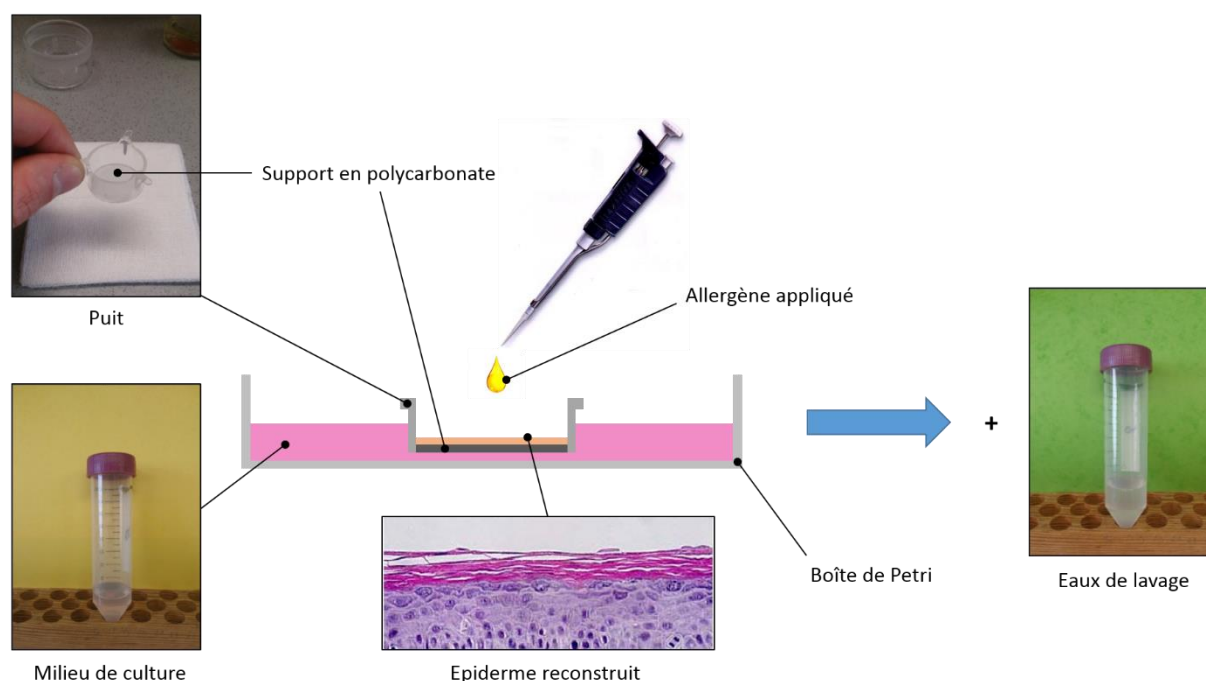


Figure 20. Eléments du modèle RHE

○ *Analyse des milieux de cultures et des eaux de rinçage*

Les milieux de cultures ainsi que les eaux de rinçage ont été analysés par spectroscopie RMN du liquide. Pour ce faire, les solutions récupérées après décollement des épidermes ont été extraites à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques ont été concentrées, celles aqueuses lyophilisées, puis toutes analysées par RMN. Que ce soit dans les milieux de culture ou dans les eaux de rinçage, aucune trace des corticostéroïdes n'a été trouvée. Ainsi, il semblerait que les allergènes appliqués restent au sein du puit contenant l'épiderme reconstruit.

○ *Analyse des supports en polycarbonate*

Pour mettre en évidence du produit déposé à la surface du support en polycarbonate (PC) nous avons utilisé la technique infrarouge de la réflexion totale atténuée (ATR). Cette technique se prête particulièrement bien à l'étude de surfaces d'échantillons solides, lisses et flexibles (profondeur de pénétration de quelques microns). Elle a en outre l'avantage de permettre l'analyse d'échantillons en l'état avec une préparation réduite au strict minimum.^[316,317]

Ainsi, après décollement des épidermes reconstruits, les puits ont été récupérés et séchés plusieurs jours à l'air ambiant. Les supports en polycarbonate ont été découpés et les faces supérieures (intérieur des puits) et inférieures (extérieur des puits en contact direct avec le milieu de culture) analysés par spectroscopie ATR-FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) (**Figure 21**). Ces mesures ont été réalisées au moyen d'un spectromètre Nicolet IR 200 FT-IR équipé d'une cellule ATR et d'un cristal en diamant. Pour comparaison les spectres des différents composés à l'état pur ont également été enregistrés avec la même technique.

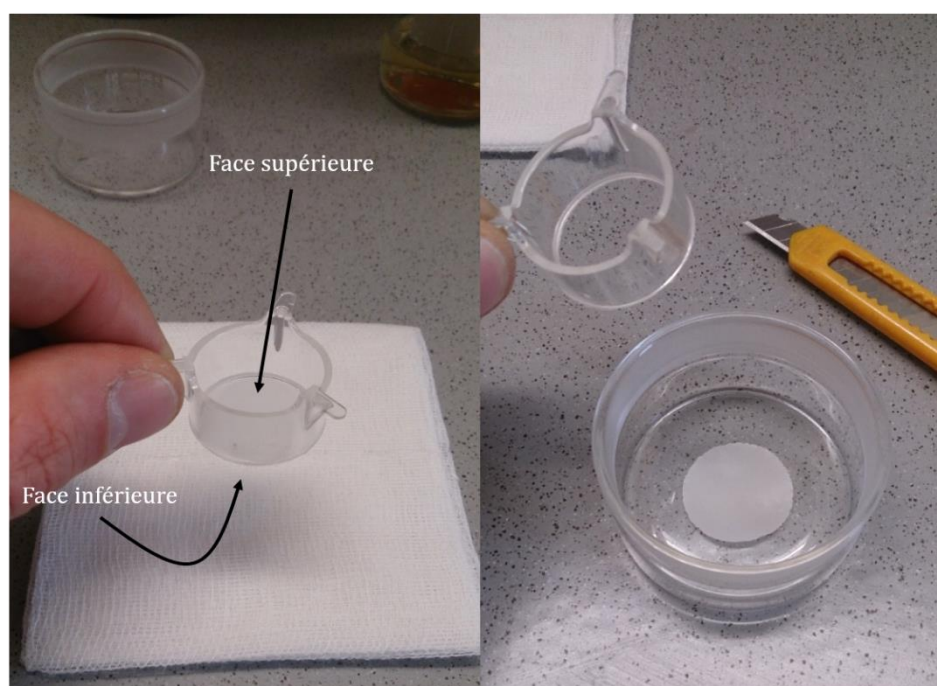


Figure 21. Récupération des puits (à gauche) et découpage des supports en polycarbonate (PC) (à droite)

La présence de la cortexolone 20- (^{13}C) -**21** sur le polycarbonate est attestée par une bande à 1664 cm^{-1} , absente dans le spectre du polycarbonate pur, et qui correspond à la superposition des absorptions de la cétone α,β -insaturée en position 3 ($\nu\text{ C}_3=\text{O}$) et de la cétone substituée au carbone 13

en position 20 ($\nu^{13}\text{C}_{20}=\text{O}$) (**Figure 22**). Il est à noter que la substitution par un carbone 13 déplace la bande $\text{C}_{20}=\text{O}$ de $\sim 1710\text{ cm}^{-1}$ dans le composé non marqué vers $\sim 1670\text{ cm}^{-1}$ en accord avec l'augmentation de la masse réduite du groupement carbonyle.^[318]

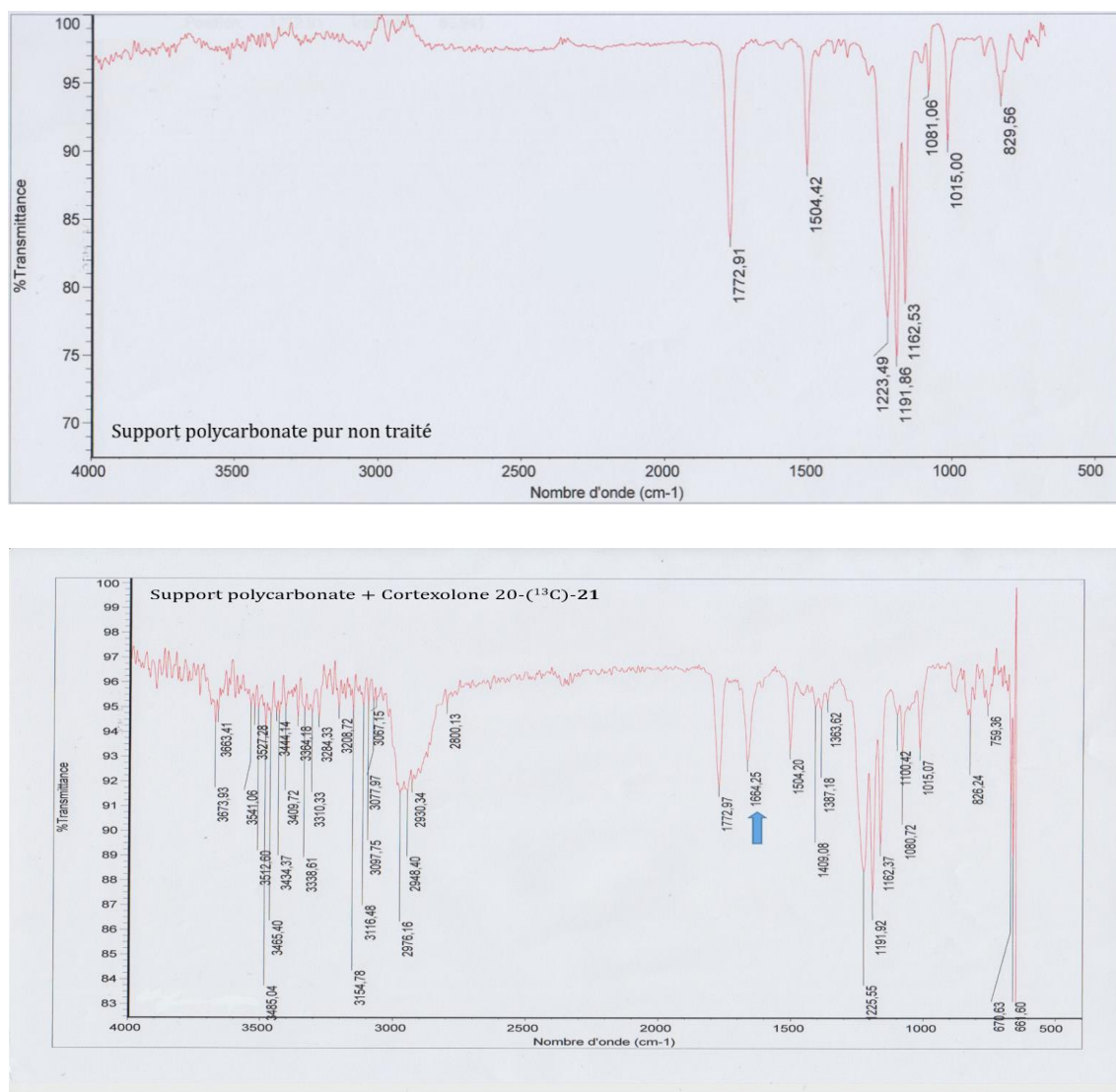


Figure 22. Spectres ATR-FTIR du filtre en PC non exposé (en haut)

et du filtre en PC traité exposé à la cortisolone 20-(¹³C)-21 (en bas)

De même, la 21-déhydrocortexolone 20-(^{13}C)-**28** peut être détectée sur le support par une bande à 1660 cm^{-1} ($\nu\text{ C}_3=\text{O}$ et $\nu\text{ }^{13}\text{C}_{20}=\text{O}$) (**Figure 22**). L'absence de bande carbonyle aldéhydique au-dessus de 1700 cm^{-1} est en accord avec la forme dimérique du composé 20-(^{13}C)-**28**.

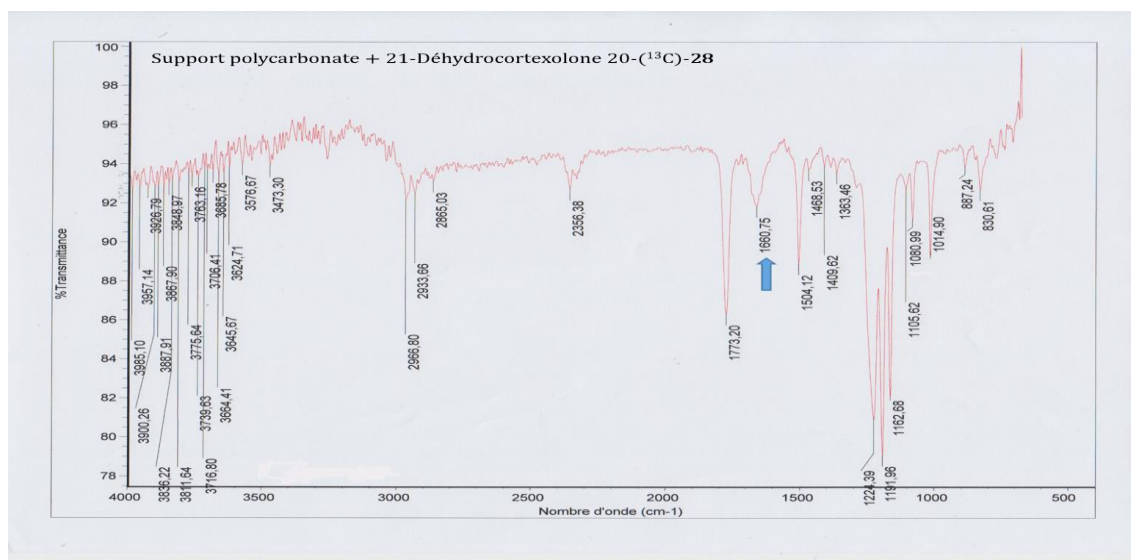


Figure 23. Spectre ATR-FTIR du filtre en PC exposé à la 21-déhydrocortisol 20-(^{13}C)-**28**

La cortisolone 21-(^{13}C)-**21** est quant à elle clairement identifiée sur le polymère par des bandes à 1708 cm^{-1} ($\nu\text{ C}_{20}=\text{O}$), 1662 cm^{-1} ($\nu\text{ C}_3=\text{O}$) et 1614 cm^{-1} ($\nu\text{ C}_4=\text{C}_5$) (**Figure 23**).

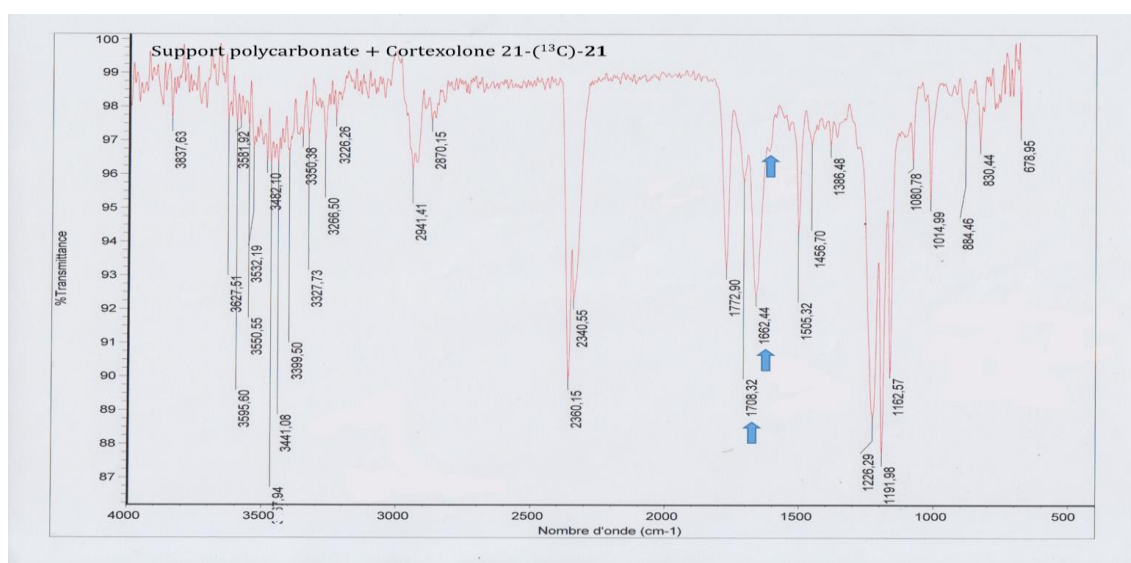


Figure 24. Spectre ATR-FTIR du filtre en PC exposé à la cortisolone 21-(^{13}C)-**21**

Pour ce qui est de la 21-déhydrocortexolone 21-(^{13}C)-**28**, elle se reconnaît sur le support en polycarbonate à des bandes à 1718 cm^{-1} ($\nu\text{ C}_2\text{O}=\text{O}$), 1665 cm^{-1} ($\nu\text{ C}_3=\text{O}$) et $\sim 1615\text{ cm}^{-1}$ ($\nu\text{ C}_4=\text{C}_5$) (**Figure 24**). La plus grande fréquence de la vibration $\nu\text{ C}_2\text{O}=\text{O}$ peut être attribuée à la formation du dimère et la présence d'un hémiacétal en α du carbonyle.

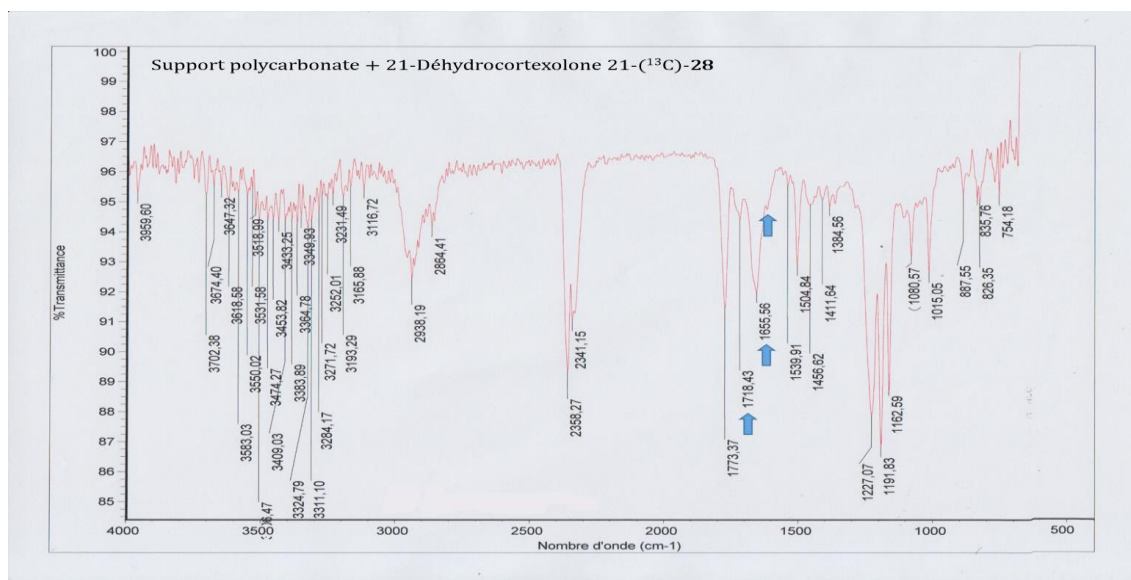


Figure 25. Spectre ATR-FTIR du filtre en PC exposé à la 21-déhydrocortexolone 21-(^{13}C)-**28**

L'ensemble des résultats est confirmé par comparaison avec les spectres de référence des composés purs. Dans tous les cas, aucune trace de produit n'a pu être détectée sur les faces inférieures des supports. On peut également signaler ici que, pour toutes les autres molécules appliquées sur le modèle RHE, les analyses des supports en polycarbonate par ATR n'ont jamais révélé la présence d'allergène en quantité significative. De façon claire et non équivoque, l'étude par spectroscopie IR des supports en polycarbonate met en évidence la mauvaise pénétration des dérivés corticostéroïdiens dans le modèle RHE lorsqu'ils sont appliqués dans l'acétone. Une des solutions pour contourner le problème pourrait être d'utiliser un autre solvant plus pro-pénétrant tel que le DMSO.

II.5. Le DMSO, meilleur véhicule ?

Pour pallier aux problèmes de pénétration des corticostéroïdes dans les épidermes reconstruits, nous avons décidé de remplacer l'acétone traditionnellement utilisée par du DMSO. Le DMSO est un excellent solvant qui possède un pouvoir de pénétration cutanée élevé.^[319] Il augmente la perméabilité de la peau en interagissant de façon plus ou moins réversible avec les lipides intercellulaires et la

kératine cellulaire.^[320] De par son mode d'action, le DMSO assure une bonne pénétration cutanée au matériel qu'il est capable de solubiliser.^[321] Des tests *in vivo* ont montré que le DMSO est un bien meilleur véhicule que l'acétone en ce qui concerne la pénétration de dérivés stéroïdiens appliqués à la surface de la peau.^[322] Certains tests cliniques de sensibilisation aux corticostéroïdes sont réalisés au moyen du DMSO.^[294,323,324] En outre, le DMSO est aujourd'hui régulièrement utilisé, pur ou sous forme de mélange, pour faire pénétrer des composés à tester dans des cultures cellulaires de peau, notamment des épidermes reconstruits.^[325-328]

Si le DMSO se présente comme un bon véhicule pour l'application des corticostéroïdes sur le modèle RHE, il n'en reste pas moins un solvant capable d'induire des modifications non réversibles des cellules de la peau.^[329] Nous nous sommes donc intéressés en premier lieu aux modifications que pourrait engendrer le DMSO au modèle RHE.

II.5.A. Le modèle RHE en présence de DMSO

Du DMSO pur a été appliqué sur deux échantillons d'épiderme reconstruit incubés 24 h. La quantité de DMSO appliquée sur chacun des deux épidermes correspond à la quantité d'acétone généralement utilisée pour tester les allergènes. Contrairement à l'acétone, il semble peu probable que le DMSO soit éliminé par évaporation. Dans le but d'éliminer l'excès de DMSO qui n'aurait pas pénétré, un des deux échantillons a été rincé. Expérimentalement, l'échantillon est traité par 100 μ L de DMSO, incubé 40 min, puis rincé avec une dizaine de mL d'une solution de tampon phosphate pH = 7,4 (STP 7,4) avant d'être remis dans l'incubateur pour compléter son cycle de 24 h. Les spectres des échantillons rincé et non rincé ont été comparés et l'intérêt du rinçage discuté.

Les spectres 2D HSQC ^1H - ^{13}C édités obtenus par RMN HRMAS pour l'échantillon « blanc » non traité (**Figure 26**), et les échantillons traités par le DMSO non rincé (**Figure 27**) et rincé (**Figure 28**) sont présentés ci-après.

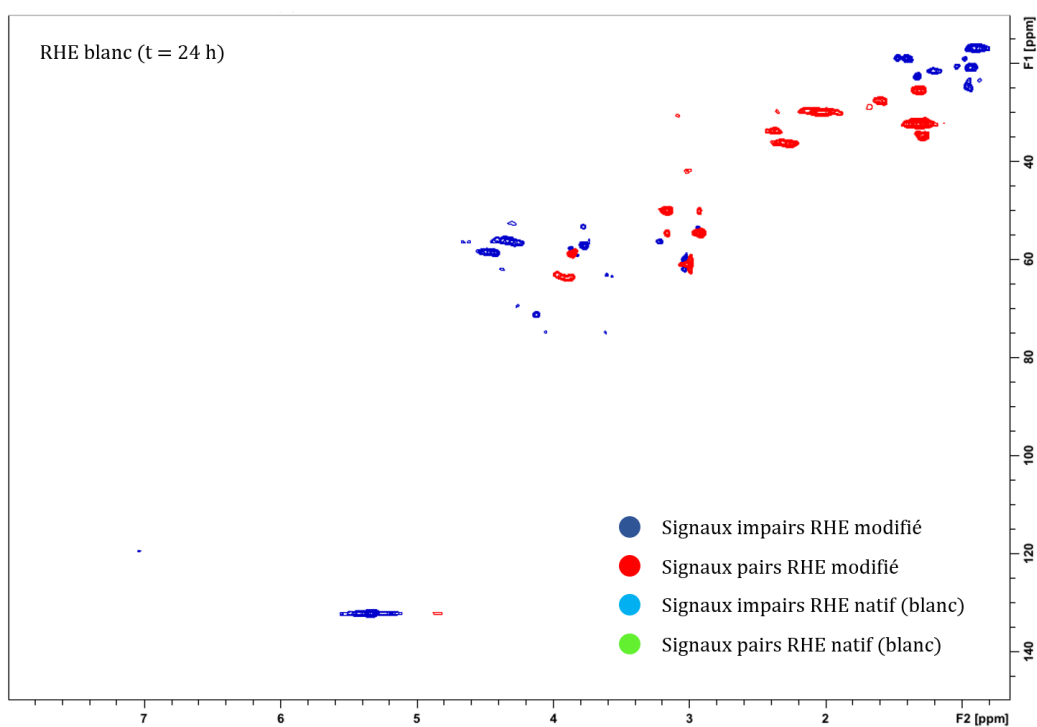


Figure 26. Spectre 2D HSQC ^1H - ^{13}C édité de l'échantillon « blanc » non traité

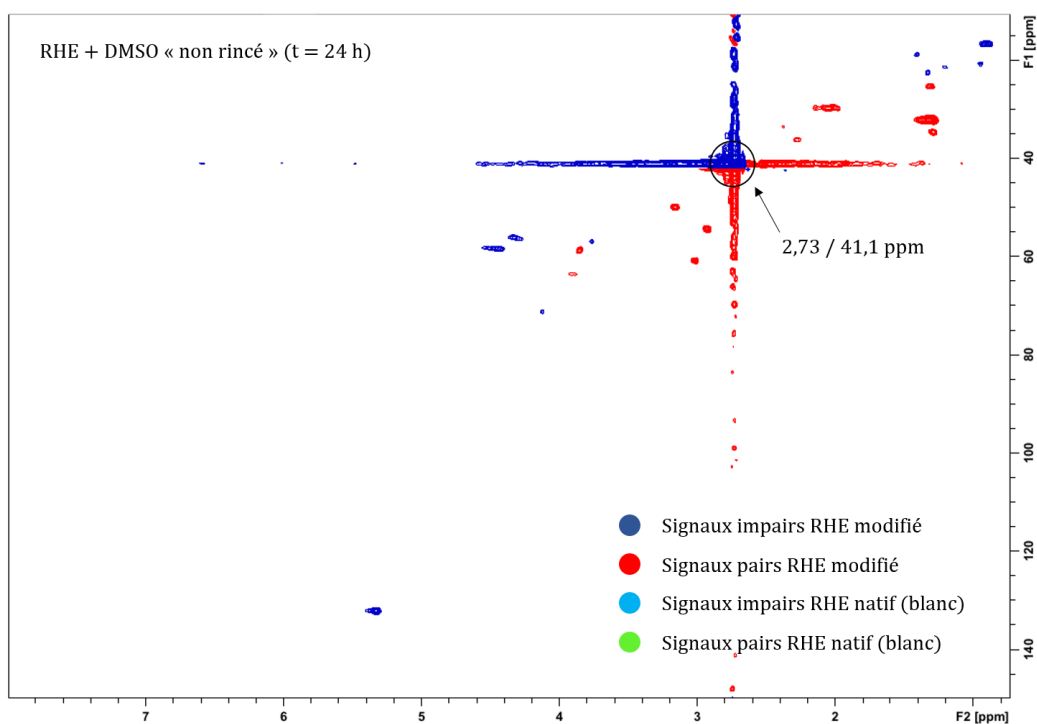


Figure 27. Spectre 2D HSQC ^1H - ^{13}C édité de l'échantillon traité par le DMSO non rincé

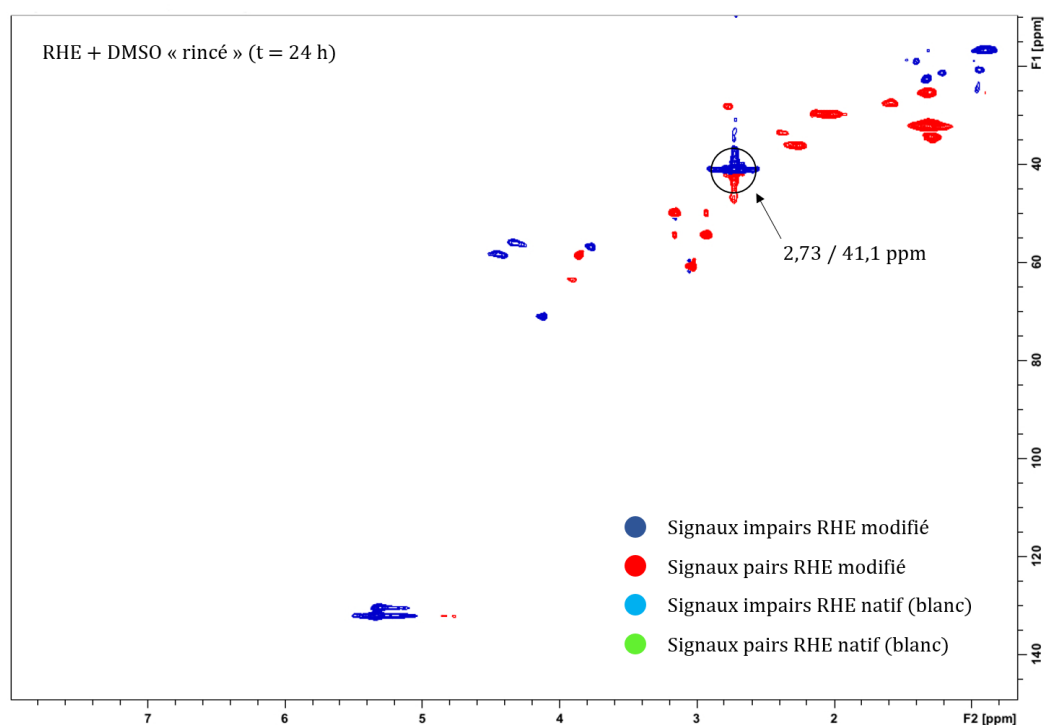


Figure 28. Spectre 2D HSQC ^1H - ^{13}C édité de l'échantillon traité par le DMSO rincé

Première observation, le profil métabolique de l'échantillon blanc non traité et celui des deux échantillons traités par le DMSO semblent identiques. Ainsi, du point de vue de la RMN HRMAS, le DMSO ne semble pas interagir avec les épidermes reconstruits après 24 h d'incubation.

Le spectre HSQC de l'échantillon traité par le DMSO non rincé laisse apparaître une saturation de la tache de corrélation correspondant au DMSO (δ 2,73/41,1 ppm). Cette saturation, due à une importante quantité de DMSO, perturbe clairement l'acquisition de données puisque certains métabolites ne sont plus détectés.

Le spectre HSQC de l'échantillon traité par le DMSO et rincé témoigne de l'efficacité de la technique de rinçage. En effet, la tache de corrélation du DMSO (δ 2,73/41,1 ppm) est nettement moins importante, et elle ne perturbe ni l'acquisition des données, ni l'interprétation du spectre. Le rinçage du puit contenant l'épiderme reconstruit permet donc d'éliminer efficacement et avec intérêt l'excès de DMSO qui n'a pas pénétré l'épiderme reconstruit, mais confirme la capacité du DMSO à pénétrer dans l'épiderme de façon très significative.

II.5.B. Application de la cortexolone dans le DMSO

La cortexolone 20- (^{13}C) -**21** et la 21-déhydrocortexolone 20- (^{13}C) -**28** ont donc été appliquées sur le modèle RHE à une concentration de 0,4 M en utilisant comme solvant/véhicule le DMSO. Dans un cas, les molécules ont été appliquées sans rinçage ; dans l'autre, les échantillons ont été rincés après 40 min d'incubation. Tous les échantillons ont été incubés 24 heures. Un total de quatre échantillons a donc été préparé :

- Cortexolone 20- (^{13}C) -**21**, échantillon non rincé
- 21-déhydrocortexolone 20- (^{13}C) -**28**, échantillons non rincé
- Cortexolone 20- (^{13}C) -**21**, échantillon rincé par STP 7,4
- 21-déhydrocortexolone 20- (^{13}C) -**28**, échantillons rincé par STP 7,4

Les échantillons ont été analysés par RMN HRMAS au moyen d'expériences monodimensionnelles ^1H CPMG et $1\text{D } ^{13}\text{C}$. Les spectres obtenus sont présentés sur les figures qui suivent (**Figure 29 à 32**).

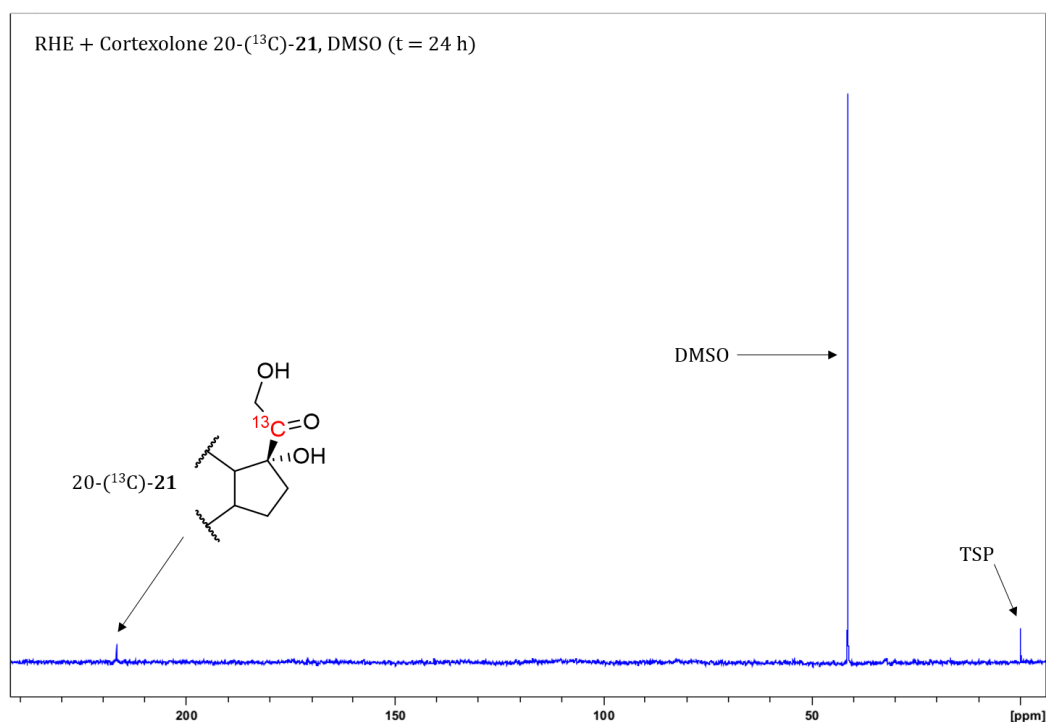


Figure 29. Spectre $1\text{D } ^{13}\text{C}$ de l'échantillon RHE traité par la cortisolone 20- (^{13}C) -**21** dans le DMSO à 24 h (sans rinçage)

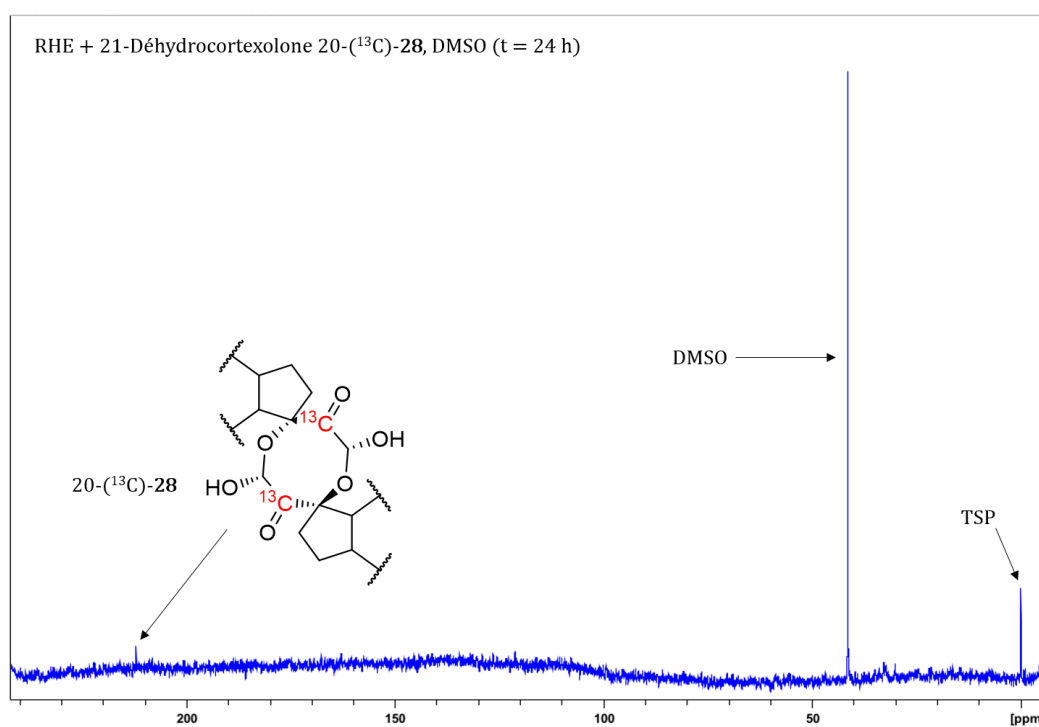


Figure 31. Spectre 1D ^{13}C de l'échantillon RHE traité par la 21-déhydrocortexolone 20-(^{13}C)-**28** dans le DMSO à 24 h (sans rinçage)

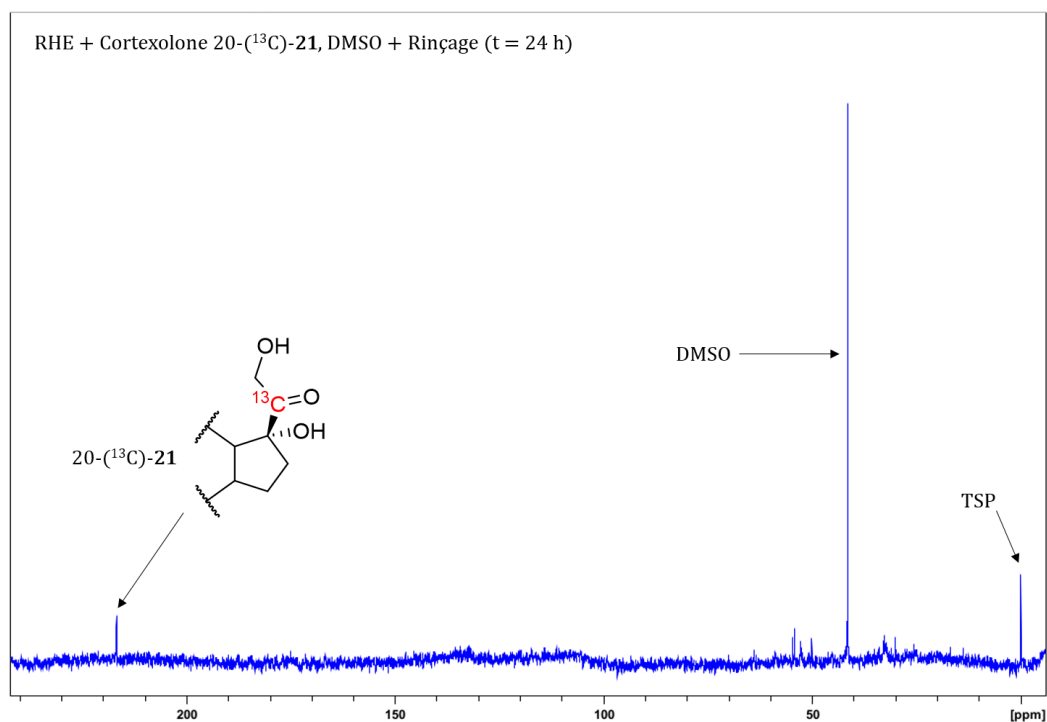


Figure 32. Spectre 1D ^{13}C de l'échantillon RHE traité par la cortexolone 20-(^{13}C)-**21** dans le DMSO à 24 h (+ rinçage STP 7,4 après 40 min d'incubation)

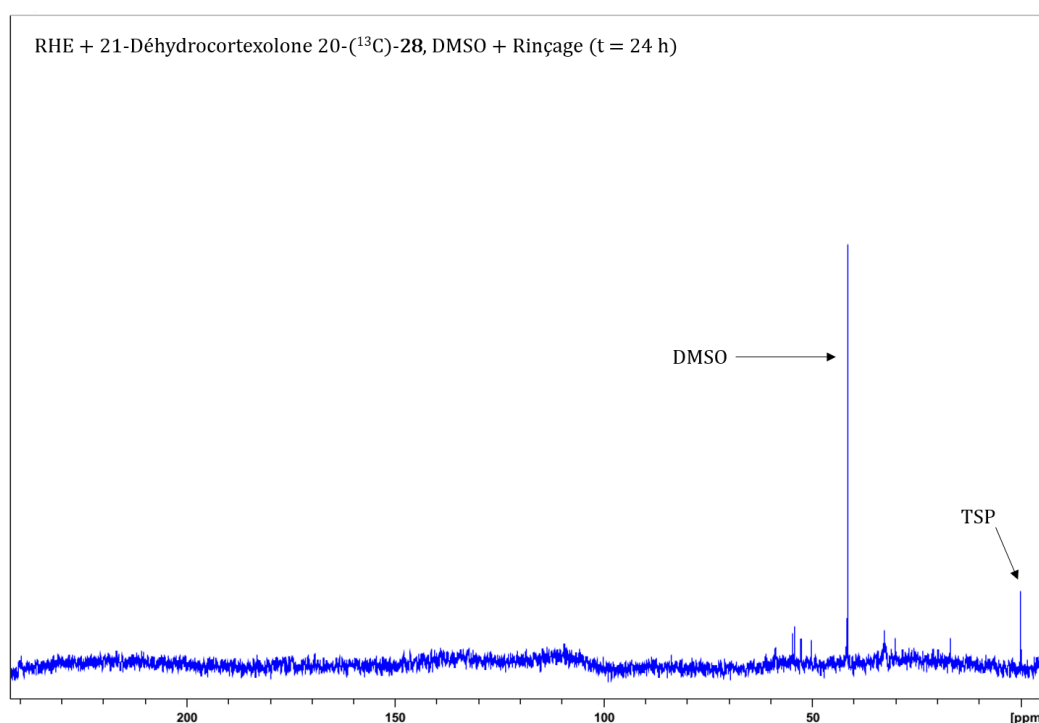


Figure 33. Spectre 1D ^{13}C de l'échantillon RHE traité par la 21-déhydrocortisolone 20- (^{13}C) -**28** dans le DMSO à 24 h (+ rinçage STP 7,4 après 40 min d'incubation)

Le spectre 1D ^{13}C de la cortisolone 20- (^{13}C) -**21** appliqué dans le DMSO à 24 h montre uniquement la présence, dans une quantité plutôt faible, du produit de départ (δ 216,8 ppm) (**Figure 29**). Le spectre de la 21-déhydrocortisolone 20- (^{13}C) -**28** témoigne quant à lui de la présence du dimère au sein de l'épiderme reconstruit (δ 212,2 ppm) (**Figure 30**). Bien que le signal soit faible, il montre que le DMSO est, comparativement à l'acétone, un meilleur véhicule. L'utilisation de la STP 7,4 pour rincer les puits contenant les épidermes ne semble pas éliminer la cortisolone 20- (^{13}C) -**21** puisque l'intensité du signal de cette dernière est *grosso modo* inchangée (δ 216,8 ppm) (**Figure 31**). Cependant, concernant la 21-déhydrocortisolone 20- (^{13}C) -**28**, l'étape de rinçage a complètement éliminé le dimère de départ (**Figure 32**). Etant donné que les dérivés de type corticostéroïde sont insolubles dans l'eau, cette élimination résulte probablement d'une action mécanique de la STP 7,4, lors du rinçage, sur la 21-déhydrocortisolone 20- (^{13}C) -**28** n'ayant pas pénétré l'épiderme reconstruit après 40 min d'incubation.

Si le DMSO semble être un meilleur solvant/véhicule que l'acétone concernant l'application des corticostéroïdes sur le modèle RHE, les spectres 1D ^{13}C obtenus témoignent encore une fois d'un réel problème de pénétration. En effet, seuls les signaux correspondant aux molécules de départ en de faibles concentrations sont visibles. L'étude des supports en polycarbonate (PC) par spectroscopie IR

(ATR-FTIR) a confirmé cette mauvaise pénétration puisque la cortexolone 20-(^{13}C)-**21** et la 21-déhydrocortexolone 20-(^{13}C)-**28** y ont été retrouvées. Les molécules n'ont été détectées ni dans les milieux de culture ni dans les eaux de lavages/rinçage. Il semblerait donc que les dérivés de type corticostéroïde en solution dans le DMSO pénètrent difficilement les épidermes reconstruits et sont finalement présentes sur les supports en PC. Cependant, comparativement aux études menées avec l'acétone, aucun dépôt solide n'a été observé *de visu* en surface des épidermes reconstruits. Nous ne pouvons donc pas exclure l'hypothèse selon laquelle les corticostéroïdes testés auraient traversé les épidermes reconstruits sans être pris en charge avant de se retrouver (absorbés/adsorbés) sur les supports en PC.

Pour l'heure, la mauvaise pénétration dans les épidermes reconstruits des cortexolones 20-(^{13}C)-**21** et 21-(^{13}C)-**21**, et de leurs formes oxydées 20-(^{13}C)-**28** et 21-(^{13}C)-**28**, empêche l'étude de leur comportement sur le modèle RHE. Si l'acétone et le DMSO purs se sont avérés ne pas être des solvants adaptés, d'autres pistes peuvent être explorées.^[321,330] Nous pensons notamment à l'utilisation d'éthanol,^[331] ou d'un corps gras tel que la vaseline ou l'huile d'olive, généralement employés dans les tests épicutanés pour assurer la pénétration des composés.^[332] Des mélanges de solvants peuvent également être envisagés.

III. La 16 α -méthylcortexolone, analogue de la bétaméthasone

Les corticostéroïdes majoritairement responsables des cas d'allergie de contact appartiennent aux groupes A, B et D.^[294] Seuls les composés du groupe C semblent guère actifs en terme d'induction de réactions allergiques. La principale différence entre les corticostéroïdes du groupe C et ceux des autres groupes se situe au niveau du cycle D. En effet, tous les corticostéroïdes appartenant au groupe C présentent un groupement méthyle en position 16. Pour mieux comprendre les causes à l'origine de ce phénomène, nous nous sommes intéressés à la 16 α -méthylcortexolone, une molécule analogue de la bétaméthasone. Contrairement à la cortexolone, elle possède en position 16 un méthyle qui lui confère un encombrement stérique au niveau du motif α -hydroxycétone/ α -cétoaldéhyde supposé réactif.

Afin d'étudier par RMN HRMAS le comportement de la 16 α -méthylcortexolone **29** sur les épidermes reconstruits, le corticostéroïde a été synthétisé en série substituée au carbone 13. Les positions 20 et 21 supposées réactives ont été substituées séparément. Ainsi, deux molécules, 20-(^{13}C)-**29** et 21-(^{13}C)-**29**, ont été préparées. Encore une fois, la finalité est de pouvoir croiser les données recueillies en RMN RHMAS pour chacune des deux molécules afin d'obtenir le maximum d'informations sur la

réactivité *in situ* de la 16 α -méthylcortexolone. La synthèse des deux molécules est directement inspirée de travaux précédemment réalisés au laboratoire.^[310,333]

III.1. Synthèse en série substituée au carbone 13 en position 20

La synthèse de la 16 α -méthylcortexolone 20-(^{13}C)-**29** est décrite ci-après (**Figure 34**).

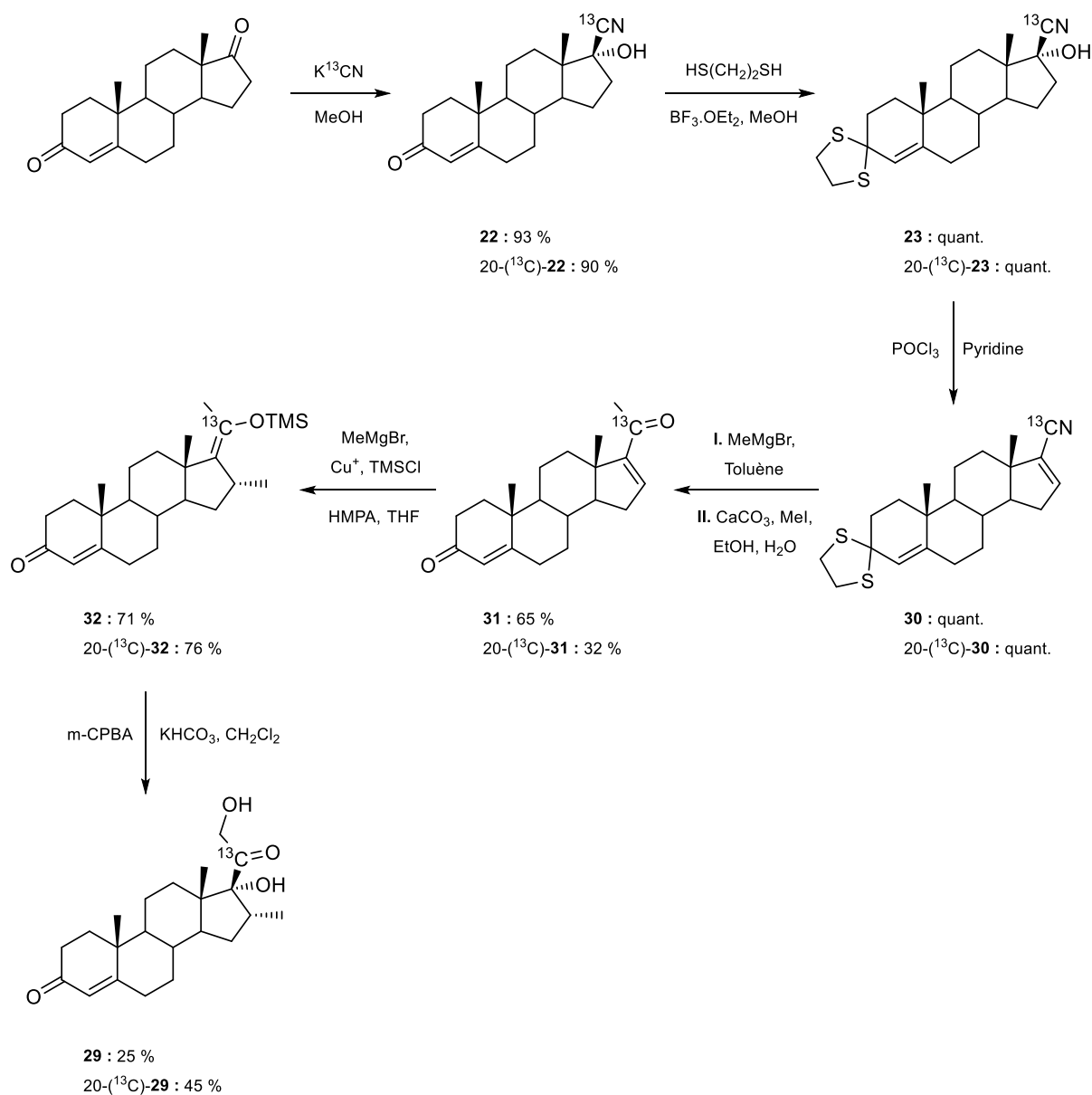


Figure 34. Synthèse de la 16 α -méthylcortexolone 20-(^{13}C)-**29**

La synthèse de la 16 α -méthylcortexolone 20-(¹³C)-**29** est réalisée en 6 étapes à partir de l'androstènedione commerciale. La substitution au carbone 13 est introduite régiosélectivement en position 20 lors de la première étape de synthèse grâce une réaction de cyanation au moyen de (¹³C)-cyanure de potassium. La cétone α,β -insaturée 20-(¹³C)-**22** obtenue est protégée sous la forme d'un dithioacétale cyclique 20-(¹³C)-**23**. Une réaction de déshydratation de l'alcool en position 17 effectuée à l'aide trichlorure de phosphoryle conduit à la cyanhydrine α,β -insaturée 20-(¹³C)-**30**. Cette dernière est engagée dans une réaction de Grignard réalisée en présence de bromure de méthylmagnésium. Sans purification, le brut réactionnel est traité par du carbonate de calcium et du iodométhane permettant la déprotection du dithioacétale. La méthylcétone conjuguée 20-(¹³C)-**31** est ainsi générée avec un rendement, sur deux étapes, de 32 %. L'obtention du motif α -hydrocétone à partir de la méthylcétone conjuguée est décrite dans la littérature.^[334] Elle repose sur deux étapes successives. La première repose sur l'addition 1,4 de bromure de méthyle magnésium sur la cétone conjuguée et permet l'introduction sélective du méthyle en position 16 α . L'énol formé est transformé *in situ* en éther d'énol silylé 20-(¹³C)-**32**. La seconde étape est basée sur l'utilisation d'acide métachloroperbenzoïque et permet la double hydroxylation de l'éther d'énol conduisant au motif α -hydrocétone. De cette manière, la 16 α -méthylcortexolone 20-(¹³C)-**29** est générée avec un rendement de 45 %.

III.2. Synthèse en série substituée au carbone 13 en position 21

La synthèse de la 16 α -méthylcortexolone 21-(¹³C)-**29**, précédemment élaborée au laboratoire, s'apparente à celle de la 16 α -méthylcortexolone substituée en position 20 (**Figure 36**).

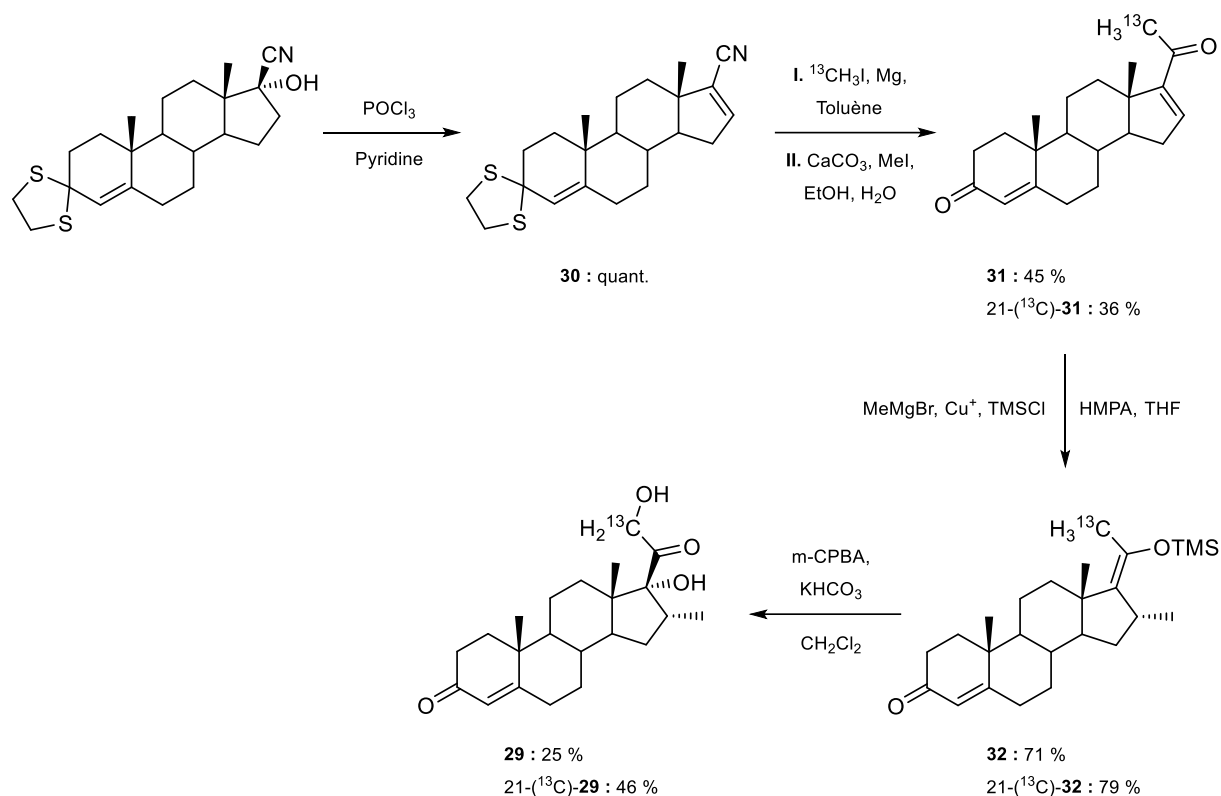


Figure 35. Synthèse de la 16 α -méthylcortisolone 21-(^{13}C)-**29**

Dans le cas de la substitution dans la position 21, la cyanhydrine α,β -insaturée **30** est préparée comme décrit précédemment. L'introduction du carbone 13 est réalisée par une réaction de Grignard au moyen d'un excès d'iodure de méthylmagnésium substitué au carbone 13. L'organomagnésien est généré *in situ* grâce à des copeaux de magnésium en suspension dans l'éther, auxquels est ajouté du (^{13}C)-iodométhane. Le brut réactionnel est traité par du carbonate de calcium et de l'iodométhane permettant la déprotection du dithioacétal. La méthylcétone conjuguée 21-(^{13}C)-**31** est ainsi synthétisée avec un rendement sur deux étapes de 36 %. Comme précédemment, le motif α -hydrocétone est obtenu à partir de la méthylcétone conjuguée par deux étapes successives. La première permet d'introduire sélectivement le méthyle en position 16 α et conduit à la formation de l'éther d'énol silylé 21-(^{13}C)-**32**. La seconde permet d'obtenir la 16 α -méthylcortisolone 21-(^{13}C)-**29**.

III.3. 16 α -méthylcortexolone : perspectives sur le modèle RHE

Pour l'heure, et compte tenu des difficultés de pénétration rencontrées dans l'étude de la cortexolone, la 16 α -méthylcortexolone n'a pas encore été appliquée sur les épidermes reconstruits. La mise au point de conditions adaptées (véhicule, temps d'incubation, etc.) aux corticostéroïdes sur le modèle RHE permettra d'envisager l'étude du comportement *in situ* des 16 α -méthylcortexolones 20-(^{13}C)-**29** et 21-(^{13}C)-**29**. En outre, il est supposé que la réactivité des corticostéroïdes est due au motif α -cétoaldéhyde issu de l'oxydation par voie enzymatique du motif α -hydrocétone. Ainsi, les 16 α -méthylcortexolones 20-(^{13}C)-**29** et 21-(^{13}C)-**29** seront également oxydées en 21-déhydro-16-méthylcortexolones avant d'être appliquées sur le modèle RHE (**Figure 36**).

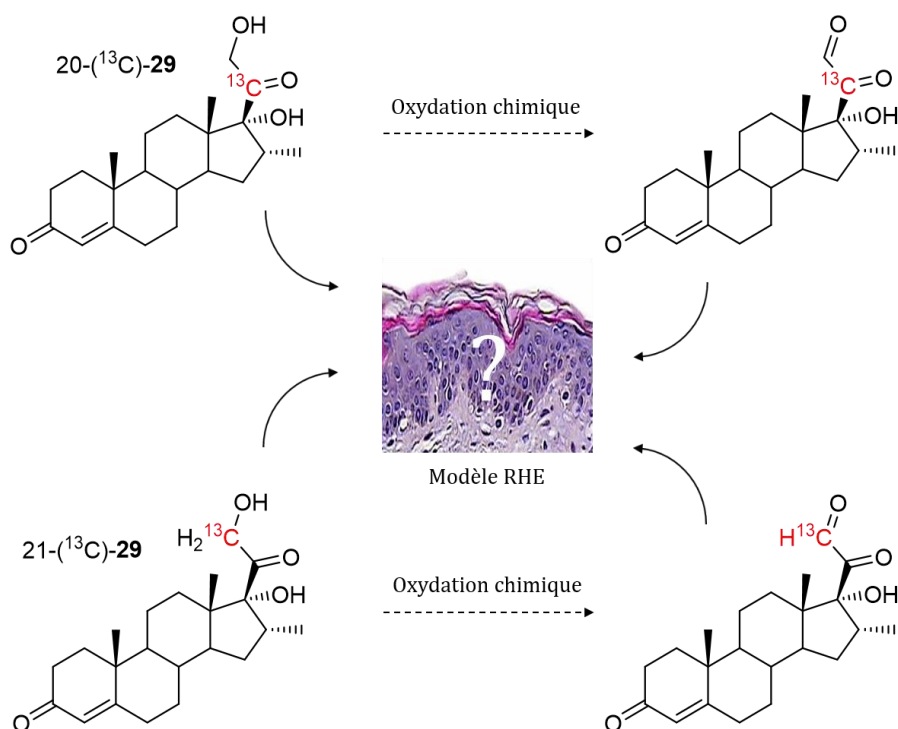


Figure 36. Perspectives : étude de la réactivité des 16 α -méthylcortexolones 20-(^{13}C)-**29** et 21-(^{13}C)-**29** et de leurs formes oxydées respectives sur le modèle RHE de SkinEthic®

IV. Conclusion

L'étude des interactions des corticostéroïdes (cortexolone et 16 α -méthylcortexolone) avec les épidermes reconstruits a mis en évidence, pour la première fois, un problème associé à la pénétration des substances à tester dans le modèle RHE. D'un côté, cela a limité, pour le moment, notre capacité d'étude de cette catégorie d'allergènes. D'un autre côté, cela confirme que la couche cornée présente

sur le modèle RHE, même si elle est réputée moins efficace que la stratum corneum, joue un rôle effectif dans le contrôle de la pénétration des molécules. L'enjeu principal des futures études sera donc de trouver un solvant/véhicule capable de solubiliser convenablement les corticostéroïdes tout en leur assurant une bonne pénétration cutanée au sein des épidermes reconstruits. En ce sens, il peut être intéressant d'utiliser des mélanges de solvants (éthanol-eau, DMSO-eau, etc.), ou à des corps gras (vaseline, huile d'olive, etc.) habituellement utilisés lors des tests épicutanés.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

La peau, première barrière de protection de l'organisme, est en contact permanent avec les molécules de l'environnement. Dans certains cas, cette exposition peut conduire à des pathologies telles que l'allergie de contact. A l'heure actuelle, aucune thérapie n'existe pour soigner cette maladie cutanée ; le moyen le plus efficace pour la prévenir reste l'éviction totale de la substance allergène incriminée. En ce sens, il est important de pouvoir évaluer avec attention les risques liés à la commercialisation de nouveaux composés chimiques, en particulier les compositions cosmétiques et pharmaceutiques à application topique. Ce besoin s'est accru en 2007 par l'adoption de la législation européenne REACH qui vise l'évaluation toxicologique du pouvoir sensibilisant de plus de 30 000 substances chimiques d'ici 2018.^[11] Aujourd'hui, les tests d'évaluation du potentiel sensibilisant des molécules sont essentiellement effectués sur l'animal, notamment chez la souris. En effet, le test du LLNA reste une référence pour déterminer et quantifier le potentiel sensibilisant d'une substance chimique.^[12] Cependant, le champ d'action de ces tests est limité depuis le 1^{er} mars 2013 et l'adoption du 7^{ème} amendement de la Directive Cosmétique Européenne qui interdit l'importation et la vente de produits cosmétiques dont les ingrédients auraient été testés sur des animaux.^[13] Dans ce contexte, il devient essentiel de développer de nouvelles méthodes « alternatives » permettant l'évaluation du potentiel sensibilisant des molécules et ne reposant pas sur l'utilisation d'animaux. L'ensemble de la communauté scientifique est d'accord pour dire qu'il ne sera pas possible d'avoir un test unique mais une stratégie reposant sur plusieurs tests simples.

I. Problématique de thèse

A l'échelle moléculaire, l'allergie de contact repose sur la formation d'un complexe antigénique allergène-protéine.^[14] Le développement de nouvelles méthodes alternatives passe donc nécessairement par la chimie et la compréhension des mécanismes réactionnels qui régissent cette étape clé. En ce sens, le laboratoire de Dermatochimie s'efforce de comprendre les mécanismes qui aboutissent à l'allergie de contact en étudiant les mécanismes d'interaction entre les allergènes et divers modèles *in vitro* (acides aminés, peptides ou protéines). Toutefois, l'observation clinique de certains cas d'allergie cutanée semble indiquer que les mécanismes réactionnels observés sur les modèles diffèrent de ceux qui aboutissent à l'apparition de symptômes chez le patient. Dans le but de se rapprocher au plus près des phénomènes *in vivo* qui aboutissent à l'allergie de contact, il devient nécessaire d'affiner nos connaissances en améliorant les modèles.

En 2012 a été développé un nouveau modèle d'étude de l'allergie de contact reposant sur l'utilisation conjointe d'épidermes humains reconstruits (modèle RHE de SkinEthic®) et de la technique d'analyse de la RMN HRMAS.^[19,202] Si la technique a permis d'étudier avec succès les interactions haptènes-protéines, le travail de thèse ici présenté s'est proposé d'élargir l'utilisation du modèle RHE aux pro-haptènes. L'objectif de ce travail de thèse aura donc été d'étudier leur métabolisation ainsi que leur réactivité dans les épidermes reconstruits. Au sein du modèle RHE, les systèmes enzymatiques pouvant être impliqués dans l'activation métabolique des pro-haptènes sont nombreux, comme le souligne le tableau ci-dessous (**Tableau 1**). Pour l'heure, trois classes d'enzymes sur six ont clairement été identifiées et étudiées ; il s'agit des oxydoréductases, des transférases et des hydrolases.

-	-	Cytochromes P450 (CYP450)	-
EC 1	Oxydoréductases	Alcool / Aldéhyde déshydrogénases (ADH / ALDH)	EC 1.1.1.1 / EC 1.2.1.3
		Peroxydases	EC 1.11.x
EC 2	Transférases	Catéchol-O-méthyltransférases (COMT)	EC 2.1.1.6
		N-acétyltransférases (NAT)	EC 2.3.1
		Glucuronosyltransférases (UGT)	EC 2.4.1.17
		Glutathion S-transférases (GST)	EC 2.5.1.18
		Sulfotransférases (SULT)	EC 2.8.2.x
EC 3	Hydrolases	Estérases (ES)	EC 3.1.x

Tableau 1. Systèmes enzymatiques actifs identifiés dans le modèle RHE ^[138]

Les pro-haptènes que nous avons retenus pour nos études se sont intéressés à certains de ces systèmes enzymatiques en tentant de répondre à des problématiques cliniques concrètes.

II. Métabolisme des pro-haptènes au sein du modèle RHE

Nos premières études se sont portées sur la réactivité de dérivés de type *para*-alkylphénol (créosol, eugénol et isoeugénol). En accord avec les études menées dans les conditions du PPRA, nous sommes partis du postulat que ces molécules sont de bons substrats des peroxydases capables de les oxyder sous la forme de *para*-méthylène quinones réactives. La technique RHE/RMN HRMAS a montré que le comportement *in situ* dans les épidermes reconstruits des trois allergènes repose sur une compétition

entre deux voies de métabolisation : d'un côté, celle régie par les peroxydases (EC 1.11), de l'autre, celle contrôlée par les mono-oxygénases à cytochrome P450 (EC 1.14). Concernant le créosol et l'eugénol, tous les deux des pro-haptènes, il semblerait que leurs prises en charge par les peroxydases conduisent à la formation de dimères. Parallèlement, leurs applications en séries doublement substituées au carbone 13 a clairement montré la formation de méthanediol, l'hydrate du formaldéhyde. Cette observation est capitale puisqu'elle met en évidence que des pro-haptènes sont également métabolisés par les mono-oxygénases à cytochromes P450 via une réaction de O-déméthylation conduisant à des catéchols précurseurs d'orthoquinones potentiellement réactives. De manière très intéressante, l'isoeugénol qui est un pré-haptène, ne semble pas suivre la même voie métabolique que le créosol et que son isomère, l'eugénol. En effet, son application sur le modèle RHE n'a pas montré la formation de méthanediol. Il semblerait donc que l'isoeugénol soit directement oxydé sous la forme d'un dimère ou d'une *para*-méthylène quinone réactive. Cette oxydation peut être réalisée par voie enzymatique au moyen d'une peroxydase, ou par simple contact de la molécule avec le dioxygène environnant. L'équilibre de la balance métabolique peroxydases/cytochromes P450 au sein du modèle RHE est donc dicté par la nature de l'allergène qui est pris en charge. Ainsi, le créosol et l'eugénol qui semblent être plus difficilement oxydables que l'isoeugénol, sont préférentiellement pris en charge par les mono-oxygénases à cytochromes P450. *A contrario*, l'isoeugénol qui est facilement oxydé, paraît être un bon substrat des peroxydases (**Figure 1**). Cette différence au niveau du mode de prise en charge privilégié par chacun des trois allergènes est, à n'en point douter, à l'origine de leurs différences de potentiels sensibilisants.^[203]

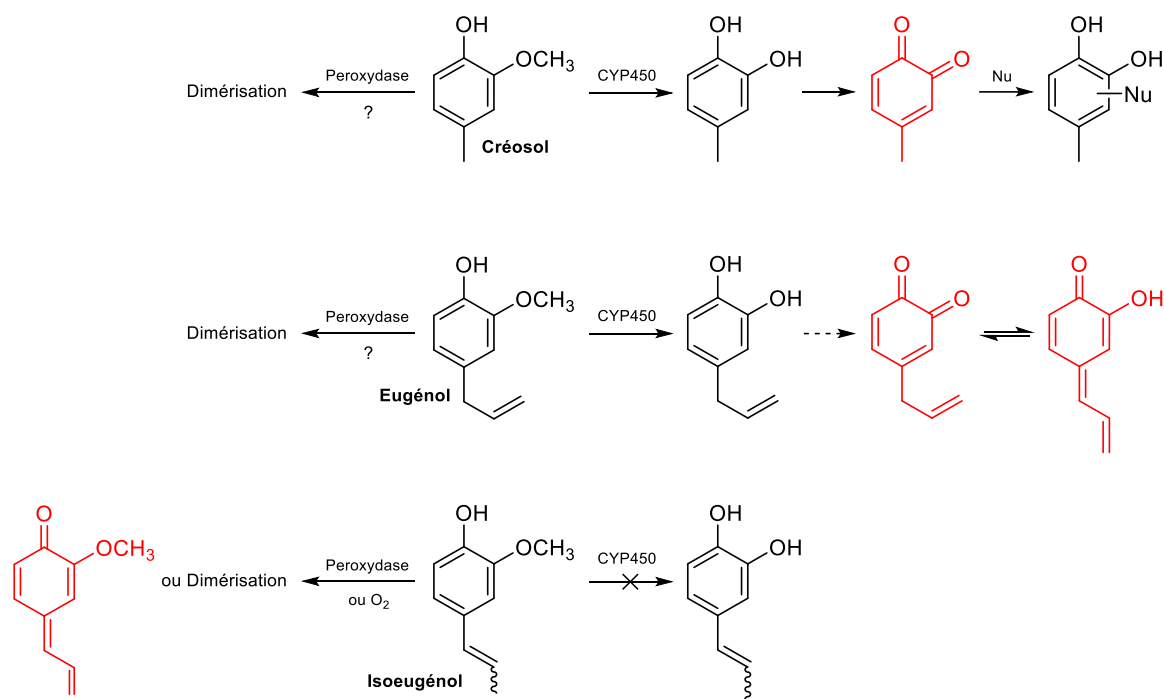


Figure 1. Modèle RHE : voies métaboliques proposées pour le créosol, l'eugénol et l'isoeugénol

Les espèces potentiellement réactives sont dessinées en rouge

Premier métabolite du créosol et de l'eugénol dans le modèle RHE, le formaldéhyde a également été étudié dans les épidermes reconstruits. Les résultats ont montré que le formaldéhyde est métabolisé *in situ* en formiate. Si les voies métaboliques qui mènent au formiate n'ont pas pu être clairement définies, il semblerait que le formaldéhyde se conjugue avec un résidu thiol avant d'être oxydé, par une alcool déshydrogénase (EC 1.1.1.1), puis hydrolysé, au moyen d'une hydrolase (EC 3.1), en formiate. Compte tenu de la forte réactivité du formaldéhyde et de ses métabolites au sein des épidermes reconstruits, il convient de garder à l'esprit que sa contribution dans le phénomène d'allergie de contact au créosol et à l'eugénol n'est certainement pas négligeable.

L'étude des dérivés de type corticostéroïdes (cortexolone et 16-méthylcortexolone) sur le modèle RHE s'est proposée de mettre en avant l'activité enzymatique des alcools déshydrogénases (EC 1.1.1.1) dans les épidermes reconstruits. Dans ce cadre, nous avons rencontré pour la première fois un problème associé à la pénétration des substances testées. Pour l'instant, cette mauvaise pénétration limite notre capacité à étudier cette catégorie d'allergènes. Elle confirme en revanche que la couche cornée présente dans le modèle RHE joue un rôle effectif dans le contrôle de la pénétration. L'enjeu principal des futures études sera donc de trouver un solvant/véhicule adapté à l'étude des dérivés corticostéroïdiens.

Finalement, l'utilisation conjointe du modèle RHE et de la RMN HRMAS a montré un très bon potentiel concernant l'étude *in situ* du métabolisme de pro-haptènes. Si pour l'heure les adduits haptène-protéine n'ont pas toujours été détectés ou identifiés avec précision, les métabolites observés nous ont systématiquement permis de proposer une ou plusieurs voies de métabolisation cohérentes pour chacune des molécules étudiées. L'activation des pro-haptènes a permis de souligner l'activité de certains systèmes enzymatiques présents dans les épidermes reconstruits. Ainsi, l'étude des dérivés de type *para*-alkylphénols a montré la présence de peroxydases, mais surtout et pour la première fois de cytochromes P450 actifs dans le modèle RHE à des niveaux d'activité permettant l'activation métabolique des pro-haptènes. L'étude du formaldéhyde laisse quant à elle supposer une activité importante des alcools déshydrogénases et des hydrolases. Comparativement aux modèles « *in vitro* » traditionnellement utilisés pour étudier les interactions entre haptènes et protéines (acides aminés, peptides, etc.), la technique RHE/RMN HRMAS se place comme un modèle *in situ* plus proche des mécanismes qui régissent le phénomène d'allergie de contact chez l'Homme. Novatrice, elle se présente comme un outil précieux adapté à l'étude *in situ* de pro-haptènes.

La liste des systèmes enzymatiques identifiés dans le modèle RHE est fournie et ne cesse d'être étoffée (**Tableau 1**). Dans une volonté de continuer à l'explorer, nos investigations sont aujourd'hui tournées vers une autre classe d'enzymes, celle des estérases (EC 3.1). Pour ce faire, nous étudions actuellement le devenir des acétates de phényle au sein du modèle RHE. Les résultats, encore préliminaires, sont présentés en guise de perspectives dans les pages qui suivent.

III. Vers une activité significative des estérases au sein du modèle RHE ?

Les dérivés de type acétate de phényle (acétates d'isoeugénol et d'eugénol) se présentent comme de bons substrats des estérases. L'étude de leur comportement sur le modèle RHE propose de s'intéresser à l'activité des estérases dans les épidermes reconstruits tout en essayant de répondre à un problème clinique concret : est-il possible de substituer dans les produits cosmétiques l'isoeugénol et l'eugénol par leurs acétates respectifs ?

L'isoeugénol et l'eugénol sont des composés très présents dans les huiles essentielles, les comestiques et les parfums, responsables d'un nombre important de cas d'allergie de contact.^[335,336] Cependant, leurs acétates respectifs, les acétates d'eugénol et d'isoeugénol, qui rentrent également dans la composition de nombreux parfums,^[55,337] ne sont pas considérés comme allergisant d'après le RIFM (the Research Institute for Fragrance Materials) sur la base de tests de sensibilisation réalisés sur l'animal. Depuis 1998, l'IFRA (International Fragrance Association), une association qui vise à protéger les intérêts des parfumeurs tout en préservant la santé des consommateurs, préconise de ne pas utiliser plus de 0,02 % d'isoeugénol dans les produits de consommation courante. Cependant, l'IFRA n'émet aucune restriction à propos des produits de substitution de l'isoeugénol tel que l'acétate d'isoeugénol. En 1999, White *et al.* sont venus contester cette position.^[338] Leurs travaux, qui s'appuient sur des tests épicutanés réalisés sur plus d'une centaine de patients, ont montré que la plupart des sujets sensibilisés à l'isoeugénol déclenchaient des réactions d'allergie cutanée lorsqu'ils étaient exposés à l'acétate d'isoeugénol. Cinq ans plus tard, en 2004, des études cliniques conduites sur un total de 2261 patients sont venues confirmer cette observation (**Figure 1**).^[339]

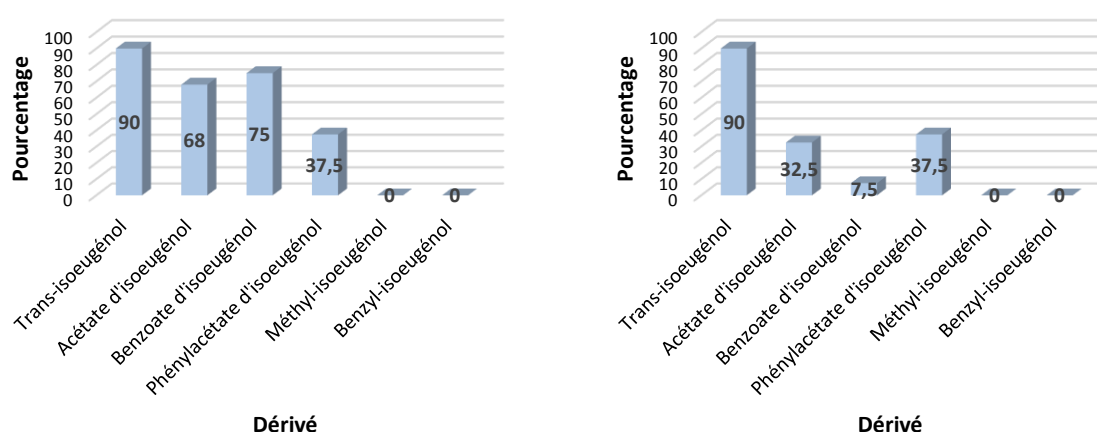


Figure 1. Pourcentage de réactions épicutanées positives à l'isoeugénol chez des patients présentant un test épicutané positif à un des dérivés de l'isoeugénol (à gauche) et pourcentage de réactions épicutanées positives à un des dérivés de l'eugénol chez des patients présentant un test épicutané positif à l'isoeugénol (à droite)

Les résultats montrent clairement qu'un haut degré de concomitance existe entre l'isoeugénol et son acétate. Ainsi, une majorité des patients réagissant à l'acétate d'isoeugénol manifeste une réaction cutanée positive au contact de l'isoeugénol. Inversement, un tiers des sujets réagissant à l'isoeugénol manifestent une réaction cutanée positive lorsqu'ils sont exposés à l'acétate d'isoeugénol. Au vu des observations, il semblerait donc qu'au moins un tiers des individus allergiques à l'isoeugénol soient susceptibles d'hydrolyser de manière significative l'acétate d'isoeugénol (**Figure 3**).^[340,341]

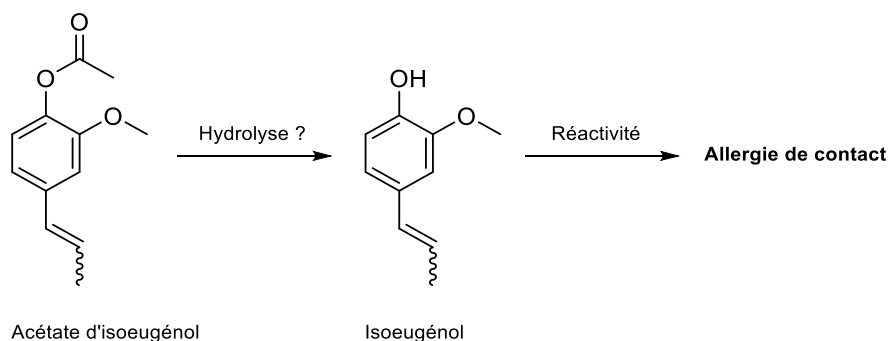


Figure 3. Comportement *in vivo* de l'acétate d'isoeugénol : est-il hydrolysé en isoeugénol ?

Au sein de la peau, l'hydrolyse des acétates d'isoeugénol et d'eugénol peut être envisagée de façon « classique » par l'eau présente. Il est également possible que la libération de l'isoeugénol et de l'eugénol résulte d'une réaction de transestérification prenant place entre leur acétate respectif et un résidu nucléophile (alcool, amine ou thiol) présent dans la structure des protéines épidermiques (**Figure 4**).

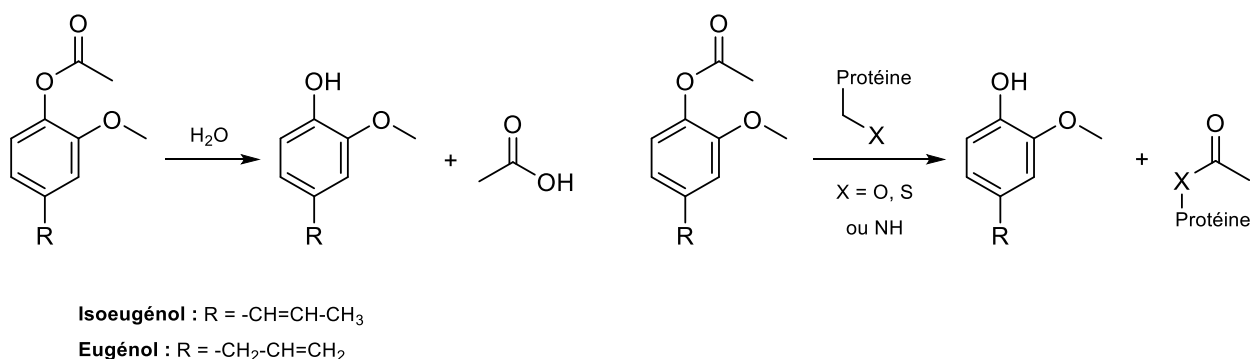


Figure 4. Formation d'isoeugénol et d'eugénol : hydrolyse « classique » par une molécule d'eau (à gauche) et réaction de transestérification par un résidu nucléophile d'une protéine (à droite)

Il semble également raisonnable d'envisager que cette hydrolyse soit réalisée par voie enzymatique au moyen d'une hydrolase (EC 3), et plus particulièrement par une esterase (EC 3.1). Les estérases sont des enzymes capables de catalyser l'hydrolyse des esters, des thioesters et quelques fois des amides, suivant la réaction présentée ci-dessous.^[342]



Les estérases sont présentes dans de nombreux organes (foie, intestin, poumon, etc.).^[343,344] Dans la peau, elles sont présentes à des niveaux significatifs puisqu'elles interviennent dans la métabolisation de nombreux xénobiotiques.^[65,345] Certaines estérases sont spécifiques des esters carboxyliques et sont nommées carboxylestérases (EC 3.1.1). Leur mécanisme d'action chez les mammifères est connu.^[346] Il repose sur une triade catalytique composée de trois acides aminés (une sérine, une histidine et un acide glutamique) (**Figure 5**). Au sein du site catalytique de l'enzyme, les esters d'acides carboxyliques sont attaqués par une sérine activée conduisant à la formation de l'alcool et d'un intermédiaire covalent de type acyl-enzyme. L'hydrolyse de cet intermédiaire libère l'acide correspondant et régénère la sérine. La présence en grande quantité d'un autre alcool dans le site de l'enzyme peut cependant conduire à une réaction de transestérification.

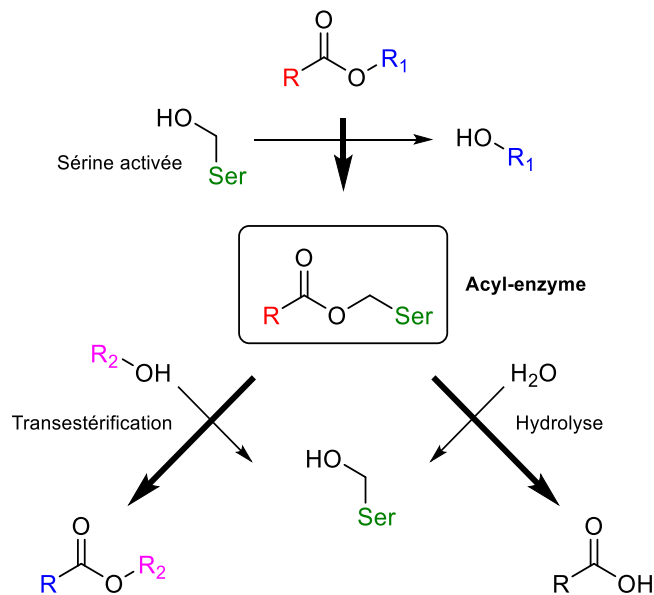


Figure 5. Mécanisme d'action des carboxylestérases

L'application des acétates d'isoeugénol et d'eugénol sur les épidermes humains reconstruits se propose d'observer leurs éventuelles transformations en isoeugénol et eugénol. Le cas échéant, nous essayerons de déterminer la ou les voie(s) qui mène(nt) à la libération des *para*-alkylphénols.

Les acétates d'isoeugénol et d'eugénol ont été synthétisés en prenant soin d'introduire sélectivement un carbone 13 sur une position nous permettant de mettre en évidence leur éventuelle hydrolyse et/ou estérification en *para*-alkylphénols. En ce sens, il semble stratégique de substituer isotopiquement le carbone quaternaire du groupement acétate par lequel ce dernier est lié au phénol. La mise au point des synthèses des acétates d'isoeugénol (^{13}C)-**33** et d'eugénol (^{13}C)-**34** a d'abord été réalisée en série non substituée au carbone 13 (**Figure 6**).

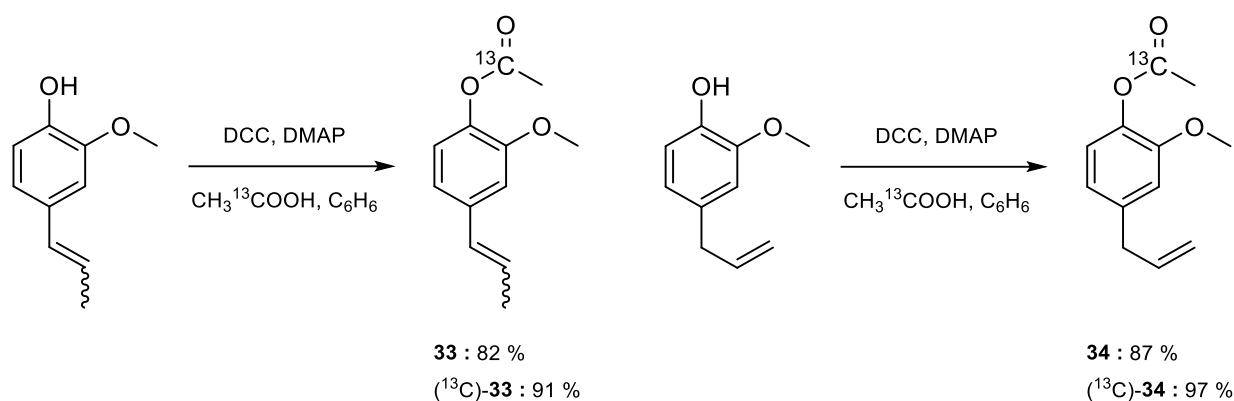


Figure 6. Synthèse des acétates d'isoeugénol (^{13}C)-**33** (à gauche) et d'eugénol (^{13}C)-**34** (à droite)

Les synthèses des acétates d'isoeugénol (^{13}C)-**33** et d'eugénol (^{13}C)-**34** sont identiques. La substitution au carbone 13 est introduite par une étape d'acétylation de l'isoeugénol et de l'eugénol au moyen d'acide-1-(^{13}C)-acétique conduisant respectivement aux acétates d'isoeugénol et d'eugénol. L'acétylation est réalisée via une estérification de Steglich grâce à un agent de couplage, la dicyclohexylcarbodiimide (DCC), et de 4-diméthylaminopyridine (DMAP). Les rendements, supérieurs à 90 % en série substituée, sont plutôt satisfaisants.

Les acétates d'isoeugénol et d'eugénol substitués au carbone 13 ont ensuite été appliqués sur le modèle RHE et leur réactivité a été suivie par RMN HRMAS. La position substituée au carbone 13 étant quaternaire, la séquence HSQC ^1H - ^{13}C traditionnellement utilisée lors de nos précédentes études a été remplacée par une séquence 1D ^{13}C . Pour l'heure, les résultats confirment une hydrolyse très rapide des acétates conduisant à la formation d'acide acétique, observé sous la forme d'acétate ($\text{CH}_3^{13}\text{COO}^-$). Les spectres 1D ^{13}C de l'acétate d'isoeugénol (^{13}C)-**33** correspondant à des temps d'incubation courts (de 5 à 45 min) illustrent parfaitement ce phénomène (**Figure 7**).

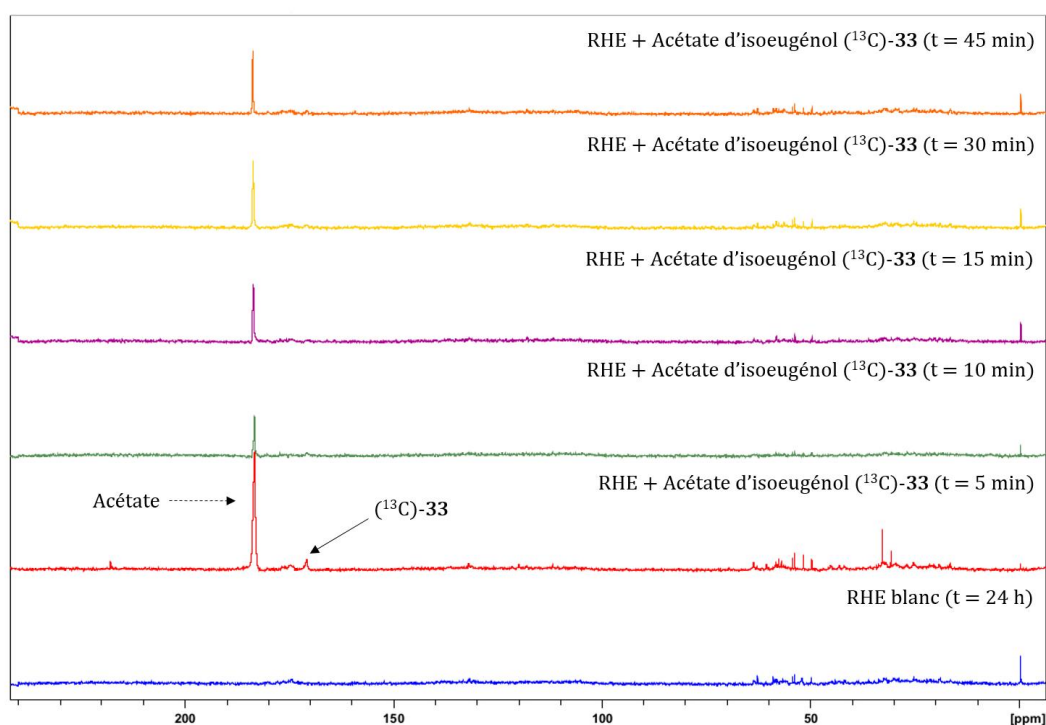


Figure 7. Superposition des spectres 1D ^{13}C de l'échantillon RHE blanc (bleu) et des échantillons RHE traités par l'acétate d'isoeugénol (^{13}C)-33 à 5 min (rouge), 10 min (vert), 15 min (violet), 30 min (jaune) et 45 min (orange)

Les spectres obtenus témoignent de l'extrême rapidité avec laquelle l'acétate d'isoeugénol est hydrolysé. En effet, dès le premier temps (t = 5 min), la quasi-totalité de l'acétate d'isoeugénol (δ 170,8 ppm) est déjà hydrolysé, et l'acétate correspondant (δ 183,4 ppm) libéré.^[347] Si après 10 min, le signal correspondant à l'acétate d'isoeugénol n'est pratiquement plus visible, après 15 min il a complètement disparu. La libération d'isoeugénol et d'eugénol dans le modèle RHE est donc réalisée par hydrolyse (enzymatique ou non) des acétates correspondants. Elle n'est donc pas le fruit d'une réaction de transestérification prenant place entre les acétates d'isoeugénol et d'eugénol et un résidu nucléophile présent dans la structure des protéines.

Le temps initial (t = 5 min) correspond au temps le plus court que nous pouvons techniquement réaliser. En effet, les 5 minutes équivalent au temps nécessaire pour préparer et récupérer l'épiderme reconstruit traité par l'acétate d'isoeugénol (application du produit en surface + décollement de l'épiderme reconstruit du support en polycarbonate avant congélation). Ainsi, l'échantillon t = 5 min n'a pas été incubé. Sur un temps aussi court, nous considérons que l'épiderme reconstruit a été en contact pendant 5 min avec l'allergène (à température ambiante) avant que les réactions soient stoppées par la congélation. De la même manière, l'échantillon t = 10 min a été incubé 5 minutes avant

d'être préparé pendant 5 autres minutes. Si certaines pistes sont actuellement à l'étude, il semble difficile de réduire le temps nécessaire à la préparation des échantillons.

L'acquisition par RMN HRMAS d'un spectre 1D ^{13}C pour un échantillon d'épiderme reconstruit donné est relativement longue (29 heures). De plus, elle est réalisée à une température de 3-4 °C. Compte tenu des conditions dans lesquelles l'analyse des échantillons est effectuée, nous sommes en droit de penser que l'hydrolyse des acétates peut avoir lieu, au moins partiellement, lors de l'acquisition des données. Les spectres CPMG réalisés en début et en fin de chaque séquence 1D ^{13}C semble réfuter cette hypothèse. Similaires, ils indiquent que les échantillons possèdent une bonne stabilité dans les conditions (temps et température) d'analyse. Nous pouvons donc estimer que l'hydrolyse des acétates est bel et bien réalisée rapidement lors de la préparation/incubation des échantillons.

Les récents travaux d'Eilstein *et al.* ont montré que l'activité des estérases au sein du modèle RHE est importante et comparable à celle des estérases présentes dans l'épiderme humain.^[138] Il semble donc raisonnable de penser que l'hydrolyse rapide ($\approx$ 5-10 min) de l'acétate d'isoeugénol résulte d'une prise en charge enzymatique par une estérase. Pour appuyer cette idée, des tests de stabilité en solution des acétates d'isoeugénol et d'eugénol ont été menés. Ils ont pour objectif d'étudier si l'hydrolyse rapide des acétates observés sur les épidermes reconstruits est liée à l'activité des estérases. Dans la pratique, les acétates d'isoeugénol (^{13}C)-**33** et d'eugénol (^{13}C)-**34** ont été séparément mis en solution à pH 7,4 en absence et en présence d'une estérase de foie de porc (esterase from porcine liver, ≥ 15 units/solid), et l'évolution des espèces suivies au moyen de la RMN ^{13}C du liquide. Les résultats obtenus sont très intéressants puisqu'ils montrent que les acétates d'isoeugénol et d'eugénol possèdent une bonne stabilité en milieu aqueux à pH 7,4. En effet, après 1 mois, seule une faible quantité des acétates est hydrolysée. En présence d'estérases dans le milieu, l'évolution est bien différente puisque les acétates d'isoeugénol et d'eugénol sont instantanément hydrolysés en isoeugénol et eugénol. En extrapolant ces résultats au modèle RHE, nous pouvons estimer que l'hydrolyse rapide des acétates d'isoeugénol (^{13}C)-**33** et d'eugénol (^{13}C)-**34** sur les épidermes reconstruits n'est pas réalisée de façon « classique » par l'eau, mais bel et bien par voie enzymatique au moyen d'une estérase capable de catalyser la réaction.

L'hydrolyse des acétates d'isoeugénol et d'eugénol soulève une question majeure en ce qui concerne la validité des modèles animaux utilisés pour détecter les molécules sensibilisantes. Les études cliniques menées sur l'Homme, combinées à nos observations sur le modèle RHE, indiquent clairement que les acétates sont hydrolysés au sein des épidermes, qu'ils soient « vivants » ou reconstruits. Cependant, les acétates d'isoeugénol et d'eugénol ne sont pas des molécules sensibilisantes chez l'animal. Il semblerait donc que les enzymes de métabolisation présentes dans les épidermes des animaux ne soit pas en mesure d'hydrolyser les acétates dans des quantités permettant

l'induction d'une réaction allergique. En définitive, les modèles animaux sont-ils réellement adaptés pour détecter les molécules allergisantes pour l'Homme ? Différentes études se sont intéressées à l'activité des estérases dans la peau de plusieurs d'espèces, dont celle de l'Homme.^[71,348] Pour exemple, l'activité des estérases dans la peau de rat est deux à trois supérieure à celle dans la peau humaine. Le modèle de peau le plus représentatif de la peau humaine est sans conteste celui des mini-porcs. Qu'en est-il des souris et des cochons d'Inde ? En l'absence de données, il nous est difficile de conclure. Il serait très intéressant d'étudier le comportement des acétates d'isoeugénol et d'eugénol par RMN RHMAS sur des épidermes animaux. La comparaison des résultats permettrait de lever certaines interrogations...

A la lumière de ce travail de thèse, l'utilisation conjointe du modèle RHE et de la RMN HRMAS a montré un très bon potentiel concernant l'étude *in situ* du métabolisme de pro-haptènes. La technique RHE/RMN HRMAS se présente comme un outil novateur dans la compréhension des mécanismes qui régissent le phénomène d'allergie de contact chez l'Homme. Compte tenu des résultats obtenus, il est envisageable d'exploiter la technique pour s'intéresser au devenir d'autres pro-haptènes dans les épidermes reconstruits. En ce sens, l'alcool cinnamique et la Névirapine se présentent comme des molécules tout à fait intéressantes. L'alcool cinnamique est un pro-haptène rencontré dans les huiles essentielles, très utilisé en parfumerie, qui rentre dans la composition du Fragrance Mix I.^[349] Alcool qualifié de « précurseur d'aldéhyde », son activation passe par une oxydation enzymatique en aldéhyde cinnamique réalisée par une alcool déshydrogénase (ADH, EC 1.1.1.1).^[80] L'aldéhyde cinnamique ainsi formé est un allergène qui peut facilement réagir avec les résidus nucléophiles des protéines pour former des adduits stables à la base des mécanismes de l'eczéma de contact.^[350] Toutefois, la capacité de la peau à transformer l'aldéhyde cinnamique en acide cinnamique laisse supposer la présence d'aldéhydes déshydrogénases (ALDH, EC 1.2.1.3) dans les épidermes humains (**Figure 9**).

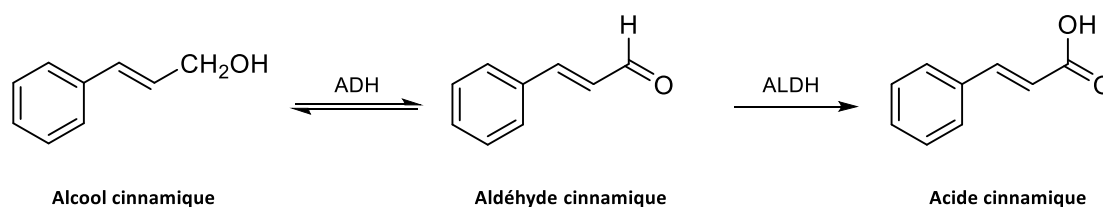


Figure 9. Voie de métabolisation de l'alcool cinnamique en aldéhyde cinnamique et acide cinnamique

De son côté, la Névirapine est un médicament antirétroviral qui inhibe la transcriptase inverse du VIH de type I. Très utilisée en association avec d'autres antirétroviraux, elle peut provoquer de graves effets secondaires hépatiques et surtout cutanés chez les patients traités. La Névirapine est métabolisée dans le foie par un cytochrome P450 pour former, via un intermédiaire radicalaire, soit une méthylène quinone responsable de la toxicité hépatique, soit un dérivé hydroxylé (12-OH-NVP). Ce dernier non réactif pourrait alors diffuser dans l'organisme jusqu'aux couches superficielles de la peau où il serait sélectivement activé par une sulfotransférase (EC 2.8.2) épidermique. Le 12-OH-NVP ainsi formé pourrait alors alkyler les protéines épidermiques et induire de graves toxidermies de type nécrolyse épidermique toxique (syndrome de Steven-Johnson) (**Figure 10**).^[351,352]

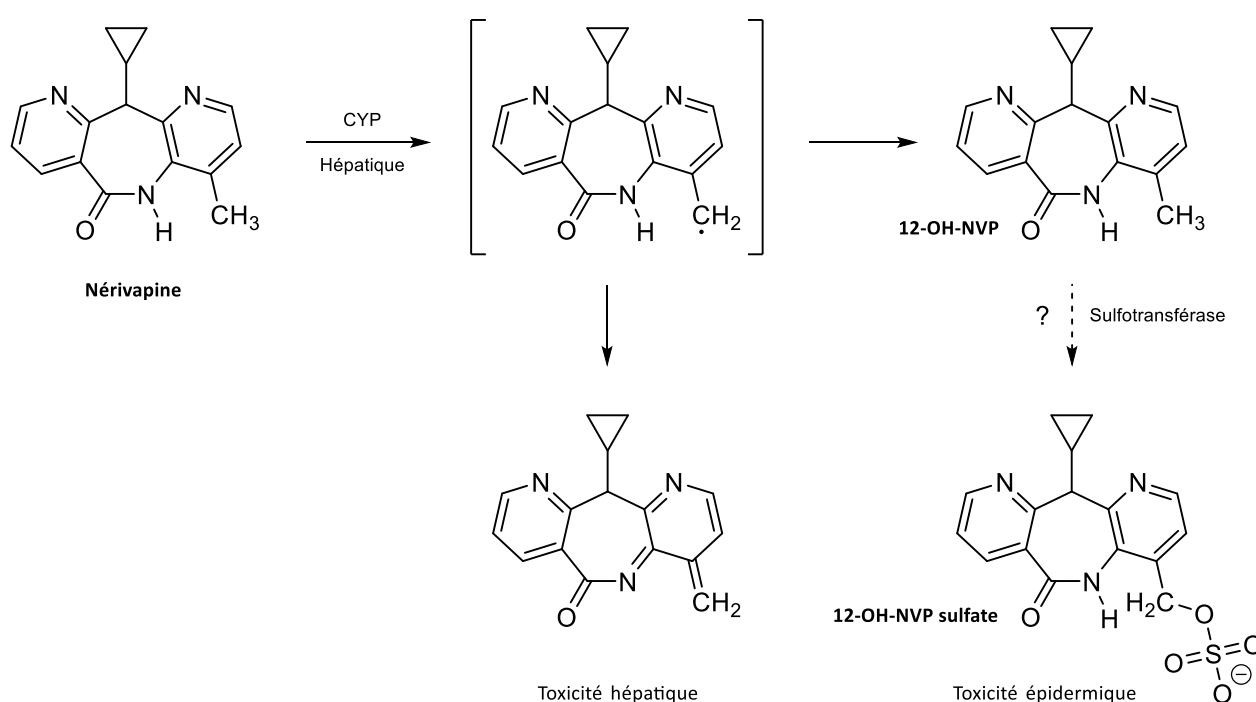


Figure 10. Voies de métabolisation et toxicité de la Névirapine

D'autre part, les cellules de Langerhans (cellules dendritiques présentatrices d'antigènes), présents dans le tissu cutané, jouent un rôle important dans l'allergie de contact.^[353] Néanmoins, elles ne rentrent pas dans la composition du modèle RHE que nous avons utilisé pour mener à bien nos études.^[354] Il convient de signaler que la reproduction de nos expériences sur un modèle d'épiderme possédant des cellules de Langerhans permettrait peut-être d'observer des disparités au niveau de la vitesse des réactions mises en jeu. Le cas échant, des études quantitatives permettraient d'évaluer avec précision l'impact des cellules de Langerhans dans la cinétique des réactions qui peuvent aboutir à l'induction d'un eczéma de contact.

Enfin, lors de l'induction d'une allergie de contact, il faut garder à l'esprit que la population des adduits qui se forme est très diverse à bien des égards. Toutes les combinaisons ou presque vont se former dans des quantités plus ou moins importantes. Ainsi, un pro-haptène de départ peut subir diverses biotransformations qui peuvent donner naissance à des espèces réactives différentes. Chacune d'entre elles peut réagir avec les résidus nucléophiles des protéines épidermiques et le site réactif sur une même espèce réactive n'est pas nécessairement le même. Nous ne pouvons pas prétendre que l'adduit le plus fréquemment détecté par RMN HRMAS sera celui qui influencera le plus la réaction immunitaire ; il est possible qu'une combinaison minoritaire non révélée en raison de la limite de sensibilité de la technique d'analyse fasse plus d'effet. A cela vient s'ajouter la variabilité interindividuelle qui reflète les différences qui existent d'un patient à l'autre, principalement dans la composition du répertoire lymphocytaire T et des capacités métaboliques.^[355] Il convient donc d'être particulièrement prudent dans l'interprétation des résultats, une observation clinique ou un résultat *in vivo* prévalant toujours sur une expérience effectuée sur un épiderme reconstruit...

Experimental section

Partie expérimentale

Experimental section

Material and methods

Chemistry

All air- and moisture-sensitive reactions were carried out in flame-dried glassware under an argon atmosphere.

Dichloromethane (CH_2Cl_2), tetrahydrofuran (THF), diethyl ether (Et_2O) and toluene (PhMe) were dried by passing through activated alumina under an argon pressure using Glasste Technology GTS100 devices. All the following distillations were carried out under an argon atmosphere. Benzene (PhH) was distilled from CaH_2 . Dimethylformamide (DMF) was distilled under reduced pressure and stored over 4 Å molecular sieves. Hexamethylphosphoramide (HMPA) was distilled from CaH_2 under reduced pressure and stored over 4 Å molecular sieves. Pyrrolidine was distilled from barium oxide (BaO). Triethylamine (Et_3N) was distilled from KOH. Distilled water was obtained by crossing on activated carbon cartridge (ORC, Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France) and on ion exchange cartridges (R3, M3 and ORC Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France).

All commercially available reagents were used as received or purified by standard means,^[356] depending on their purity. Lithium compounds (*n*-BuLi, *s*-BuLi and MeLi) were gauged according to the method described by Suffert.^[357] All extractive procedures were performed using technical grade solvents, and all aqueous solutions were saturated unless details are given.

Analytical thin layer chromatography (TLC) was carried out on silica gel 60 F₂₅₄ plates (Mercks) with visualization by ultraviolet light (UV/vis, $\lambda = 254$ nm), cerium phosphomolybdic acid (PMA/Ce) or anisaldehyde bip. All TLC stains were prepared as specified:

- PMA/Ce: phosphomolybdic acid (2 g), cerium (IV) sulfate (0.8 g), sulphuric acid (4.8 mL) and water (75.2 mL)
- Anisaldehyde: *p*-anisaldehyde (0.5 mL), *m*-anisaldehyde (0.5 mL), acetic acid (100 mL), methanol (85 mL) and sulphuric acid (5 mL)

Flash column chromatography was carried out using SiO_2 60 (40-63 μm , Merck) and the procedures included the subsequent evaporation of solvents under reduced pressure.

Proton (^1H NMR) and Carbon (^{13}C NMR) nuclear magnetic resonance spectra were recorded on the following 300, 400 or 500 MHz instruments (Bruker). Chemical shifts are given in part per million (ppm) on the δ scale. The residual solvent peak was used as reference values. For ^1H NMR: $\text{CDCl}_3 = 7.26$ ppm. For ^{13}C NMR: $\text{CDCl}_3 = 77.16$ ppm. Data are presented as followed: chemical shift, multiplicity (s=singlet, d=doublet, t=triplet, q=quartet, m=multiplet, br.=broad), integration and coupling constants J (in Hz). Assignments were determined either on the basis of unambiguous chemical shifts or coupling patterns. COSY, HSQC or HMBC experiments were performed when necessary to complete spectral attribution for related compounds. Mass spectra (MS) data were recorded by the Service de Spectrométrie de Masse of the University of Strasbourg on a microTOF spectrometer equipped with an orthogonal electrospray interface (ESI). The parent ions $[\text{M}+\text{H}]^+$ or $[\text{M}+\text{Na}]^+$ are quoted. Melting points were measured using a Büchi-tottoli 510 apparatus without temperature correction. MW refers to molecular weight (g/mol).

Buffers preparation

All buffers were prepared as specified:

- Phosphate buffer saline, 0.1 M, pH = 7.4
 - 40.5 mL of solution of 0.2 M Na_2HPO_4
 - 9.5 mL of solution of 0.2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2$
 - 50 mL of milliq. H_2OpH was adjusted to 7,4 with Na_2HPO_4 / $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2$ solutions
- HEPES buffer saline, 0.05 M, pH = 7,4
 - HEPES (1.19 g, 5 mmol)
 - NaCl (0.88 g, 15 mmol)
 - 100 mL of milliq. H_2OpH was adjusted to 7,4 with a solution of KOH (1 M)

RMN and LC-MS reactivity studies

All monodimensional nuclear magnetic resonance spectra (^1H and ^{13}C) were recorded on a Bruker Avance I (300 MHz (^1H) and 75 MHz (^{13}C)) spectrometer, Bruker Avance III (400 MHz (^1H) and 100 MHz (^{13}C)) spectrometer or Bruker Avance I (500 MHz (^1H) and 125 MHz (^{13}C)) spectrometer. Adducts formed were identified thanks to HSQC or HMBC experiments.

All bidimensional nuclear magnetic resonance spectre $^1\text{H}\{^{13}\text{C}\}$ were recorded on a Bruker Avance I (300 MHz (^1H) and 75 MHz (^{13}C)) spectrometer, Bruker Avance III (400 MHz (^1H) and 100 MHz (^{13}C)) spectrometer or Bruker Avance I (500 MHz (^1H) and 125 MHz (^{13}C)) spectrometer in DMSO- d_6 or a mixture of phosphate buffer 7,4 and CD_3CN . The solvent peak was used as reference values. For ^1H NMR: DMSO- d_6 = 2.50 ppm. For ^{13}C NMR: DMSO- d_6 = 39.52 ppm. For ^1H NMR: CD_3CN = 1.94 ppm. For ^{13}C NMR: CD_3CN = 1.32/118.26 ppm.

All liquid chromatography-mass spectrometry analyses were performed on a Agilent 1200 equipment with a C18 reverse phase column (Poroshell 98 or Hypersil Gold). The samples were eluted in a water/acetonitrile gradient. Mass spectre (MS) were recorded on a quadrupole Agilent 5973B spectrometer equipped with an electrospray/atmospheric pressure chemical ionization interface (ESI/APCI). The parent ions $[\text{M}+\text{H}]^+$ or $[\text{M}-\text{H}]^-$ are quoted.

Reconstructed Human Epidermis (RHE) and HRMAS NMR technique

Reconstructed Human Epidermis

For all experiments, the SkinEthic® RHE model (SkinEthic, France) was chosen as it could be obtained in a large 4 cm² format. SkinEthic® RHE are normal human keratinocytes cultured for 17 days on an inert polycarbonate filter at the air-liquid interface. The 3D reconstructed epidermis were received on day 18, aseptically removed from the transport medium and pre-incubated 2 hours in a growth culture medium (SkinEthic, France) at 37 °C, 5 % CO_2 , and humidified atmosphere, according to SkinEthic's procedures.^[358]

Rotor preparation

According to the procedure described by Piotto *et al.*,^[201] samples were prepared at -20 °C by introducing with a biopsy punch 15-20 mg of frozen RHE in to a disposable 30 μL Kelf insert. To provide a lock frequency for the NMR spectrometer, 10 μL of D_2O containing 1 % w/w of trimethylsilyl propanoic acid (TSP) were also added into the insert. The insert was then sealed tightly with a conical plug and stored at -80 °C pending HR-MAS analysis. The insert insures that the entire RHE sample is detected by the radio-frequency coil of the probe and that no leaks occur during the HR-MAS analysis. Shortly before analysis, the insert was placed into a standard 4 mm ZrO_2 rotor closed with a cap. The ensemble was then inserted into a HR-MAS probe pre-cooled at 4 °C. All HR-MAS experiments were performed at 4 °C and were started immediately after the temperature inside the insert was taken out

of the rotor and stored back at -80 °C. Therefore, complementary HR-MAS analysis can be performed at a later stage on any of the stored sample inserts.

HR-MAS NMR: data acquisition

HR-MAS spectra were recorded on a Bruker Avance III 500 spectrometer (Haute-pierre University Hospital, Strasbourg) operating at a proton frequency of 500.13 MHz. The spectrometer was equipped with a 4 mm double resonance (^1H and ^{13}C) gradient HR-MAS probe. A Bruker Cooling Unit (BCU) was used to regulate the temperature at 3 °C by cooling down the bearing air flowing into the probe. All the NMR experiments were conducted on sample spinning at 3502 Hz in order to keep the rotation sidebands out of the spectral region of interest. According to the method described by Piotto *et al.*,^[359] shimming procedure of HR-MAS is realized. For each sample, a one-dimensional proton spectrum using a standard one-pulse and a Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) pulse sequences were acquired (Bruker *cpmgpr1d* pulse sequence). Both sequences were coupled with water presaturation. CPMG sequence allows a better observation of signals by reducing the intensity of those of macromolecules and lipids in the spectrum. The inter-pulse delay between the 180° pulses of the CPMG pulse train was synchronized with the sample rotation and set to 285 ms ($1/\omega_r = 1/3502 = 285 \mu\text{s}$) in order to eliminate signal losses caused by B_1 field inhomogeneities. The number of loops was set to 328 giving the CPMG pulse train a total length of 93 ms.

One-pulse and CPMG experiments were acquired with the following parameters: sweep width 14.2 ppm, number of points 32 k, relaxation delay 2 s, acquisition time 2.3 s. A total of 256 FID were acquired resulting in an acquisition time of 19 min. All spectra were recorded in such a manner that only a zero phase order correction was necessary to properly phase the spectrum. The FID was multiplied by an exponential weighing function corresponding to a line broadening of 0.3 Hz prior to Fourier transformation. All spectra were preprocessed using automatic base line correction routines. Spectra were referenced by setting the lactate doublet chemical shift to 1.33 ppm in ^1H and to 22.7 ppm in ^{13}C .

The ^{13}C NMR spectra were acquired using a single-pulse experiment, with decoupling performed during the recycle delay and during acquisition (WALTZ-16 pulse sequence). The experiments were acquired with the following parameters: flip angle of 30°, sweep width 248 ppm, number of points 64 k, relaxation delay of 1 s, acquisition time of 1.05 s. A total of 48000 FID were acquired resulting in an acquisition time of 29 hours. All spectra were recorded in such a manner that only a zero phase order correction was necessary to properly phase the spectrum. The FID was multiplied by an exponential weighing function corresponding to a line broadening of 5 Hz prior to Fourier transformation. All spectra were processed using automatic base line correction routines. Spectra

were referenced by setting the lactate doublet chemical shift to 22.7 ppm in ^{13}C or by setting the TSP singlet to 0 ppm when lactate was not detectable.

Two-dimensional heteronuclear ^1H - ^{13}C g-HSQC multiplicity-edited experiments using echo-antiecho grandient selection for phase-sensitive detection were acquired using a 73 ms acquisition time with GARP ^{13}C decoupling and a 1.5 s relaxation delay. A total of 136 transients were averaged for each of 256 t_1 increments, corresponding approximately to a total acquisition time of 15 h. Two 1 ms sine-shaped gradient pulses of strength 40 and 10.05 G/cm were used in the experiment. Data were zero-filled to a 2k * 1k matrix and weighted with a shifted square sine bell function before Fourier transformation.

Synthesis of ^{13}C -substituted molecules

Synthesis of creosol, creosol- ^{13}C , creosol- $^{13}\text{C}_2$ and derivatives

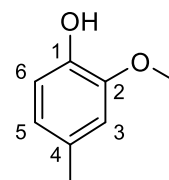
Synthesis of **1**

2-Methoxy-4-methylphenol; Creosol

$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_2$

$\text{MW} = 138.17 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$\text{TLC } R_f = 0.43$ (pentane/ether, 70:30); rev: PMA/Ce



To a solution of **4** (340 mg, 0.9 mmol, 1 equiv.) in dry tetrahydrofuran (5 mL) was added tetra-*n*-butylammonium fluoride (1.8 mL, 1 M in tetrahydrofuran, 1.8 mmol, 2 equiv.). The solution was stirred for 60 min at room temperature, then quenched with water (5 mL). The aqueous layer was extracted with diethyl ether (3 x 5 mL), and the organic extracts were combined, washed with brine (10 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography (pentane/diethyl ether, 70:30) to give 2-methoxy-4-methylphenol **1** (123 mg, 0.89 mmol, quant.) as a colorless oily liquid. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 2.32 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 3.88 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 5.54 (s, 1H, $-\text{OH}$), 6.67-6.70 (m, 2H, H-3 and H-5), 6.84 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6 \text{ Hz}$, H-6). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 21.1 ($-\text{CH}_3$), 55.9 ($-\text{OCH}_3$), 111.8 (C-3), 114.3 (C-6), 121.6 (C-5), 129.7 (C-4), 143.4 (C-1), 146.4 (C-2).

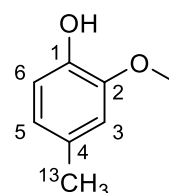
Synthesis of (^{13}C)-**1**

2-Methoxy-4-(^{13}C)methylphenol; Creosol- ^{13}C

$\text{C}_7^{13}\text{CH}_{10}\text{O}_2$

$\text{MW} = 139.16 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

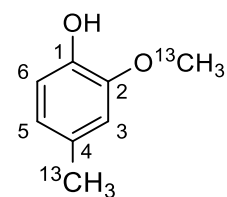
$\text{TLC } R_f = 0.43$ (pentane/ether, 70:30); rev: PMA/Ce



Starting from silyl ether **4** (430 mg, 1.14 mmol) and using the same procedure as for the synthesis of 2-methoxy-4-methylphenol **1** gave after purification on silica gel (^{13}C)-**1** (150 mg, 1.08 mmol, 95 %) as a yellowish oily liquid. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 2.31 (d, 3H, $^1J_{\text{HC}} = 126.0 \text{ Hz}$, $^{-13}\text{CH}_3$), 3.87 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 5.53 (br. s, 1H, $-\text{OH}$), 6.66-6.70 (m, 2H, H-3 and H-5), 6.83 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.7 \text{ Hz}$, H-6). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 21.2 ($^{-13}\text{CH}_3$), 55.9 ($-\text{OCH}_3$), 111.7 (C-3), 114.3 (C-6), 121.6 (C-5), 129.9 (d, $^1J_{\text{CC}} = 44.9 \text{ Hz}$, C-4), 143.4 (C-1), 146.4 (C-2).

Synthesis of ($^{13}\text{C}_2$)-1

2-(^{13}C)Methoxy-4-(^{13}C)methylphenol; Creosol- $^{13}\text{C}_2$



$\text{C}_6^{13}\text{C}_2\text{H}_{10}\text{O}_2$

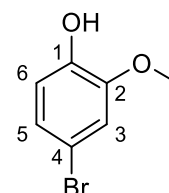
$\text{MW} = 140.15 \text{ g.mol}^{-1}$

$\text{TLC } R_f = 0.43$ (pentane/diethyl ether, 70:30); rev: PMA/Ce

Starting from ($^{13}\text{C}_2$)-4 (296 mg, 0.79 mmol) and using the same procedure as for the synthesis of 2-methoxy-4-methylphenol **1** gave after purification on silica gel ($^{13}\text{C}_2$)-**1** (104 mg, 0.74 mmol, 94 %) as a yellowish oily liquid. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 2.29 (d, 3H, $^1J_{\text{HC}} = 126.5 \text{ Hz}$, $-\text{CH}_3$), 3.87 (d, 3H, $^1J_{\text{HC}} = 144.4 \text{ Hz}$, $-\text{O}^{13}\text{CH}_3$), 6.64–6.70 (m, 2H, H-3 and H-5), 6.81 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.7 \text{ Hz}$, H-6). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 21.2 ($-\text{CH}_3$), 56.0 ($-\text{O}^{13}\text{CH}_3$), 111.8 (C-3), 114.2 (C-6), 121.6 (C-5), 129.7 (d, $^1J_{\text{CC}} = 45.3 \text{ Hz}$, C-4), 143.5 (C-1), 146.4 (C-2).

Synthesis of 2

4-Bromo-2-methoxyphenol



$\text{C}_7\text{H}_7\text{BrO}_2$

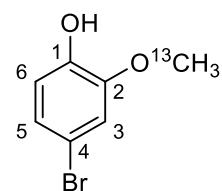
$\text{MW} = 203.04 \text{ g.mol}^{-1}$

$\text{TLC } R_f = 0.30$ (pentane/ethyl acetate, 90:10); rev: UV/vis

To a solution of 2-methoxyphenol **7** (0.89 mL, 8.10 mmol, 1 equiv.) in dry dichloromethane (60 mL) at 0°C was added over 90 min a solution of bromine (0.42 mL, 8.10 mmol, 1 equiv.) in dry dichloromethane (10 mL). At the end of the addition, the reaction mixture was quenched with water (60 mL), and the aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 x 20 mL). The organic extracts were combined, washed with saturated solution of sodium hydrosulfite (30 mL), brine (30 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography (pentane/ethyl acetate, 90:10) to give 4-bromo-2-methoxyphenol **2** (1.17 g, 5.76 mmol, 71 %) as a yellowish oily liquid. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 3.81 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 5.88 (br. s, 1H, $-\text{OH}$), 6.77 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.2 \text{ Hz}$, H-6), 6.93–6.95 (m, 2H, H-3 and H-5). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 55.1 ($-\text{OCH}_3$), 111.6 (C-3), 114.1 (C-4), 115.8 (C-6), 124.1 (C-5), 144.1 (C-1), 147.2 (C-2).

Synthesis of (¹³C)-2

4-Bromo-2-(¹³C)methoxyphenol



$C_6^{13}CH_8O_2$

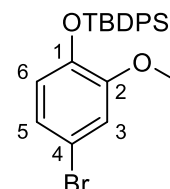
MW = 204.03 g.mol⁻¹

TLC R_f = 0.30 (pentane/ethyl acetate, 90:10); rev: UV/vis

Starting from (¹³C)-7 (390 mg, 3.12 mmol) and using the same procedure as for the synthesis of 4-bromo-2-methoxyphenol **2** gave after purification on silica gel (¹³C)-**2** (336 mg, 1.65 mmol, 53 %) as a yellowish oily liquid. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 3.88 (s, 3H, ¹J_{HC} = 144.7 Hz, -O¹³CH₃), 5.54 (s, 1H, -OH), 6.80 (d, ³J_{HH} = 8.0 Hz, 3H, H-6), 6.96–7.01 (m, 2H, H-3 and H-5). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 56.3 (-O¹³CH₃), 111.8 (C-3), 114.3 (C-4), 116.0 (C-6), 124.3 (C-5), 144.3 (C-1), 147.3 (C-2).

Synthesis of 3

(4-Bromo-2-methoxyphenoxy)-(tert-butyl)diphenylsilane



$C_{23}H_{25}BrO_2Si$

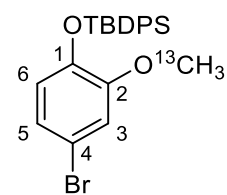
MW = 441.44 g.mol⁻¹

TLC R_f = 0.20 (pentane/dichloromethane, 85:15); rev: UV/vis

To a solution of 4-bromo-2-methoxyphenol **2** (0.5 g, 2.46 mmol, 1 equiv.) in dichloromethane (15 mL) at room temperature was added imidazole (0.503 g, 7.38 mmol, 3 equiv.). The reaction mixture was stirred to complete dissolution, and *tert*-butyldiphenylchlorosilane (0.7 mL, 3.94 mmol, 1.6 equiv.) was added dropwise. The solution was stirred for 2 h at room temperature, then quenched with water (15 mL). The aqueous layer was separated and extracted with diethyl ether (3 x 15 mL). The organic extracts were combined, washed with brine (40 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography (pentane/dichloromethane, 95:5) to give silyl ether **3** (1.08 g, 2.46 mmol, quant.) as a colorless oil. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.10 (s, 9H, -SiC(CH₃)₃), 3.55 (s, 3H, -OCH₃), 6.56 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.3 Hz, H-6), 6.75 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.3 Hz, ⁴J_{HH} = 2.3 Hz, H-5), 6.84 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 2.3 Hz, H-3), 7.29–7.45 (m, 6H, 4 x *meta*-SiArH and 2 x *para*-SiArH), 7.63–7.75 (m, 4H, *ortho*-SiArH). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 19.9 (-SiC(CH₃)₃), 26.8 (3C, -SiC(CH₃)₃), 55.5 (-OCH₃), 113.3 (C-4), 115.6 (ArCH), 121.3 (ArCH), 123.5 (ArCH), 127.6 (4C, *meta*-SiArCH), 129.7 (2C, *para*-SiArCH), 133.3 (2C, -SiArC), 135.5 (4C, *ortho*-SiArCH), 144.4 (C-1 or C-2), 151.4 (C-1 or C-2).

Synthesis of (¹³C)-3

[4-Bromo-2-(¹³C)methoxyphenoxy]-(tertbutyl)diphenylsilane



C₂₂¹³CH₂₅BrO₂Si

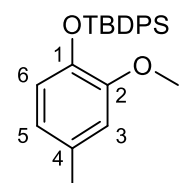
MW = 442.43 g.mol⁻¹

TLC *R_f* = 0.20 (pentane/dichloromethane, 85:15); rev: UV/vis

Starting from (¹³C)-**2** (336 mg, 1.65 mmol) and using the same procedure as for the synthesis of silyl ether **3** gave after purification on silica gel (¹³C)-**3** (617 mg, 1.40 mmol, 85 %) as a colorless oil. **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ 1.10 (s, 9H, -SiC(CH₃)₃), 3.55 (d, 3H, ¹*J*_{HC} = 144.3 Hz, -O¹³CH₃), 6.56 (d, 1H, ³*J*_{HH} = 8.4 Hz, H-6), 6.75 (dd, 1H, ³*J*_{HH} = 8.4 Hz, ⁴*J*_{HH} = 2.3 Hz, H-5), 6.86 (d, 1H, ⁴*J*_{HH} = 2.3 Hz, H-3), 7.32–7.44 (m, 6H, 4 x *meta*-SiArH and 2 x *para*-SiArH), 7.67–7.70 (m, 4H, *ortho*-SiArH). **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ 19.9 (-SiC(CH₃)₃), 26.8 (3C, -SiC(CH₃)₃), 55.7 (-O¹³CH₃), 113.2 (C-4), 115.7 (ArCH), 121.2 (ArCH), 123.5 (ArCH), 127.6 (4C, *meta*-SiArCH), 129.7 (2C, *para*-SiArCH), 133.3 (2C, -SiArC), 135.4 (4C, *ortho*-SiArCH), 144.5 (C-1 or C-2), 151.4 (C-1 or C-2).

Synthesis of 4

(2-Methoxy-4-methylphenoxy)-(tert-butyl)diphenylsilane

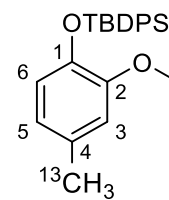


C₂₄H₂₈O₂Si

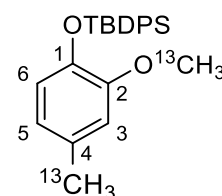
MW = 376.57 g.mol⁻¹

TLC *R_f* = 0.51 (cyclohexane/toluene, 70:30); rev: PMA/Ce

To a solution of silyl ether **3** (498 mg, 1.13 mmol, 1 equiv.) in dry diethyl ether (5 mL) at -40°C was added dropwise *n*-buthyllithium (1.16 mL, 1.46 M in hexane, 1.69 mmol, 1.5 equiv.). The reaction mixture was warmed to 0°C and stirred for 90 min. Methyl iodide (0.35 mL, 5.65 mmol, 5 equiv.) was added, and the solution was stirred for an additional 18 h at room temperature. The reaction was quenched with saturated solution of ammonium chloride (15 mL), and the aqueous layer was extracted with diethyl ether (3 x 15 mL). The organics extracts were combined, washed with brine (40 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/toluene, 90:10) to give **4** (270 mg, 0.72 mmol, 64 %) as a colorless oil. **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ 1.11 (s, 9H, -SiC(CH₃)₃), 2.23 (s, 3H, -CH₃), 3.57 (s, 3H, -OCH₃), 6.45 (dd, 1H, ³*J*_{HH} = 7.8 Hz, ⁴*J*_{HH} = 1.6 Hz, H-5), 6.59 (d, 1H, ⁴*J*_{HH} = 1.6 Hz, H-3), 6.61 (d, 1H, ³*J*_{HH} = 7.8 Hz, H-6), 7.29–7.48 (m, 6H, 4 x *meta*-SiArH and 2 x *para*-SiArH), 7.67–7.83 (m, 4H, *ortho*-SiArH). **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ 19.8 (-SiC(CH₃)₃), 21.2 (-CH₃), 26.8 (3C, -SiC(CH₃)₃), 55.6 (-OCH₃), 113.6 (ArCH), 119.9 (ArCH), 121.0 (ArCH), 127.6 (4C, *meta*-SiArCH), 129.6 (2C, *para*-SiArCH), 131.1 (C-4), 133.9 (2C, -SiArC), 135.5 (4C, *ortho*-SiArCH), 142.9 (C-1 or C-2), 150.2 (C-1 or C-2).

Synthesis of (¹³C)-4[2-Methoxy-4-(¹³C)methylphenoxy]-(tert-butyl)diphenylsilane**C₂₃¹³CH₂₈O₂Si****MW** = 377.56 g.mol⁻¹**TLC** *R_f* = 0.51 (cyclohexane/toluene, 70:30); rev: PMA/Ce

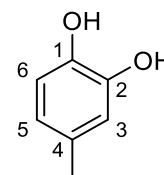
Starting from silyl ether **3** (618 mg, 1.4 mmol, 1 equiv.) and methyl-¹³C iodide (1 g, 7 mmol, 5 equiv.) and using the same procedure as for the synthesis of **4** gave after purification on silica gel (¹³C)-**4** (452 mg, 1.19 mmol, 85 %) as a colorless oil. **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ 1.11 (s, 9H, -SiC(CH₃)₃), 2.22 (d, 3H, ¹*J*_{HC} = 126.2 Hz, -¹³CH₃), 3.56 (s, 3H, -OCH₃), 6.42-6.47 (m, 1H, H-5), 6.58-6.61 (m, 2H, H-3 and H-6), 7.31-7.43 (m, 6H, 4 x *meta*-SiArH and 2 x *para*-SiArH), 7.71-7.77 (m, 4H, *ortho*-SiArH). **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ 19.9 (-SiC(CH₃)₃), 21.2 (-¹³CH₃), 26.9 (3C, -SiC(CH₃)₃), 55.6 (-OCH₃), 113.6 (ArCH), 119.9 (ArCH), 121.0 (ArCH), 127.6 (4C, *meta*-SiArCH), 129.6 (2C, *para*-SiArCH), 131.1 (d, ¹*J*_{CC} = 42.6 Hz, C-4), 134.0 (2C, -SiArC), 135.5 (4C, *ortho*-SiArCH), 142.8 (C-1 or C-2), 150.0 (C-1 or C-2).

Synthesis of (¹³C₂)-4[2-(¹³C)Methoxy-4-(¹³C)methylphenoxy]-(tertbutyl)diphenylsilane**C₂₂¹³C₂H₂₈O₂Si****MW** = 378.56 g.mol⁻¹**TLC** *R_f* = 0.51 (cyclohexane/toluene, 70:30); rev: phosphomolybdic acid/cerium

Starting from (¹³C)-**3** (617 mg, 1.4 mmol, 1 equiv.) and methyl-¹³C iodide (1 g, 7 mmol, 5 equiv.) and using the same procedure as for the synthesis of **4** gave after purification on silica gel (¹³C₂)-**4** (296 mg, 0.79 mmol, 56 %) as a colorless oil. **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ 1.10 (s, 9H, -SiC(CH₃)₃), 2.22 (d, 3H, ¹*J*_{HC} = 126.2 Hz, -¹³CH₃), 3.58 (d, 3H, ¹*J*_{HC} = 144.4 Hz, -O¹³CH₃), 6.43-6.46 (m, 1H, H-5), 6.58-6.62 (m, 2H, H-3 and H-6), 7.30-7.43 (m, 6H, 4 x *meta*-SiArH and 2 x *para*-SiArH), 7.71-7.77 (m, 4H, *ortho*-SiArH). **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ 19.8 (-SiC(CH₃)₃), 21.2 (-¹³CH₃), 27.0 (3C, -SiC(CH₃)₃), 55.5 (-O¹³CH₃), 113.6 (ArCH), 119.8 (ArCH), 121.1 (ArCH), 127.7 (4C, *meta*-SiArCH), 129.7 (2C, *para*-SiArCH), 131.2 (d, ¹*J*_{CC} = 43.0 Hz, C-4), 134.0 (2C, -SiArC), 135.4 (4C, *ortho*-SiArCH), 142.8 (C-1 or C-2), 150.0 (C-1 or C-2).

Synthesis of 5

4-Methylcatechol



$C_7H_8O_2$

$MW = 124.14 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

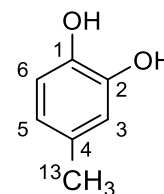
TLC $R_f = 0.41$ (pentane/diethyl ether, 50:50); rev: PMA/Ce

mp = 64-65 °C / **mp** (lit.) = 65 °C

To a solution of 2-methoxy-4-methylphenol **1** (100 mg, 0.72 mmol, 1 equiv.) in dichloromethane (15 mL) at -78 °C was added dropwise boron tribromide (2.51 mL, 1 M in hexane, 2.51 mmol, 3.5 equiv.). The reaction medium was stirred for 15 min, then warmed to room temperature and stirred for an additional 90 min. The solution was cooled to 0 °C, and quenched with saturated solution of sodium chloride (10 mL). The aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 x 10 mL), and the organics extracted were combined, dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography (pentane/diethyl ether, 60:40) to give **5** (89 mg, 0.72 mmol, quant.) as a pale white solid. **¹H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 2.23 (s, 3H, $-CH_3$), 5.67 (br. s, 2H, $-OH$), 6.61 (dd, 1H, $^3J_{HH} = 8.2 \text{ Hz}$, $^4J_{HH} = 1.5 \text{ Hz}$, H-5), 6.70 (d, 1H, $^4J_{HH} = 1.5 \text{ Hz}$, H-3), 6.76 (d, 1H, $^3J_{HH} = 8.2 \text{ Hz}$, H-6). **¹³C NMR** (125 MHz, $CDCl_3$): δ 20.8 ($-CH_3$), 115.5 (C-6), 116.5 (C-3), 121.7 (C-5), 131.3 (C-4), 141.0 (C-1), 143.3 (C-2).

Synthesis of 5

4-(^{13}C)Methylcatechol



$C_6^{13}CH_8O_2$

$MW = 125.13 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

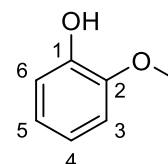
TLC $R_f = 0.41$ (pentane/diethyl ether, 50:50); rev: PMA/Ce

mp = 62-63 °C

Starting from (^{13}C)-**1** (60 mg, 0.43 mmol) and using the same procedure as for the synthesis of 4-methylcatechol **5** gave after purification on silica gel (^{13}C)-**5** (53 mg, 0.43 mmol, quant.) as a pale white solid. **¹H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ 2.22 (d, 3H, $^1J_{HC} = 126.0 \text{ Hz}$, $-^{13}CH_3$), 5.84 (br. s, 2H, 2 x $-OH$), 6.57 (ddd, 1H, $^3J_{HC} = 4.5 \text{ Hz}$, $^3J_{HH} = 7.8 \text{ Hz}$, $^4J_{HH} = 1.6 \text{ Hz}$, H-5), 6.69 (dd, 1H, $^3J_{HC} = 4.5 \text{ Hz}$, $^4J_{HH} = 1.6 \text{ Hz}$, H-3), 6.75 (d, 1H, $^3J_{HH} = 7.8 \text{ Hz}$, H-6). **¹³C NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): δ 20.8 ($-^{13}CH_3$), 115.2 (C-6), 116.2 (C-3), 121.2 (C-5), 130.3 (d, $^1J_{CC} = 45.3 \text{ Hz}$, C-4), 140.9 (C-1), 142.5 (C-2).

Synthesis of **7**

2-Methoxyphenol



$\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$

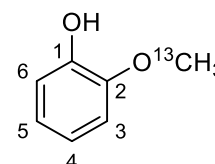
$\text{MW} = 124.14 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$\text{TLC } R_f = 0.37$ (petroleum ether/ethyl acetate, 80:10); rev: UV/vis

To a solution of methyl iodide (0.44 mL, 7.05 mmol, 1 equiv.) in dry acetone (5 mL) were added commercial catechol (985 mg, 8.95 mmol, 1.27 equiv.) and potassium carbonate (974 mg, 7.05 mmol, 1 equiv.). The mixture was stirred for 16 hours at 41°C, and then filtered. The filtrate was evaporated and the resulting residue dissolved in ethyl acetate (30 mL). The solution was extracted with 1 M solution of potassium hydroxide (5 x 30 mL), and the pH was adjusted to about 6 with 1 M solution of hydrochloric acid. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate (3 x 50 mL). The organic extracts were combined, washed with brine (100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography (petroleum ether/ethyl acetate, 80:10) to give 2-methoxyphenol **7** (620 mg, 4.99 mmol, 71 %) as a colorless oily liquid. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 3.89 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 5.95 (br. s, 1H, $-\text{OH}$), 7.10–7.26 (m, 4H, ArH). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 55.8 ($-\text{OCH}_3$), 110.7 (C-3), 114.5 (C-6), 120.1 (C-4), 121.4 (C-5), 145.6 (C-2), 146.5 (C-1).

Synthesis of (^{13}C)-**7**

2-(^{13}C)Methoxyphenol



$\text{C}_6^{13}\text{CH}_8\text{O}_2$

$\text{MW} = 125.13 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$\text{TLC } R_f = 0.37$ (petroleum ether/ethyl acetate, 80:10); rev: UV/vis

Starting from commercial catechol (0.978 g, 8.89 mmol, 1.27 equiv.) and methyl- ^{13}C iodide (1 g, 7 mmol, 1 equiv.) and using the same procedure as for the synthesis of 2-methoxy-4-methylphenol **7** gave after purification on silica gel (^{13}C)-**7** (0.429 g, 3.43 mmol, 49 %) as a yellowish oily liquid. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 3.89 (d, 3H, $^1J_{\text{HC}} = 144.4 \text{ Hz}$, $-\text{O}^{13}\text{CH}_3$), 5.38 (br. s, 1H, $-\text{OH}$), 6.86–6.97 (m, 4H, ArH). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 56.0 ($-\text{O}^{13}\text{CH}_3$), 110.9 (C-3), 114.7 (C-6), 120.3 (C-4), 121.6 (C-5), 145.8 (C-2), 146.7 (C-1).

Synthesis of **8**

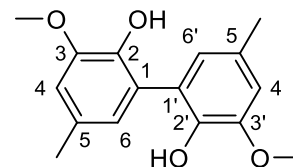
3,3'-Dimethoxy-5,5'-dimethyl-2,2'-diol-1,1'-biphenyl

C₁₆**H**₁₈**O**₄

MW = 274.32 g.mol⁻¹

TLC *R*_f = 0.32 (petroleum ether/ethyl acetate, 60:40); rev: PMA/Ce

mp = 129–130 °C / **mp** (lit.) = 133–135 °C



To a solution of commercial 2-methoxy-4-methylphenol (500 mg, 3.60 mmol, 1 equiv.) in 0.1 M pH 7.4 phosphate buffer/methanol (135/15 mL) was added HRP (313 U/mg, 2.3 mg). The reaction flask was covered with an aluminum foil to avoid peroxide decomposition. Reaction was initiated by addition of H₂O₂ (2 % in water, 8.45 mL, 5.75 mmol, 1.6 equiv.). The reaction medium was stirred for 2 h at room temperature, then the resulting yellow precipitate was filtered and solubilized in ethyl acetate (50 mL). The filtrate was extracted with ethyl acetate (3 x 50 mL), and the organic layers were combined, washed with brine (100 mL), dried over magnesium sulfate and concentrated *in vacuo*. The crude orange solid was purified by column chromatography (toluene/ethyl acetate, 80:20) to give dicreosol **8** (129 mg, 0.47 mmol, 26 %) as a beige solid. **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ 2.29 (s, 6H, 2 x -CH₃), 3.88 (s, 6H, 2 x -OCH₃), 6.01 (s, 2H, 2 x -OH), 6.72–6.74 (m, 4H, ArH). **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃): δ 21.3 (2C, 2 x -CH₃), 55.7 (2C, 2 x -OCH₃), 110.8 (2C, C-4 and C-4' or C-6 and C-6'), 123.2 (2C, C-4 and C-4' or C-6 and C-6'), 124.5 (2C, C-1 and C-1' or C-5 and C-5'), 132.1 (2C, C-1 and C-1' or C-5 and C-5'), 141.0 (2C, C-2 and C-2' or C-3 and C-3'), 147.3 (2C, C-2 and C-2' or C-3 and C-3'). **MM-ES+APCI**, Pos: *m/z* = 275.2 [M+H]⁺ calcd. 275.13; **MM-ES+APCI**, Neg: *m/z* = 273.0 [M-H]⁺ calcd. 273.11.

Synthesis of eugenol, eugenol-¹³C, eugenol-¹³C₂ and derivatives

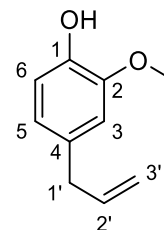
Synthesis of **10**

4-Allyl-2-methoxyphenol; Eugenol

C₁₀**H**₁₂**O**₂

MW = 164.20 g.mol⁻¹

TLC *R*_f = 0.39 (pentane/ethyl acetate, 90:10); rev: PMA/Ce



To a solution of silyl ether **14** (183 mg, 0.45 mmol, 1 equiv.) in dry tetrahydrofuran (5 mL) was added tetra-*n*-butylammonium fluoride (0.9 mL, 1 M in tetrahydrofuran, 0.9 mmol, 2 equiv.). The solution was stirred for 90 min at room temperature, then quenched with water (5 mL). The aqueous layer was extracted with diethyl ether (3 x 5 mL), and the organic extracts were combined, washed with brine (10 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography (pentane/ethyl acetate, 90:10) to give eugenol **10** (68 mg, 0.41 mmol, 92 %) as a yellowish liquid. **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ 3.33 (d, 2H, ³*J*_{HH} = 6.6 Hz, H-1'), 3.88 (s, 3H, -OCH₃), 5.04–5.12 (m, 2H, H-3'), 5.51 (s, 1H, -OH), 5.94 (m, 1H, H-2'), 6.68–6.71 (m, 2H, ArH), 6.84–6.87 (m, 1H, ArH). **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ 40.0 (C-1') 56.1 (-OCH₃), 111.1 (C-3'), 114.4 (C-3), 115.6 (C-6), 121.3 (C-5), 132.0 (C-4), 137.9 (C-2'), 143.9 (C-1), 146.9 (C-2).

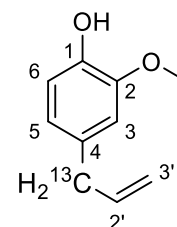
Synthesis of (¹³C)-**10**

4-(1-¹³C)Allyl-2-methoxyphenol, Eugenol-¹³C

C₉¹³**C****H**₁₂**O**₂

MW = 165.20 g.mol⁻¹

TLC *R*_f = 0.39 (pentane/ethyl acetate, 90:10); rev: PMA/Ce



Starting from silyl ether (¹³C)-**14** (368 mg, 0.91 mmol) and using the same procedure as for the synthesis of eugenol **10** gave after purification on silica gel (¹³C)-**10** (87 mg, 0.53 mmol, 58 %) as a colorless liquid. **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ 3.26 (dd, 2H, ¹*J*_{HC} = 126.7 Hz, ³*J*_{HH} = 6.3 Hz, H-1'), 3.88 (d, 3H, -OCH₃), 5.02–5.13 (m, 2H, H-3'), 5.55 (s, 1H, -OH), 5.89–6.04 (m, 1H, H-2'), 6.67–6.72 (m, 2H, ArH), 6.84–6.87 (m, 1H, ArH). **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ 40.0 (¹³C -1'), 56.1 (-OCH₃), 111.2 (C-3'), 114.4 (C-3), 115.7 (C-6), 121.3 (C-5), 132.2 (d, ¹*J*_{HC} = 44.2 Hz, C-4), 138.1 (d, ¹*J*_{HC} = 41.1 Hz, C-2'), 144.0 (C-1), 146.5 (C-2).

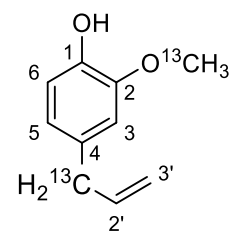
Synthesis of (¹³C₂)-**10**

4-(1-¹³C)Allyl-2-(¹³C)methoxyphenol; Eugenol-¹³C₂

C₈¹³C₂H₁₂O₂

MW = 166.19 g.mol⁻¹

TLC *R_f* = 0.39 (pentane/ethyl acetate, 90:10); rev: PMA/Ce



Starting from silyl ether (¹³C₂)-**14** (226 mg, 0.56 mmol) and using the same procedure as for the synthesis of eugenol **10** gave after purification on silica gel (¹³C₂)-**10** (53 mg, 0.45 mmol, 81 %) as a colorless liquid. **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ 3.26 (dd, 2H, ¹*J*_{HC} = 126.5 Hz, ³*J*_{HH} = 6.8 Hz, H-1'), 3.87 (d, 3H, ¹*J*_{HC} = 144.7 Hz, -O¹³CH₃), 5.02–5.11 (m, 2H, H-3'), 5.90–5.01 (m, 1H, H-2'), 6.67–6.73 (m, 2H, ArH), 6.83–6.85 (m, 1H, ArH). **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ 40.0 (¹³C-1'), 56.1 (-O¹³CH₃), 111.2 (C-3'), 114.3 (C-3), 115.7 (C-6'), 121.3 (C-5), 132.1 (d, ¹*J*_{CC} = 44.3 Hz, C-4), 138.1 (d, ¹*J*_{CC} = 41.3 Hz, C-2'), 144.0 (C-1), 146.5 (C-2).

Synthesis of **11**

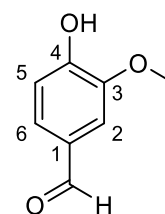
4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyde; Vanillin

C₈H₈O₃

MW = 152.15 g.mol⁻¹

TLC *R_f* = 0.19 (dichloromethane/pentane, 80:20); rev: UV/vis

mp = 77–78 °C / **mp** (lit.) = 80–81 °C



To a solution of 4-bromo-2-methoxyphenol **2** (500 mg, 2.46 mmol, 1 equiv.) in dry tetrahydrofuran (30 mL) at -40°C was added methyllithium (2 mL, 1.47 M in diethyl ether, 2.95 mmol, 1.2 equiv.). The reaction mixture was stirred for 30 min, and *sec*-buthyllithium (3.51 mL, 1.40 M in cyclohexane, 4.92 mmol, 2 equiv.) was added slowly maintaining the reaction temperature below -30°C. The solution was stirred for 1 h at -40°C and dry dimethylformamide (0.56 mL, 7.38 mmol, 3 equiv.) was added dropwise. The reaction mixture was warmed to 0°C, and stirred for an additional 3 h. The pH was adjusted about 2 with 1 M solution of aqueous hydrochloric acid, and the aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 x 30 mL). The organic extracts were combined, washed with brine (2 x 30 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was dried overnight under reduce pressure to give vanillin **11** (362 mg, 2.38 mmol, 97 %) as a yellowish solid. The crude aldehyde was used in the next step without further purification. **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ 3.96 (s, 3H, -OCH₃), 6.25 (br. s, 1H, -OH), 7.04 (d, 1H, ³*J*_{HH} = 8.4 Hz, H-5), 7.41–7.44 (m, 2H, H-2 and H-6), 9.83 (s, 1H, -CHO). **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ 56.3 (-OCH₃), 108.9 (C-2), 114.5 (C-6), 127.7 (C-5), 130.0 (C-1), 147.3 (C-3), 151.8 (C-4), 191.1 (-CHO).

Synthesis of (¹³C)-11

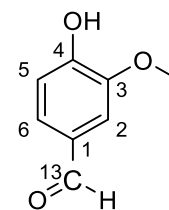
4-Hydroxy-3-methoxybenz-(¹³C)aldehyde; Vanillin-¹³C

C₇¹³CH₈O₃

MW = 153.14 g.mol⁻¹

TLC *R_f* = 0.19 (dichloromethane/pentane, 80:20); rev: UV/vis

mp = 79–80 °C



Starting from 4-bromo-2-methoxyphenol **2** (926 mg, 4.56 mmol, 1 equiv.) and dimethylformamide-¹³C (1.06 mL, 13.68 mmol, 3 equiv.) and using the same procedure as for the synthesis of vanillin **11** gave (¹³C)-**11** (663 mg, 4.33 mmol, 95 %) as a yellowish solid. The crude aldehyde was used in the next step without further purification. **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ 3.97 (s, 3H, -OCH₃), 6.24 (br. s, 1H, -OH), 7.04 (d, 1H, ³*J*_{HH} = 8.3 Hz, H-5), 7.40–7.45 (m, 2H, H-2 and H-6), 9.82 (d, 1H, ¹*J*_{HC} = 172.7 Hz, -¹³CHO). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ 56.3 (-O¹³CH₃), 108.2 (C-2), 114.5 (C-6), 127.3 (C-5), 130.1 (d, ¹*J*_{CC} = 56.0 Hz, C-1), 147.3 (C-3), 151.8 (C-4), 191.0 (-¹³CHO).

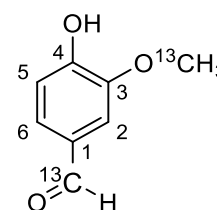
Synthesis of (¹³C₂)-11

4-Hydroxy-3-(¹³C)methoxybenz-(¹³C)aldehyde

C₆¹³C₂H₈O₃

MW = 154.13 g.mol⁻¹

TLC *R_f* = 0.19 (dichloromethane/pentane, 80:20); rev: UV/vis



Starting from bromo derivative (¹³C)-**2** (569 mg, 2.79 mmol, 1 equiv.) and (¹³C)-dimethylformamide (0.65 mL, 8.37 mmol, 3 equiv.) and using the same procedure as for the synthesis of vanillin **11** gave (¹³C₂)-**11** (420 mg, 2.73 mmol, 98 %) as a yellowish solid. The crude aldehyde was used in the next step without further purification. **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ 3.96 (d, 3H, ¹*J*_{HC} = 145.7 Hz, -O¹³CH₃), 6.37 (br. s, 1H, -OH), 7.03 (d, 1H, ³*J*_{HH} = 8.5 Hz, H-5), 7.39–7.43 (m, 2H, H-2 and H-6), 9.83 (d, 1H, ¹*J*_{HC} = 172.8 Hz, -¹³CHO). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ 56.3 (-O¹³CH₃), 109.0 (C-2), 114.6 (C-6), 127.3 (C-5), 130.0 (d, ¹*J*_{CC} = 55.8 Hz, C-1), 147.3 (C-3), 151.9 (C-4), 191.0 (-¹³CHO).

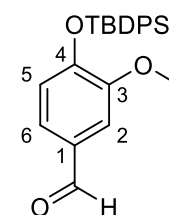
Synthesis of 12

4-[(Tert-butyldiphenylsilyl)oxy]-3-methoxybenzaldehyde

C₂₄H₂₆O₃Si

MW = 390.55 g.mol⁻¹

TLC *R_f* = 0.35 (diethyl ether/pentane, 80:20); rev: phosphomolybdic acid/cerium



To a solution of vanillin **11** (180 mg, 1.18 mmol, 1 equiv.) in dry dichloromethane (15 mL) at room temperature was added imidazole (242 mg, 3.54 mmol, 3 equiv.). The reaction mixture was stirred to complete dissolution, and *tert*-butyldiphenylchlorosilane (0.46 mL, 1.77 mmol, 1.5 equiv.) was added dropwise. The solution was stirred for 2 h at room temperature, then quenched with water (15 mL). The aqueous layer was separated and extracted with diethyl ether (3 x 15 mL). The organic extracts were combined, dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography (dichloromethane/pentane, 60:40) to give silyl ether **12** (391 mg, 1 mmol, 85 %) as a colorless oil. **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ 1.12 (s, 9H, -Si(CH₃)₃), 3.63 (s, 3H, -OCH₃), 6.79 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.0 Hz, H-5), 7.18 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.0 Hz, ⁴J_{HH} = 2.0 Hz, H-6), 7.30 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 2.0 Hz, H-2), 7.32–7.45 (m, 6H, 4 x *meta*-SiArH and 2 x *para*-SiArH), 7.67–7.71 (m, 4H, *ortho*-SiArH), 9.77 (s, 1H, -CHO). **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ 19.9 (-SiC(CH₃)₃), 26.7 (3C, -SiC(CH₃)₃), 55.4 (-OCH₃), 110.2 (ArCH), 120.1 (ArCH), 126.1 (ArCH), 127.8 (4C, *meta*-SiArCH), 130.0 (2C, *para*-SiArCH), 130.9 (C-1), 132.8 (2C, -SiArC), 135.3 (4C, *ortho*-SiArCH), 151.2 (C-3 or C-4), 151.4 (C-3 or C-4), 191.1 (-CHO).

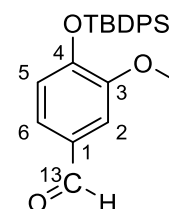
Synthesis of (¹³C)-12

[(*Tert*-butyldiphenylsilyl)oxy]-3-methoxybenz-(¹³C)aldehyde

C₂₃¹³CH₂₆O₃Si

MW = 391.55 g.mol⁻¹

TLC *R_f* = 0.35 (diethyl ether/pentane, 80:20); rev: PMA/Ce



Starting from phenol (¹³C)-**11** (650 mg, 4.24 mmol) and using the same procedure as for the synthesis of silyl ether **12** gave after purification on silica gel (¹³C)-**12** (1.23 g, 3.14 mmol, 74 %) as a colorless oil. **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ 1.13 (s, 9H, -Si(CH₃)₃), 3.63 (s, 3H, -OCH₃), 6.80 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.0 Hz, H-5), 7.18 (ddd, 1H, ³J_{HC} = 5.6 Hz, ³J_{HH} = 8.0, ⁴J_{HH} = 2.0 Hz, H-6), 7.31 (dd, 1H, ³J_{HC} = 4.4 Hz, ⁴J_{HH} = 2.0 Hz, H-2), 7.33–7.45 (m, 6H, 4 x *meta*-SiArH and 2 x *para*-SiArH), 7.67–7.72 (m, 4H, *ortho*-SiArH), 9.77 (d, 1H, ¹J_{HC} = 173.3 Hz, -¹³CHO). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ 20.0 (-SiC(CH₃)₃), 26.7 (3C, -SiC(CH₃)₃), 55.5 (-OCH₃), 110.3 (ArCH), 120.2 (ArCH), 126.2 (ArCH), 127.8 (4C, *meta*-SiArCH), 130.1 (2C, *para*-SiArCH), 130.9 (d, ¹J_{CH} = 55.4 Hz, C-1), 132.9 (2C, -SiArC), 135.4 (4C, *ortho*-SiArCH), 151.3 (C-3 or C-4), 151.5 (C-3 or C-4), 191.2 (-¹³CHO).

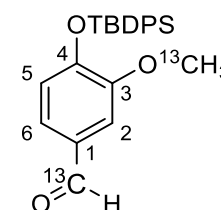
Synthesis of (¹³C₂)-12

[(*Tert*-butyldiphenylsilyl)oxy]-3-(¹³C)methoxybenz-(¹³C)aldehyde

C₂₂¹³C₂H₂₆O₃Si

MW = 392.54 g.mol⁻¹

TLC *R_f* = 0.35 (diethyl ether/pentane, 80:20); rev: PMA/Ce



Starting from phenol ($^{13}\text{C}_2$)-**11** (420 mg, 2.72 mmol) and using the same procedure as for the synthesis of silyl ether **12** gave after purification on silica gel ($^{13}\text{C}_2$)-**12** (635 mg, 1.61 mmol, 59 %) as a colorless oil. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1.13 (s, 9H, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 3.63 (d, 3H, $^1J_{\text{HC}} = 144.3$ Hz, $-\text{O}^{13}\text{CH}_3$), 6.80 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.1$ Hz, H-5), 7.18 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HC}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.9$, $^2J_{\text{HH}} = 1.9$ Hz, H-6), 7.30 (dd, 1H, $^3J_{\text{HC}} = 4.3$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.9$ Hz, H-2), 7.34–7.44 (m, 6H, 4 x *meta*-SiArH and 2 x *para*-SiArH), 7.68–7.71 (m, 4H, *ortho*-SiArH), 9.77 (d, 1H, $^1J_{\text{HC}} = 172.9$ Hz, $-\text{CHO}$). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 20.0 ($-\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 26.7 (3C, $-\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 55.5 ($-\text{O}^{13}\text{CH}_3$), 110.3 (ArCH), 120.2 (ArCH), 126.1 (ArCH), 127.8 (4C, *meta*-SiArCH), 130.0 (2C, *para*-SiArCH), 130.9 (d, $^1J_{\text{CC}} = 54.4$ Hz, C-1), 132.9 (2C, $-\text{SiArC}$), 135.4 (4C, *ortho*-SiArCH), 151.3 (C-3 or C-4), 151.4 (C-3 or C-4), 191.1 ($-\text{CHO}$).

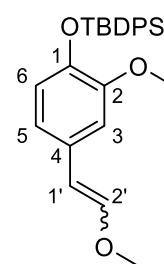
Synthesis of 13

(E/Z)-[2-Methoxy-4-(2-methoxyvinyl)-phenoxy]-(tert-butyl)diphenylsilane

$\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_3\text{Si}$

MW = 418.58 g.mol $^{-1}$

TLC R_f = 0.48 (pentane/diethyl ether, 90:10); rev: PMA/Ce



To a solution of (methoxymethyl)triphenylphosphonium chloride **15** (1.402 g, 4.09 mmol, 1.5 equiv.) in dry tetrahydrofuran (10 mL) at 0°C was added potassium *tert*-butoxide (0.229 g, 4.09 mmol, 1.5 equiv.). The dark red solution was stirred for 90 min at 0°C, then the aldehyde **12** (1.065 g, 2.73 mmol, 1 equiv.) in tetrahydrofuran (10 mL) was added dropwise via cannula. The reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for an additional 15 h. The solution was quenched with saturated solution of ammonium chloride (20 mL) and the aqueous layer was extracted with diethyl ether (4 x 20 mL). The organic extracts were combined, washed with brine (60 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated *in vacuo*. A silica gel (pentane/diethyl ether, 90:10) purification yields a mixture of diastereomers of enol ether **13** (0.953 g, 2.28 mmol, 84 % - E/Z, 60:40) as a colorless oil. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ (E isomer) 1.11 (s, 9H, $-\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 3.58 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.63 (s, 3H, $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$), 5.70 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13.2$ Hz, H-1'), 6.51–6.86 (m, 3H, ArH), 6.88 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13.2$ Hz, H-2'), 7.31–7.43 (m, 6H, 4 x *meta*-SiArH and 2 x *para*-SiArH), 7.70–7.75 (m, 4H, *ortho*-SiArH). δ (Z isomer) 1.11 (s, 9H, $-\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 3.59 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.73 (s, 3H, $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$), 5.10 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz, H-1'), 6.01 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz, H-2'), 6.51–6.86 (m, 2H, H-5 and H-6), 7.12 (d, 1H, $^1J_{\text{HH}} = 1.9$ Hz, H-3), 7.31–7.43 (m, 6H, 4 x *meta*-SiArH and 2 x *para*-SiArH), 7.70–7.75 (m, 4H, *ortho*-SiArH).

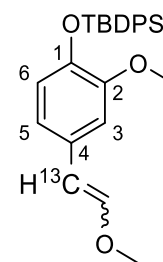
Synthesis of (¹³C)-**13**

(E/Z)-[2-Methoxy-4-(2-methoxy-(1-¹³C)vinyl)-phenoxy]-
(tert-butyl)diphenylsilane

C₂₅¹³CH₃₀O₃Si

MW = 419.60 g.mol⁻¹

TLC *R_f* = 0.48 (pentane/diethyl ether, 90:10); rev: PMA/Ce



Starting from aldehyde (¹³C)-**12** (1.23 g, 3.14 mmol) and using the same procedure as for the synthesis of enol ether **13** gave after purification on silica gel a mixture of diastereomers of (¹³C)-**13** (1.095 g, 2.61 mmol, 83 % - E/Z, 58:42) as a colorless oil. **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ (E isomer) 1.11 (s, 9H, -SiC(CH₃)₃), 3.58 (s, 3H, -OCH₃), 3.63 (s, 3H, -CH₂OCH₃), 5.70 (dd, 1H, ¹*J*_{HC} = 151.9 Hz, ³*J*_{HH} = 12.9 Hz, H-1'), 6.50–6.91 (m, 3H, ArH), 6.87 (dd, 1H, ²*J*_{HC} = 7.6 Hz, ³*J*_{HH} = 12.9 Hz, H-2'), 7.31–7.43 (m, 6H, 4 x *meta*-SiArH and 2 x *para*-SiArH), 7.70–7.74 (m, 4H, *ortho*-SiArH). δ (Z isomer) 1.11 (s, 9H, -SiC(CH₃)₃), 3.59 (s, 3H, -OCH₃), 3.73 (s, 3H, -CH₂OCH₃), 5.09 (dd, 1H, ¹*J*_{HC} = 156.0 Hz, ³*J*_{HH} = 7.1, H-1'), 6.01 (dd, 1H, ²*J*_{HC} = 9.2 Hz, ³*J*_{HH} = 7.1, H-2'), 6.51–6.91 (m, 2H, H-5 and H-6), 7.12 (dd, 1H, ³*J*_{HC} = 4.7 Hz, ⁴*J*_{HH} = 1.9 Hz, H-3), 7.31–7.43 (m, 6H, 4 x *meta*-SiArH and 2 x *para*-SiArH), 7.70–7.74 (m, 4H, *ortho*-SiArH).

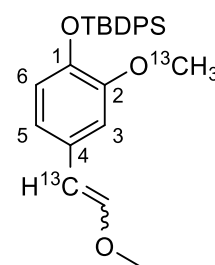
Synthesis of (¹³C₂)-**13**

(E/Z)-[2-(¹³C)Methoxy-4-(2-methoxy-(1-¹³C)vinyl)-phenoxy]-
(tert-butyl)diphenylsilane

C₂₄¹³C₂H₃₀O₃Si

MW = 420.59 g.mol⁻¹

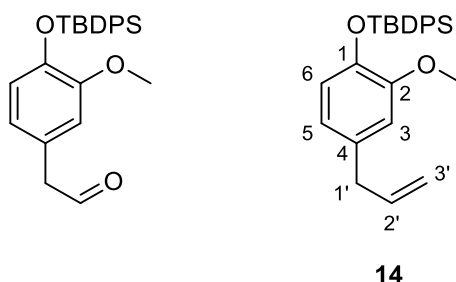
TLC *R_f* = 0.48 (pentane/diethyl ether, 90:10); rev: PMA/Ce



Starting from aldehyde (¹³C₂)-**12** (635 mg, 1.61 mmol) and using the same procedure as for the synthesis of enol ether **13** gave after purification on silica gel a mixture of diastereomers of (¹³C₂)-**13** (501 mg, 1.19 mmol, 74 % - E/Z, 58:42) as a colorless oil. **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ (E isomer) 1.11 (s, 9H, -SiC(CH₃)₃), 3.57 (d, 3H, ¹*J*_{HC} = 144.0 Hz, -O¹³CH₃), 3.63 (s, 3H, -CH₂OCH₃), 5.70 (dd, 1H, ¹*J*_{HC} = 152.7 Hz, ³*J*_{HH} = 13.2 Hz, H-1'), 6.50–6.86 (m, 3H, ArH), 6.87 (dd, 1H, ²*J*_{HC} = 7.6 Hz, ³*J*_{HH} = 13.2 Hz, H-2'), 7.31–7.43 (m, 6H, 4 x *meta*-SiArH and 2 x *para*-SiArH), 7.70–7.74 (m, 4H, *ortho*-SiArH). δ (Z isomer) 1.11 (s, 9H, -SiC(CH₃)₃), 3.58 (d, 3H, ¹*J*_{HC} = 144.0 Hz, -O¹³CH₃), 3.73 (s, 3H, -CH₂OCH₃), 5.09 (dd, 1H, ¹*J*_{HC} = 155.0 Hz, ³*J*_{HH} = 7.0, H-1'), 6.01 (dd, 1H, ²*J*_{HC} = 9.2 Hz, ³*J*_{HH} = 7.0, H-2'), 6.51–6.86 (m, 2H, H-5 and H-6), 7.12 (dd, 1H, ²*J*_{HC} = 4.6 Hz, ⁴*J*_{HH} = 2.0, H-3), 7.31–7.43 (m, 6H, 4 x *meta*-SiArH and 2 x *para*-SiArH), 7.70–7.74 (m, 4H, 4 x *ortho*-SiArH).

Synthesis of **14**

(4-Allyl-2-methoxyphenoxy)-(tert-butyl)diphenylsilane



C₂₆H₃₀O₂Si

MW = 402.61 g.mol⁻¹

TLC *R_f* = 0.71 (pentane/diethyl ether, 97:3); rev: PMA/Ce

To a solution of enol ether **13** (265 mg, 0.63 mmol, 1 equiv.) in acetonitrile (15 mL) at -20°C were added successively sodium iodide (116 mg, 0.69 mmol, 1.1 equiv.) and trimethylsilyl chloride (0.09 mL, 0.69 mmol, 1.1 equiv.). The reaction mixture was stirred for 30 min at -20°C, then quenched with saturated solution of sodium thiosulfate (10 mL). The aqueous layer was extracted with diethyl ether (3 x 10 mL). The organic extracts were combined, washed with saturated solution of sodium chloride (20 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated *in vacuo* to yield crude aldehyde which was used in the next step without further purification.

To a solution of methyltriphenylphosphonium iodide **16** (384 mg, 0.95 mmol, 1.5 equiv.) in dry tetrahydrofuran (10 mL) at -78°C was added dropwise *n*-butyllithium (0.56 mL, 1.58 M in cyclohexane, 0.88 mmol, 1.4 equiv.). The reaction mixture was stirred for 15 min at -78°C, then warmed to room temperature and stirred for an additional 10 min. The solution was cooled at -78°C, and the previous crude aldehyde in dry tetrahydrofuran (10 mL) was added dropwise via cannula. The reaction mixture was stirred at -78°C for 15 min, then warmed to room temperature and stirred for an additional 1 h. The solution was quenched with water (20 mL) and the aqueous layer was extracted with diethyl ether (3 x 20 mL). The organic extracts were combined, washed with brine (50 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (pentane/diethyl ether, 97:3) to give allyl **14** (111 mg, 0.28 mmol, 44 %) as a colorless oil. **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ 1.13 (s, 9H, -Si(CH₃)₃), 3.26 (d, 2H, ³*J*_{HH} = 6.7 Hz, H-1'), 3.55 (s, 3H, -OCH₃), 4.97–5.03 (m, 2H, H-3'), 5.85–5.98 (m, 1H, H-2'), 6.46 (dd, 1H, ³*J*_{HH} = 7.9 Hz, ⁴*J*_{HH} = 2.0 Hz, H-5), 6.59 (d, 1H, ⁴*J*_{HH} = 2.0 Hz, H-3), 6.63 (d, 1H, ³*J*_{HH} = 7.9 Hz, H-6), 7.31–7.43 (m, 6H, 4 x *meta*-SiArH and 2 x *para*-SiArH), 7.70–7.74 (m, 4H, *ortho*-SiArH). **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ 19.9 (-SiC(CH₃)₃), 26.8 (3C, -SiC(CH₃)₃), 39.9 (C-1'), 55.5 (-OCH₃), 113.0 (ArCH), 115.5 (C-3'), 120.1 (ArCH), 120.6 (ArCH), 127.7 (4C, *meta*-ArSiCH), 129.6 (2C, *para*-ArSiCH), 133.3 (C-4), 133.9 (2C, -SiArC), 135.5 (4C, *ortho*-ArSiCH), 138.0 (C-2'), 143.4 (C-1 or C-2), 150.4 (C-1 or C-2).

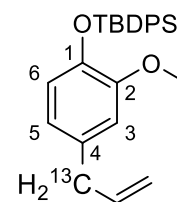
Synthesis of (¹³C)-**14**

[4-(1-¹³C)Allyl-2-methoxy]-(tert-butyl)diphenylsilane

C₂₅¹³CH₃₀O₂Si

MW = 403.60 g.mol⁻¹

TLC *R_f* = 0.71 (pentane/diethyl ether, 97:3); rev: PMA/Ce



Starting from enol ether (¹³C)-**13** (942 mg, 2.23 mmol) and using the same procedure as for the synthesis of allyl **14** gave after purification on silica gel (¹³C)-**14** (368 mg, 0.91 mmol, 41 %) as a colorless oil. **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ 1.12 (s, 9H, -Si(CH₃)₃), 3.26 (dd, 2H, ¹*J*_{HC} = 126.3 Hz, ³*J*_{HH} = 6.8 Hz, H-1'), 3.56 (d, 3H, -OCH₃), 4.97–5.06 (m, 2H, H-3'), 5.85–6.00 (m, 1H, H-2'), 6.47 (ddd, 1H, ³*J*_{HH} = 8.1 Hz, ³*J*_{HC} = 4.2, Hz, ⁴*J*_{HH} = 2.1 Hz, H-5), 6.60 (dd, 1H, ³*J*_{HC} = 4.4, Hz, ⁴*J*_{HH} = 2.1 Hz, H-3), 6.62 (d, 1H, ³*J*_{HH} = 8.1 Hz, H-6), 7.32–7.43 (m, 6H, *meta*-SiArH and *para*-SiArH), 7.71–7.74 (m, 4H, *ortho*-SiArH). **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ 19.9 (-SiC(CH₃)₃), 26.8 (3C, -SiC(CH₃)₃), 39.9 (¹³C-1') 55.5 (-OCH₃), 113.1 (ArCH), 115.5 (C-3'), 120.1 (ArCH), 120.6 (ArCH), 127.6 (4C, *meta*-ArSiCH), 129.6 (2C, *para*-ArSiCH), 133.3 (d, ¹*J*_{CH} = 45.6 Hz, C-4), 133.9 (2C, -SiArC), 135.5 (4C, *ortho*-ArSiCH), 136.9 (d, ¹*J*_{HC} = 41.6 Hz, C-2'), 143.5 (C-1 or C-2), 150.5 (C-1 or C-2).

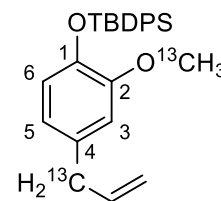
Synthesis of (¹³C₂)-**14**

[4-(1-¹³C)Allyl-2-(¹³C)methoxy]-(tert-butyl)diphenylsilane

C₂₄¹³C₂H₃₀O₂Si

MW = 404.59 g.mol⁻¹

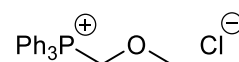
TLC *R_f* = 0.71 (pentane/diethyl ether, 97:3); rev: PMA/Ce



Starting from enol ether (¹³C₂)-**13** (501 mg, 1.19 mmol) and using the same procedure as for the synthesis of allyl **14** gave after purification on silica gel (¹³C₂)-**14** (226 mg, 0.56 mmol, 47 %) as a colorless oil. **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ 1.10 (s, 9H, -Si(CH₃)₃), 3.26 (dd, 2H, ¹*J*_{HC} = 126.7 Hz, ³*J*_{HH} = 7.0 Hz, H-1'), 3.55 (d, 3H, ¹*J*_{HC} = 143.8 Hz, -O¹³CH₃), 4.95–5.04 (m, 2H, H-3'), 5.83–5.98 (m, 1H, H-2'), 6.46 (ddd, 1H, ³*J*_{HC} = 4.2, Hz, ³*J*_{HH} = 7.9 Hz, ⁴*J*_{HH} = 2.2 Hz, H-5), 6.59 (dd, 1H, ³*J*_{HC} = 4.2, Hz, ⁴*J*_{HH} = 2.2 Hz, H-3), 6.62 (d, 1H, ³*J*_{HH} = 7.9 Hz, H-6), 7.30–7.42 (m, 6H, 4 x *meta*-SiArH and 2 x *para*-SiArH), 7.69–7.72 (m, 4H, 4 x *ortho*-SiArH). **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ 19.9 (-SiC(CH₃)₃), 26.8 (3C, -SiC(CH₃)₃), 39.9 (¹³C-1') 55.5 (-O¹³CH₃), 113.1 (ArCH), 115.5 (C-3'), 120.1 (ArCH), 120.6 (ArCH), 127.7 (4C, *meta*-ArSiCH), 129.6 (2C, *para*-ArSiCH), 133.3 (d, ¹*J*_{CC} = 44.1 Hz, C-4), 133.9 (2C, -SiArC), 135.5 (4C, *ortho*-ArSiCH), 136.9 (d, ¹*J*_{CC} = 44.6 Hz, C-2'), 143.4 (C-1 or C-2), 150.5 (C-1 or C-2).

Synthesis of 15

(Methoxymethyl)triphenylphosphonium chloride



C₂₀H₂₀ClOP

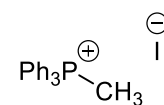
MW = 342.80 g.mol⁻¹

mp = 187–188 °C / **mp** (lit.) = 191–193 °C

To a solution of dimethoxymethane (2.35 mL, 26.6 mmol, 1.4 equiv.) was added dropwise acetyl chloride (1.75 mL, 24.6 mmol, 1.3 equiv.). The solution was stirred for 3 h at room temperature, then dimethoxymethane (2.35 mL, 26.6 mmol, 1.4 equiv.) and triphenylphosphine (5 g, 19 mmol, 1 equiv.) were added. The reaction mixture was stirred overnight, and the resulting precipitate was filtered, washed with toluene (50 mL) and dried under reduce pressure to give **15** (6.3 g, 18.4 mmol, 97 %) as a white solid. **¹H NMR** (500 MHz, (CD₃)CO): δ 3.56 (s, 3H, -OCH₃), 5.50 (d, 2H, ²J_{HP} = 4.7 Hz, -PCH₂OCH₃), 7.64–7.87 (m, 15H, ArH). **¹³C NMR** (125 MHz, (CD₃)CO): δ 62.6 (d, ³J_{CP} = 14.0 Hz, -OCH₃), 65.7 (d, ¹J_{CP} = 72.5 Hz, -PCH₂OCH₃), 117.3 (d, 3C, ¹J_{CP} = 86.3 Hz, -PArC), 131.1 (d, 6C, ²J_{CP} = 13.0 Hz, *ortho*-PArCH), 134.5 (d, 6C, ³J_{CP} = 10.1 Hz, *meta*-PArCH), 136.2 (d, 3C, ⁴J_{CP} = 3.1 Hz, *para*-PArCH).

Synthesis of 16

Methyltriphenylphosphonium iodide



C₁₉H₁₈IP

MW = 404.23 g.mol⁻¹

mp = 181–182 °C / **mp** (lit.) = 182–183 °C

To a solution of triphenylphosphine (1 g, 3.81 mmol, 1 equiv.) in dry diethyl ether (10 mL) was added dropwise methyl iodide (0.23 mL, 3.81 mmol, 1 equiv.) in dry diethyl ether (5 mL). The reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature, and overnight equilibrium. The resulting precipitate was filtered, washed several times with diethyl ether and dried under reduce pressure to give **16** (0.92 g, 2.28 mmol, 60 %) as a white solid. **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ 3.15 (d, 3H, ²J_{HP} = 13.2 Hz, -CH₃), 7.64–7.82 (m, 15H, ArH). **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ 11.7 (d, ¹J_{CP} = 57.6 Hz, -OCH₃), 118.9 (d, 3C, ¹J_{CP} = 86.7 Hz, -PArC), 130.6 (d, 6C, ²J_{CP} = 12.9 Hz, *ortho*-PArCH), 133.4 (d, 6C, ³J_{CP} = 10.8 Hz, *meta*-PArCH), 135.3 (d, 3C, ⁴J_{CP} = 2.7 Hz, *para*-PArCH).

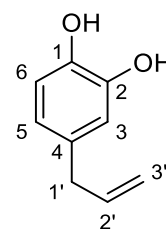
Synthesis of **17**

4-Allylcatechol

C₉H₁₀O₂

MW = 150.18 g.mol⁻¹

TLC *R_f* = 0.65 (pentane/ethyl acetate, 80:20); rev: PMA/Ce



To a solution of eugenol **10** (320 mg, 1.95 mmol, 1 equiv.) in dichloromethane (15 mL) at -78 °C was added dropwise boron tribromide (2.15 mL, 1 M in hexane, 2.15 mmol, 1.1 equiv.). The reaction medium was stirred for 1 h at room temperature, then cooled to 0 °C and quenched with saturated solution of sodium chloride (10 mL). The aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 x 10 mL), and the organics extracted were combined, dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography (pentane/ethyl acetate, 80:20) to give **17** (205 mg, 1.37 mmol, 70 %) as white solid. **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ 3.28 (d, 2H, ³*J*_{HH} = 6.6 Hz, H-1'), 5.03–5.09 (m, 2H, H-3'), 5.24 (br. s, 2H, 2 x -OH), 5.88–5.98 (m, 1H, H-2'), 6.63 (dd, 1H, ³*J*_{HH} = 7.9 Hz, ⁴*J*_{HH} = 1.9 Hz, H-5), 6.72 (d, 1H, ⁴*J*_{HH} = 1.9 Hz, H-3), 6.80 (d, 1H, ³*J*_{HH} = 7.9 Hz, H-6). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ 39.6 (C-1'), 115.6 (ArCH), 115.7 (C-3'), 115.9 (ArCH), 121.2 (ArCH), 133.5 (C-4), 137.7 (C-2'), 141.7 (C-1 or C-2), 143.5 (C-1 or C-2).

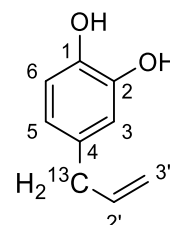
Synthesis of (¹³C)-**17**

4-(1-¹³C)Allylcatechol

C₈¹³CH₁₀O₂

MW = 151.17 g.mol⁻¹

TLC *R_f* = 0.65 (pentane/ethyl acetate, 80:20); rev: PMA/Ce



Starting from eugenol (¹³C)-**10** (61 mg, 0.37 mmol) and using the same procedure as for the synthesis of 4-allylcatechol **17** gave after purification on silica gel (¹³C)-**17** (42 mg, 0.28 mmol, 76 %) as a yellowish solid. **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ 3.27 (dd, 2H, ¹*J*_{HC} = 127.0 Hz, ³*J*_{HH} = 6.6 Hz, H-1'), 5.01–5.09 (m, 2H, H-3'), 5.67 (br. s, 2H, 2 x -OH), 5.87–5.98 (m, 1H, H-2'), 6.61 (dd, 1H, ³*J*_{HH} = 7.9 Hz, ⁴*J*_{HH} = 1.9 Hz, H-5), 6.71 (d, 1H, ⁴*J*_{HH} = 1.9 Hz, H-3), 6.79 (d, 1H, ³*J*_{HH} = 7.9 Hz, H-6). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ 39.7 (¹³C-1'), 115.4 (ArCH), 115.6 (C-3'), 115.8 (ArCH), 121.0 (ArCH), 133.2 (d, ¹*J*_{CC} = 44.0 Hz, C-4), 137.8 (d, ¹*J*_{CC} = 41.2 Hz, C-2'), 142.0 (C-1 or C-2), 143.7 (C-1 or C-2).

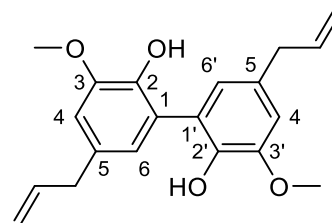
Synthesis of **19**

3,3'-Dimethoxy-2,2'-diol-5,5'-di-(2-propen-1-yl)-1,1'-biphenyl

C₂₀**H**₂₂**O**₄

MM = 326.39 g.mol⁻¹

mp = 100–102 °C / **mp** (lit.) = 105–106 °C



To a solution of commercial eugenol (500 mg, 3.04 mmol, 1 equiv.) in 0.1 M pH 7.4 phosphate buffer (250 mL) was added HRP (313 U/mg, 1.95 mg). The reaction flask was covered with an aluminum foil to avoid peroxide decomposition. Reaction was initiated by slow addition of H₂O₂ (35 % in water, 0.52 mL, 6.08 mmol, 2 equiv.) at 0.10 mL/h. At the end of the addition, the reaction mixture was filtered, and the filtrate was extracted with diethyl ether (3 x 100 mL). The organic extracts was combined and concentrated *in vacuo*. The resulting solid was washed with water (several times) and ethanol (few mL), and dried under reduce pressure to give dieugenol **19** (352 mg, 2.16 mmol, 71 %) as a beige solid. **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ 3.29 (d, 4H, ¹J_{HH} = 6.4 Hz, 2 x -CH₂CHCH₂), 3.84 (s, 6H, 2 x -OCH₃), 5.06–5.13 (m, 4H, 2 x -CH₂CHCH₂), 5.94–6.03 (m, 4H, 2 x -CH₂CHCH₂ and 2 x -OH), 6.95 (m, 4H, ArH). **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃): δ 42.9 (2C, 2 x -CH₂CHCH₂), 57.7 (2C, 2 x -OCH₃), 110.8 (2C, C-4 and C-4' or C-6 and C-6'), 115.9 (2C, 2 x -CH₂CHCH₂), 123.2 (2C, C-4 and C-4' or C-6 and C-6'), 124.5 (2C, C-1 and C-1' or C-5 and C-5'), 132.1 (2C, C-1 and C-1' or C-5 and C-5'), 137.8 (2C, 2 x -CH₂CHCH₂), 141.0 (2C, C-2 and C-2' or C-3 and C-3'), 147.3 (2C, C-2 and C-2' or C-3 and C-3'). **+ESI-MS**: m/z = 349.137 [M+Na]⁺ calcd. 349.141.

Synthesis of isoeugenol and isoeugenol- ^{13}C

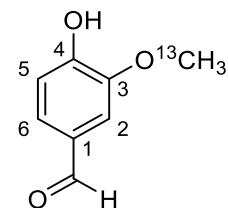
Synthesis of (^{13}C)-**11'**

4-Hydroxy-3-(^{13}C)methoxybenzaldehyde; Vanillin-(^{13}C)methoxy

$\text{C}_7^{13}\text{CH}_8\text{O}_3$

MW = 153.14 g.mol $^{-1}$

TLC R_f = 0.19 (dichloromethane/pentane, 80:20); rev: UV/vis



Starting from bromo derivative (^{13}C)-**11'** (224 mg, 1.1 mmol, 1 equiv.) and using the same procedure as for the synthesis of vanillin **11** gave (^{13}C)-**11'** (76 mg, 0.50 mmol, 45 %) as a yellowish solid. The crude aldehyde was used in the next step without further purification. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 3.95 (d, 3H, $^1J_{\text{HC}}$ = 145.3 Hz, $-\text{O}^{13}\text{CH}_3$), 6.43 (br. s, 1H, $-\text{OH}$), 7.03 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}}$ = 8.4 Hz, H-5), 7.39–7.43 (m, 2H, H-2 and H-6), 9.82 (d, 1H, $-\text{CHO}$). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 56.2 ($-\text{O}^{13}\text{CH}_3$), 108.4 (C-2), 114.5 (C-6), 127.6 (C-5), 129.9 (C-1), 147.3 (C-3), 151.8 (C-4), 191.1 ($-\text{CHO}$).

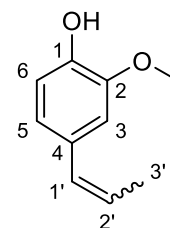
Synthesis of **20** (Z product major)

(E/Z)-2-Methoxy-4-(1-propen-1-yl)phenol; (E/Z)-Isoeugenol

$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$

MW = 164.20 g.mol $^{-1}$

TLC R_f = 0.57 (ethyl acetate/petroleum ether, 20:80); rev: PMA/Ce



To a solution of ethyltriphenylphosphonium bromide (3.66 g, 9.86 mmol, 1.5 equiv.) in dry tetrahydrofuran (20 mL) was added potassium *tert*-butoxide (1.84 g, 16.43 mmol, 2.5 equiv.). The solution was stirred for 10 min at room temperature, and commercial vanillin (1 g, 6.57 mmol, 1 equiv.) in dry tetrahydrofuran (10 mL) was added dropwise via cannula. The solution was stirred at room temperature for an additional 2 h, then quenched with saturated solution of ammonium chloride (30 mL). Tetrahydrofuran was removed under reduce pressure and the aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 x 30 mL). The organic extracts were combined, washed with brine (60 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography (ethyl acetate/petroleum ether, 20:80) to give a mixture of diastereomers of isoeugenol **20** (0.98 g, 5.97 mmol, 91 % - E/Z, 17:83) as a colorless oily liquid. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ (E isomer) 1.87 (dd, 3H, $^3J_{\text{HH}}$ = 6.4 Hz, $^4J_{\text{HH}}$ = 1.7 Hz, H-3'), 3.89 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 6.03–6.15 (m, 1H, H-2'), 6.31–6.41 (m, 1H, H-1'), 6.82–6.93 (m, 3H, ArH). δ (Z isomer) 1.92 (dd, 3H, $^3J_{\text{HH}}$ = 7.2 Hz, $^4J_{\text{HH}}$ = 1.7 Hz, H-3'), 3.88 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 5.66–5.77 (m, 2H, H-2' and $-\text{OH}$), 6.31–6.41 (m, 1H, H-1'), 6.82–6.93 (m, 3H, ArH). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ (E isomer) 18.5 (C-3') 55.9 ($-\text{OCH}_3$), 108.0 (C-3), 114.5 (C-6), 119.4 (C-5), 123.5 (C-2'), 130.8

(C-4), 130.9 (C-1'), 144.9 (C-1), 146.7 (C-2). δ (Z isomer) 14.6 (C-3') 55.9 ($-\text{OCH}_3$), 111.5, 114.2, 122.1, 125.2, 129.7, 130.1 (C-4), 144.4 (C-1 or C-2), 146.2 (C-1 or C-2).

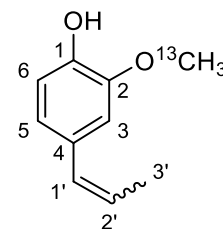
Synthesis of (^{13}C)-**20** (Z product major)

(E/Z)-2-(^{13}C)Methoxy-4-(1-propen-1-yl)phenol; (E/Z)-Isoeugenol- ^{13}C

$\text{C}_9^{13}\text{CH}_{12}\text{O}_2$

$\text{MW} = 165.20 \text{ g.mol}^{-1}$

$\text{TLC } R_f = 0.57$ (ethyl acetate/petroleum ether, 20:80); rev: PMA/Ce



Starting from aldehyde ^{13}C -**11'** (75 mg, 0.49 mmol) and using the same procedure as for the synthesis of (E/Z)-isoeugenol **20** gave after purification on silica gel (^{13}C)-**20** (72 mg, 0.44 mmol, 90 % - E/Z, 17:83) as a colorless oily liquid. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ (E isomer) 1.87 (dd, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 6.6 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 1.6 \text{ Hz}$, H-3'), 3.89 (d, 3H, $^1J_{\text{HC}} = 144.6 \text{ Hz}$, $-\text{O}^{13}\text{CH}_3$), 6.03–6.14 (m, 1H, H-2'), 6.30–6.39 (m, 1H, H-1'), 6.81–6.90 (m, 3H, ArH). δ (Z isomer) 1.91 (dd, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 1.6 \text{ Hz}$, H-3'), 3.89 (d, 3H, $^1J_{\text{HC}} = 144.6 \text{ Hz}$, $-\text{O}^{13}\text{CH}_3$), 5.60–5.77 (m, 1H, H-2'), 6.30–6.39 (m, 1H, H-1'), 6.81–6.90 (m, 3H, ArH). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ (Z isomer) 14.7 (C-3') 56.0 ($-\text{O}^{13}\text{CH}_3$), 111.6, 114.3, 122.2, 125.3, 129.7, 130.2 (C-4), 144.5 (C-1 or C-2), 146.3 (C-1 or C-2).

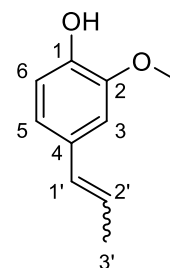
Synthesis of **20** (E product major)

(E/Z)-2-Methoxy-4-(1-propen-1-yl)phenol; (E/Z)-Isoeugenol

$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$

$\text{MW} = 164.20 \text{ g.mol}^{-1}$

$\text{TLC } R_f = 0.57$ (ethyl acetate/petroleum ether, 20:80); rev: PMA/Ce



To a solution of (E/Z)-isoeugenol **20** (225 mg, 1.37 mmol, 1 equiv.) in dry diethyl ether (10 mL) was added diiodo (16 mg, 0.06 mmol, cat.). The solution was stirred for 2 h at room temperature, then quenched with saturated solution of sodium thiosulfate (10 mL) and stirred for an additional 20 min. The aqueous layer was extracted with diethyl ether (3 x 10 mL), and the organic extracts were combined, washed with brine (20 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was dried under reduce pressure to give a mixture of diastereomers of isoeugenol **20** (190 mg, 1.15 mmol, 84 % - E/Z, 93:7) as a colorless oily liquid. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ (E isomer) 1.87 (dd, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 6.4 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 1.7 \text{ Hz}$, H-3'), 3.89 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 5.52 (br. s, 1H, $-\text{OH}$), 6.03–6.14 (m, 1H, H-2'), 6.30–6.40 (m, 1H, H-1'), 6.81–6.89 (m, 3H, ArH). δ (Z isomer) 1.91 (dd, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 7.2 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 1.7 \text{ Hz}$, H-3'), 3.89 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 5.55–5.76 (m, 1H, H-2'), 6.30–6.40 (m, 1H, H-1'), 6.81–6.89 (m, 3H, ArH). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ

(E isomer) 18.5 (C-3') 55.9 (-OCH₃), 108.0 (C-3), 114.5 (C-6), 119.4 (C-5), 123.5 (C-2'), 130.8 (C-4), 130.9 (C-1'), 144.9 (C-1), 146.7 (C-2).

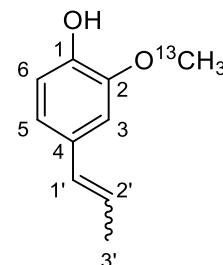
Synthesis of (¹³C)-**20** (E product)

(E)-2-(¹³C)Methoxy-4-(1-propen-1-yl)phenol; (E)-Isoeugenol-¹³C

C₉¹³CH₁₂O₂

MW = 165.20 g.mol⁻¹

TLC *R_f* = 0.57 (ethyl acetate/petroleum ether, 20:80); rev: PMA/Ce



Starting from (E/Z)-isoeugenol (¹³C)-**20** (72 mg, 0.44 mmol) and using the same procedure as for the synthesis of (E/Z)-isoeugenol **20** gave after purification on silica gel (pentane/ethyl acetate, 80:20) (¹³C)-**20** (58 mg, 0.35 mmol, 80 % - E > 99 %) as a yellowish liquid. **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ (E isomer) 1.87 (dd, 3H, ³*J*_{HH} = 6.6 Hz, ⁴*J*_{HH} = 1.6 Hz, H-3'), 3.89 (d, 3H, ¹*J*_{Hc} = 144.6 Hz, -O¹³CH₃), 5.58 (br. s, 1H, -OH), 6.02-6.14 (m, 1H, H-2'), 6.29-6.36 (m, 1H, H-1'), 6.83-6.87 (m, 3H, ArH). **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ (E isomer) 18.5 (C-3'), 56.0 (-O¹³CH₃), 108.0 (C-3), 114.5 (C-6), 119.4 (C-5), 123.5 (C-2'), 130.9 (C-4), 130.9 (C-1'), 144.9 (C-1), 146.7 (C-2).

Synthesis of cortexolone, cortexolone-¹³C and derivatives

Synthesis of **21**

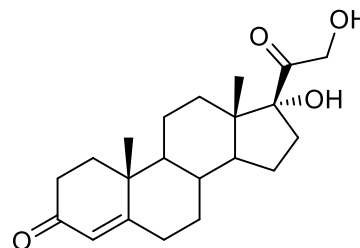
17 α ,21-Dihydroxypregn-4-en-3,20-dione; Cortexolone

C₂₁**H**₃₀**O**₄

MW = 346.47 g.mol⁻¹

TLC *R*_f = 0.25 (petroleum ether/ethyl acetate, 50:50); rev: PMA/Ce

mp = 200–201 °C / **mp** (lit.) = 196–199 °C



To a solution of crude bromo ketone **27** (340 mg, 0.68 mmol, 1 equiv.) in acetone/water (108/72 mL) was added potassium carbonate (360 mg, 2.59 mmol, 3.8 equiv.). The reaction mixture was stirred for 3 days at room temperature, then acetone was removed under reduced pressure. The aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 x 35 mL), and the organic extracts were combined, washed with 1 M solution of hydrochloric acid (50 mL), brine (2 x 50 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography (petroleum ether/ethyl acetate, 50:50) to give cortexolone **21** (153 mg, 0.44 mmol, 65 %) as a white solid. ¹**H NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ 0.68 (s, 3H, H-18), 0.92–0.97 (m, 1H, NA), 1.04–1.12 (m, 1H, NA), 1.17 (s, 3H, H-19), 1.32–1.43 (m, 3H, NA), 1.56–1.88 (m, 8H, NA), 2.00–2.04 (m, 1H, NA), 2.25–2.44 (m, 4H, NA), 2.64–2.70 (m, 1H, NA), 2.84 (s, 1H, –CH₂OH or –COH), 3.16 (s, 1H, –CH₂OH or –COH), 4.18 [A part of an AB system, 1H, ²*J*_{AB} = 19.1 Hz, H-21], 4.56 [B part of an AB system, 1H, ²*J*_{AB} = 19.1 Hz, H-21], 5.71 (s, 1H, H-4). ¹³**C NMR** (125 MHz, CDCl₃): δ 15.1 (C-18), 17.5 (C-19), 20.6 (C-11), 23.8 (C-15), 30.2, 32.1, 32.9, 34.0, 34.6, 35.7 (C-8), 35.8, 38.7 (C-10), 48.7 (C-13), 50.4 (C-14), 53.4 (C-9), 67.5 (C-21), 89.1 (C-17), 124.0 (C-4), 171.5 (C-5), 200.0 (C-3), 212.6 (C-20).

Synthesis of 20-(¹³C)-**21**

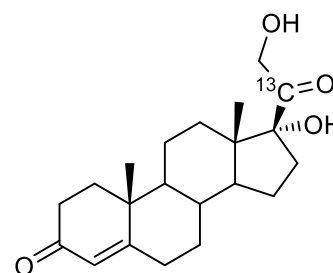
17 α ,21-Dihydroxypregn-4-en-3,20-(20-¹³C)dione; Cortexolone-20-¹³C

C₂₀²¹**H**₃₀**O**₄

MW = 347.46 g.mol⁻¹

TLC *R*_f = 0.25 (petroleum ether/ethyl acetate, 50:50); rev: PMA/Ce

mp = 199–200 °C

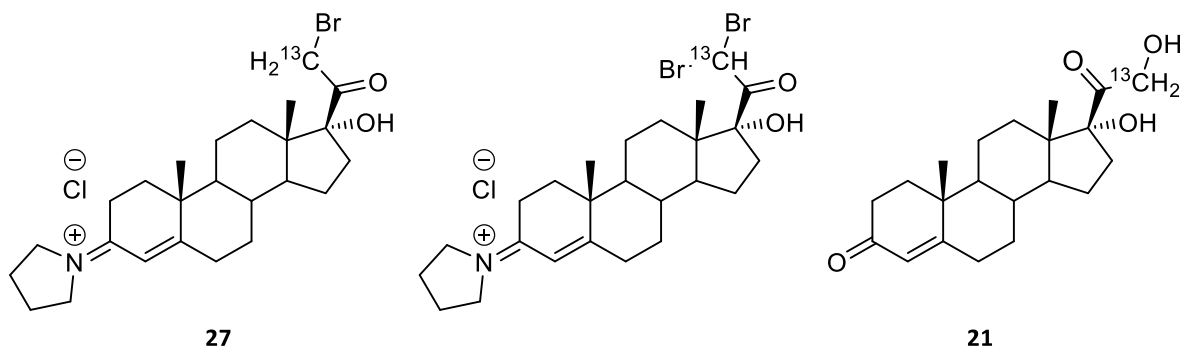


Starting from bromo ketone 20-(¹³C)-**27** (1.34 g, 2.68 mmol) and using the same procedure as for the synthesis of **21** gave after purification on silica gel (¹³C)-**21** (0.298 g, 0.86 mmol, 32 %) as a white solid. ¹**H NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ 0.69 (s, 3H, H-18), 0.84–1.47 (m, 5H, NA), 1.17 (s, 3H, H-19), 1.56–1.90 (m, 8H, NA), 1.99–2.05 (m, 1H, NA), 2.23–2.48 (m, 4H, NA), 2.63–2.73 (m, 2H, H-16 β and –CH₂OH or –COH), 3.11–3.16 (m, 1H, –CH₂OH or –COH), 4.29 [A part of an AB system, 1H, ²*J*_{AB} = 19.8 Hz, ²*J*_{HC} = 5.0 Hz, H-21], 4.56 [B part of an AB system, 1H, ²*J*_{AB} = 19.8 Hz, ²*J*_{HC} = 5.0 Hz, H-21], 5.71 (s, 1H, H-4). ¹³**C NMR** (125 MHz, CDCl₃): δ

15.0 (C-18), 17.5 (C-19), 20.5 (C-11), 23.8 (C-15), 30.1, 32.0, 32.8, 34.0, 34.7, 35.7 (C-8), 35.8, 38.7 (C-10), 48.7 (C-13), 50.4 (C-14), 53.4 (C-9), 67.5 (d, $^1J_{\text{CC}} = 37.6$ Hz, C-21), 89.1 (d, $^1J_{\text{CC}} = 46.4$ Hz, C-17), 124.0 (C-4), 171.5 (C-5), 200.0 (C-3), 212.6 (^{21}C -20).

Synthesis of 21-(^{13}C)-21

17 α ,21-(21- ^{13}C)Dihydroxypregn-4-en-3,20-dione; Cortisolone-21- ^{13}C



$\text{C}_{20}^{21}\text{H}_{30}\text{O}_4$

MW = 347.46 g.mol $^{-1}$

TLC R_f = 0.25 (petroleum ether/ethyl acetate, 50:50); rev: phosphomolybdic acid/cerium

mp = 202–203 °C

To a solution of enamine 21-(^{13}C)-**26** (530 mg, 1.38 mmol, 1 equiv.) in ethanol (25 mL) at room temperature was added 12 M solution of hydrochloric acid (0.58 mL, 6.9 mmol, 5 equiv.). A solution of bromine (0.11 mL, 2.07 mmol, 1.5 equiv.) in ethanol (10 mL) was added over 30 min, and the reaction mixture was stirred for 3 h. The solvent was removed *in vacuo*, the crude residue was triturated in diethyl ether, filtered and dried under reduced pressure until a reddish solid was obtained. The mixture of monobromo ketone 21-(^{13}C)-**27** and dibromo ketone-21- ^{13}C (690 mg) was used in the next step without further purification.

To a solution of mixture of monobromo ketone 21-(^{13}C)-**27** and dibromo ketone-21- ^{13}C (690 mg) in acetone/water (219/146 mL) was added potassium carbonate (725 mg, 5.24 mmol, 3.8 equiv.). The reaction mixture was stirred for 3 days at room temperature, then acetone was removed under reduced pressure. The aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 x 60 mL), and the organic extracts were combined, washed with 1 M solution of hydrochloric acid (100 mL), brine (2 x 100 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography (petroleum ether/ethyl acetate, 50:50) to give 21-(^{13}C)-**21** (201 mg, 0.58 mmol, 42 %) as a white solid. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0.68 (s, 3H, H-18), 0.84–2.47 (m, 18H, NA), 1.17 (s, 3H, H-19), 2.83 (m, 2H, H-16 β and $-\text{CH}_2\text{OH}$ or $-\text{COH}$), 3.15 (br. s, 1H, $-\text{CH}_2\text{OH}$ or $-\text{COH}$), 4.29 [A part of an AB system, 1H, $^2J_{\text{AB}} = 19.7$ Hz, $^1J_{\text{HC}} = 145.6$ Hz, H-21], 4.56 [B part of an AB system, 1H, $^2J_{\text{AB}} = 19.7$ Hz, $^1J_{\text{HC}} = 145.6$ Hz,

H-21], 5.71 (s, 1H, H-4). **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ 15.1 (C-18), 17.5 (C-19), 20.7 (C-11), 23.8 (C-15), 30.1, 32.0, 32.8, 34.0, 34.7, 35.7 (C-8), 35.8, 38.7 (C-10), 48.7 (C-13), 50.4 (C-14), 53.4 (C-9), 67.5 (¹³C-21), 89.1 (d, ²J_{CC} = 13.6 Hz, C-17), 124.0 (C-4), 171.5 (C-5), 200.0 (C-3), 212.6 (d, ¹J_{CC} = 37.0 Hz, ²¹C-20).

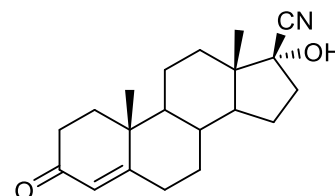
Synthesis of 22

17β-Carbonitrile-17α-hydroxyandrost-4-en-3-one

C₂₀H₂₇NO₂

MW = 313.44 g.mol⁻¹

TLC *R_f* = 0.64 (ethyl acetate); rev: anisaldehyde



To a suspension of commercial androstenedione (10 g, 34.91 mmol, 1 equiv.) in methanol (78 mL) was added potassium cyanide (9.6 g, 146.62 mmol, 4.2 equiv.). Acetic acid (3.5 mL, 61.09 mmol, 1.75 equiv.) was added dropwise, and the limpid solution was stirred for 3 h at room temperature, then overnight equilibrium. Acetic acid (7 mL, 122.18 mmol, 3.5 equiv.) was added dropwise again, and the suspension was stirred for an additional 2 h, then left without agitation for 4 h. The resulting precipitate was filtered, washed with water (50 mL) and dried overnight under reduce pressure to give cyanohydrin **22** (10.23 g, 32.64 mmol, 93 %) as a white solid. **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ 0.90–1.89 (m, 12H, NA), 0.97 (s, 3H, H-18), 1.19 (s, 3H, H-19), 1.96–2.07 (m, 2H, NA), 2.24–2.49 (m, 5H, NA), 3.33 (s, 1H, –OH), 5.74 (s, 1H, H-4). **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃): δ 16.4 (C-18 or C-19), 17.6 (C-18 or C-19), 20.5 (C-11), 24.0 (C-15), 29.5, 32.1, 32.8, 34.0, 35.8, 36.1 (C-8), 38.3, 38.7 (C-10), 47.8 (C-14), 49.2 (C-13), 53.2 (C-9), 77.8 (C-17), 121.1 (C-20), 124.1 (C-4), 171.2 (C-5), 200.0 (C-3).

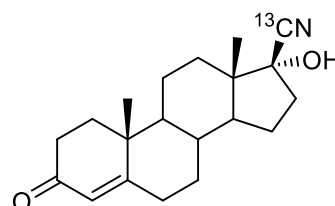
Synthesis of 20-(¹³C)-22

17β-(¹³C)Carbonitrile-17α-hydroxyandrost-4-en-3-one

C₁₉¹³CH₂₇NO₂

MW = 314.43 g.mol⁻¹

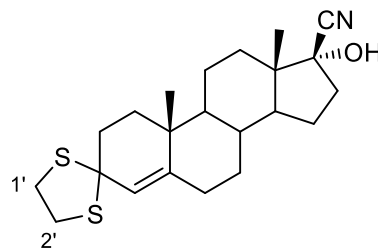
TLC *R_f* = 0.64 (ethyl acetate); rev: anisaldehyde



Starting from commercial androstenedione (2.06 g, 7.20 mmol, 1 equiv.) and potassium cyanide-¹³C (2 g, 30.25 mmol, 4.2 equiv.) and using the same procedure as for the synthesis of cyanohydrin **22** gave 20-(¹³C)-**22** (2.04 g, 6.48 mmol, 90 %) as a white solid. **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ 0.91–1.87 (m, 12H, NA), 0.98 (s, 3H, H-18), 1.19 (s, 3H, H-19), 1.98–2.06 (m, 2H, NA), 2.245–2.47 (m, 5H, NA), 3.17 (s, 1H, –OH), 5.74 (s, 1H, H-4). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ 16.4 (C-18), 17.5 (C-19), 20.5 (C-11), 24.1 (C-15), 29.5, 32.1, 32.8, 34.0, 35.8, 36.1 (C-8), 38.3, 38.7 (C-10), 47.8 (C-14), 49.2 (C-13), 53.2 (C-9), 77.8 (d, ¹J_{CC} = 79.3 Hz, C-17), 122.2 (¹³C-20), 124.1 (C-4), 171.1 (C-5), 200.0 (C-3).

Synthesis of **23**

17 β -Carbonitrile-3,3-[1,2-ethanedithiolbis(thio)]-17 α -hydroxyandrost-4-ene



C₂₂H₃₁NOS₂

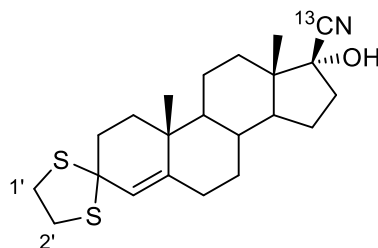
MW = 389.62 g.mol⁻¹

TLC *R_f* = 0.82 (pentane/ethyl acetate, 70:30); rev: PMA/Ce

To a solution of α,β -unsaturated ketone **22** (1.8 g, 5.74 mmol, 1 equiv.) in methanol (54 mL) were added 1,2-ethanedithiol (0.75 mL, 8.61 mmol, 1.5 equiv.) and boron trifluoride diethyl etherate (0.87 mL, 6.89 mmol, 1.2 equiv.). The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature, then the solvent was removed under reduce pressure. The residue was solubilized in hot ethyl acetate (30 mL), washed with saturated solution of sodium bicarbonate (3 x 40 mL), water (40 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated *in vacuo* to give dithioacetal **23** (2.27 g, 5.80 mmol, quant.) as a white solid. **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ 0.74–1.00 (m, 2H, NA), 0.95 (s, 3H, H-18), 1.03 (s, 3H, H-19), 1.15–2.24 (m, 17H, NA), 2.41 (ddd, 1H, ²*J*_{HH} = 14.8 Hz, ³*J*_{HH} = 11.2 Hz, ³*J*_{HH} = 2.9 Hz, H-16 β), 3.16–3.40 (m, 4H, H-1' and H-2'), 5.49 (s, 1H, H-4). **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ 16.4 (C-18), 18.7 (C-19), 20.8 (C-11), 24.1 (C-15), 29.6, 32.0, 32.8, 36.3 (C-8), 36.7 (C-10), 37.5, 38.1, 38.3, 39.7, 40.2, 47.9 (C-14), 49.4 (C-13), 53.6 (C-9), 65.8 (C-3), 78.1 (C-17), 121.0 (C-20), 124.7 (C-4), 145.8 (C-5).

Synthesis of 20-(¹³C)-**23**

17 β -(¹³C)Carbonitrile-3,3-[1,2-ethanedithiolbis(thio)]-17 α -hydroxyandrost-4-ene



C₂₁¹³CH₃₁NOS₂

MW = 390.61 g.mol⁻¹

TLC *R_f* = 0.82 (pentane/ethyl acetate, 70:30); rev: PMA/Ce

Starting from α,β -unsaturated ketone 20-(¹³C)-**22** (1.8 g, 5.74 mmol) and using the same procedure as for the synthesis of dithioacetal **23** gave 20-(¹³C)-**23** (2.24 g, 5.74 mmol, quant.) as a white solid. **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ 0.78–0.99 (m, 2H, NA), 0.94 (s, 3H, H-18), 1.02 (s, 3H, H-19), 1.23–2.21 (m, 17H, NA), 2.40 (dddd, 1H, ³*J*_{HC} = 3.2 Hz, ²*J*_{HH} = 14.8 Hz, ³*J*_{HH} = 11.3 Hz, ³*J*_{HH} = 3.3 Hz, H-16 β), 3.18–3.39 (m, 4H, H-1' and H-2'), 5.49 (s, 1H, H-4). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ 16.4 (C-18), 18.7 (C-19), 20.7 (C-11), 24.1 (C-15), 29.6, 32.0, 32.8, 36.3 (C-8), 36.7 (C-10), 37.5, 38.1, 38.2, 39.7, 40.2, 47.9 (C-14), 49.3 (C-13), 53.6 (C-9), 65.8 (C-3), 78.1 (¹*J*_{CC} = 63.7 Hz, C-17), 121.1 (¹³C-20), 124.7 (C-4), 145.8 (C-5).

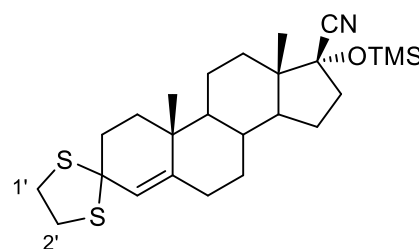
Synthesis of **24**

17 β -Carbonitrile-3,3-[1,2-ethanediylbis(thio)]-17 α -
[(trimethylsilyl)oxy]androst-4-ene

C₂₅H₃₉NOS₂Si

MW = 461.80 g.mol⁻¹

TLC *R_f* = 0.88 (pentane/ethyl acetate, 80:20); rev: PMA/Ce



To magnesium sulfate (some spatulas) flame dried under reduce pressure during several minutes was added via cannula cyanohydrin **23** (2.72 g, 6.98 mmol, 1 equiv.) in dry dimethylformamide (37 mL). The reaction mixture was stirred for 15 min at room temperature, then imidazole (2.28 g, 33.50 mmol, 4.8 equiv.) was added. The reaction mixture was stirred to complete dissolution, and trimethylchlorosilane (5.37 mL, 19.54 mmol, 2.8 equiv.) was added dropwise. After 24 h of agitation, the reaction mixture is quenched slowly with saturated solution of sodium bicarbonate (150 mL). The aqueous layer was extracted with diethyl ether (3 x 100 mL), and the combined organic extracts were washed with water (3 x 100 mL), brine (100 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated *in vacuo* to give silyl-protected cyanohydrin **24** (3.23 g, 6.98 mmol, quant.) as a white solid. **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ 0.23 (s, 9H, -Si(CH₃)₃), 0.75–1.00 (m, 2H, NA), 0.90 (s, 3H, H-18), 1.02 (s, 3H, H-19), 1.20–2.24 (m, 16H, NA), 2.33 (ddd, 1H, ²*J*_{HH} = 14.7 Hz, ³*J*_{HH} = 11.5 Hz, ³*J*_{HH} = 3.2 Hz, H-16 β), 3.17–3.40 (m, 4H, H-1' and H-2'), 5.50 (s, 1H, H-4). **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ 1.2 (3C, -Si(CH₃)₃), 16.2 (C-18), 18.7 (C-19), 20.8 (C-11), 24.2 (C-15), 29.9, 32.1, 32.9, 36.4 (C-8), 36.8 (C-10), 37.4, 38.1, 39.0, 39.7, 40.2, 47.9 (C-14), 50.3 (C-13), 53.6 (C-9), 65.9 (C-3), 78.9 (C-17), 121.2 (C-20), 124.5 (C-4), 146.1 (C-5).

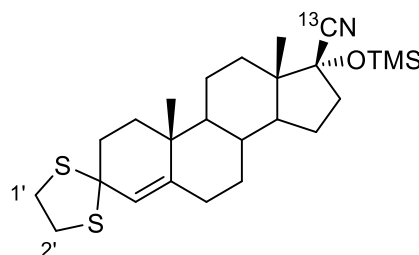
Synthesis of 20-(¹³C)-**24**

17 β -(¹³C)Carbonitrile-3,3-[1,2-ethanediylbis(thio)]-17 α -
[(trimethylsilyl)oxy]androst-4-ene

C₂₄¹³CH₃₉NOS₂Si

MW = 462.79 g.mol⁻¹

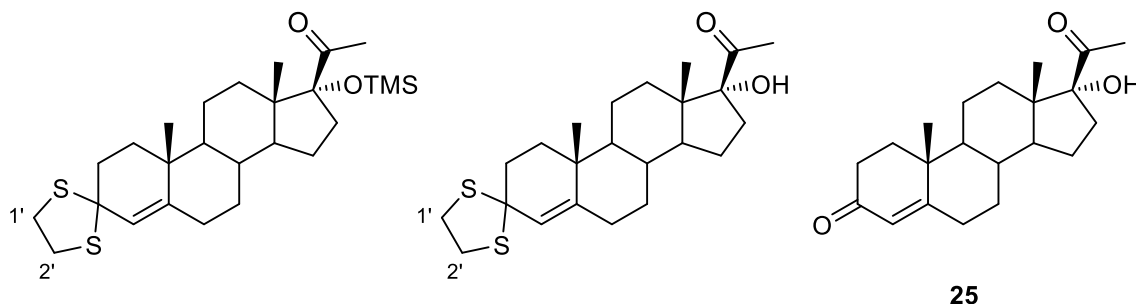
TLC *R_f* = 0.88 (pentane/ethyl acetate, 80:20); rev: PMA/Ce



Starting from cyanohydrin 20-(¹³C)-**23** (2.27 g, 5.83 mmol) and using the same procedure as for the synthesis of silyl ether **24** gave 20-(¹³C)-**24** (2.45 g, 5.30 mmol, 91 %) as a white solid. **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ 0.22 (s, 9H, -Si(CH₃)₃), 0.75–1.03 (m, 2H, NA), 0.90 (s, 3H, H-18), 1.02 (s, 3H, H-19), 1.23–2.24 (m, 16H, NA), 2.33 (dddd, 1H, ³*J*_{HC} = 3.3 Hz, ²*J*_{HH} = 14.6 Hz, ³*J*_{HH} = 11.5 Hz, ³*J*_{HH} = 3.3 Hz, H-16 β), 3.18–3.40 (m, 4H, H-1' and H-2'), 5.49 (s, 1H, H-4). **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ 1.2 (3C, -Si(CH₃)₃), 16.2 (C-18), 18.7 (C-19), 20.8 (C-11), 24.1 (C-15), 29.8, 32.1, 32.8, 36.4 (C-8), 36.8 (C-10), 37.4, 38.1, 38.9, 39.7, 40.1, 47.9 (C-14), 50.3 (C-13), 53.6 (C-9), 65.9 (C-3), 78.3 (¹*J*_{CC} = 62.4 Hz, C-17), 121.2 (¹³C-20), 124.5 (C-4), 146.1 (C-5).

Synthesis of 25

17 α -Hydroxypregn-4-en-3,20-dione; Hydroxyprogesterone



$C_{21}H_{30}O_3$

MW = 330.47 g.mol⁻¹

TLC R_f = 0.37 (petroleum ether/ethyl acetate, 50:50); rev: PMA/Ce

Using methymagnesium bromide

To a solution of silyl-protected cyanohydrin **24** (1 g, 2.16 mmol, 1 equiv.) in dry toluene (10 mL) was added methylmagnesium bromide (2.16 mL, 3 M in diethyl ether, 6.48 mmol, 3 equiv.). The reaction medium was sealed and stirred for 48 h at 65°C. After cooling to room temperature, the reaction mixture was quenched with 1 M solution of hydrochloric acid (50 mL), tetrahydrofuran (25 mL) and acetone (25 mL), and stirred for 24 h. The organic solvents were removed to reduce pressure, and the aqueous layer was extracted with dichloromethane (150 mL, then 2 x 100 mL). The organic extracts were washed with saturated solution of bicarbonate sodium (2 x 150 mL), saturated solution of sodium thiosulfate (2 x 150 mL), water (2 x 100 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated *in vacuo* to yield a mixture of methyl ketones (1.04 g) which was used in the next step without further purification.

To a solution of mixture of methyl ketones (1.04 g) in dry tetrahydrofuran (15 mL) at 0°C was added tetra-*n*-butylammonium fluoride (5 mL, 1 M in tetrahydrofuran, 4.97 mmol, 2.3 equiv.). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature, then filtered through silica. Silica filter was rinsed several times with dichloromethane and diethyl ether, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give the crude methyl ketone (0.880 g) which was used in the next step without further purification.

To a solution of crude methyl ketone (0.880 g) in ethanol/water (135/15 mL) was added calcium carbonate (0.216 g, 2.16 mmol, 1 equiv.). The reaction medium was cooled to 0°C, and methyl iodide (6.66 mL, 108 mmol, 50 equiv.) was added. After 18 h of agitation at reflux, the solution was extracted with dichloromethane (200 mL, then 2 x 100 mL). The organic layers were combined, washed with saturated solution of sodium thiosulfate (200 mL), brine (200 mL), water (200 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column

chromatography (petroleum ether/ethyl acetate, 75:25) to give diketone **25** (0.240 g, 0.72 mmol, 33 %) as a yellowish solid.

Using methyl iodide and magnesium

To magnesium (0.158 g, 6.50 mmol, 3 equiv.) flame dried under reduce pressure during several minutes was added dry diethyl ether (2.8 mL) and methyl iodide (0.43 mL, 6.93 mmol, 3.2 equiv.). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h, then silyl-protected cyanohydrin **24** (1 g, 2.16 mmol, 1 equiv.) in dry toluene (12.6 mL) was added via cannula. The solution was stirred for 48 h at 60°C. After cooling to room temperature, the reaction mixture was quenched with 1 M solution of hydrochloric acid (50 mL), tetrahydrofuran (25 mL) and acetone (25 mL), and stirred for 24 h. The organic solvents were remove to reduce pressure, and the aqueous layer was extracted with dichloromethane (150 mL, then 2 x 100 mL). The organic extracts were washed with saturated solution of bicarbonate sodium (2 x 150 mL), saturated solution of sodium thiosulfate (2 x 150 mL), water (2 x 100 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated *in vacuo* to yield a mixture of methyl ketones and diketone **25** (1.03 g) which was used in the next step without further purification.

To a solution of mixture of methyl ketones and diketone **25** (1.03 g) in dry tetrahydrofuran (15 mL) at 0°C was added tetra-*n*-butylammonium fluoride (5 mL, 1 M in tetrahydrofuran, 4.97 mmol, 2.3 equiv.). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature, then filtered through silica. Silica filter was rinsed several times with dichloromethane and diethyl ether, and the filtrate was concentrated under reduce pressure to give a mixture of methyl ketone and diketone **25** (0.861 g) which was used in the next step without further purification.

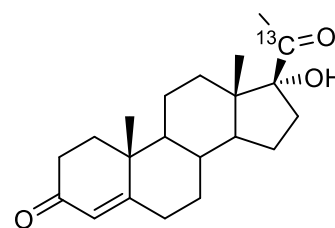
To a solution of mixture of methyl ketone and diketone **25** (0.861 g) in ethanol/water (135/15 mL) was added calcium carbonate (0.216 g, 2.16 mmol, 1 equiv.). The reactive medium was cooled to 0°C, and methyl iodide (6.66 mL, 108 mmol, 50 equiv.) was added. After 18 h of agitation at reflux, the solution was extracted with dichloromethane (200 mL, then 2 x 100 mL). The organic layers were combined, washed with saturated solution of sodium thiosulfate (200 mL), brine (200 mL), water (200 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduce pressure. The crude product was purified by column chromatography (petroleum ether/ethyl acetate, 75:25) to give diketone **25** (0.294 g, 0.89 mmol, 41 %) as a yellowish solid.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 0.75 (s, 3H, H-18), 0.87–1.00 (m, 2H, NA), 1.18 (s, 3H, H-19), 1.26–1.44 (m, 3H, NA), 1.55–1.88 (m, 8H, NA), 1.99–2.04 (m, 1H, NA), 2.26–2.45 (m, 4H, NA), 2.27 (s, 3H, H-21), 2.67 (ddd, 1H, ²*J*_{HH} = 14.8 Hz, ³*J*_{HH} = 11.5 Hz, ³*J*_{HH} = 2.9 Hz, H-16β), 2.85 (br. s, 1H, –OH), 5.72 (s, 1H, H-4). **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ 15.5 (C-18), 17.5 (C-19), 20.6 (C-11), 24.1 (C-15), 28.0 (C-21), 30.1, 32.1, 32.9, 33.6, 34.0, 35.6 (C-8), 35.8, 38.7 (C-10), 48.3 (C-13), 50.1 (C-14), 53.4 (C-9), 89.9 (C-17), 124.1 (C-4), 171.1 (C-5), 199.7 (C-3), 211.8 (C-20).

Synthesis of 20-(¹³C)-25

17 α -Hydroxypregn-4-en-3,20-(20-¹³C)dione;

Hydroxyprogesterone-20-¹³C



$C_{20}^{13}CH_{30}O_3$

MW = 331.46 g.mol⁻¹

TLC R_f = 0.37 (petroleum ether/ethyl acetate, 50:50); rev: PMA/Ce

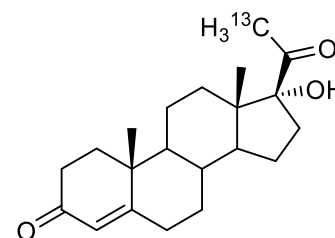
Using methymagnesium bromide

Starting from cyanohydrin 20-(¹³C)-**24** (2.45 g, 5.30 mmol) and using the same procedure as for the synthesis of diketone **25** gave after purification on silica gel 20-(¹³C)-**25** (1.04 g, 3.14 mmol, 59 %) as a yellowish solid. **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ 0.75 (s, 3H, H-18), 0.83–1.44 (m, 5H, NA), 1.18 (s, 3H, H-19), 1.55–1.88 (m, 8H, NA), 1.99–2.04 (m, 1H, NA), 2.26 (s, 3H, $^2J_{HC}$ = 5.9 Hz, H-21), 2.28–2.45 (m, 4H, NA), 2.68 (dddd, 1H, $^2J_{HC}$ = 3.0 Hz, $^2J_{HH}$ = 14.5 Hz, $^3J_{HH}$ = 11.5 Hz, $^3J_{HH}$ = 3.0 Hz, H-16 β), 5.72 (s, 1H, H-4). **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃): δ 15.5 (C-18), 17.5 (C-19), 20.6 (C-11), 24.1 (C-15), 28.0 (d, $^1J_{CC}$ = 40.6 Hz, C-21), 30.2, 32.1, 33.0, 33.6, 34.1, 35.6 (C-8), 35.8, 38.7 (C-10), 48.3 (C-13), 50.1 (C-14), 53.4 (C-9), 89.9 (d, $^1J_{CC}$ = 43.5 Hz, C-17), 124.1 (C-4), 171.1 (C-5), 199.6 (C-3), 211.7 (²¹C-20).

Synthesis of 21-(¹³C)-25

17 α -Hydroxy-(21-¹³C)pregn-4-en-3,20-dione;

Hydroxyprogesterone-21-¹³C



$C_{20}^{13}CH_{30}O_3$

MW = 331.46 g.mol⁻¹

TLC R_f = 0.37 (petroleum ether/ethyl acetate, 50:50); rev: PMA/Ce

Using methyl iodide-¹³C and magnesium

Starting from cyanohydrin **24** (2.02 g, 4.37 mmol, 1 equiv.) and methyl iodide-¹³C (2 g, 13.99 mmol, 3.2 equiv.) and using the same procedure as for the synthesis of diketone **25** gave 21-(¹³C)-**25** (0.595 g, 1.79 mmol, 41 %) as a yellowish solid. **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ 0.73 (s, 3H, H-18), 0.92–1.45 (m, 5H, NA), 1.17 (s, 3H, H-19), 1.52–1.88 (m, 8H, NA), 1.98–2.00 (m, 1H, NA), 2.23–2.45 (m, 4H, NA), 2.26 (d, 3H, $^1J_{HC}$ = 127.8 Hz, H-21), 2.67 (dddd, 1H, $^2J_{HH}$ = 14.6 Hz, $^3J_{HH}$ = 11.5 Hz, $^3J_{HH}$ = 3.0 Hz, H-16 β), 5.71 (s, 1H, H-4). **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ 15.5 (C-18), 17.5 (C-19), 20.6 (C-11), 24.0 (C-15), 27.9 (¹³C-21), 30.2, 32.1, 33.0, 33.6, 34.0, 35.6 (C-8), 35.8, 38.7 (C-10), 48.2 (C-13), 50.1 (C-14), 53.4 (C-9), 89.9 (d, $^2J_{CC}$ = 11.5 Hz, C-17), 124.0 (C-4), 171.1 (C-5), 199.6 (C-3), 211.3 (d, $^1J_{CC}$ = 39.9 Hz, C-20).

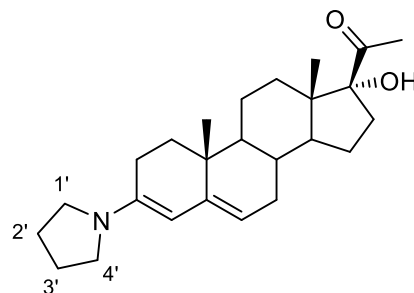
Synthesis of **26**

17 α -Hydroxy-3-(1-pyrrolidinyl)pregna-3,5-dien-20-one

C₂₅**H**₃₇**NO**₂

MW = 383.58 g.mol⁻¹

TLC *R*_f = 0.58 (petroleum ether/ethyl acetate, 50:50); rev: UV/vis



In a Dean-Stark apparatus, to a solution of methyl ketone **25** (1 g, 3.03 mmol, 1 equiv.) in dry benzene (20 mL) was added distilled pyrrolidine (0.98 mL, 12.1 mmol, 4 equiv.). The solution was stirred for 4 h at reflux, then organic solvents and excess of pyrrolidine were removed *in vacuo*. The residue was dried overnight under reduced pressure to give enamine **26** (1.185 g, 3.09 mmol, quant.) as a pale orange solid. **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ 0.74 (s, 3H, H-18), 1.00 (s, 3H, H-19), 1.02–1.89 (m, 16H, NA), 2.12–2.32 (m, 2H, NA), 2.27 (s, 3H, H-21), 2.67 (ddd, 1H, $^2J_{HH} = 14.6$ Hz, $^3J_{HH} = 11.7$ Hz, $^3J_{HH} = 2.5$ Hz, H-16 β), 2.89–2.98 (m, 3H, NA), 3.10–3.15 (m, 4H, NA), 4.77 (s, 1H, H-4), 5.03–5.07 (m, 1H, H-6). **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ 15.6 (C-18), 19.3 (C-19), 20.8 (C-11), 24.2, 25.0, 25.1 (2C, C-2' and C-3'), 28.0 (C-21), 30.4, 32.1 (2C), 33.7, 34.3, 34.9, 47.2 (2C, C-1' and C-4'), 48.0 (C-9), 48.4 (C-13), 51.3 (C-14), 90.2 (C-17), 96.5 (C-4), 113.0 (C-6), 142.6 (C-3 or C-5), 142.7 (C-3 or C-5), 212.0 (C-20).

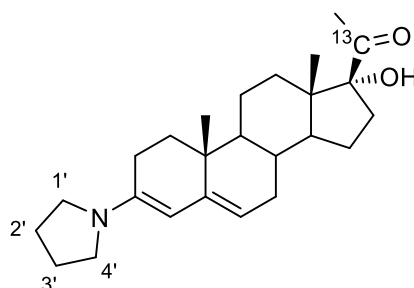
Synthesis of 20-(¹³C)-**26**

17 α -Hydroxy-3-(1-pyrrolidinyl)pregna-3,5-dien-20-(¹³C)one

C₂₄**²¹CH**₃₇**NO**₂

MW = 384.57 g.mol⁻¹

TLC *R*_f = 0.58 (petroleum ether/ethyl acetate, 50:50); rev: UV/vis



Starting from α,β -unsaturated ketone 20-(¹³C)-**25** (1 g, 3.02 mmol) and using the same procedure as for the synthesis of enamine **26** gave 20-(¹³C)-**26** (1.16 g, 3.02 mmol, quant.) as a pale orange solid. **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ 0.73 (s, 3H, H-18), 0.81–1.88 (m, 16H, NA), 1.00 (s, 3H, H-19), 2.13–2.32 (m, 2H, NA), 2.26 (d, 3H, $^2J_{HC} = 5.7$ Hz, H-21), 2.67 (m, 1H, H-16 β), 2.92–2.96 (m, 3H, NA), 3.10–3.14 (m, 4H, NA), 4.76 (s, 1H, H-4), 5.03–5.05 (m, 1H, H-6). **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ 15.6 (C-18), 19.3 (C-19), 20.8 (C-11), 24.2, 24.9, 25.1 (2C, C-2' and C-3'), 28.0 (d, $^1J_{CC} = 40.7$ Hz, C-21), 30.4, 32.1 (2C), 33.7, 34.3, 34.9, 47.2 (2C, C-1' and C-4'), 48.1 (C-9), 48.4 (C-13), 51.3 (C-14), 90.2 (d, $^1J_{CC} = 44.0$ Hz, C-17), 96.5 (C-4), 113.0 (C-6), 142.6 (C-3 or C-5), 142.7 (C-3 or C-5), 212.0 (²¹C-20).

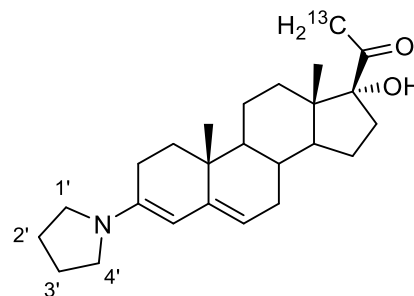
Synthesis of 21-(¹³C)-26

17 α -Hydroxy-3-(1-pyrrolidinyl)-(21-¹³C)pregna-3,5-dien-20-one

C₂₄¹³**CH**₃₇**NO**₂

MW = 384.57 g.mol⁻¹

TLC *R*_f = 0.58 (petroleum ether/ethyl acetate, 50:50); rev: UV/vis



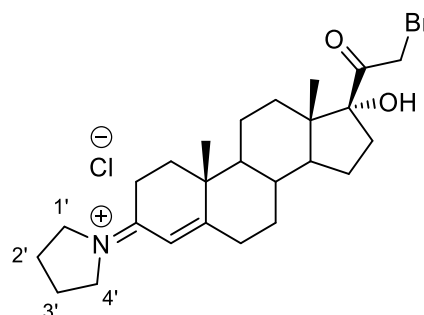
Starting from α,β -unsaturated ketone 21-(¹³C)-**25** (595 mg, 1.79 mmol) and using the same procedure as for the synthesis of enamine **26** gave 21-(¹³C)-**26** (684 mg, 1.78 mmol, quant.) as a pale orange solid. **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ 0.74 (s, 3H, H-18), 0.85–1.87 (m, 16H, NA), 1.00 (s, 3H, H-19), 2.15–2.31 (m, 2H, NA), 2.26 (d, 3H, ²*J*_{HC} = 128.0 Hz, H-21), 2.66 (m, 1H, ddd, 1H, ²*J*_{HH} = 14.6 Hz, ³*J*_{HH} = 11.3 Hz, ³*J*_{HH} = 3.0 Hz, H-16 β), 2.93–2.96 (m, 3H, NA), 3.11–3.13 (m, 4H, NA), 4.76 (s, 1H, H-4), 5.04–5.06 (m, 1H, H-6). **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ 15.6 (C-18), 19.3 (C-19), 20.8 (C-11), 24.2, 24.9, 25.1 (2C, C-2' and C-3'), 28.0 (¹³C-21), 30.4, 32.0 (2C), 33.7, 34.3, 34.9, 47.2 (2C, C-1' and C-4'), 48.1 (C-9), 48.4 (C-13), 51.3 (C-14), 90.2 (d, ²*J*_{CC} = 11.7 Hz, C-17), 96.5 (C-4), 113.0 (C-6), 142.6 (C-3 or C-5), 142.7 (C-3 or C-5), 212.1 (d, ¹*J*_{CC} = 40.3 Hz, C-20).

Synthesis of 27

1-(21-Bromo-17 α -hydroxy-20-oxopregn-4-en-3-ylidene)pyrrolidinium chloride

C₂₅**H**₃₇**BrClNO**₂

MW = 498.93 g.mol⁻¹



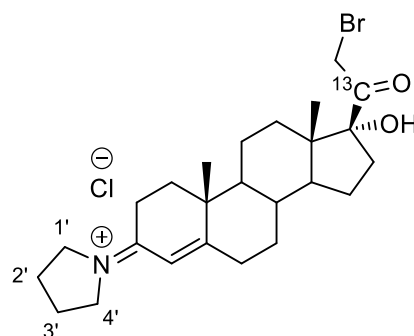
To a solution of enamine **26** (420 mg, 1.09 mmol, 1 equiv.) in ethanol (25 mL) at room temperature was added 12 M solution of hydrochloric acid (0.47 mL, 5.45 mmol, 5 equiv.). A solution of bromine (0.09 mL, 1.64 mmol, 1.5 equiv.) in ethanol (5 mL) was added over 30 min, and the reaction mixture was stirred for 3 h. The solvent was removed *in vacuo*, then the crude residue was triturated in diethyl ether, filtered and dried under reduced pressure until a reddish solid was obtained. The bromo ketone **27** (401 mg, 0.8 mmol, *R* = 74 %) was used in the next step without further purification. **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃ / DMSO, 5:1): δ 0.43 (s, 3H, H-18), 0.79–2.05 (m, 18H, NA), 0.96 (s, 3H, H-19), 2.26–2.35 (m, 2H, NA), 2.65–2.77 (m, 1H, H-16 β), 3.01–3.03 (m, 2H, NA), 3.76–3.87 (m, 4H, H-1' and H-4'), 4.01 [A part of an AB system, 1H, ²*J*_{AB} = 15.7 Hz, H-21], 4.32 [B part of an AB system, 1H, ²*J*_{AB} = 15.7 Hz, H-21], 6.12 (s, 1H, H-4). **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃ / DMSO, 5:1): δ 14.6 (C-18), 17.1 (C-19), 20.2 (C-11), 23.0 (C-15), 23.9 (C-2' or C-3'), 24.1 (C-2' or C-3'), 26.9, 29.9, 31.5, 32.9, 33.6, 34.0, 34.9 (C-8), 36.0, 39.0 (C-10), 47.0 (C-13), 49.3 (C-9 or C-14), 52.3 (C-9 or C-14), 52.3 (C-1' or C-4'), 52.9 (C-1' or C-4'), 89.3 (C-17), 115.2 (C-4), 171.8 (C-3 or C-5), 182.0 (C-3 or C-5), 203.4 (C-20).

Synthesis of 20-(¹³C)-27

1-(21-Bromo-17 α -hydroxy-20-(¹³C)oxopregn-4-en-3-ylidene)pyrrolidinium chloride

C₂₄²¹CH₃₇BrClNO₂

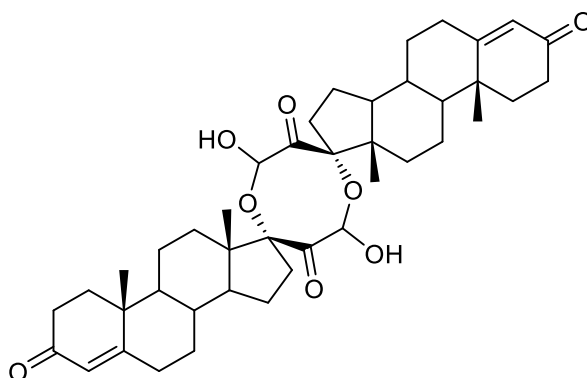
MW = 499.92 g.mol⁻¹



Starting from methyl ketone 20-(¹³C)-**26** (1.150 g, 3 mmol) and using the same procedure as for the synthesis of bromo ketone **27** gave 20-(¹³C)-**27** (1.34 g, 2.68 mmol, 89 %) as a reddish solid. The crude product was used in the next step without further purification. **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃ / DMSO, 5:1): δ 0.46 (s, 3H, H-18), 0.86–2.03 (m, 18H, NA), 1.02 (s, 3H, H-19), 2.33–2.54 (m, 2H, NA), 2.76–2.84 (m, 1H, H-16 β), 3.10 (m, 2H, NA), 3.82–3.96 (m, 4H, H-1' and H-4'), 4.08 [A part of an AB system, 1H, $^2J_{AB}$ = 15.2 Hz, $^2J_{CC}$ = 3.9 Hz, H-21], 4.40 [B part of an AB system, 1H, $^2J_{AB}$ = 15.7 Hz, $^2J_{CC}$ = 2.4 Hz, H-21], 6.17 (s, 1H, H-4). **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃ / DMSO, 5:1): δ 14.7 (C-18), 17.3 (C-19), 20.4 (C-11), 23.2 (C-15), 24.1 (C-2' or C-3'), 24.2 (C-2' or C-3'), 27.1, 30.0, 31.7, 33.1, 33.8, 34.2, 35.0 (C-8), 36.2 (d, $^1J_{CC}$ = 39.1 Hz, C-21), 39.2 (C-10), 47.2 (C-13), 49.6 (C-9 or C-14), 52.5 (C-9 or C-14), 53.0 (C-1' or C-4'), 54.7 (C-1' or C-4'), 89.6 (d, $^1J_{CC}$ = 47.5 Hz, C-17), 115.4 (C-4), 172.1 (C-3 or C-5), 182.2 (C-3 or C-5), 203.6 (²¹C-20).

Synthesis of 28

21-Al-17 α -hydroxypregn-4-en-3,20-dione (dimer)



C₄₂H₅₆O₈

MW = 688.90 g.mol⁻¹

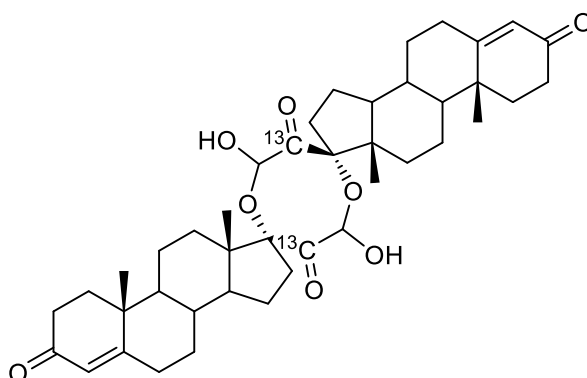
TLC R_f = 0.35 (dichloromethane/ethanol/water, 94:5:1); rev: PMA/Ce

To a solution of cortexolone **21** (200 mg, 0.58 mmol, 1 equiv.) in methanol (10 mL) was added a solution of copper acetate complex (52 mg, 0.29 mmol, 0.5 equiv.) solubilized in hot methanol (15 mL). The solution was stirred for 4 h at room temperature, then quenched with saturated solution of ammonium chloride

(10 mL). The aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 x 15 mL), and the organic extracts were combined, washed with water (20 mL), dried over magnesium sulphate, filtered and concentrated *in vacuo* to give a mixture of diastereomers of dimer **28** (203 mg, 0.29 mmol of dimer, quant.) as a white solid. **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD): δ = 0.69 (s, 3H, H-18 or H-18'), 0.70 (s, 3H, H-18 or H-18'), 0.72–0.2.53 (m, 38H, NA), 1.24 (s, 6H, H-19 and H-19'), 2.63–2.69 (m, 2H, H-16 β and H-16' β), 5.16 (s, 1H, H-21 or H-21'), 5.28 (s, 1H, H-21 or H-21'), 5.72 (s, 2H, H-4 and H-4'). **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD): δ 15.1 (C-18 or C-18'), 15.4 (C-18 or C-18'), 17.7 (2C, C-19 and C-19'), 21.8 (2C, C-11 and C-11'), 24.5 (2C, C-15 and C-15'), 31.5, 31.7, 33.5 (2C), 33.9 (2C), 34.3, 34.7 (2C), 35.2, 36.8 (2C), 37.0 (2C, C-8 and C-8'), 40.0, (2C, C-10 and C-10'), 49.5 (C-13 or C-13'), 49.7 (C-13 or C-13'), 51.5 (C-14 or C-14'), 51.9 (C-14 or C-14'), 49.9 (C-9 or C-9'), 55.0 (C-9 or C-9'), 89.9 (C-17 or C-17'), 90.1 (C-17 or C-17'); 93.8 (C-21 or C-21'), 94.5 (C-21 or C-21'), 124.2 (2C, C-4 and C-4'), 175.0 (C-5 or C-5'), 175.1 (C-5 or C-5'), 202.3 (2C, C-3 and C-3'), 207.5 (C-20 or C-20'), 207.6 (C-20 or C-20').

Synthesis of 20,20'-(¹³C₂)-**28**

21-Al-17 α -hydroxypregn-4-en-3,20-(20-¹³C)dione (dimer)



C₄₀¹³C₂H₅₆O₈

MW = 690.89 g.mol⁻¹

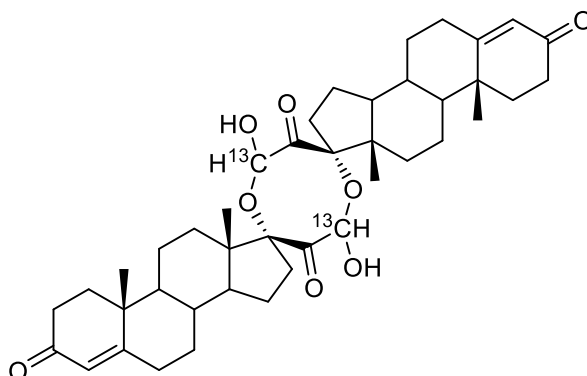
TLC *R_f* = 0.35 (dichlormethane/ethanol/water, 94:5:1); rev: PMA/Ce

Starting from 20-(¹³C)-**21** (20 mg, 57 μ mol) and using the same procedure as for the synthesis of dimer **28** gave a mixture of diastereomers of dimer 20,20'-(¹³C₂)-**28** (19 mg, 0.28 μ mol of dimer, 96%) as a white solid. **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD): δ = 0.70 (s, 3H, H-18 or H-18'), 0.71 (s, 3H, H-18 or H-18'), 0.89–2.53 (m, 38H, NA), 1.24 (s, 6H, H-19 and H-19'), 2.63–2.69 (m, 2H, H-16 β and H-16' β), 5.16 (s, 1H, H-21 or H-21'), 5.28 (s, 1H, H-21 or H-21'), 5.72 (s, 2H, H-4 and H-4'). **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD): δ 15.1 (C-18 or C-18'), 15.4 (C-18 or C-18'), 17.7 (2C, C-19 and C-19'), 21.8 (2C, C-11 and C-11'), 24.5 (2C, C-15 and C-15'), 31.5, 31.7, 33.5 (2C), 33.9 (2C), 34.3, 34.7 (2C), 35.2, 36.8 (2C), 37.0 (2C, C-8 and C-8'), 40.0, (2C, C-10 and C-10'), 49.5 (C-13 or C-13'), 49.7 (C-13 or C-13'), 51.5 (C-14 or C-14'), 51.9 (C-14 or C-14'), 49.9 (C-9 or C-9'), 55.0 (C-9 or C-9'), 89.9 (d, $^1J_{CC}$ = 46.5 Hz, C-17 or C-17'), 90.1 (d, $^1J_{CC}$ = 46.5 Hz, C-17 or C-17'); 93.7 (d, $^1J_{CC}$ =

51.3 Hz, C-21 or C-21'), 94.3 (d, $^1J_{CC} = 51.3$ Hz, C-21 or C-21'), 124.2 (2C, C-4 and C-4'), 175.0 (C-5 or C-5'), 175.1 (C-5 or C-5'), 202.3 (2C, C-3 and C-3'), 207.5 (^{13}C -20 or ^{13}C -20'), 207.6 (^{13}C -20 or ^{13}C -20').

Synthesis of 21,21'-($^{13}\text{C}_2$)-**28**

21-Al-17 α -hydroxy-(21- ^{13}C)pregn-4-en-3,20-dione (dimer)



$\text{C}_{40}^{13}\text{C}_2\text{H}_{56}\text{O}_8$

$\text{MW} = 690.89 \text{ g.mol}^{-1}$

$\text{TLC } R_f = 0.35$ (dichlormethane/ethanol/water, 94:5:1); rev: phosphomolybdic acid/cerium

Starting from 21-(^{13}C)-**21** (20 mg, 57 μmol) and using the same procedure as for the synthesis of dimer **28** gave a mixture of diastereomers of dimer 21,21'-($^{13}\text{C}_2$)-**28** (21 mg, 0.30 μmol of dimer, quant.) as a white solid. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ = 0.70 (s, 3H, H-18 or H-18'), 0.71 (s, 3H, H-18 or H-18'), 0.88–2.53 (m, 38H, NA), 1.24 (s, 6H, H-19 and H-19'), 2.63–2.70 (m, 2H, H-16 β and H-16' β), 5.15 (d, 1H, $^1J_{HC} = 166.8$ Hz, H-21 or H-21'), 5.28 (s, 1H, $^1J_{HC} = 166.8$ Hz, H-21 or H-21'), 5.72 (s, 2H, H-4 and H-4'). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CD_3OD): δ 15.1 (C-18 or C-18'), 15.4 (C-18 or C-18'), 17.7 (2C, C-19 and C-19'), 21.8 (2C, C-11 and C-11'), 24.5 (2C, C-15 and C-15'), 31.5, 31.7, 33.5 (2C), 33.9 (2C), 34.3, 34.7 (2C), 35.2, 36.8 (2C), 37.0 (2C, C-8 and C-8'), 40.0, (2C, C-10 and C-10'), 49.5 (C-13 or C-13'), 49.7 (C-13 or C-13'), 51.5 (C-14 or C-14'), 51.9 (C-14 or C-14'), 49.9 (C-9 or C-9'), 55.0 (C-9 or C-9'), 89.9 (d, $^1J_{CC} = 11.8$ Hz, C-17 or C-17'), 90.1 (d, $^1J_{CC} = 11.8$ Hz, C-17 or C-17'); 93.7 (^{13}C -21 or ^{13}C -21'), 94.3 (^{13}C -21 or ^{13}C -21'), 124.2 (2C, C-4 and C-4'), 175.0 (C-5 or C-5'), 175.1 (C-5 or C-5'), 202.3 (2C, C-3 and C-3'), 207.5 (d, $^1J_{CC} = 46.2$ Hz, C-20 or C-20'), 207.6 (d, $^1J_{CC} = 46.2$ Hz, C-20 or C-20').

Synthesis of 16 α -methylcortexolone and 16 α -methylcortexolone-¹³C

Synthesis of **29**

17 α ,21-Dihydroxy-16 α -methylpregn-4-en-3,20-dione;

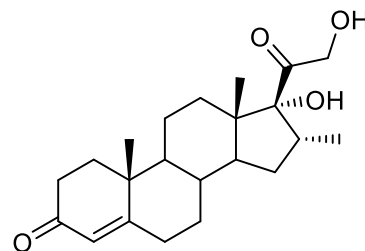
16 α -Methylcortexolone

C₂₂**H**₃₂**O**₃

MW = 360.49 g.mol⁻¹

TLC *R*_f = 0.32 (ethyl acetate/hexane, 50:50); rev: PMA/Ce

mp = 194–195 °C / **mp** (lit.) = 191–192 °C



To a suspension of silyl enol ether **32** (271 mg, 0.68 mmol, 1 equiv.) in dry dichloromethane (5 mL) was added potassium carbonate (598 mg, 4.33 mmol, 6.4 equiv.). The reaction mixture was cooled to 0°C, then *meta*-chloroperoxybenzoic acid (3.4 mL, 0.5 M in dichloromethane, 1.70 mmol, 2.5 equiv.) was added dropwise over 30 min. At the end of the addition, the reaction medium was stirred for an additional 15 min, then 0.5 M solution of sodium thiosulfate (3.5 mL) was added slowly. The solution was extracted with dichloromethane (3 x 15 mL), and the organic extracts were combined and concentrated *in vacuo*. The resulting residue was solubilized in tetrahydrofuran (5 mL), and the pH was adjusted to about 1 with 12 M solution of hydrochloric acid. The solution was stirred for 30 min at room temperature, then most of the solvent was removed under reduce pressure. The residue was dissolved in dichloromethane (15 mL) and washed with saturated solution of sodium carbonate (10 mL). The aqueous layers was extracted with dichloromethane (3 x 10 mL), then the organic extracts were combined, washed with brine (20 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography (petroleum ether/ethyl acetate, 50:50) to give 16 α -cortexolone **29** (80 mg, 0.17 mmol, 25 %) as yellowish solid. **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ 0.77 (s, 3H, H-18), 0.91 (d, 3H, ³*J*_{HH} = 7.2 Hz, Me-16), 0.83–2.40 (m, 18H, NA), 1.16 (s, 3H, H-19), 2.52 (br. s, 1H, –OH), 2.96–3.03 (m, 1H, H-16 β), 4.27 [A part of an AB system, 1H, ²*J*_{AB} = 19.9 Hz, H-21], 4.60 [B part of an AB system, 1H, ²*J*_{AB} = 19.9 Hz, H-21], 5.71 (s, 1H, H-4). **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ 14.9 (C-18), 15.2 (C-19), 17.5, 20.6, 30.5, 32.0, 32.6, 32.9, 34.0, 35.7, 35.8, 36.8, 38.7, 49.8 (C-14), 49.9 (C-13), 53.4 (C-9), 68.0 (C-21), 90.7 (C-17), 124.0 (C-4), 171.1 (C-5), 199.7 (C-3), 212.7 (C-20).

Synthesis of 20-(¹³C)-29

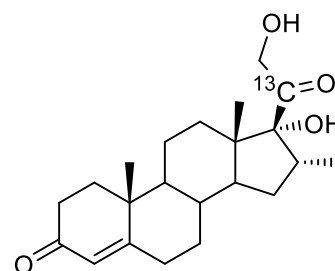
17 α ,21-Dihydroxy-16 α -methylpregn-4-en-3,20-(20-¹³C)dione;
16 α -Methylcortexolone-20-¹³C

C₂₁¹³**CH**₃₂**O**₄

MW = 361.49 g.mol⁻¹

TLC *R*_f = 0.23 (ethyl acetate/hexane, 50:50); rev: PMA/Ce

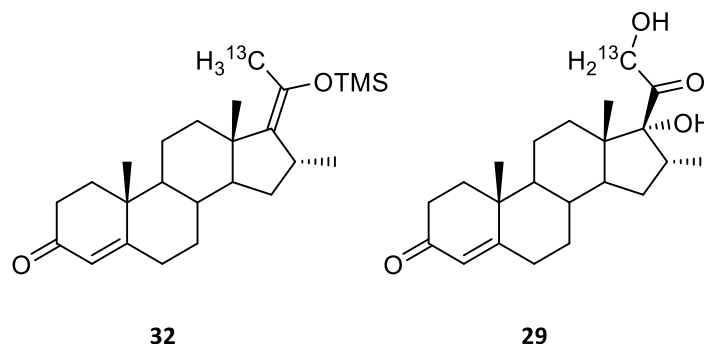
mp = 192–193 °C



Starting from silyl enol ether **32** (634 mg, 1.58 mmol) and using the same procedure as for the synthesis of 16 α -cortexolone **29** gave 20-(¹³C)-**29** (244 mg, 0.71 mmol, 45 %) as a yellowish solid. **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ 0.77 (s, 3H, H-18), 0.92 (d, 3H, ³*J*_{HH} = 7.3 Hz, Me-16), 0.65–2.42 (m, 19H, NA), 1.17 (s, 3H, H-19), 2.98–3.07 (m, 1H, H-16 β), 4.27 [A part of an AB system, 1H, ²*J*_{AB} = 20.0 Hz, ²*J*_{HC} = 3.2 Hz, H-21], 4.60 [B part of an AB system, 1H, ²*J*_{AB} = 19.9 Hz, ²*J*_{HC} = 3.2 Hz, H-21], 5.71 (s, 1H, H-4). **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ 14.9 (C-18), 15.2 (C-19), 17.5, 20.6, 30.5, 32.0, 32.6, 32.9, 34.0, 35.7, 35.8, 36.8, 38.7, 49.8 (C-14), 49.9 (C-13), 53.4 (C-9), 68.0 (d, ¹*J*_{CC} = 35.6 Hz, C-21), 90.7 (d, ¹*J*_{CC} = 46.6 Hz, C-17), 124.0 (C-4), 171.1 (C-5), 199.7 (C-3), 212.7 (¹³C-20).

Synthesis of 21-(¹³C)-29

17 α ,21-(21-¹³C)Dihydroxy-16 α -methylpregn-4-en-3,20-dione; 16 α -Methylcortexolone-21-¹³C



C₂₁¹³**CH**₃₂**O**₄

MW = 361.49 g.mol⁻¹

TLC *R*_f = 0.23 (ethyl acetate/hexane, 50:50); rev: PMA/Ce

mp = 195–196 °C

Starting from α,β -unsaturated methyl ketone **31** (673 mg, 2.16 mmol) and using the same procedure as for the synthesis of silyl enol ether **32** gave 21-(¹³C)-**32** (683 mg, 1.70 mmol, 79 %). In accord with the NMR spectral analysis, the crude product was used in the next step without further purification.

Starting from crude silyl enol ether **32** (683 mg, 1.70 mmol) and using the same procedure as for the synthesis of 16 α -cortexolone **29** gave 21-(¹³C)-**29** (288 mg, 0.79 mmol, 46 %) as a yellowish solid. **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ 0.77 (s, 3H, H-18), 0.92 (d, 3H, ³J_{HH} = 7.2 Hz, H-23), 0.94–2.44 (m, 18H, NA), 1.17 (s, 3H, H-19), 2.99–3.06 (m, 1H, H-16 β), 3.14 (br. s, 1H, –COH or –CH₂OH), 4.28 [A part of an AB system, 1H, ²J_{AB} = 19.9 Hz, ¹J_{HC} = 144.9 Hz, H-21], 4.60 [B part of an AB system, 1H, ²J_{AB} = 19.9 Hz, ¹J_{HC} = 146.9 Hz, H-21], 5.71 (s, 1H, H-4). **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃): δ 14.9 (C-18 or C-19), 15.2 (C-18 or C-19), 17.5, 20.6, 30.5, 32.0, 32.7, 32.9, 34.0, 35.7, 35.8, 36.8, 38.7, 49.8 (C-14), 50.0 (C-13), 53.4 (C-9), 68.0 (C-21), 90.7 (d, ¹J_{CC} = 10.6 Hz, C-17), 124.0 (C-4), 171.1 (C-5), 199.7 (C-3), 212.7 (d, ¹J_{CC} = 36.9 Hz, C-20).

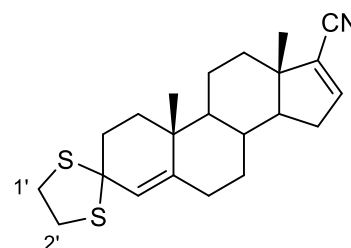
Synthesis of 30

17-Carbonitrile-3,3-[1,2-ethanedithiolbis(thio)]androst-4,16-diene

C₂₂H₂₉NS₂

MW = 371.60 g.mol⁻¹

TLC *R_f* = 0.87 (ethyl acetate/pentane, 20:80); rev: UV/vis



To a suspension of cyanohydrin **23** (3.85 g, 9.89 mmol, 1 equiv.) in distilled pyridine was added phosphoryl chloride (3.44 mL, 37.58 mmol, 3.8 equiv.). The reaction medium was stirred for 20 h at 45°C, then poured into a mixture of ice (59 g), 12 M solution of hydrochloric acid (39 mL) and water (15 mL). The reaction mixture was stirred for 4 h, and the resulting precipitate was filtered, washed with water and dried overnight under reduce pressure to give α,β -unsaturated nitrile **30** (3.68 g, 9.89 mmol, quant.) as a white solid. **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ 0.85–0.99 (m, 1H, NA), 0.93 (s, 3H, H-18), 1.04 (s, 3H, H-19), 1.37–2.37 (m, 16H, NA), 3.19–3.39 (m, 4H, H-1' and H-2'), 5.50 (s, 1H, H-4), 6.60 (dd, 1H, ³J_{HH} = 3.2 Hz, ³J_{HH} = 1.9 Hz, H-16). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ 16.9 (C-18), 18.5 (C-19), 20.0 (C-11), 31.9, 32.4, 33.0, 34.1, 34.4, 36.9 (C-10), 37.2 (C-8), 38.1, 39.7, 40.2, 48.3 (C-13), 54.4 (C-9), 55.6, 65.7 (C-3), 116.0 (C-20), 124.9 (C-4), 127.5 (C-17), 145.7 (C-5), 147.4 (C-16).

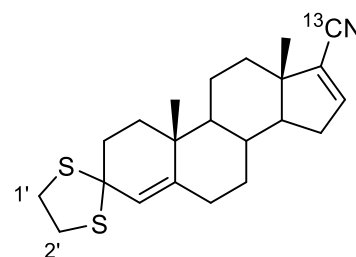
Synthesis of 20-(¹³C)-30

17-(¹³C)Carbonitrile-3,3-[1,2-ethanedithiolbis(thio)]androst-4,16-diene

C₂₁¹³CH₂₉NS₂

MW = 372.59 g.mol⁻¹

TLC *R_f* = 0.87 (ethyl acetate/pentane, 20:80); rev: UV/vis

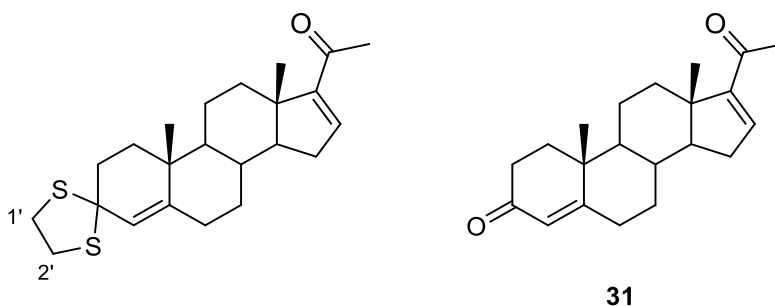


Starting from cyanohydrin 20-(¹³C)-**23** (2.46 g, 6.29 mmol) and using the same procedure as for the synthesis of α,β -unsaturated nitrile **30** gave 20-(¹³C)-**30** (2.34 g, 6.29 mmol, quant.) as a white solid. **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ 0.82–1.04 (m, 1H, NA), 0.91 (s, 3H, H-18), 1.03 (s, 3H, H-19), 1.35–2.37 (m, 16H, NA),

3.16–3.39 (m, 4H, H-1' and H-2'), 5.49 (s, 1H, H-4), 6.59 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HC}} = 5.0$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.2$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 1.9$ Hz, H-16). **^{13}C NMR** (100 MHz, CDCl_3): δ 16.9 (C-18), 18.5 (C-19), 20.0 (C-11), 31.9, 32.4, 33.0, 34.1, 34.4, 36.9 (C-10), 37.2 (C-8), 38.1, 39.7, 40.2, 48.4 (C-13), 54.4 (C-9), 55.6, 65.8 (C-3), 116.0 (^{13}C -20), 124.9 (C-4), 125.9 (d, $^1J_{\text{CC}} = 59.5$ Hz, C-17), 145.7 (C-5), 147.4 (d, $^2J_{\text{CC}} = 2.9$ Hz, C-16).

Synthesis of 31

Pregn-4,16-diene-3,20-dione



$\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_2$

MW = 312.45 g.mol⁻¹

TLC R_f = 0.67 (petroleum ether/ethyl acetate, 75:25); rev: PMA/Ce

Using methymagnesium bromide

To a solution of α,β -unsaturated nitrile **30** (420 mg, 1.13 mmol, 1 equiv.) in dry toluene (5 mL) was added methymagnesium bromide (1.13 mL, 3.39 mmol, 3 equiv.). The reaction medium was sealed and stirred overnight at 65°C. After cooling to room temperature, the reaction medium was quenched with 1 M solution of hydrochloric acid (30 mL), tetrahydrofuran (10 mL) and acetone (10 mL), and stirred for 18 h. The organic solvents were removed to reduce pressure, and the aqueous layer was cooled down then extracted with dichloromethane (3 x 100 mL). The organic extracts were combined, washed with saturated solution of bicarbonate sodium (2 x 100 mL), water (2 x 80 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated *in vacuo* to yield crude methyl ketone which was used in the next step without further purification.

To a solution of previous crude methyl ketone in ethanol/water (33/4 mL) was added calcium carbonate (113 mg, 1.13 mmol, 1 equiv.). The reactive medium was cooled to 0°C, and methyl iodide (3.50 mL, 56.5 mmol, 50 equiv.) was added. After one night of agitation at reflux, the solution was extracted with dichloromethane (3 x 35 mL). The organic extracts were combined, washed with saturated solution of sodium thiosulfate (40 mL), brine (40 mL), water (3 x 40 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (petroleum ether/ethyl acetate, 75:25) to give diketone **31** (219 mg, 0.70 mmol, 62 %) as a yellowish solid.

Using methyl iodide and magnesium

To magnesium (0.370 g, 14.5 mmol, 3.6 equiv.) flame dried under reduce pressure during several minutes was added dry diethyl ether (4.22 mL) and methyl iodide (0.88 mL, 14.14 mmol, 3.5 equiv.). The reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature, then α,β -unsaturated nitrile **30** (1.5 g, 4.04 mmol, 1 equiv.) in dry toluene (19 mL) was added via cannula. The solution was stirred overnight at 60°C. After cooling to room temperature, the reaction medium was quenched with 1 M solution of hydrochloric acid (75 mL), tetrahydrofuran (35 mL) and acetone (35 mL), and stirred for 18 h. The organic solvents were remove to reduce pressure, and the aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 x 100 mL). The organic extracts were combined, washed with a saturated solution of bicarbonate sodium (2 x 135 mL), water (2 x 100 mL), brine (100 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated *in vacuo* to yield a mixture of methyl ketone and diketone **31** which was used in the next step without further purification.

To a solution of previous mixture of methyl ketone and diketone **31** in ethanol/water (118/14 mL) was added calcium carbonate (0.404 mg, 4.04 mmol, 1 equiv.). The reactive medium was cooled to 0°C, and methyl iodide (12.46 mL, 202 mmol, 50 equiv.) was added. After one night of agitation at reflux, the solution was extracted with dichloromethane (3 x 120 mL). The organic extracts were combined, washed with saturated solution of sodium thiosulfate (150 mL), brine (150 mL), water (150 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduce pressure. The crude product was purified by column chromatography (petroleum ether/ethyl acetate, 75:25) to give diketone **31** (568 mg, 1.82 mmol, 45 %) as a yellowish solid.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 0.92 (s, 3H, H-18), 0.95–2.14 (m, 11H, NA), 1.19 (s, 3H, H-19), 2.20–2.45 (m, 6H, NA), 2.24 (s, 3H, H-21), 5.71 (s, 1H, H-4), 6.69 (m, 1H, H-16). **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃): δ 15.9 (C-18), 17.3 (C-19), 20.8 (C-11), 27.2 (C-21), 31.9, 32.2, 32.8, 33.9, 34.0, 34.5, 35.6 (C-8), 38.8 (C-10), 46.1 (C-13), 54.1 (C-9), 55.7 (C-14), 124.1 (C-4), 144.3 (C-16), 155.2 (C-17), 171.2 (C-5), 196.9 (C-20), 199.7 (C-3).

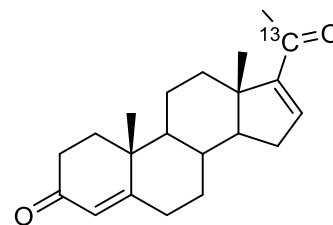
Synthesis of 20-(¹³C)-31

Pregn-4,16-diene-3,20-(20-¹³C)dione

C₂₀¹³CH₂₈O₂

MW = 313.45 g.mol⁻¹

TLC *R_f* = 0.67 (petroleum ether/ethyl acetate, 75:25); rev: PMA/Ce



Using methymagnesium bromide

Starting from α,β -unsaturated nitrile 20-(¹³C)-**30** (2.46 g, 6.62 mmol) and using the same procedure as for the synthesis of diketone **31** gave after purification on silica gel 20-(¹³C)-**31** (0.66 g, 2.12 mmol, 32 %) as a yellowish solid. **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ 0.93 (s, 3H, H-18), 0.82–2.42 (m, 17H, NA), 1.18 (s, 3H, H-

19), 2.23 (s, 3H, $^3J_{\text{HC}} = 5.8$ Hz, H-21), 5.70 (s, 1H, H-4), 6.66–6.69 (m, 1H, H-16). **^{13}C NMR** (125 MHz, CDCl_3): δ 15.9 (C-18), 17.3 (C-19), 20.8 (C-11), 27.2 (d, $^1J_{\text{CC}} = 41.8$ Hz, C-21), 31.9, 32.2, 32.8, 33.9, 34.0, 34.4, 35.6 (C-8), 38.8 (C-10), 46.1 (C-13), 54.1 (C-9), 55.7 (C-14), 124.1 (C-4), 144.2 (C-16), 155.2 (d, $^1J_{\text{CC}} = 54.1$ Hz, C-17), 171.2 (C-5), 196.9 (^{13}C -20), 199.7 (C-3).

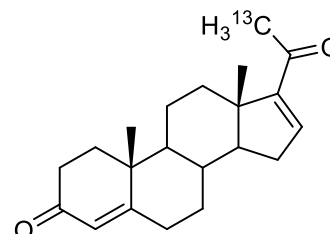
Synthesis of 21-(^{13}C)-31

(21- ^{13}C)Pregn-4,16-diene-3,20-dione

$\text{C}_{20}^{13}\text{CH}_{28}\text{O}_2$

MW = 313.45 g.mol $^{-1}$

TLC R_f = 0.67 (petroleum ether/ethyl acetate, 75:25); rev: PMA/Ce



Using methyl iodide- ^{13}C and magnesium

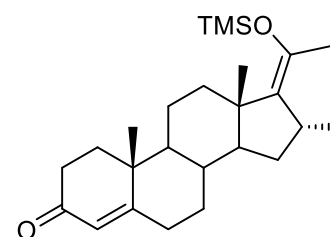
Starting from α,β -unsaturated nitrile **30** (2.23 g, 5.99 mmol, 1 equiv.) and methyl iodide- ^{13}C (3 g, 20.97 mmol, 3.5 equiv.) and using the same procedure as for the synthesis of diketone **31** gave 21-(^{13}C)-**31** (673 mg, 2.16 mmol, 36 %) as a yellowish solid. **^1H NMR** (500 MHz, CDCl_3): δ 0.92 (s, 3H, H-18), 0.95–2.44 (m, 17H, NA), 1.19 (s, 3H, H-19), 2.24 (d, 3H, $^1J_{\text{HC}} = 127.6$ Hz, H-21), 5.71 (s, 1H, H-4), 6.68 (dd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 3.5$ Hz, $^2J_{\text{HH}} = 1.8$ Hz, H-16). **^{13}C NMR** (125 MHz, CDCl_3): δ 15.9 (C-18), 17.3 (C-19), 20.8 (C-11), 27.2 (^{13}C -21), 31.9, 32.2, 32.8, 33.9, 34.0, 34.4, 35.6 (C-8), 38.8 (C-10), 46.1 (C-13), 54.1 (C-9), 55.7 (C-14), 124.1 (C-4), 144.2 (C-16), 155.2 (d, $^1J_{\text{CC}} = 13.4$ Hz, C-17), 171.2 (C-5), 196.8 (d, $^1J_{\text{CC}} = 41.7$ Hz, C-20), 199.7 (C-3).

Synthesis of 32

16 α -Methyl-20-[(trimethylsilyl)oxy]pregn-4,17(20)-dien-3-one

$\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{O}_2\text{Si}$

MW = 400.68 g.mol $^{-1}$



To a suspension of methyl ketone **31** (300 mg, 0.96 mmol, 1 equiv.) in dry tetrahydrofuran (5 mL) was added copper bromide-dimethyl sulfide complex (1 mg, 0.005 mmol, cat.). Hexamethylphosphoramide (0.37 mL, 2.11 mmol, 2.2 equiv.) was added, then the reaction medium was cooled to -78°C , and trimethylsilyl chloride (0.25 mL, 1.92 mmol, 2 equiv.) and methylmagnesium bromide (0.32 mL, 3 M in diethyl ether, 0.96 mmol, 1.1 equiv.) were successively added dropwise. The solution was stirred overnight at about -55°C , then stopped by slow addition of dry triethylamine (0.27 mL, 1.92 mmol, 2 equiv.). The reaction mixture was poured into a mixture of ice (10 g), cyclohexane (40 mL) and sodium bicarbonate (10 mL), then stirred for 15 min. The solution was extracted with petroleum ether (3 x 50 mL), and the organic extracts were combined, washed with water (2 x 60 mL), brine (2 x 60 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated *in vacuo* to yield crude silyl enol ether **32** (262 mg, 0.65 mmol, 71 %) which was

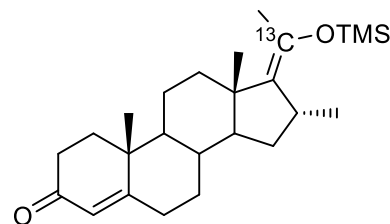
used in the next step without further purification. **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ 0.17 (s, 9H, -Si(CH₃)₃), 0.80-2.61 (m, 18H, NA), 0.88 (s, 3H, H-18), 0.97 (d, 3H, ³J_{HH} = 7.0 Hz, Me-16), 1.17 (s, 3H, H-19), 1.76 (s, 3H, H-21), 5.71 (s, 1H, H-4). **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ 1.17 (3C, -Si(CH₃)₃), 17.2 (C-18 or C-19), 17.3 (C-18 or C-19), 20.7 (C-21), 21.4 (C-11), 22.3 (Me-16), 29.9, 32.3, 33.1, 33.6, 34.1, 34.3 (C-8 or C-16), 34.4 (C-8 or C-16), 35.7, 38.9 (C-9), 44.12 (C-13), 52.2 (C-9 or C-14), 54.2 (C-9 or C-14), 123.8 (C-4), 132.8 (C-17), 140.1 (C-20), 171.8 (C-5), 199.7 (C-3).

Synthesis of 20-(¹³C)-**32**

16α-Methyl-20-(¹³C)[(trimethylsilyl)oxy]pregn-4,17(20)-dien-3-one

C₂₄¹³CH₄₀O₂Si

MW = 401.67 g.mol⁻¹



Starting from α,β-methyl ketone 20-(¹³C)-**31** (650 mg, 2.07 mmol) and using the same procedure as for the synthesis of silyl enol ether **32** gave 20-(¹³C)-**32** (634 mg, 1.58 mmol, 76 %) which was used in the next step without further purification. **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ 0.17 (s, 9H, -Si(CH₃)₃), 0.81-2.62 (m, 18H, NA), 0.87 (s, 3H, H-18), 0.97 (d, 3H, ³J_{HH} = 7.2 Hz, Me-16), 1.17 (s, 3H, H-19), 1.76 (s, 3H, ²J_{HC} = 6.5 Hz, H-21), 5.71 (s, 1H, H-4). **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ 1.8 (3C, -Si(CH₃)₃), 17.2 (C-18 or C-19), 17.3 (C-18 or C-19), 20.7 (d, ¹J_{CC} = 48.2 Hz, C-21), 21.4 (C-11), 22.3 (Me-16), 29.9, 32.3, 33.1, 33.6, 34.1, 34.3 (C-8 or C-16), 34.4 (C-8 or C-16), 35.7, 38.9 (C-9), 44.12 (C-13), 52.2 (C-9 or C-14), 54.2 (C-9 or C-14), 123.8 (C-4), 132.8 (d, ¹J_{CC} = 83.8 Hz, C-17), 140.2 (¹³C-20), 171.8 (C-5), 199.7 (C-3).

Reactivity studies in solution

Coupling of 4-methyl-orthoquinone-¹³C, (¹³C)-6 to amino acids and peptides

Preparation of 4-methyl-orthoquinone-¹³C

To a solution of 4-methylcatechol **5** (30 mg, 0,24 mmol, 1 equiv.) and sodium sulphate (catalytic amount) in diethyl ether (5 mL) was added silver(I) oxide (156 mg, 0,67 mmol, 2,8 mmol). The mixture was stirred for 2 h at room temperature then filtered through celite. Celite filter was rinsed with diethyl ether (few mL) and the filtrate was concentrated *in vacuo* to give 4-methyl-orthoquinone-¹³C, (¹³C)-**6** which was used quickly in reactivity studies without further purification.

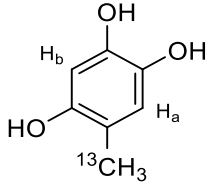
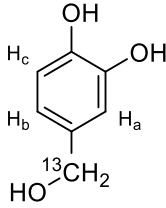
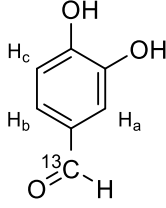
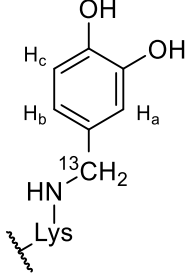
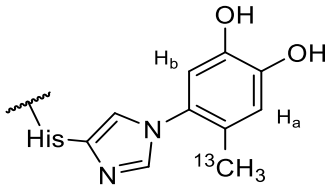
General procedure for coupling of 4-methyl-orthoquinone-¹³C to amino acids in DMSO or PBS/CD₃CN

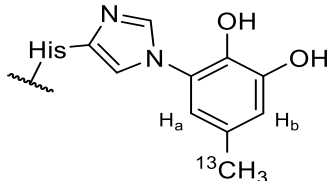
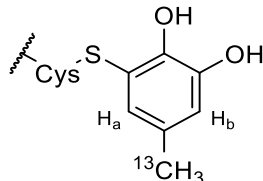
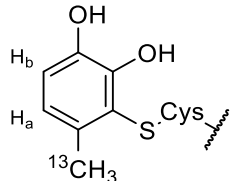
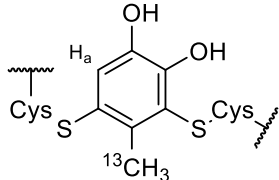
To a solution of amino acid Ac-X-OR (70 µmol, 10 equiv.) (**Table 1**) in DMSO-d₆ (450 µL) or PBS (450 µL, 0.1 M, pH 7.4) was added a solution of 4-methyl-orthoquinone-¹³C (¹³C)-**6** (0.88 mg, 7 µmol, 1 equiv.) in DMSO-d₆ (150 µL) or CD₃CN (150 µL). The mixture was placed into an NMR tube for further analysis. After 7 days, the reaction medium was analysed by LC-MS.

Amino acid Ac-X-OR	Quantity (mg)	Adduct(s) characterized	
		DMSO	PBS / CD ₃ CN
No amino acid	-	(¹³ C)- 6a , (¹³ C)- 6b , (¹³ C)- 6c	x
Ac-Lysine-OMe	17	(¹³ C)- 6d	x
Ac-Histidine-OMe	15	(¹³ C)- 6e , (¹³ C)- 6f	(¹³ C)- 6e
Ac-Arginine-OH	15	x	x
Ac-Cysteine-OMe	13	(¹³ C)- 6g , (¹³ C)- 6h , (¹³ C)- 6i	(¹³ C)- 6h
Ac-Serine-OH	10	x	x
Ac-Tryptophan-OEt	20	x	x
Ac-Asparagine-OH	12	x	x
Ac-Tyrosine-OH	16	x	(¹³ C)- 6j
Ac-Aspartic acid-OH	13	x	x

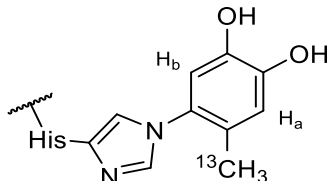
Table 1. Amino acids, quantities used and characterized adducts in DMSO-d₆ and PBS/CD₃CN

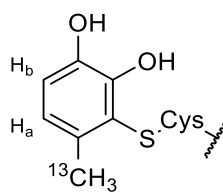
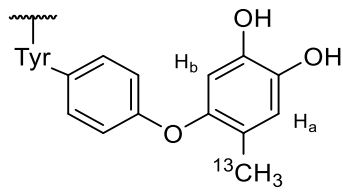
○ Characterized adducts in DMSO- d_6

	δ (ppm) ^{13}C	δ (ppm) ^1H HSQC	δ (ppm) ^1H HMBC	Proposed structure
$(^{13}\text{C})\text{-6a}$	17.4 ($^{-13}\text{CH}_3$)	2.19 ($^{-13}\text{CH}_3$)	6.66 (H_a) 6.31 (H_b)	 ESI/APCI : m/z 140 [$(^{13}\text{C})\text{-6a} - \text{H}^+$]
$(^{13}\text{C})\text{-6b}$	62.9 ($^{-13}\text{CH}_2\text{OH}$)	4.29 ($^{-13}\text{CH}_2\text{OH}$)	6.53 (H_a) 6.71 (H_b) 6.83 (H_c)	 ESI/APCI : m/z 140 [$(^{13}\text{C})\text{-6b} - \text{H}^+$]
$(^{13}\text{C})\text{-6c}$	191.1 (^{-13}CHO)	9.70 (^{-13}CHO)	7.23 (H_a) 7.27 (H_b) 6.73 (H_c)	 ESI/APCI : m/z 138 [$(^{13}\text{C})\text{-6c} - \text{H}^+$]
$(^{13}\text{C})\text{-6d}$	50.1 ($^{-13}\text{CH}_2\text{NH-}$)	2.19 ($^{-13}\text{CH}_2\text{NH-}$)	7.05 (H_a) 6.66 (H_b) 6.46 (H_c)	 ESI/APCI : m/z 322 [$(^{13}\text{C})\text{-6d} - \text{H}^+$]
$(^{13}\text{C})\text{-6e}$	16.1 ($^{-13}\text{CH}_3$)	1.94 ($^{-13}\text{CH}_3$)	6.80 (H_a) 6.75 (H_b)	 ESI/APCI : m/z 333 [$(^{13}\text{C})\text{-6e} - \text{H}^+$]

	δ (ppm) ^{13}C	δ (ppm) ^1H HSQC	δ (ppm) ^1H HMBC	Proposed structure
$(^{13}\text{C})\text{-6f}$	21.1 ($^{-13}\text{CH}_3$)	2.18 ($^{-13}\text{CH}_3$)	6.86 (H_a) 6.71 (H_b)	 ESI/APCI : m/z 333 [$(^{13}\text{C})\text{-6f} - \text{H}^+$]
$(^{13}\text{C})\text{-6g}$	20.6 ($^{-13}\text{CH}_3$)	2.14 ($^{-13}\text{CH}_3$)	6.70 (H_a) 6.52 (H_b)	 ESI/APCI : m/z 299 [$(^{13}\text{C})\text{-6g} - \text{H}^+$]
$(^{13}\text{C})\text{-6h}$	19.4 ($^{-13}\text{CH}_3$)	2.18 ($^{-13}\text{CH}_3$)	6.63 (H_a) 6.66 (H_b)	 ESI/APCI : m/z 299 [$(^{13}\text{C})\text{-6h} - \text{H}^+$]
$(^{13}\text{C})\text{-6i}$	17.2 ($^{-13}\text{CH}_3$)	2.11 ($^{-13}\text{CH}_3$)	6.38 (H_a)	 ESI/APCI : m/z 474 [$(^{13}\text{C})\text{-6i} - \text{H}^+$]

○ Characterized adducts in PBS/ CD_3CN

	δ (ppm) ^{13}C	δ (ppm) ^1H HSQC	δ (ppm) ^1H HMBC	Proposed structure
$(^{13}\text{C})\text{-6e}$	16.7 ($^{-13}\text{CH}_3$)	1.89 ($^{-13}\text{CH}_3$)	6.75 (H_a) 6.70 (H_b)	 ESI/APCI : m/z 333 [$(^{13}\text{C})\text{-6e} - \text{H}^+$]

	δ (ppm) ^{13}C	δ (ppm) ^1H HSQC	δ (ppm) ^1H HMBC	Proposed structure
$(^{13}\text{C})\text{-6h}$	20.2 ($^{-13}\text{CH}_3$)	1.95 ($^{-13}\text{CH}_3$)	6.69 (H_a) 6.64 (H_b)	 ESI/APCI : m/z 299 [$(^{13}\text{C})\text{-6h} - \text{H}^+$] ⁻
$(^{13}\text{C})\text{-6j}$	15.4 ($^{-13}\text{CH}_3$)	1.90 ($^{-13}\text{CH}_3$)	6.70 (H_a) 6.43 (H_b)	 ESI/APCI : m/z 345 [$(^{13}\text{C})\text{-6j} - \text{H}^+$] ⁻

General procedure for coupling of 4-methyl-orthoquinone- ^{13}C to peptides in PBS/ CD_3CN

To a solution of peptide Pep-X (**Table 2**) in PBS (450 μL , 0.1 M, pH 7.4) was added a solution of 4-methyl-orthoquinone- ^{13}C ($(^{13}\text{C})\text{-6}$ (0.88 mg, 7 μmol , 1 equiv.) in CD_3CN (150 μL). The mixture was placed into an NMR tube for further analysis. After 7 days, the reaction medium was analysed by LC-MS.

Peptide Pep-X	mg / μmmol	Equivalent	Adduct(s) characterized
Pep-Lysine	9.6 / 2	2	No adduct observed by NMR
Pep-Cysteine	9.6 / 2	2	
Pep-20 amino acids	4.7 / 1	1	
Glutathione (GSH)	4.2 / 2	2	

Table 2. Peptides, quantities used and number of equivalents

Coupling of 4-allyl-orthoquinone-¹³C, (¹³C)-**18** to amino acids and peptides

Preparation of 4-allyl-orthoquinone-¹³C

To a solution of 4-allylcatechol **17** (30 mg, 0.26 mmol, 1 equiv.) and sodium sulphate (catalytic amount) in diethyl ether (X mL) was added silver(I) oxide (1.81 g, 7.81 mmol, 10 equiv.). The mixture was stirred for 30 min at room temperature then filtered through celite. Celite filter was rinsed with diethyl ether (few mL) and the filtrate was concentrated *in vacuo* to give 4-allyl-orthoquinone-¹³C, (¹³C)-**18** which was used quickly in reactivity studies without further purification.

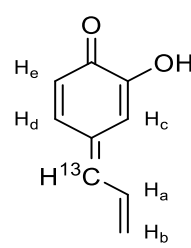
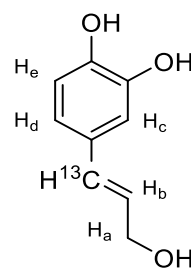
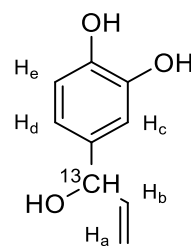
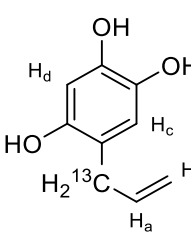
General procedure for coupling of 4-allyl-orthoquinone-¹³C to amino acids in DMSO or PBS/CD₃CN

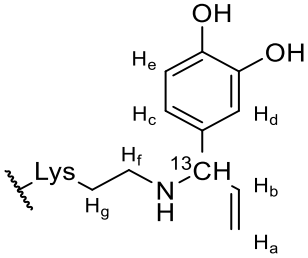
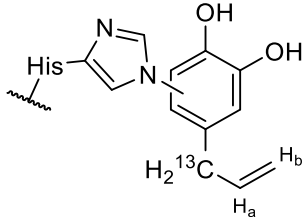
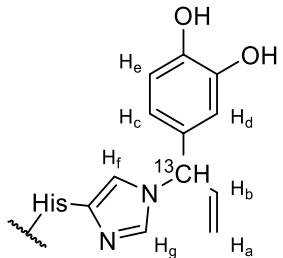
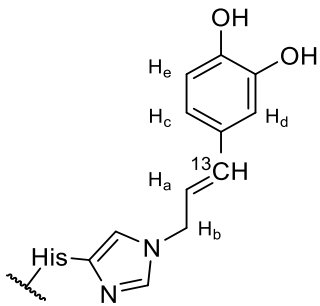
To a solution of amino acid Ac-X-OR (70 μmol, 10 equiv.) (**Table 3**) in DMSO-d₆ (450 μL) or PBS (450 μL, 0.1 M, pH 7.4) was added a solution of 4-allyl-orthoquinone-¹³C (¹³C)-**18** (0.88 mg, 7 μmol, 1 equiv.) in DMSO-d₆ (150 μL) or CD₃CN (150 μL). The mixture was placed into an NMR tube for further analysis. After 7 days, the reaction medium was analysed by LC-MS.

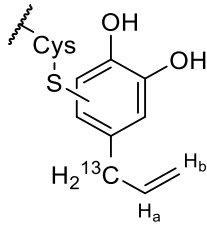
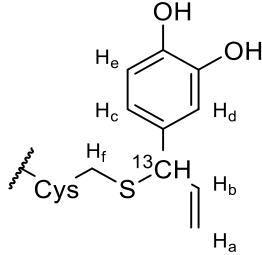
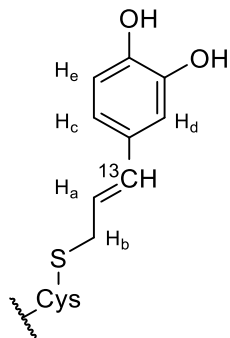
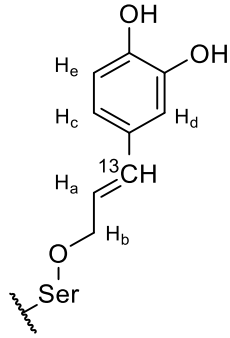
		Adduct(s) characterized	
Amino acid Ac-X-OR	Quantity (mg)	DMSO	PBS / CD ₃ CN
No amino acid	-	(¹³ C)- 18a , (¹³ C)- 18b , (¹³ C)- 18c , (¹³ C)- 18c	No adduct observed by NMR
Ac-Lysine-OMe	17	(¹³ C)- 18e	
Ac-Histidine-OMe	15	(¹³ C)- 18f , (¹³ C)- 18g , (¹³ C)- 18h	
Ac-Arginine-OH	15	x	
Ac-Cysteine-OMe	13	(¹³ C)- 18i , (¹³ C)- 18j , (¹³ C)- 18k	
Ac-Serine-OH	10	(¹³ C)- 18l	
Ac-Tyrosine-OH	16	(¹³ C)- 18m	
Ac-Aspartic acid-OH	13	x	

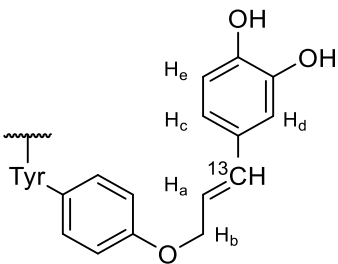
Table 3. Amino acids, quantities used and characterized adducts in DMSO-d₆ and PBS/CD₃CN

○ Characterized adducts in DMSO- d_6

	δ (ppm) ^{13}C	δ (ppm) ^1H HSQC	δ (ppm) ^1H HMBC	Proposed structure
$(^{13}\text{C})\text{-18a}$	143.7 ($^{-13}\text{CH-}$)	6.96 ($^{-13}\text{CH-}$)	6.55 (H_a) 5.72 (H_b) 6.41 (H_c) 7.27 (H_d) 6.75 (H_e)	 ESI/APCI : -
$(^{13}\text{C})\text{-18b}$	136.7 ($^{-13}\text{CH-}$)	6.41 ($^{-13}\text{CH-}$)	5.77 (H_a) 4.63 (H_b) 7.12 (H_c) 6.80 (H_d) 6.72 (H_e)	 ESI/APCI : m/z 166 [$(^{13}\text{C})\text{-18b} - \text{H}^+$]
$(^{13}\text{C})\text{-18c}$	76.8 ($^{-13}\text{CH-}$)	5.53 ($^{-13}\text{CH-}$)	5.46 (H_a) 5.17 (H_b) 6.65 (H_c) 6.58 (H_d) 6.68 (H_e)	 ESI/APCI : m/z 166 [$(^{13}\text{C})\text{-18c} - \text{H}^+$]
$(^{13}\text{C})\text{-18d}$	35.6 ($^{-13}\text{CH}_2\text{-}$)	3.31 ($^{-13}\text{CH}_2\text{-}$)	5.85 (H_a) 5.01 (H_b) 6.68 (H_c) 6.42 (H_d)	 ESI/APCI : m/z 166 [$(^{13}\text{C})\text{-18d} - \text{H}^+$]

	δ (ppm) ^{13}C	δ (ppm) ^1H HSQC	δ (ppm) ^1H HMBC	Proposed structure
$(^{13}\text{C})\text{-18e}$	63.2 ($^{-13}\text{CH-}$)	4.53 ($^{-13}\text{CH-}$)	5.16-5.43 (H_a) 5.67 (H_b) 6.62 (H_c) 6.69 (H_d) 6.83 (H_e) 2.76 (H_f) 1.60 (H_g)	 ESI/APCI : m/z 350 [$(^{13}\text{C})\text{-18e} - \text{H}^+$]
$(^{13}\text{C})\text{-18f}$	34.9 ($^{-13}\text{CH}_2\text{-}$)	3.54 ($^{-13}\text{CH}_2\text{-}$)	5.05 (H_a) 6.04 (H_b)	 ESI/APCI : m/z 359 [$(^{13}\text{C})\text{-18f} - \text{H}^+$]
$(^{13}\text{C})\text{-18g}$	62.6 ($^{-13}\text{CH-}$)	5.19 ($^{-13}\text{CH-}$)	5.42-5.38 (H_a) 6.30 (H_b) 7.19 (H_c) 7.27 (H_d) 6.89 (H_e) 6.85 (H_f) 7.31 (H_g)	 ESI/APCI : m/z 359 [$(^{13}\text{C})\text{-18g} - \text{H}^+$]
$(^{13}\text{C})\text{-18h}$	127.5 ($^{-13}\text{CH-}$)	6.48 ($^{-13}\text{CH-}$)	6.54 (H_a) 4.45 (H_b) 7.00 (H_c) 7.10 (H_d) 6.72 (H_e)	 ESI/APCI : m/z 359 [$(^{13}\text{C})\text{-18h} - \text{H}^+$]

	δ (ppm) ^{13}C	δ (ppm) ^1H HSQC	δ (ppm) ^1H HMBC	Proposed structure
(^{13}C) - 18i	37.7 ($-^{13}\text{CH}_2$ -)	3.44 ($-^{13}\text{CH}_2$ -)	5.98 (H_a) 5.08 (H_b)	 ESI/APCI : m/z 325 [(^{13}C)-18i - H^+]$^-$
(^{13}C) - 18j	54.1 ($-^{13}\text{CH}$ -)	5.09 ($-^{13}\text{CH}$ -)	4.62-5.04 (H_a) 5.72 (H_b) 6.68 (H_c) 6.51 (H_d) 6.75 (H_e) 2.83 (H_f)	 ESI/APCI : m/z 325 [(^{13}C)-18j - H^+]$^-$
(^{13}C) - 18k	137.5 ($-^{13}\text{CH}$ -)	6,38 ($-^{13}\text{CH}$ -)	6.17 (H_a) 3.42 (H_b) 6.92 (H_c) 7.00 (H_d) 6.98 (H_e)	 ESI/APCI : m/z 325 [(^{13}C)-18k - H^+]$^-$
(^{13}C) - 18l	132.3 ($-^{13}\text{CH}$ -)	6.59 ($-^{13}\text{CH}$ -)	6.15 (H_a) 4.15 (H_b) 6.81 (H_c) 7.13 (H_d) 6.72 (H_e)	 ESI/APCI : m/z 295 [(^{13}C)-18l - H^+]$^-$

	δ (ppm) ^{13}C	δ (ppm) ^1H HSQC	δ (ppm) ^1H HMBC	Proposed structure
$(^{13}\text{C})\text{-18m}$	133.4 ($^{-13}\text{CH-}$)	6.68 ($^{-13}\text{CH-}$)	6.31 (H_a) 4.66 (H_b) 6.81 (H_c) 7.14 (H_d) 6.71 (H_e)	 ESI/APCI : m/z 371 [$(^{13}\text{C})\text{-18m} - \text{H}^+$] ⁺

○ Characterized adducts in PBS/ CD_3CN

No adduct observed by NMR

General procedure for coupling of 4-allyl-orthoquinone- ^{13}C to peptides in PBS/ CD_3CN

To a solution of peptide Pep-X (**Table 4**) in PBS (450 μL , 0.1 M, pH 7.4) was added a solution of 4-allyl-orthoquinone- ^{13}C ($(^{13}\text{C})\text{-18}$ (X mg, 7 μmol , 1 equiv.) in CD_3CN (150 μL). The mixture was placed into an NMR tube for further analysis. After 7 days, the reaction medium was analysed by LC-MS.

Peptide Pep-X	mg / μmmol	Equivalent	Adduct(s) characterized
Pep-Lysine	9.6 / 2	2	No adduct observed by NMR
Pep-Cysteine	9.6 / 2	2	
Pep-20 amino acids	4.7 / 1	1	
Glutathione (GSH)	4.2 / 2	2	

Table 4. Peptides, quantities used and number of equivalents

Reactivity studies in RHE model

General procedure

SkinEthic® RHE were topically treated with pre- or pro-hapten- ^{13}C in acetone (0.4 M, 100 μL) or DMSO (0.4 M, 100 μL)⁽¹⁾ and post-incubated. After post-incubation, the RHE samples were washed with purified water, separated from the polycarbonate support using a treatment with Dispase II (neutral protease, grade II, Roche, Mannheim) in HEPES buffer,⁽²⁾ washed with purified water and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ before NMR sample preparation.

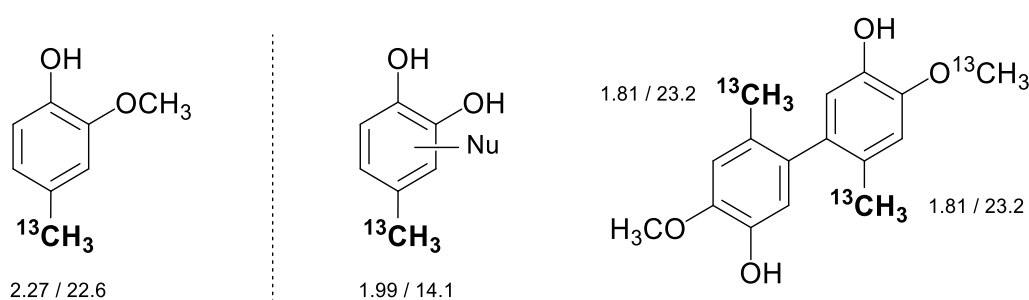
⁽¹⁾ In some cases, RHE-DMSO samples were rinsed with phosphate buffer (10 mL, 0.1 M, pH 7.4) after 40 min of incubation and reincubated for several hours.

⁽²⁾ A 2.4 U/mL stock solution may be prepared: to a solution of Dispase II (0.96 U/mg, 240 mg) in HEPES saline buffer (24 mL, 0.1 M, pH = 7.4) was added purified water (72 mL). It should be stored at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2D ^1H - ^{13}C HSQC and 1D ^{13}C chemical shifts are given in part per million (ppm) on the scale δ . The lactate correlation peak was used as reference values. For ^1H NMR: δ lactate = 1.33 ppm. For ^{13}C NMR: δ lactate = 22.7 ppm.

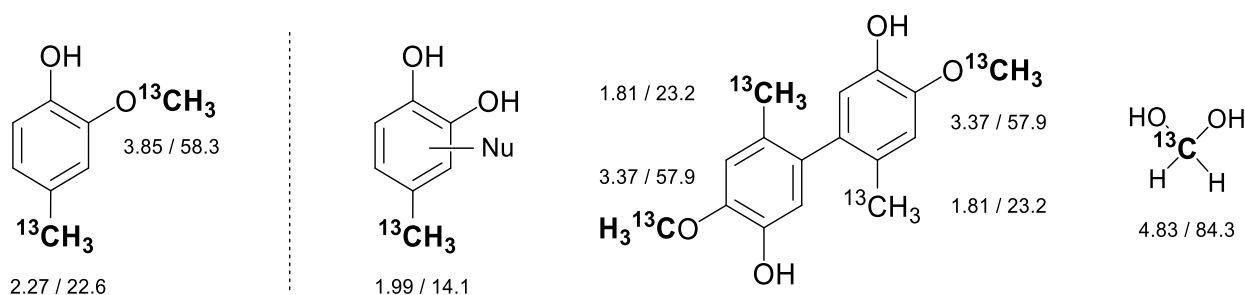
Coupling of creosol- ^{13}C to SkinEthic® RHE

Applied in acetone (0.4 M); ^1H - ^{13}C HSQC experiment



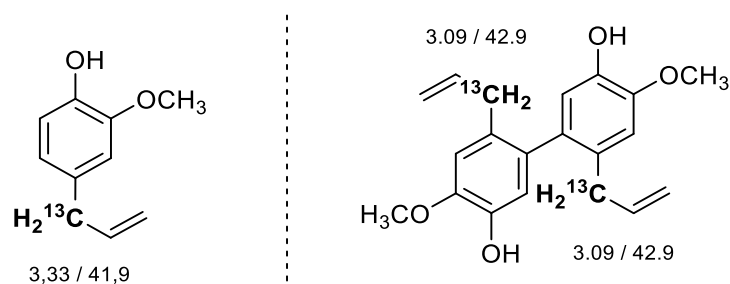
Coupling of creosol- $^{13}\text{C}_2$ to SkinEthic $^{\text{®}}$ RHE

Applied in acetone (0.4 M); ^1H - ^{13}C HSQC experiment



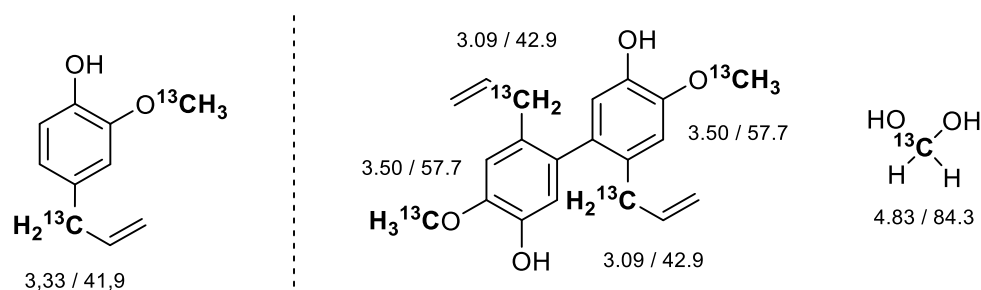
Coupling of eugenol- ^{13}C to SkinEthic $^{\text{®}}$ RHE

Applied in acetone (0.4 M); ^1H - ^{13}C HSQC experiment



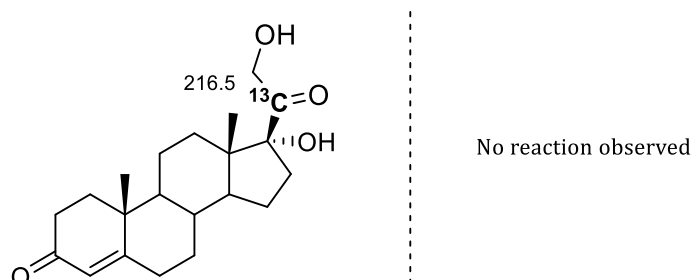
Coupling of creosol- $^{13}\text{C}_2$ to SkinEthic $^{\text{®}}$ RHE

Applied in acetone (0.4 M); ^1H - ^{13}C HSQC experiment

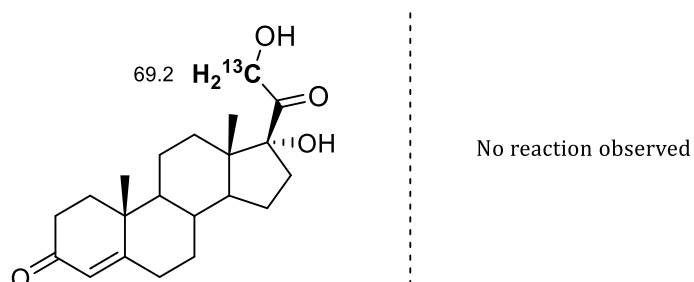


Coupling of cortexolone-20-¹³C to SkinEthic® RHE

Applied in acetone (0.4 M); ¹³C experiment

**Coupling of cortexolone-21-¹³C to SkinEthic® RHE**

Applied in acetone (0.4 M); ¹³C experiment

**Coupling of 21-dehydrocortexolone-20-¹³C to SkinEthic® RHE**

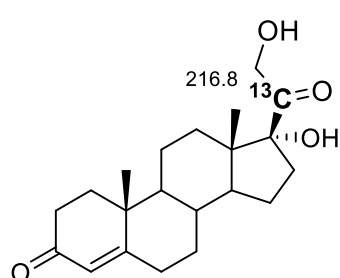
Applied in acetone (0.4 M); ¹³C experiment

No signal detected

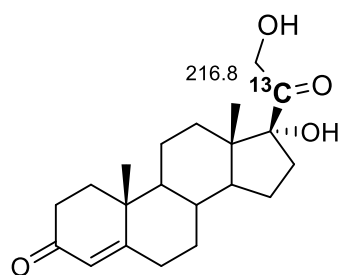
Coupling of 21-dehydrocortexolone-21-¹³C to SkinEthic® RHE

Applied in acetone (0.4 M); ¹³C experiment

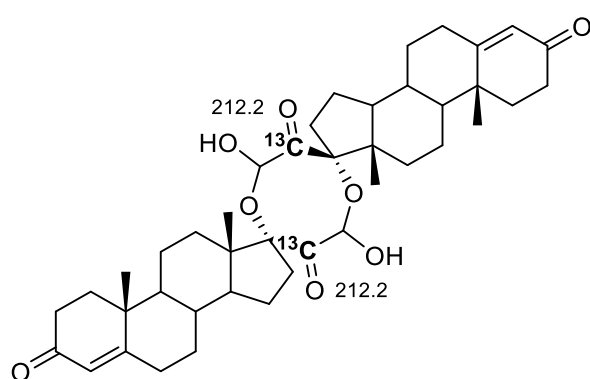
No signal detected

Coupling of cortisolone-20- ^{13}C to SkinEthic $^{\text{®}}$ RHEApplied in DMSO; ^{13}C experiment

No reaction observed

Coupling of cortisolone-20- ^{13}C to SkinEthic $^{\text{®}}$ RHEApplied in DMSO + rinse PBS; ^{13}C experiment

No reaction observed

Coupling of 21-dehydrocortisolone-20- ^{13}C to SkinEthic $^{\text{®}}$ RHEApplied in DMSO; ^{13}C experiment

No reaction observed

Coupling of 21-dehydrocortexolone-20-¹³C to SkinEthic® RHE

Applied in DMSO + rinse PBS; ¹³C experiment

No signal detected

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] Thyssen, J. P.; Linneberg, A.; Menné, T.; Johansen, J. D. The epidemiology of contact allergy in the general population—prevalence and main findings. *Contact Dermatitis* **2007**, *57*, 287–299.
- [2] Peiser, M.; Tralau, T.; Heidler, J.; Api, A. M.; Arts, J. H. E.; Basketter, D. A.; English, J.; Diepgen, T. L.; Fuhlbrigge, R. C.; Gaspari, A. A.; Johansen, J. D.; Karlberg, A. T.; Kimber, I.; Lepoittevin, J. P.; Liebsch, M.; Maibach, H. I.; Martin, S. F.; Merk, H. F.; Platzeck, T.; Rustemeyer, T.; Schnuch, A.; Vandebriel, R. J.; White, I. R.; Luch, A. Allergic contact dermatitis: epidemiology, molecular mechanisms, in vitro methods and regulatory aspects. Current knowledge assembled at an international workshop at BfR, Germany. *Cell. Mol. Life Sci.* **2012**, *69*, 763–781.
- [3] White, I. R.; De Groot, C. Cosmetic and skin care products. In *Contact Dermatitis*; Frosch, P. J., Menné, T., Lepoittevin, J.-P., Ed.; Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 2006; pp 493–506.
- [4] Le Coz, C. J. Clothing. In *Contact Dermatitis*; Frosch, P. J., Menné, T., Lepoittevin, J.-P., Ed.; Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 2006; pp 679–702.
- [5] Björkner, B.; Ponté, A.; Zimerson, E.; Frick, M. Plastic materials. In *Contact Dermatitis*; Frosch, P. J., Menné, T., Lepoittevin, J.-P., Ed.; Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 2006; pp 583–622.
- [6] Brandao, F.; Goossens, A.; Tosti, A. Topical drugs. In *Contact Dermatitis*; Frosch, P. J., Menné, T., Lepoittevin, J.-P., Ed.; Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 2006; pp 623–652.
- [7] Lidén, C. Pesticides. In *Contact Dermatitis*; Frosch, P. J., Menné, T., Lepoittevin, J.-P., Ed.; Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 2006; pp 801–810.
- [8] Le Coz, C. J.; Ducombs, G. Plants and plant products. In *Contact Dermatitis*; Frosch, P. J., Menné, T., Lepoittevin, J.-P., Ed.; Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 2006; pp 751–800.
- [9] Coombs, R. R. A.; Gell, P. G. H. Classification of allergic reaction for clinical hypersensitivity, disease. In *Clinical Aspects of Immunology*; Gell, P. G. H., Coombs, R. R. A., Lachman, P. J., Ed.; Oxford Blackwell Scientific, London, 1975; pp 761–781.
- [10] Belsito, D. V. The diagnostic evaluation, treatment, and prevention of allergic contact dermatitis in the new millennium. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2000**, *105*, 409–420.
- [11] Regulation, E. C. No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006, concerning the Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals (REACH), 1999. *Off. J. Eur. Union* **2006**, L396, 25–849.
- [12] Basketter, D. A.; Blaikie, L.; Dearman, R. J.; Kimber, I.; Ryan, C. A.; Gerberick, G. F.; Harvey, P.; Evans, P.; White, I. R.; Rycroft, R. J. G. Use of the local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Contact Dermatitis* **2000**, *42*, 344–348.
- [13] Directive, E. C. No 15/2003 of the European Parliament and of the Council of 27 February 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products. *Off. J. Eur. Union* **2003**, L66, 26–35.
- [14] Lepoittevin, J.-P. Les bases chimiques de l'allergie de contact. *Rev. Fr. Allergol.* **2011**, *51*, 208–211.
- [15] Alvarez-Sánchez, R.; Basketter, D.; Pease, C.; Lepoittevin, J.-P. Studies of chemical selectivity of hapten, reactivity, and skin sensitization potency. 3. Synthesis and studies on the reactivity toward model

- nucleophiles of the ^{13}C -labeled skin sensitizers, 5-chloro-2-methylisothiazol-3-one (MCI) and 2-methylisothiazol-3-one (MI). *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16*, 627–636.
- [16] Kireche, M.; Gimenez-Arnau, E.; Lepoittevin, J.-P. Preservatives in cosmetics: reactivity of allergenic formaldehyde-releasers towards amino acids through breakdown products other than formaldehyde. *Contact Dermatitis* **2010**, *63*, 192–202.
- [17] Gerberick, G. F.; Vassallo, J. D.; Bailey, R. E.; Chaney, J. G.; Morrall, S. W.; Lepoittevin, J.-P. Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicol. Sci.* **2004**, *81*, 332–343.
- [18] Lepoittevin, J.-P.; Benezra, C. ^{13}C -Enriched methyl alkanesulfonates: new lipophilic methylating agents for the identification of nucleophilic amino acids of proteins by NMR. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3875–3878.
- [19] Elbayed, K.; Berl, V.; Debeuckelaere, C.; Moussallieh, F.-M.; Piotto, M.; Namer, I.-J.; Lepoittevin, J.-P. HR-MAS NMR spectroscopy of reconstructed human epidermis: potential for the *in situ* investigation of the chemical interactions between skin allergens and nucleophilic amino acids. *Chem. Res. Toxicol.* **2013**, *26*, 136–145.
- [20] Bensouilah, J.; Buck, P. Skin structure and function. In *Aromadermatology: aromatherapy in the treatment and care of common skin conditions*; Ed.; Radcliffe Publishing, 2006; pp. 1–11.
- [21] Dréno, B. Anatomie et physiologie de la peau et de ses annexes. *Ann. Dermatol. Vener.* **2009**, *136*, S247–S251.
- [22] Crickx, B. Système immunitaire cutané. *Ann. Dermatol. Vener.* **2005**, *132*, 8S3.
- [23] Gall, Y. Acide hyaluronique : structure, métabolisme et implication dans la cicatrisation. *Ann. Dermatol. Vener.* **2010**, *137*, S30–S39.
- [24] Doutre, M.-S. Le système immunitaire cutané. *Ann. Dermatol. Vener.* **2009**, *136*, S257–S262.
- [25] Descotes, J.; Choquet-Kastylevsky, G. Gell and Coombs's classification: is it still valid? *Toxicology* **2001**, *158*, 43–49.
- [26] Johansson, S. G. O.; O'B Hourihane, J.; Bousquet, J.; Bruijnzeel-Koomen, C.; Dreborg, S.; Haahtela, T.; Kowalski, M. L.; Mygind, N.; Ring, J.; van Cauwenberge, P.; van Hage-Hamsten, M.; Wüthrich, B. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* **2001**, *56*, 813–824.
- [27] Rajan, T. V. The Gell–Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. *Trends Immunol.* **2003**, *24*, 376–379.
- [28] Roberts, D. W.; Lepoittevin, J.-P. Hapten-protein interactions. In *Allergic Contact Dermatitis*; Lepoittevin, J.-P., Basketter, D. A., Goossens, A., Karlberg, A.-T., Ed.; Springer, 1998; pp 81–111.
- [29] Lepoittevin, J.-P. Molecular aspects of allergic contact dermatitis. In *Contact Dermatitis*; Frosch, P. J., Menné, T., Lepoittevin, J.-P., Ed.; Springer, 2006; pp. 45–68.
- [30] Karlberg, A.-T.; Bergström, M. A.; Börje, A.; Luthman, K.; Nilsson, J. L. G. Allergic contact dermatitis–formation, structural requirements and reactivity of skin sensitizers. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 53–69.
- [31] Jolles, S. Paul Langerhans. *J. Clin. Pathol.* **2002**, *55*, 243.
- [32] Wilson, N. S.; Villadangos, J. A. Lymphoid organ dendritic cells: beyond the Langerhans cells paradigm. *Immunol. Cell Biol.* **2004**, *82*, 91–98.

- [33] Lanzavecchia, A. Mechanisms of antigen uptake for presentation. *Curr. Opin. Immunol.* **1996**, *8*, 348-354.
- [34] Authier, F.; Posner, B. I.; Bergeron J. J. M. Endosomal proteolysis of internalized proteins. *FEBS Lett.* **1996**, *389*, 55-60.
- [35] Germain, R. N. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* **1994**, *76*, 287-299.
- [36] Randolph, G. J.; Angeli, V.; Swartz, M. A. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat. Rev. Immunol.* **2005**, *5*, 617-628.
- [37] Rustemeyer, T.; van Hoogstraten, I. M. W.; von Blomberg, B. M. E.; Scheper, R. J.; Mechanisms in allergic contact dermatitis. In Kanerva's occupational dermatology; Rustemeyer, T., Elsner, P., John, S.-M., Maibach, H. I., Ed.; Springer, 2012; pp 113-146.
- [38] Macatonia, S. E.; Knight, S. C.; Edwards, A. J.; Griffiths, S.; Fryer, P. Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. Functional and Morphological Studies. *J. Exp. Med.* **1987**, *166*, 1654-1667.
- [39] Isakov, N.; Altman, A. Lymphocyte activation and immune regulation. *Immunol. Today* **1986**, *7*, 155-157.
- [40] Grabbe, S.; Schwarz, T.; Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Immunol. Today* **1998**, *19*, 37-43.
- [41] Semple, S. Dermal exposure to chemicals in the workplace: just how important is skin absorption? *Occup. Environ. Med.* **2004**, *61*, 376-382.
- [42] Gruvberger, B. Allergen exposure assessment. In Contact Dermatitis; Frosch, P. J., Menné, T., Lepoittevin, J.-P., Ed.; Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 2006; pp 413-427.
- [43] Lepoittevin, J.-P. Pourquoi pas elles ? Des molécules hypo- ou anallergiques sont-elles utilisables ? In Progès en dermato-allergologie; GERDA, Ed.; John Libbey Eurotext, 2003; pp 199-214.
- [44] Moss, G. P.; Dearden, J. C.; Patel, H.; Cronin, M. T. D. Quantitative structure-permeability relationships (QSPRs) for percutaneous absorption. *Toxicol. In Vitro* **2002**, *16*, 299-317.
- [45] Basketter, D.; Dooms-Goossens, A.; Karlberg, A.-T.; Lepoittevin, J.-P. The chemistry of contact allergy: why is a molecule allergic? *Contact Dermatitis* **1995**, *32*, 65-73.
- [46] Lepoittevin, J.-P.; Benezra, C. Chimie de l'allergie de contact : pourquoi une molécule est-elle allergisante ? *Rev. Fr. Allergol.* **1991**, *31*, 235-241.
- [47] Yoshihisa, Y.; Shimizu, T. Metal allergy and systemic contact dermatitis: an overview. *Dermatol. Res. Pract.* **2012**, *2012*, ID 749561, 5 pages.
- [48] Schaumlöffel, D. Nickel species: analysis and toxic effects. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2012**, *26*, 1-6.
- [49] Katugampola, R. P.; Mills, C. M.; Stone, N. M. Occupational allergic contact dermatitis to epoxy resin in a gravestone repairer. *Contact Dermatitis* **2006**, *55*, 194.
- [50] Rømyhr, O.; Nyfors, A.; Leira, H. L.; Smedbold, H. T. Allergic contact dermatitis caused by epoxy resin systems in industrial painters. *Contact Dermatitis* **2006**, *55*, 167-172.
- [51] Rycroft, R. J. G. Allergic contact dermatitis from laboratory synthesis of 4-bromomethyl-6,8-dimethyl-2(1H)-quinolone. *Contact Dermatitis* **1981**, *7*, 39-42.

- [52] Klimuk, S. K.; Semple, S. C.; Scherrer, P.; Hope, M. J. Contact hypersensitivity: a simple model for the characterization of disease-site targeting by liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1417*, 191–201.
- [53] Aptula, A. O.; Patlewicz, G.; Roberts, D. W. Skin sensitization: reaction mechanistic applicability domains for structure–activity relationships. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 1420–1426.
- [54] Rougier, N.; Redziniak, G.; Mougin, D.; Schmitt, D.; Vincent, C. In vitro evaluation of the sensitization potential of weak contact allergens using Langerhans-like dendritic cells and autologous T cells. *Toxicology* **2000**, *145*, 73–82.
- [55] Rastogi, S. C.; Heydorn, S.; Johansen, J. D.; Basketter, D. A. Fragrance chemicals in domestic and occupational products. *Contact Dermatitis* **2001**, *45*, 221–225.
- [56] Rodriguez, E.; Towers, G. H. N.; Mitchell, J. C. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry* **1976**, *15*, 1573–1580.
- [57] Lepoittevin, J.-P.; Berl, V.; Giménez-Arnau, E. α -Methylene- γ -butyrolactones: versatile skin bioactive natural products. *Chem. Rec.* **2009**, *9*, 258–270.
- [58] Weltzien, H. U.; Padovan, E. Molecular features of penicillin allergy. *J Invest Dermatol* **1998**, *110*, 203–206.
- [59] Lepoittevin, J.-P. Metabolism *versus* chemical transformation or pro- *versus* prehapten? *Contact Dermatitis* **2006**, *54*, 73–74.
- [60] Karlberg, A.-T.; Shao, L. P.; Nilsson, U.; Gåfvert, E.; Nilsson, J. L. G. Hydroperoxides in oxidized d-limonene identified as potent contact allergens. *Arch. Dermatol. Res.* **1994**, *286*, 97–103.
- [61] Christensson, J. B.; Forsström, P.; Wennberg, A.-M.; Karlberg, A.-T.; Matura, M. Air oxidation increases skin irritation from fragrance terpenes. *Contact Dermatitis* **2009**, *60*, 32–40.
- [62] Matura, M.; Goossens, A.; Bordalo, O.; Garcia-Bravo, B.; Magnusson, K.; Wrangsjö, K.; Karlberg, A.-T. Patch testing with oxidized *R*-(+)-limonene and its hydroperoxide fraction. *Contact Dermatitis* **2003**, *49*, 15–21.
- [63] Eilstein, J.; Giménez-Arnau, E.; Duché, D.; Rousset, F.; Lepoittevin, J.-P. Synthesis and reactivity toward nucleophilic amino acids of 2,5-[^{13}C]-dimethyl-*p*-benzoquinonediimine. *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, *19*, 1248–1256.
- [64] Eilstein, J.; Giménez-Arnau, E.; Duché, D.; Rousset, F.; Lepoittevin, J.-P. Mechanistic Studies on the lysine-induced *N*-formylation of 2,5-dimethyl-*p*-benzoquinonediimine. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20*, 1155–1161.
- [65] Lepoittevin, J.-P. Métabolisme cutané. In *Progrès en Dermato-Allergologie*; GERDA, ed.; John Libbey Eurotext, 2005; pp 29–40.
- [66] Park, B. K.; Pirmohamed, M.; Kitteringham, N. R. The role of cytochrome P450 enzymes in hepatic and extrahepatic human drug toxicity. *Pharmacol. Therapeut.* **1995**, *68*, 385–424.
- [67] Krueger, S. K.; Williams, D. E. Mammalian flavin-containing monooxygenases: structure/function, genetic polymorphisms and role in drug metabolism. *Pharmacol. Ther.* **2005**, *106*, 357–387.
- [68] Cheung, C.; Smith, C. K.; Hoog, J.-O.; Hotchkiss, S. A. M. Expression and localization of human alcohol and aldehyde dehydrogenase enzymes in skin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *261*, 100–107.
- [69] Weyler, W.; Hsu, Y.-P.; Breakefield, X. O. Biochemistry and genetics of monoamine oxidase. *Pharmacol. Therapeut.* **1990**, *47*, 391–417.

- [70] Hollenberg, P. F. Mechanisms of cytochrome P450 and peroxidase-catalyzed xenobiotic metabolism. *FASEB J.* **1992**, *6*, 686–694.
- [71] Prusakiewicz, J. J.; Ackermann, C.; Voorman, R. Comparison of skin esterase activities from different species. *Pharm. Res.* **2006**, *23*, 1517–1524.
- [72] Levine, W. G. Metabolism of azo dyes: implication for detoxication and activation. *Drug Metab. Rev.* **1991**, *23*, 253–309.
- [73] Martin, R. J.; Denyer, S. P.; Hadgraft, J. Skin metabolism of topically applied compounds. *Int. J. Pharm.* **1987**, *39*, 23–32.
- [74] Tukey, R. H.; Strassburg, C. P. Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2000**, *40*, 581–616.
- [75] Coughtrie, M. W. H.; Sharp, S.; Maxwell, K.; Innes, N. P. Biology and function of the reversible sulfation pathway catalysed by human sulfotransferases and sulfatases. *Chem. Biol. Interact.* **1998**, *109*, 3–27.
- [76] Kawakubo, Y.; Merk, H. F.; Al Masaoudi, T.; Sieben, S.; Blömeke, B. N-Acetylation of paraphenylenediamine in human skin and keratinocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *292*, 150–155.
- [77] Giralt, M.; Cervello, I.; Nogues, M. R.; Puerto, A. M.; Ortin, F.; Argany, N.; Mallol, J. Glutathione, glutathion *S*-transferase and reactive oxygen species of human scalp sebaceous glands in male pattern baldness. *J. Invest. Dermatol.* **1996**, *107*, 154–158.
- [78] Smith Pease, C. K.; Basketter, D. A.; Patlewicz, G. Y. Contact allergy: the role of skin chemistry and metabolism. *Clin. Exp. Dermatol.* **2003**, *28*, 177–183.
- [79] Johansen, J. D.; Menné, T. The fragrance mix and its constituents: a 14-years material. *Contact Dermatitis* **1995**, *32*, 18–23.
- [80] Smith, C. K.; Moore, C. A.; Elahi, E. N.; Smart, A. T. S.; Hotchkiss, S. A. M. Human skin absorption and metabolism of the contact allergens, cinnamic aldehyde, and cinnamic alcohol. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2000**, *168*, 189–199.
- [81] Ott, H.; Bergström, M. A.; Heise, R.; Skazik, C.; Zwadlo-Klarwasser, G.; Merk, H. F.; Baron, J. M.; Karlberg, A.-T. Cutaneous metabolic activation of carboxime, a self-activating, skin-sensitizing prohapten. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 399–405.
- [82] Spiewak, R. Patch testing for contact allergy and allergic contact Dermatitis. *Open Allergy J* **2008**, *1*, 42–51.
- [83] Cohen, D. E.; Heidary, N. Treatment of irritant and allergic contact dermatitis. *Dermatol. Ther.* **2004**, *17*, 334–340.
- [84] Russel, W. H. S.; Burch, R. L. The principles of humane experimental technique; Methuen, London, 1959; p 238.
- [85] Directive, No 67/548/EEC of the European Council of 27 June 1967 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances. *Off. J. Eur. Comm.* **1967**, *196*, 16.8.
- [86] Directive, E. C. 45/1999 of the European Parliament and the Council of 31 may 1999 concerning the approximation of the laws, regulation and administrative provisions of the member states relating

- to the classification, packaging and labeling of dangerous preparations. *Off. J. Eur. Comm.* **1999**, L200, 1-68.
- [87] Magnusson, B.; Kligman, A. M. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J. Invest. Dermatol.* **1969**, *52*, 268–276.
- [88] Buehler, E. V. Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig. *Arch. Dermatol.* **1965**, *91*, 171–175.
- [89] Kimber, I.; Dearman, R. J.; Basketter, D. A.; Ryan, C. A.; Gerberick, G. F. The local lymph node assay: past, present and future. *Contact Dermatitis* **2002**, *47*, 315–328.
- [90] Stokes, W. S.; Kulpa-Eddy, J. A. Updated ICCVAM-recommended protocol: the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. NIH Publication No. 11-7709.
- [91] Kimber, I.; Basketter, D. ; Butler, M.; Gamer, A.; Garrigue, J.-L.; Gerberick, G. F.; Newsome, C.; Steiling, W.; Vohr, H.-W. Classification of contact allergens according to potency: proposals. *Food Chem. Toxicol.* **2003**, *41*, 1799–1809.
- [92] Aeby, P.; Ashikaga, T.; Bessou-Touya, S.; Schepky, A.; Gerberick, F.; Kern, P.; Marrec-Fairley, M.; Maxwell, G.; Ovigne, J.-M.; Sakaguchi, H.; Reisinger, K.; Tailhardat, M.; Martinozzi-Teissier, S.; Winkler, P. Identifying and characterizing chemical skin sensitizers without animal testing: Colipa's research and method development program. *Toxicol. in Vitro* **2010**, *24*, 1465–1473.
- [93] Nukada, Y.; Ashikaga, T.; Miyazawa, M.; Hirota, M.; Sakaguchi, H.; Sasa, H.; Nishiyama, N. Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human cell line activation test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicol. In Vitro* **2012**, *26*, 1150–1160.
- [94] Python, F.; Goebel, C.; Aeby, P. Assessment of the U937 cell line for the detection of contact allergens. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2007**, *220*, 113–124.
- [95] Natsch, A.; Bauch, C.; Foertsch, L.; Gerberick, F.; Norman, K.; Hilberer, A.; Inglis, H.; Landsiedel, R.; Onken, S.; Reuter, H.; Schepky, A.; Emter, R.. 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*, 733–744.
- [96] Facy, V.; Flouret, V.; Régnier, M.; Schmidt, R. Reactivity of Langerhans cells in human reconstructed epidermis to known allergens and UV radiation. *Toxicol. in Vitro* **2005**, *19*, 787–795.
- [97] Poumay, Y.; Coquette, A. Modelling the human epidermis in vitro: tools for basic and applied research. *Arch. Dermatol. Res.* **2006**, *298*, 361–369.
- [98] Casati, S.; Aeby, P.; Basketter, D. A.; Cavani, A.; Gennari, A.; Gerberick, G. F.; Griem, P.; Hartung, T.; Kimber, I.; Lepoittevin, J.-P.; Meade, B. J.; Pallardy, M.; Rougier, N.; Rousset, F.; Rubinstenn, G.; Sallusto, F.; Verheyen, G. R.; Zuang, V. Dendritic cells as a tool for the predictive identification of skin sensitisation hazard. The report and recommendations of ECVAM workshop 51. *ATLA* **2005**, *33*, 47-62.
- [99] Lepoittevin, J.-P. Development of structure–activity relationships (SARs) in allergic contact dermatitis. *Cell Biol. Toxicol.* **1999**, *15*, 47–55.
- [100] Benezra, C.; Sigman, C. C.; Perry, L. R.; Helmes, C. T.; Maibach, H. I. A Systematic search for structure-activity relationships of skin contact sensitizers: methodology. *J. Invest. Dermatol.* **1985**, *85*, 351-356.

- [101] Sanderson, D. M.; Earnshaw, C. G. Computer prediction of possible toxic action from chemical structure; the DEREK system. *Hum. Exp. Toxicol.* **1991**, *10*, 261–273.
- [102] Enslein, K.; Gombar, V. K.; Blake, B. W.; Maibach, H. I.; Hostynek, J. J.; Sigman, C. C.; Bagheri, D. A quantitative structure-toxicity relationships model for the dermal sensitization guinea pig maximization assay. *Food Chem. Toxicol.* **1997**, *35*, 1091–1098.
- [103] Roberts, D. W.; Fragnals, R.; Lepoittevin, J.-P.; Benezra, C. Refinement of the relative alkylation index (RAI) model for skin sensitization and application to mouse and guinea-pig test data for alkyl alkanesulphonates. *Arch. Dermatol. Res.* **1991**, *283*, 387–394.
- [104] Gerberick, G. F.; Ryan, C. A.; Kern, P. S.; Dearman, R. J.; Kimber, I.; Patlewicz, G. Y.; Basketter, D. A. A Chemical dataset for evaluation of alternative approaches to skin-sensitization testing. *Contact Dermatitis* **2004**, *50*, 274–288.
- [105] Landsteiner, K.; Jacobs, J. Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. II. *J. Exp. Med.* **1936**, *64*, 625–639.
- [106] Gerberick, F.; Aleksic, M.; Basketter, D.; Casati, S.; Karlberg, A.-T.; Kern, P.; Kimber, I.; Lepoittevin, J.-P.; Natsch, A.; Ovigne, J.-M.; Rovida, C.; Sakaguchi, H.; Schultz, T. Chemical reactivity measurement and the predictive identification of skin sensitizers. The report and recommendations of ECVAM workshop 64. *ATLA* **2008**, *36*, 215–242.
- [107] Gerberick, G. F.; Vassallo, J. D.; Foertsch, L. M.; Price, B. B.; Chaney, J. G.; Lepoittevin, J.-P. Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: a classification tree model approach. *Toxicol. Sci.* **2007**, *97*, 417–427.
- [108] Silvia, C.; Claudius, G. EURL ECVAM recommendation on the direct peptide reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing, 2013, 36 pages.
- [109] Merckel, F.; Bernard, G.; Mutschler, J.; Giménez-Arnau, E.; Gerberick, G. F.; Lepoittevin, J.-P. 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*, 1433–1441.
- [110] Gerberick, G. F.; Troutman, J. A.; Foertsch, L. M.; Vassallo, J. D.; Quijano, M.; Dobson, R. L. M.; Goebel, C.; Lepoittevin, J.-P. Investigation of peptide reactivity of pro-hapten skin sensitizers using a peroxidase-peroxide oxidation system. *Toxicol. Sci.* **2009**, *112*, 164–174.
- [111] Smith, B. J.; Curtis, J. F.; Eling, T. E. Bioactivation of xenobiotics by prostaglandin H synthase. *Chem. Biol. Interact.* **1991**, *79*, 245–264.
- [112] Hofstra, A. H.; Uetrecht, J. P. Myeloperoxidase-mediated activation of xenobiotics by human leukocytes. *Toxicology* **1993**, *82*, 221–242.
- [113] Troutman, J. A.; Foertsch, L. M.; Kern, P. S.; Dai, H. J.; Quijano, M.; Dobson, R. L. M.; Lalko, J. F.; Lepoittevin, J.-P.; Gerberick, G. F. The incorporation of lysine into the Peroxidase Peptide Reactivity Assay for skin sensitization assessments. *Toxicol. Sci.* **2011**, *122*, 422–436.
- [114] Kato, H.; Okamoto, M.; Yamashita, K.; Nakamura, Y.; Fukumori, Y.; Nakai, K.; Kaneko, H. Peptide-binding assessment using mass spectrometry as a new screening method for skin sensitization. *J. Toxicol. Sci.* **2003**, *28*, 19–24.
- [115] Schultz, T. W.; Yarbrough, J. W.; Johnson, E. L. Structure–activity relationships for reactivity of carbonyl-containing compounds with glutathione. *SAR QSAR Environ. Res.* **2005**, *16*, 313–322.

- [116] Aptula, A. O.; Patlewicz, G.; Roberts, D. W.; Schultz, T. W. Non-enzymatic glutathione reactivity and in vitro toxicity: a non-animal approach to skin sensitization. *Toxicol. in Vitro* **2006**, *20*, 239–247.
- [117] Natsch, A.; Gfeller, H. LC-MS-based characterization of the peptide reactivity of chemicals to improve the *in vitro* prediction of the skin sensitization potential. *Toxicol. Sci.* **2008**, *106*, 464–478.
- [118] Wang, X.; Tabor, W. Studies of the reactivity of morpholine, 2-mercaptobenzothiazole and 2 of their derivatives with selected amino acids. *Contact Dermatitis* **1988**, *19*, 16–21.
- [119] Talaga, P.; Schaeffer, M.; Mattes, H.; Benezra, C.; Stampf, J.-L. Synthesis of Boc-Cys-Ala-OMe and its stereoselective addition to α -methylene- γ -butyrolactones. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 5029–5038.
- [120] Franot, C.; Benezra, C.; Lepoittevin, J.-P. Synthesis and interaction studies of ^{13}C labeled lactone derivatives with a model protein using ^{13}C NMR. *Bioorg. Med. Chem.* **1993**, *1*, 389–397.
- [121] Divkovic, M.; Pease, C. K.; Gerberick, G. F.; Basketter, D. A. Hapten–protein binding: from theory to practical application in the *in vitro* prediction of skin sensitization. *Contact Dermatitis* **2005**, *53*, 189–200.
- [122] Pruniéras, M.; Delescluse, C.; Regnier, M. The culture of skin. A review of theories and experimental methods. *J. Invest. Dermatol.* **1976**, *67*, 58–65.
- [123] Rheinwatd, J. G.; Green, H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* **1975**, *6*, 331–344.
- [124] Pruniéras, M.; Régnier, M.; Woodley, D. Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *J. Invest. Dermatol.* **1983**, *81*, 28s–33s.
- [125] Berking, C.; Herlyn, M. Human skin reconstruct models: a new application for studies of melanocyte and melanoma biology. *Histol Histopathol* **2001**, *16*, 669–674.
- [126] Todd, C.; Hewitt, S. D.; Kempenaar, J.; Noz, K.; Thody, A. J.; Ponc, M. Co-culture of human melanocytes and keratinocytes in a skin equivalent model: effect of ultraviolet radiation. *Arch. Dermatol. Res.* **1993**, *285*, 455–459.
- [127] Régnier, M.; Staquet, M.-J.; Schmitt, D.; Schmidt, R. Integration of Langerhans cells into a pigmented reconstructed human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **1997**, *109*, 510–512.
- [128] Régnier, M.; Patwardhan, A.; Scheynius, A.; Schmidt, R. Reconstructed human epidermis composed of keratinocytes, melanocytes and Langerhans cells. *Med. Biol. Eng. Comput.* **1998**, *36*, 821–824.
- [129] Poumay, Y.; Dupont, F.; Marcoux, S.; Leclercq-Smekens, M.; Hérin, M.; Coquette, A. A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in in vitro studies. *Arch. Dermatol. Res.* **2004**, *296*, 203–211.
- [130] Shevchenko, R. V.; James, S. L.; James, S. E. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *J. R. Soc. Interface* **2010**, *7*, 229–258.
- [131] Boyce, S. T. Cultured skin substitutes: a review. *Tissue Eng.* **1996**, *2*, 255–266.
- [132] Boelsma, E.; Gibbs, S.; Faller, C.; Ponc, M. Characterization and comparison of reconstructed skin models: morphological and immunohistochemical evaluation. *Acta Derm.-Venereol.* **2000**, *80*, 82–88.
- [133] Netzlaff, F.; Lehr, C.-M.; Wertz, P. W.; Schaefer, U. F. The human epidermis models EpiSkin®, SkinEthic® and EpiDerm®: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2005**, *60*, 167–178.

- [134] ECVAM protocol for EPIDERM™ (EPI-200) an *in vitro* assay for assessing dermal corrosivity. ICCVAM review of in vitro dermal corrosivity methods, Section 3.2, 2002, 57-76.
- [135] Spielmann, H.; Hoffmann, S.; Liebsch, M.; Botham, P.; Fentem, J. H.; Eskes, C.; Roguet, R.; Cotovio, J.; Cole, T.; Worth, A.; Heylings, J.; Jones, P.; Robles, C.; Kandarova, H.; Gamer, A.; Remmele, M.; Curren, R.; Raabe, H.; Cockshott, A.; Gerner, I.; Zuang, V. The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the skin integrity function test. *ATLA* **2007**, *35*, 559-601.
- [136] Stinchcomb, A. L. Xenobiotic bioconversion in human epidermis models. *Pharm. Res.* **2003**, *20*, 1113-1118.
- [137] Luu-The, V.; Duche, D.; Ferraris, C.; Meunier, J.-R.; Leclaire, J.; Labrie, F. Expression profiles of phases 1 and 2 metabolizing enzymes in human skin and the reconstructed skin models Episkin™ and full thickness model from Episkin™. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2009**, *116*, 178-186.
- [138] Eilstein, J.; Léreaux, G.; Budimir, N.; Hussler, G.; Wilkinson, S.; Duché, D. Comparison of xenobiotic metabolizing enzyme activities in *ex vivo* human skin and reconstructed human skin models from SkinEthic. *Arch. Toxicol.* **2014**, *88*, 1681-1694.
- [139] Vičanová, J.; Mommaas, A. M.; Mulder, A. A.; Koerten, H. K.; Ponec, M. Impaired desquamation in the in vitro reconstructed human epidermis. *Cell Tissue Res.* **1996**, *286*, 115-122.
- [140] Mak, V. H. W.; Cumpstone, M. B.; Kennedy, A. H.; Harmon, C. S.; Guy, R. H.; Potts, R. O. Barrier function of human keratinocyte cultures grown at the air-liquid interface. *J. Invest. Dermatol.* **1991**, *96*, 323-327.
- [141] Rosdy, M.; Clauss, L.-C. Terminal epidermal differentiation of human keratinocytes grown in chemically defined medium on inert filter substrates at the air-liquid interface. *J. Invest. Dermatol.* **1990**, *95*, 409-414.
- [142] Ponec, M.; Boelsma, E.; Weerheim, A.; Mulder, A.; Bouwstra, J.; Mommaas, M. Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models. *Int. J. Pharm.* **2000**, *203*, 211-225.
- [143] Kandárová, H.; Liebsch, M.; Spielmann, H.; Genschow, E.; Schmidt, E.; Traue, D.; Guest, R.; Whittingham, A.; Warren, N.; Gamer, A. O.; Remmele, M.; Kaufmann, T.; Wittmer, E.; De Wever, B.; Rosdy, M. Assessment of the human epidermis model SkinEthic RHE for in vitro skin corrosion testing of chemicals according to new OECD TG 431. *Toxicol. in Vitro* **2006**, *20*, 547-559.
- [144] Bernard, F. X.; Barrault, C.; Deguerce, A.; De Wever, B.; Rosdy, M. Development of a highly sensitive *in vitro* phototoxicity assay using the SkinEthic™ reconstructed human epidermis. *Cell Biol. Toxicol.* **2000**, *16*, 391-400.
- [145] De Brugerolle de Fraissinette, A.; Picarles, V.; Chibout, S.; Kolopp, M.; Medina, J.; Burtin, P.; Ebelin, M. E.; Osborne, S.; Mayer, F. K.; Spake, A.; Rosdy, M.; De Wever, B.; Ettlin, R. A.; Cordier, A. Predictivity of an *in vitro* model for acute and chronic skin irritation (SkinEthic) applied to the testing of topical vehicles. *Cell Biol. Toxicol.* **1999**, *15*, 121-135.
- [146] Schmook, F. P.; Meingassner, J. G.; Billich, A. comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. *Int. J. Pharm.* **2001**, *215*, 51-56.
- [147] Elbayed, K.; Dillmann, B.; Raya, J.; Piotto, M.; Engelke, F. Field modulation effects induced by sample spinning: application to high-resolution magic angle spinning NMR. *J. Magn. Reson.* **2005**, *174*, 2-26.

- [148] Andrew, E. R.; Bradbury, A.; Eades, R. G. Removal of dipolar broadening of nuclear magnetic resonance spectra of solids by specimen rotation. *Nature* **1959**, *183*, 1802–1803.
- [149] Lowe, I. J. Free induction decays of rotating solids. *Phys. Rev. Lett.* **1959**, *2*, 285–287.
- [150] Doskočilová, D.; Tao, D. D.; Schneider, B. Effects of macroscopic spinning upon linewidth of NMR signals of liquid in magnetically inhomogeneous systems. *Czech. J. Phys. B* **1975**, *25*, 202–209.
- [151] Anderson, R. C.; Stokes, J. P.; Shapiro, M. J. Structure determination in combinatorial chemistry: utilization of magic angle spinning HMQC and TOCSY NMR spectra in the structure determination of Wang-bound lysine. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 5311–5314.
- [152] Derome, A. E. Modern NMR techniques for chemistry research; Pergamon Press, 1987.
- [153] Hennel, J. W.; Klinowski, J. New techniques in solid-state NMR. *Top. Curr. Chem.* **2004**, *246*, 1–14.
- [154] Alam, T. M.; Jenkins, J. HR-MAS NMR spectroscopy in material science. In Advanced aspects of spectroscopy; Akhyar Farrukh, M., Ed.; InTech, 2012; pp 279–306.
- [155] Power, W. P. High-resolution magic angle spinning-enabling applications of NMR spectroscopy to semi-solid phases. In Annual reports on NMR spectroscopy 72; Webb, G. A., Ed.; Elsevier Inc., 2011; pp 111–156.
- [156] Stover, H. D. H.; Frechet, J. M. J. Direct polarization ^{13}C and ^1H magic angle spinning NMR in the characterization of solvent-swollen gels. *Macromolecules* **1989**, *22*, 1574–1576.
- [157] Fitch, W. L.; Detre, G.; Holmes, C. P.; Shoolery, J. N.; Keifer, P. A. High-resolution ^1H NMR in solid-phase organic synthesis. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7955–7956.
- [158] Shapiro, M. J.; Wareing, J. R. NMR methods in combinatorial chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 372–375.
- [159] Keifer, P. A.; Baltusis, L.; Rice, D. M.; Tymiak, A. A.; Shoolery, J. N. A Comparison of NMR spectra obtained for solid-phase-synthesis resins using conventional high-resolution, magic-angle-spinning, and high-resolution magic-angle-spinning probes. *J. Magn. Reson. A* **1996**, *119*, 65–75.
- [160] Wehler, T.; Westman, J. Magic angle spinning NMR: a valuable tool for monitoring the progress of reactions in solid phase synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4771–4774.
- [161] Warrass, R.; Lippens, G. Quantitative monitoring of solid phase organic reactions by high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2946–2950.
- [162] Busico, V.; Causa, M.; Cipullo, R.; Credendino, R.; Cutillo, F.; Friederichs, N.; Lamanna, R.; Segre, A.; Van Axel Castelli, V. Periodic DFT and high-resolution magic-angle-spinning (HR-MAS) ^1H NMR investigation of the active surfaces of MgCl_2 -supported Ziegler-Natta catalysts. The MgCl_2 matrix. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 1081–1089.
- [163] Blümel, J. Linkers and catalysts immobilized on oxide supports: new insights by solid-state NMR spectroscopy. *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 2410–2423.
- [164] Posset, T.; Guenther, J.; Pope, J.; Oeser, T.; Blümel, J. Immobilized Sonogashira catalyst systems: new insights by multinuclear HRMAS NMR studies. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2059–2061.
- [165] Szymanski, C. M.; Michael, F. S.; Jarrell, H. C.; Li, J.; Gilbert, M.; Larocque, S.; Vinogradov, E.; Brisson, J.-R. Detection of conserved N-linked glycans and phase-variable lipooligosaccharides and capsules from campylobacter cells by mass spectrometry and high resolution magic angle spinning NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 24509–24520.

- [166] Dag, S.; Niedziela, T.; Dzieciatkowska, M.; Lukasiewicz, J.; Jachymek, W.; Lugowski, C.; Kenne, L. The O-acetylation patterns in the O-antigens of *Hafnia alvei* strains PCM 1200 and 1203, serologically closely related to PCM 1205. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 2521–2527.
- [167] Jachymek, W.; Niedziela, T.; Petersson, C.; Lugowski, C.; Czaja, J.; Kenne, L. Structures of the O-specific polysaccharides from *Yokenella regensburgei* (*Koserella trabulsii*) strains PCM 2476, 2477, 2478, and 2494: high-resolution magic-angle spinning NMR investigation of the O-specific polysaccharides in native lipopolysaccharides and directly on the surface of living bacteria. *Biochemistry-US* **1999**, *38*, 11788–11795.
- [168] Lee, R. E. B.; Li, W.; Chatterjee, D.; Lee, R. E. Rapid structural characterization of the arabinogalactan and lipoarabinomannan in live mycobacterial cells using 2D and 3D HR-MAS NMR: structural changes in the arabinan due to ethambutol treatment and gene mutation are observed. *Glycobiology* **2004**, *15*, 139–151.
- [169] Li, W. Multidimensional HRMAS NMR: a platform for *in vivo* studies using intact bacterial cells. *Analyst* **2006**, *131*, 777–781.
- [170] Humpfer, E.; Spraul, M.; Nicholls, A. W.; Nicholson, J. K.; Lindon, J. C. Direct observation of resolved intracellular and extracellular water signals in intact human red blood cells using ^1H MAS NMR Spectroscopy. *Magn. Reson. Med.* **1997**, *38*, 334–336.
- [171] Griffin, J. L.; Bollard, M.; Nicholson, J. K.; Bhakoo, K. Spectral profiles of cultured neuronal and glial cells derived from HRMAS ^1H NMR spectroscopy. *NMR Biomed.* **2002**, *15*, 375–384.
- [172] Cheng, L. L.; Lean, C. L.; Bogdanova, A.; Wright, S. C.; Ackerman, J. L.; Brady, T. J.; Garrido, L. Enhanced resolution of proton NMR spectra of malignant lymph nodes using magic-angle spinning. *Magn. Reson. Med.* **1996**, *36*, 653–658.
- [173] Cheng, L. L.; Ma, M. J.; Becerra, L.; Ptak, T.; Tracey, I.; Lackner, A.; Gonzalez, R. G. Quantitative neuropathology by high resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 6408–6413.
- [174] Beckonert, O.; Coen, M.; Keun, H. C.; Wang, Y.; Ebbels, T. M. D.; Holmes, E.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K. High-resolution magic-angle-spinning NMR spectroscopy for metabolic profiling of intact tissues. *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 1019–1032.
- [175] Patti, G. J.; Yanes, O.; Siuzdak, G. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 263–269.
- [176] Spratlin, J. L.; Serkova, N. J.; Eckhardt, S. G. Clinical applications of metabolomics in oncology: a review. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 431–440.
- [177] Beger, R. D. A review of applications of metabolomics in cancer. *Metabolites* **2013**, *3*, 552–574.
- [178] Rocha, C. M.; Barros, A. S.; Gil, A. M.; Goodfellow, B. J.; Humpfer, E.; Spraul, M.; Carreira, I. M.; Melo, J. B.; Bernardo, J.; Gomes, A.; Sousa, V.; Carvalho, L.; Duarte, I. F. Metabolic profiling of human lung cancer tissue by ^1H high resolution magic angle spinning (HRMAS) NMR spectroscopy. *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 319–332.
- [179] Ben Sellem, D.; Elbayed, K.; Neuville, A.; Moussallieh, F.-M.; Lang-Averous, G.; Piotto, M.; Bellocq, J.-P.; Namer, I. J. Metabolomic characterization of ovarian epithelial carcinomas by HRMAS-NMR spectroscopy. *J. Oncol.* **2011**, *2011*, ID 174019, 9 pages.

- [180] Desmoulin, F.; Bon, D.; Martino, R.; Malet-Martino, M. Étude critique de l'utilisation de la RMN HR-MAS pour l'analyse des tissus biologiques. *C. R. Chim.* **2008**, *11*, 423–433.
- [181] Rutar, V. Magic angle sample spinning NMR spectroscopy of liquids as a nondestructive method for studies of plant seeds. *J. Agric. Food Chem.* **1989**, *37*, 67–70.
- [182] Gil, A. M.; Duarte, I. F.; Delgadillo, I.; Colquhoun, I. J.; Casuscelli, F.; Humpfer, E.; Spraul, M. Study of the compositional changes of mango during ripening by use of nuclear magnetic resonances spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1524–1536.
- [183] Sacco, D.; Brescia, M. A.; Buccolieri, A.; Caputi Jambrenghi, A. Geographical origin and breed discrimination of apulian lamb meat samples by means of analytical and spectroscopic determinations. *Meat Sci.* **2005**, *71*, 542–548.
- [184] Villa, P.; Castejón, D.; Herraiz, M.; Herrera, A. ¹H-HRMAS NMR study of cold smoked atlantic salmon (*Salmo Salar*) treated with E-Beam. *Magn. Reson. Chem.* **2013**, *51*, 350–357.
- [185] Ritota, M.; Marini, F.; Sequi, P.; Valentini, M. Metabolomic characterization of italian sweet pepper (*Capsicum annum* L.) by means of HRMAS-NMR spectroscopy and multivariate analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 9675–9684.
- [186] Sanchez Pérez, E. M.; Iglesias, M. J.; Ortiz, F. L.; Sanchez Pérez, I.; Martinez Galera, M. Study of the suitability of HRMAS NMR for metabolic profiling of tomatoes: application to tissue differentiation and fruit ripening. *Food. Chem.* **2010**, *122*, 877–887.
- [187] Shintu, L.; Ziarelli, F.; Caldarelli, S. Is high-resolution magic angle spinning NMR a practical speciation tool for cheese samples? Parmigiano Reggiano as a case study. *Magn. Reson. Chem.* **2004**, *42*, 396–401.
- [188] Mazzei, P.; Piccolo, A. ¹H HRMAS-NMR metabolomic to assess quality and traceability of mozzarella cheese from Campania buffalo milk. *Food Chem.* **2012**, *132*, 1620–1627.
- [189] Bertocchi, F.; Paci, M. Applications of high-resolution solid-state NMR spectroscopy in food science. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 9317–9327.
- [190] Opstad, K. S.; Bell, B. A.; Griffiths, J. R.; Howe, F. A. An assessment of the effects of sample ischaemia and spinning time on the metabolic profile of brain tumour biopsy specimens as determined by high-resolution magic angle spinning ¹H NMR. *NMR Biomed.* **2008**, *21*, 1138–1147.
- [191] Detour, J.; Elbayed, K.; Piotto, M.; Moussallieh, F. M.; Nehlig, A.; Namer, I. J. Ultra fast *in vivo* microwave irradiation for enhanced metabolic stability of brain biopsy samples during HRMAS NMR analysis. *J. Neurosci. Methods* **2011**, *201*, 89–97.
- [192] Martínez-Granados, B.; Monleón, D.; Martínez-Bisbal, M. C.; Rodrigo, J. M.; del Olmo, J.; Lluch, P.; Ferrández, A.; Martí-Bonmatí, L.; Celda, B. Metabolite identification in human liver needle biopsies by high-resolution magic angle spinning ¹H NMR spectroscopy. *NMR Biomed.* **2006**, *19*, 90–100.
- [193] The Human Metabolome Database (HMDB). www.hmdb.ca.
- [194] Biological Magnetic Resonance Data Bank. www.bmrb.wisc.edu.
- [195] Erb, G.; Elbayed, K.; Piotto, M.; Raya, J.; Neuville, A.; Mohr, M.; Maitrot, D.; Kehrli, P.; Namer, I. J. Toward improved grading of malignancy in oligodendrogliomas using metabolomics. *Magn. Reson. Med.* **2008**, *59*, 959–965.

- [196] Tessem, M.-B.; Selnæs, K. M.; Sjørusen, W.; Tranø, G.; Giskeødegård, G. F.; Bathen, T. F.; Gribbestad, I. S.; Hofslø, E. Discrimination of patients with microsatellite instability colon cancer using ^1H HR MAS MR spectroscopy and chemometric analysis. *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 3664–3670.
- [197] Di Gangi, I. M.; Vrhovsek, U.; Pazienza, V.; Mattivi, F. Analytical metabolomics-based approaches to pancreatic cancer. *Trends Anal. Chem.* **2014**, *55*, 94–116.
- [198] Chen, W.; Zu, Y.; Huang, Q.; Chen, F.; Wang, G.; Lan, W.; Bai, C.; Lu, S.; Yue, Y.; Deng, F. Study on metabonomic characteristics of human lung cancer using high resolution magic-angle spinning ^1H NMR spectroscopy and multivariate data analysis. *Magn. Reson. Med.* **2011**, *66*, 1531–1540.
- [199] Swindle, P.; Ramadan, S.; Stanwell, P.; McCredie, S.; Russell, P.; Mountford, C. Proton magnetic resonance spectroscopy of the central, transition and peripheral zones of the prostate: assignments and correlation with histopathology. *Magn. Reson. Mater. Phys.* **2008**, *21*, 423–434.
- [200] Sitter, B.; Lundgren, S.; Bathen, T. F.; Halgunset, J.; Fjosne, H. E.; Gribbestad, I. S. Comparison of HR MAS MR spectroscopic profiles of breast cancer tissue with clinical parameters. *NMR Biomed.* **2006**, *19*, 30–40.
- [201] Piotta, M.; Moussallieh, F.-M.; Imperiale, A.; Benahmed, M. A.; Detour, J.; Bellocq, J.-P.; Namer, I.-J.; Elbayed, K. Reproducible sample preparation and spectrum acquisition techniques for metabolic profiling of human tissues by ^1H HRMAS NMR. In *Methodologies in metabolomics. Experimental strategies and techniques for metabolomics research*; Lutz, N. W., Sweedler, J. V., Wevers, R. A., Ed.; Cambridge University Press, 2013; pp 496–524.
- [202] Debeuckelaere, C. Synthèse d'allergènes marqués au carbone 13 et étude par RMN HRMAS de leurs interactions avec des épidermes reconstruits. Thèse de Doctorat, Université de Strasbourg, 2012.
- [203] Gerberick, G. F.; Ryan, C. A.; Kern, P. S.; Schlatter, H.; Dearman, R. J.; Kimber, I.; Patlewicz, G. Y.; Basketter, D. A. Compilation of historical local lymph node data for evaluation of skin sensitization alternative methods. *Dermatitis* **2005**, *16*, 157–202.
- [204] Schomburg, I.; Chang, A.; Schomburg, D. BRENDA, enzyme data and metabolic information. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 47–49.
- [205] Thompson, D. C.; Thompson, J. A.; Sugumaran, M.; Moldéus, P. Biological and toxicological consequences of quinone methide formation. *Chem.-Biol. Interactions* **1992**, *86*, 129–162.
- [206] Bolton, J. L.; Valerio, L. G.; Thompson, J. A. The enzymic formation and chemical reactivity of quinone methides correlate with alkylphenol-induced toxicity in rat hepatocytes. *Chem. Res. Toxicol.* **1992**, *5*, 816–822.
- [207] Thompson, D. C.; Perera, K.; London, R. Quinone methide formation from *para* isomers of methylphenol (cresol), ethylphenol, and isopropylphenol: relationship to toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **1995**, *8*, 55–60.
- [208] Monks, T. J.; Hanzlik, R. P.; Cohen, G. M.; Ross, D.; Graham, D. G. Quinone chemistry and toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1992**, *112*, 2–16.
- [209] Koymans, L.; Donné-Op Den Kelder, G. M.; Te Koppele, J. M.; Vermeulen, N. P. E. Generalized cytochrome P450-mediated oxidation and oxygenation reactions in aromatic substrates with activated N-H, O-H, C-H, or S-H substituents. *Xenobiotica* **1993**, *23*, 633–648.

- [210] Merckel, F.; Giménez-Arnau, E.; Gerberick, G. F.; Lepoittevin, J.-P. *In chemico* evaluation of prohaptens skin sensitizers: behavior of 2-methoxy-4-(¹³C)methylphenol in the peroxidase peptide reactivity assay (PPRA) as an alternative to animal testing. *Toxicol. Lett.* **2013**, *218*, 266–272.
- [211] Anzenbacher, P.; Anzenbacherova, E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 737–747.
- [212] Guengerich, F. P.; MacDonald, T. L. Chemical mechanisms of catalysis by cytochromes P-450: a unified view. *Acc. Chem. Res.* **1984**, *17*, 9–16.
- [213] Meunier, B.; de Visser, S. P.; Shaik, S. Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3947–3980.
- [214] Guengerich, F. P. Mechanisms of cytochrome P450 substrate oxidation: minireview. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2007**, *21*, 163–168.
- [215] Peter Guengerich, F. Enzymatic oxidation of xenobiotic chemical. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1990**, *25*, 97–153.
- [216] Brown, C. M.; Reisfeld, B.; Mayeno, A. N. Cytochromes P450: a structure-based summary of biotransformations using representative substrates. *Drug Metab. Rev.* **2008**, *40*, 1–100.
- [217] Eicken, C.; Krebs, B.; Sacchettini, J. C. Catechol oxidase-structure and activity. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 677–683.
- [218] Salder, A.; Subrahmanyam, V. V.; Ross, D. Oxidation of catechol by horseradish peroxidase and human leukocyte peroxidase : reactions of *o*-benzoquinone and *o*-benzosemiquinone. *Toxicol. Appl. Pharma.* **1998**, *93*, 62–71.
- [219] Lepoittevin, J.-P.; Benezra, C. Allergic contact dermatitis caused by naturally occurring quinones. *Pharm. Weekbl.* **1991**, *13*, 119–122.
- [220] Bolton, J. L.; Trush, M. A.; Penning, T. M.; Dryhurst, G.; Monks, T. J. Role of quinones in toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, *13*, 135–160.
- [221] Piotto, M.; Saudek, V.; Sklenář, V. Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 661–665.
- [222] Bittner, S. When quinones meet amino acids: chemical, physical and biological consequences. *Amino Acids* **2006**, *30*, 205–224.
- [223] Yan, Z.; Zhong, H. M.; Maher, N.; Torres, R.; Leo, G. C.; Caldwell, G. W.; Huebert, N. Bioactivation of 4-methylphenol (*p*-cresol) via cytochromes P450-mediated aromatic oxidation in human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* **2005**, *33*, 1867–1876.
- [224] Mason, S. H.; Schwartz, L.; Peterson, D. C. The allergic principles of poison ivy. IV. On the mechanism of the enzymatic oxidation of catechols. *J. Am. Chem. Soc.* **1945**, *67*, 1233.
- [225] Moridani, M. Y.; Scobie, H.; O'Brien, P. J. Metabolism of caffeic acid by isolated rat hepatocytes and subcellular fractions. *Toxicol. Lett.* **2002**, *133*, 141–151.
- [226] Bolton, J. L.; Acay, N. M.; Vukomanovic, V. Evidence that 4-allyl-*o*-quinones spontaneously rearrange to their more electrophilic quinone methides: potential bioactivation mechanism for the hepatocarcinogen safrole. *Chem. Res. Toxicol.* **1994**, *7*, 443–450.
- [227] Zhao, S. X.; Dalvie, D. K.; Kelly, J. M.; Soglia, J. R.; Frederick, K. S.; Smith, E. B.; Obach, R. S.; Kalgutkar, A. S. NADPH-dependent covalent binding of [³H]paroxetine to human liver microsomes and S-9

- fractions: identification of an electrophilic quinone metabolite of paroxetine. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20*, 1649–1657.
- [228] Erve, J. C. L.; Svensson, M. A.; von Euler-Chelpin, H.; Klasson-Wehler, E. Characterization of glutathione conjugates of the remoxipride hydroquinone metabolite NCQ-344 formed in vitro and detection following oxidation by human neutrophils. *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, *17*, 564–571.
- [229] Zhuo, X.; Zheng, N.; Felix, C. A.; Blair, I. A. Kinetics and regulation of cytochrome P450-mediated etoposide metabolism. *Drug Metab. Dispos.* **2004**, *32*, 993–1000.
- [230] Fukuto, J. M.; Kumagai, Y.; Cho, A. K. Determination of the mechanism of demethylenation of (methylenedioxy)phenyl compounds by cytochrome P450 using deuterium isotope effects. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2871–2876.
- [231] Verhagen, H.; Schilderman, P. A. E. L.; Kleinjans, J. C. S. Butylated hydroxyanisole in perspective. *Chem.-Biol. Interactions* **1991**, *80*, 109–134.
- [232] Rizzi, G. P. Formation of Strecker aldehydes from polyphenol-derived quinones and α -amino acids in a nonenzymic model system. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 1893–1897.
- [233] Yamada, K.; Inoue, T.; Akiba, Y.; Kashiwada, A.; Matsuda, K.; Hirata, M. Removal of *p*-alkylphenols from aqueous solutions by combined use of mushroom tyrosinase and chitosan beads. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2006**, *70*, 2467–2475.
- [234] Danilewicz, J. C. Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: central role of iron and copper. *Am. J. Enol. Vitic.* **2003**, *54*, 73–85.
- [235] Nikolantonaki, M.; Waterhouse, A. L. A method to quantify quinone reaction rates with wine relevant nucleophiles: a key to the understanding of oxidative loss of varietal thiols. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 8484–8491.
- [236] Khasnis, D.; Abul-Hajj, Y. J. Estrogen quinones: reaction with propylamine. *Chem. Res. Toxicol.* **1994**, *7*, 68–72.
- [237] Tabakovic, K.; Abul-Hajj, Y. J. Reaction of lysine with estrone 3,4-*o*-quinone. *Chem. Res. Toxicol.* **1994**, *7*, 696–701.
- [238] Schweigert, N.; Zehnder, A. J.; Eggen, R. I. L. Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. *Environ. Microbiol.* **2001**, *3*, 81–91.
- [239] Stone, C. G.; Cardosi, M. F.; Davis, J. A mechanistic evaluation of the amperometric response of reduced thiols in quinone mediated systems. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *491*, 203–210.
- [240] Liberato, D. J.; Byers, V. S.; Dennick, R. G.; Castagnoli Jr, N. Regiospecific attack of nitrogen and sulfur nucleophiles on quinones derived from poison oak/ivy catechols (urushiols) and analogs as models for urushiol-protein conjugate formation. *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 28–33.
- [241] Pearson, R. G. Hard and soft acids and bases. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3533–3539.
- [242] Alvarez-Sánchez, R.; Basketter, D.; Pease, C.; Lepoittevin, J.-P. Covalent binding of the ¹³C-labeled skin sensitizers 5-chloro-2-methylisothiazol-3-one (MCI) and 2-methylisothiazol-3-one (MI) to a model peptide and glutathione. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 365–368.
- [243] Eilstein, J. Etudes de la réactivité de dérivés d'oxydation de la 2,5-diméthyl-*para*-phénylènediamine vis-à-vis d'acides aminés nucléophiles. Thèse de Doctorat, Université Louis Pasteur (Strasbourg), 2006.

- [244] Swiderek, K.; Paneth, P. Binding isotope effects. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 7851–7879.
- [245] Tonami, H.; Uyama, H.; Kobayashi, S.; Kubota, M. Peroxidase-catalyzed oxidative polymerization of *m*-substituted phenol derivatives. *Macromol. Chem. Phys.* **1999**, *200*, 2365–2371.
- [246] Sahoo, S. K.; Liu, W.; Samuelson, L. A.; Kumar, J.; Cholli, A. L. Biocatalytic polymerization of *p*-cresol: an in-situ NMR approach to understand the coupling mechanism. *Macromolecules* **2002**, *35*, 9990–9998.
- [247] Grossi, L. Evidence of an electron-transfer mechanism in the peroxynitrite-mediated oxidation of 4-alkylphenols and tyrosine. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 6349–6353.
- [248] Bouhlef, C.; Dolhem, G.A.; Fernandez, X.; Antoniotti, S. Model study of the enzymatic modification of natural extracts: peroxidase-based removal of eugenol from rose essential oil. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 1052–1058.
- [249] Institut National de Recherche et de Sécurité. Fiche toxicologique (FT 7) : aldéhyde formique et solution aqueuses (mise à jour 2011).
- [250] De Groot, A. C.; White, I. R.; Flyvholm, M.-A.; Lensen, G.; Coenraads, P.-J. Formaldehyde-releasers in cosmetics: relationship to formaldehyde contact allergy. *Contact Dermatitis* **2010**, *62*, 2–17.
- [251] Latorre, N.; Silvestre, J. F.; Monteagudo, A. F. Allergic contact dermatitis caused by formaldehyde and formaldehyde releasers. *Actas Dermosifiliorg.* **2011**, *120*, 86–97.
- [252] Teng, S.; Beard, K.; Pourahmad, J.; Moridani, M.; Easson, E.; Poon, R.; O'Brien, P. J. The formaldehyde metabolic detoxification enzyme systems and molecular cytotoxic mechanism in isolated rat hepatocytes. *Chem.-Biol. Interact.* **2001**, *130*, 285–296.
- [253] MacAllister, S. L.; Choi, J.; Dedina, L.; O'Brien, P. J. Metabolic mechanisms of methanol/formaldehyde in isolated rat hepatocytes: carbonyl-metabolizing enzymes versus oxidative stress. *Chem.-Biol. Interact.* **2011**, *191*, 308–314.
- [254] Metz, B.; Kersten, G. F. A.; Hoogerhout, P.; Brugghe, H. F.; Timmermans, H. A. M.; de Jong, A.; Meiring, H.; ten Hove, J.; Hennink, W. E.; Crommelin, D. J. A.; Jiskoot, W. Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with model peptides. *J. Biol. Chem.* **2003**, *279*, 6235–6243.
- [255] World Health Organization Regional Office for Europe Copenhagen. Formaldehyde. In Air Quality Guidelines-Second Edition; WHO Regional Publications, European Series, No. 91, 2001; pp 87–91.
- [256] U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for formaldehyde, 1999, 421 pages.
- [257] Liesivuori, J.; Savolainen, H. Methanol and formic acid toxicity: biochemical mechanisms. *Pharmacol. Toxicol.* **1991**, *69*, 157–163.
- [258] Kireche, M. Développement de méthodes alternatives : synthèse et études de réactivité de conservateurs libérateurs de formaldehyde impliqués dans l'allergie de contact. Thèse de Doctorat, Université Louis Pasteur (Strasbourg), 2009.
- [259] Hopkinson, R. J.; Barlow, P. S.; Schofield, C. J.; Claridge, T. D. W. Studies on the reaction of glutathione and formaldehyde using NMR. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 4915–4920.
- [260] Dennis, J. Reactions of aldehydes with unsaturated fatty acids during histological fixation. *Histochem. J.* **1972**, *4*, 421–465.

- [261] Markowitz, K.; Moynihan, M.; Liu, M.; Kim, S. Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol. *Oral Surg. Oral Med. O.* **1992**, *73*, 729–737.
- [262] Salim, A.; Shaw, S. Recommendation to include ester gum resin when patch testing patients with leg ulcers. *Contact Dermatitis* **2001**, *44*, 34–60.
- [263] Thompson, D.; Norbeck, K.; Olsson, L.-I.; Constantin-Teodosiu, D.; Van der Zee, J.; Moldeus, P. Peroxidase-catalyzed oxidation of eugenol : formation of a cytotoxic metabolite(s). *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 1016–1021.
- [264] Zanolotti, A. Synthesis and reactivity of vinyl quinone methides. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 941–945.
- [265] Merckel, F. Détection et évaluation « in chemico » des allergènes de contact : intérêt des microémulsions pour la mesure de la réactivité peptidique et l'activation enzymatique des pro-haptènes. Thèse de Doctorat, Université de Strasbourg, 2011.
- [266] Bolton, J. L.; Comeau, E.; Vukomanovic, V. The influence of 4-alkyl substituents on the formation and reactivity of 2-methoxy-quinone methides: evidence that extended Π -conjugation dramatically stabilizes the quinone methide formed from eugenol. *Chem.-Biol. Interact.* **1995**, *95*, 279–290.
- [267] Barratt, M. D.; Basketter, D. A. Possible origin of the skin sensitization potential of isoeugenol and related compounds. *Contact Dermatitis* **1992**, *27*, 98–104.
- [268] Bertrand, F.; Basketter, D. A.; Roberts, D. W.; Lepoittevin, J.-P. Skin sensitization to eugenol and isoeugenol in mice: possible metabolic pathways involving *ortho*-quinone and quinone methide intermediates. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 335–343.
- [269] Kamal, A.; Laxman, E.; Rao, N. V. A mild and rapid regeneration of alcohols from their allylic ethers by chlorotrimethylsilane/sodium iodide. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 371–372.
- [270] Whitby, G. S.; Katz, M. Studies of polymers and polymerization: III. The polymerization of eugenol, safrole and the corresponding iso-compounds. *Can. J. Res.* **1931**, *4*, 487–494.
- [271] Bortolomeazzi, R.; Verardo, G.; Liessi, A.; Callea, A. Formation of dehydrodiisoeugenol and dehydrodieugenol from the reaction of isoeugenol and eugenol with DPPH radical and their role in the radical scavenging activity. *Food Chem.* **2010**, *118*, 256–265.
- [272] Takeyoshi, M.; Noda, S.; Yamazaki, S.; Kakishima, H.; Yamasaki, K.; Kimber, I. Assessment of the skin sensitization potency of eugenol and its dimers using a non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J. Appl. Toxicol.* **2004**, *24*, 77–81.
- [273] Scholes, E. W.; Pendlington, R. U.; Sharma, R. K.; Basketter, D. A. Skin metabolism of contact allergens. *Toxic. in Vitro* **1994**, *8*, 551–553.
- [274] Basketter, D. A.; Pendlington, R. U.; Sarll, A.; Scholes, E. The role of P450-1A in the activation of prohaptens in skin sensitization. *J. Invest. Dermatol.* **1996**, *106*, 935.
- [275] Iverson, S. L.; Hu, L. Q.; Vukomanovic, V.; Bolton, J. L. The influence of the *p*-alkyl substituent on the isomerization of *o*-quinones to *p*-quinone methides: potential bioactivation mechanism for catechols. *Chem. Res. Toxicol.* **1995**, *8*, 537–544.
- [276] Guha, S. N.; Indira Priyadarsini, K. Kinetic and redox characteristics of phenoxyl radicals of eugenol and isoeugenol: a pulse radiolysis study. *Int. J. Chem. Kinet.* **2000**, *32*, 17–23.
- [277] Hepperle, S. S.; Li, Q.; East, A. L. L. Mechanism of cis/trans equilibration of alkenes via iodine catalysis. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 10975–10981.

- [278] Takeyoshi, M.; Iida, K.; Suzuki, K.; Yamazaki, S. Skin sensitization potency of isoeugenol and its dimers evaluated by a non-radioisotopic modification of the local lymph node assay and guinea pig maximization test. *J. Appl. Toxicol.* **2008**, *28*, 530–534.
- [279] Brunton, L.; Parker, K.; Blumenthal, D.; Buxton, I. Goodman and Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics. Portable guidance from the world's most trusted textbook of pharmacology; McGraw-Hill Education, 2007.
- [280] Sulzberger, M. B.; Witten, V. H. The effect of topically applied compound F in selected dermatoses. *J. Invest. Dermatol.* **1952**, *19*, 101–102.
- [281] Murray, J. The history of corticosteroids. *Acta Derm.-Venereol. Suppl.* **1989**, *151*, 4–6.
- [282] Sterry, W. Therapy with topical corticosteroids. *Arch. Dermatol. Res.* **1992**, *284*, S27–S29.
- [283] Baeck, M.; Marot, L.; Nicolas, J.-F.; Pilette, C.; Tennstedt, D.; Goossens, A. Allergic hypersensitivity to topical and systemic corticosteroids: a review. *Allergy* **2009**, *64*, 978–994.
- [284] Centre Belge d'Information Pharmacothérapeutique. www.cbip.be.
- [285] Hengge, U. R.; Ruzicka, T.; Schwartz, R. A.; Cork, M. J. Adverse effects of topical glucocorticosteroids. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2006**, *54*, 1–15.
- [286] Schäcke, H.; Döcke, W.-D.; Asadullah, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol. Ther.* **2002**, *96*, 23–43.
- [287] Kooij, R. Hypersensitivity to hydrocortisone. *Brit. J. Dermatol.* **1959**, *71*, 392–394.
- [288] Wilkinson, S. M. Hypersensitivity to topical corticosteroids. *Clin. Exp. Dermatol.* **1994**, *19*, 1–11.
- [289] Matura, M.; Goossens, A. Contact allergy to corticosteroids. *Allergy* **2000**, *55*, 698–704.
- [290] Doms-Goossens, A.; Degreef, H. Clinical aspect of contact allergy to corticosteroids. *Dermatology* **1994**, *189*, 54–55.
- [291] Raison-Peyron, N. Profil clinique des réactions aux corticoïdes. *Rev. Fr. Allergol.* **2013**, *53*, 288–291.
- [292] American Contact Dermatitis Society. www.contactderm.org.
- [293] Doms-Goossens, A.; Verschaeve, H.; Degreffe, H.; van Berendoncks, J. Contact allergy to hydrocortisone and thixocortol pivalate: problems in the detection of corticosteroid sensitivity. *Contact Dermatitis* **1986**, *14*, 94–102.
- [294] Coopman, S.; Degreffe, H.; Doms-Goossens, A. Identification of cross-reaction patterns in allergic contact dermatitis from topical corticosteroids. *Br. J. Dermatol.* **1989**, *121*, 27–34.
- [295] Isaksson, M.; Bruze, M.; Lepoittevin, J.-P.; Goossens, A. Patch testing with serial dilutions of budesonide, its R and S diastereomers, and potentially cross-reacting substances. *Am. J. Contact Dermatitis* **2001**, *12*, 170–176.
- [296] Lepoittevin, J.-P.; Drieghe, J.; Doms-Goossens, A. Studies in patients with corticosteroid contact allergy understanding cross-reactivity among different steroids. *Arch. Dermatol.* **1995**, *131*, 31–37.
- [297] Goossens, A.; Matura, M.; Degreffe, H. Reactions to corticosteroids: some new aspects regarding cross-sensitivity. *Cutis* **2000**, *65*, 43–48.
- [298] Jacob, S. E.; Steele, T. Corticosteroid classes: a quick reference guide including patch test substances and cross-reactivity. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2006**, *54*, 723–727.
- [299] Baeck, M.; Goossens, A.; Systemic contact dermatitis to corticosteroids. *Allergy* **2012**, *67*, 1580–1585.

- [300] Wilkinson, S. M. Corticosteroid cross-reactions: an alternative view. *Contact Dermatitis* **2000**, *42*, 59-63.
- [301] Zakhari, S. Overview: how is alcohol metabolized by the body? *Alcohol Res. Health* **2006**, *29*, 245-254.
- [302] Cheung, C.; Smith, C. K.; Hoog, J.-O.; Hotchkiss, S. A. M. Expression and localization of human alcohol and aldehyde dehydrogenase enzymes in skin. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **1999**, *261*, 100-107.
- [303] Boehnlein, J.; Sakr, A.; Lichtin, L.; Bronaugh, R. L. Characterization of esterase and alcohol dehydrogenase activity in skin. Metabolism of retinyl palmitate to retinol (vitamin A) during percutaneous absorption. *Pharm. Res.* **1994**, *11*, 1155-1159.
- [304] Krishna, D. R.; Klotz, U. Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clin. Pharmacokinet.* **1994**, *26*, 144-160.
- [305] Oppermann, U. C. T.; Maser, E. Molecular and structural aspects of xenobiotic carbonyl metabolizing enzymes. Role of reductases and dehydrogenases in xenobiotic phase I reactions. *Toxicology* **2000**, *144*, 71-81.
- [306] Lieber, C. S. Metabolism of alcohol. *Clin. Liver Dis.* **2005**, *9*, 1-35.
- [307] Arbez-Gindre, C. Synthèse de métabolites cutanés de corticostéroïdes allergisants marqués au carbone 13. Etude de leurs interactions avec les protéines. Thèse de Doctorat, Université Louis Pasteur (Strasbourg) 1997.
- [308] Baeck, M.; Chemelle, J.-A.; Rasse, C.; Terreux, R.; Goossens, A. C₁₆-methyl corticosteroids are far less allergenic than the non-methylated molecules. *Contact Dermatitis* **2011**, *64*, 305-312.
- [309] Debeuckelaere, C.; Claudel, E.; Berl, V.; Lepoittevin, J.-P. Allergic contact dermatitis to corticosteroids: group A vs. groupe C, a mechanistic study. *Contact Dermatitis* **2010**, *63* (suppl. 1), 14.
- [310] Claudel, E. Allergie de contact aux corticostéroïdes. Synthèse de métabolites marqués au carbone 13 et étude par RMN de leurs interactions avec les protéines. Thèse de Doctorat, Université Louis Pasteur (Strasbourg), 2008.
- [311] Claudel, E.; Arbez-Gindre, C.; Berl, V.; Lepoittevin, J.-P. An efficient hemisynthesis of 20- and 21-[¹³C]-labeled cortisone: a model for the study of skin sensitization to corticosteroids. *Synthesis* **2009**, *20*, 3391-3398.
- [312] Arbez-Gindre, C.; Berl, V.; Lepoittevin, J.-P. Methyl exchange on silicon during the addition of methylmagnesium iodide to a cyanohydrin O-silyl ether. *Chem. Commun.* **1999**, 431-432.
- [313] Tatar, J.; Marković, R.; Stojanović, M.; Baranac-Stojanović, M. Bromophilic substitution/carbophilic substitution cascade reactions of α,α -dibromo-2-methoxyacetophenone with C-, N- and O-nucleophiles. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 4851-4855.
- [314] Arbez-Gindre, C.; Berl, V.; Lepoittevin, J.-P. Air oxidation of 17-hydroxycorticosteroids catalyzed by cupric acetate: formation of hemiacetal dimers. *Steroids* **2003**, *68*, 361-365.
- [315] Seukeran, D. C.; Wilkinson, S. M.; Beck, M. H. Patch testing to detect corticosteroid allergy: is it adequate? *Contact Dermatitis* **1997**, *36*, 127-130.
- [316] Urbaniak-Domagala, W. The use of the spectrometric technique FTIR-ATR to examine the polymers surface. In *Advanced aspects of spectroscopy*; Akhyar Farrukh, M., Ed.; InTech, 2012; pp 221-246.

- [317] Kasal, A.; Budesinsky, M.; Griffiths, W. J. Spectroscopic methods of steroid analysis. In *Steroid Analysis*; Makin, H. L. J., Gower, D. B., Ed.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2010; pp 27–161.
- [318] Hüber, W.; Mantsch, H. H. Orientation of specifically $^{13}\text{C}=\text{O}$ labeled phosphatidylcholine multilayers from polarized attenuated total reflection FT-IR spectroscopy. *Biophys. J.* **1991**, *59*, 1261–1272.
- [319] Scheuplein, R. J. Permeability of the skin. In *Handbook of physiology, reactions to environmental agents*; Lee, D. H. K., Falk, H. L., Murphy, S. D., Geiger, S. R., Ed.; Baltimore, Waverly Press, 1977; pp 299–322.
- [320] Barry, B. W. Mode of action of penetration enhancers in human skin. *J. Controlled Release* **1987**, *6*, 85–97.
- [321] Williams, A. C.; Barry, B. W. Penetration enhancers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 128–137.
- [322] Maibach, H. I.; Feldmann, R. J. The effect of DMSO on percutaneous penetration of hydrocortisone and testosterone in man. *Ann. NY. Acad. Sci.* **1967**, *141*, 423–427.
- [323] Doooms-Goossens, A.; Morren, M. Results of routine patch testing with corticosteroid series in 2073 patients. *Contact Dermatitis* **1992**, *26*, 182–191.
- [324] Lauerma, A. I.; Tarvainen, K.; Forström, L.; Reitamo, S. Contact hypersensitivity to hydrocortisone-free-alcohol in patients with allergic patch test reactions to toxicortol pivalate. *Contact Dermatitis* **1993**, *28*, 10–14.
- [325] Gibbs, S.; Corsini, E.; Spiekstra, S. W.; Galbiati, V.; Fuchs, H. W.; DeGeorge, G.; Troese, M.; Hayden, P.; Deng, W.; Roggen, E. An epidermal equivalent assay for identification and ranking potency of contact sensitizers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2013**, *272*, 529–541.
- [326] Lelièvre, D.; Justine, P.; Christiaens, F.; Bonaventure, N.; Coutet, J.; Marrot, L.; Cotovio, J. The episkin phototoxicity assay (EPA): development of an *in vitro* tiered strategy using 17 reference chemicals to predict phototoxic potency. *Toxicol. in Vitro* **2007**, *21*, 977–995.
- [327] Hu, T.; Bailey, R. E.; Morrall, S. W.; Aardema, M. J.; Stanley, L. A.; Skare, J. A. Dermal penetration and metabolism of *p*-aminophenol and *p*-phenylenediamine: application of the EpiDerm™ human reconstructed epidermis model. *Toxicol. Lett.* **2009**, *188*, 119–129.
- [328] Curren, R. D.; Mun, G.; Gibson, D. P.; Aardema, M. J. Development of a novel micronucleus assay in the human 3-D skin model, EpiDerm™. In 44th Annual Meeting of the Society of Toxicology New Orleans, Louisiana; 2005.
- [329] Scheuplein, R.; Ross, L. Effects of surfactants and solvents on the permeability of epidermis. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **1970**, *21*, 853–873.
- [330] Moser, K.; Kriwet, K.; Naik, A.; Kalia, Y. N.; Guy, R. H. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2001**, *52*, 103–112.
- [331] Wilkinson, S. M.; Beck, M. H. Corticosteroid contact hypersensitivity: what vehicle and concentration? *Contact Dermatitis* **1996**, *34*, 305–308.
- [332] Zemmouche, S.; Barbaud, A. Démarche pharmaceutique pour la réalisation de préparations pour tests allergologiques: expérience de la pharmacie des hôpitaux Maringer-Villemin-Fournier du CHU de Nancy. *J. Pharm. Clin.* **2004**, *23*, 157–168.
- [333] Debeuckelaere, C. Rapport de Stage Master II, Université de Strasbourg, 2009.

- [334] Horigushi, Y.; Nakamura, E.; Kuwajima, I. Double hydroxylation reaction for construction of the corticoid side chain: 16 α -methylcortexolone. *Org. Synth.* **1996**, *73*, 123-129.
- [335] Duus Johansen, J. Contact allergy to fragrances: clinical and experimental investigations of the fragrance mix and its ingredients; Blackwell Munksgaard: Copenhagen, 2002.
- [336] Uter, W.; Schmidt, E.; Geier, J.; Lessmann, H.; Schnuch, A.; Frosch, P. Contact allergy to essential oils: current patch test results (2000–2008) from the information network of departments of dermatology (IVDK). *Contact Dermatitis* **2010**, *63*, 277–283.
- [337] Rastogi, S. C.; Johansen, J. D. Significant exposures to isoeugenol derivatives in perfumes. *Contact Dermatitis* **2008**, *58*, 278–281.
- [338] White, I. R.; Johansen, J. D.; Giménez-Arnau, E. G.; Lepoittevin, J.-P.; Rastogi, S.; Bruze, M.; Andersen, K. E.; Frosch, P. J.; Goossens, A.; Menné, T. Isoeugenol is an important contact allergen: can it be safely replaced with isoeugenyl acetate? *Contact Dermatitis* **1999**, *41*, 272–275.
- [339] Tanaka, S.; Royds, C.; Buckley, D.; Basketter, D. A.; Goossens, A.; Bruze, M.; Svedman, C.; Menné, T.; Johansen, J. D.; White, I. R.; McFadden, J. P. Contact allergy to isoeugenol and its derivatives: problems with allergen substitution. *Contact Dermatitis* **2004**, *51*, 288–291.
- [340] Smith, C. K.; Hotchkiss, S. A. M. Allergic contact dermatitis: chemical and metabolic mechanisms; Taylor & Francis: London; New York, 2001.
- [341] Castro, D. J.; Sweet, C. J.; Kuester, R. K.; Sipes. Hydrolysis of isoeugenyl-acetate and eugenyl-acetate by rat and human hepatic microsomes. Society of Toxicology 43rd Annual Meeting Baltimore, Maryland. The Toxicologist; 2004, Vol. 78 (supp.), Number S-1, 1446.
- [342] Cashman, J. R.; Perotti, B. Y. T.; Berkman, C. E.; Lin, J. Pharmacokinetics and molecular detoxication. *Environ. Health Persp.* **1996**, *104*, 23–40.
- [343] McCracken, N. W.; Blain, P. G.; Williams, F. M. Human xenobiotic metabolizing esterases in liver and blood. *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *46*, 1125–1129.
- [344] Satoh, T.; Hosokawa, M. The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1998**, *38*, 257–288.
- [345] Stoops, J. K.; Horgan, D. J.; Runnegar, M. T. C.; De Jersey, J.; Webb, E. C.; Zerner, B. Carboxylesterases (EC 3.1.1). Kinetic studies on carboxylesterases. *Biochemistry* **1969**, *8*, 2026–2033.
- [346] Redinbo, M. R.; Potter, P. M. Keynote review: mammalian carboxylesterases: from drug targets to protein therapeutics. *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 313–325.
- [347] University of Wisconsin, department of chemistry. www.chem.wisc.edu.
- [348] Jewell, C.; Ackermann, C.; Payne, N. A.; Fate, G.; Voorman, R.; Williams, F. M. Specificity of procaine and ester hydrolysis by human, minipig, and rat skin and liver. *Drug Metab. Dispos.* **2007**, *35*, 2015-2022.
- [349] Frosch, P. J.; Pirker, C.; Rastogi, S. C.; Andersen, K. E.; Bruze, M.; Svedman, C.; Goossens, A.; White, I. R.; Uter, W.; Giménez Arnau, E.; Lepoittevin, J.-P.; Menné, T.; Duus Johansen, J. Patch testing with a new fragrance mix detects additional patients sensitive to perfumes and missed by the current fragrance mix. *Contact Dermatitis* **2005**, *52*, 207–215.
- [350] Doorn, J. A.; Petersen, D. R. 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*, 1445–1450.

- [351] Sharma, A. M.; Klarskov, K.; Uetrecht, J. Nevirapine bioactivation and covalent binding in the skin. *Chem. Res. Toxicol.* **2013**, *26*, 410–421.
- [352] Meng, X.; Howarth, A.; Earnshaw, C. J.; Jenkins, R. E.; French, N. S.; Back, D. J.; Naisbitt, D. J.; Park, B. K. Detection of drug bioactivation in vivo: mechanism of nevirapine–albumin conjugate formation in patients. *Chem. Res. Toxicol.* **2013**, *26*, 575–583.
- [353] Silberberg, I.; Baer, R. L.; Rosenthal, S. A. The role of Langerhans cells in allergic contact hypersensitivity. A review of findings in man and guinea pigs. *J. Invest. Dermatol.* **1976**, *66*, 210–217.
- [354] Coquette, A.; Berna, N.; Vandenbosch, A.; Rosdy, M.; De Wever, B.; Poumay, Y. Analysis of interleukin-1 α (IL-1 α) and interleukin-8 (IL-8) expression and release in in vitro reconstructed human epidermis for the prediction of in vivo skin irritation and/or sensitization. *Toxicol. in Vitro* **2003**, *17*, 311–321.
- [355] Basketter, D. A.; Griffiths, H. A.; Wang, X. M.; Wilhelm, K. P.; McFadden, J. Individual, ethnic and seasonal variability in irritant susceptibility of skin: the implications for a predictive human patch test. *Contact Dermatitis* **1996**, *35*, 208–213.
- [356] Armarego, W. L. F.; Chai, C. Purification of laboratory chemicals; 7th Edition; Butterworth-Heinemann: Amsterdam: London, 2012.
- [357] Suffert, J. Simple direct titration of organolithium reagents using *N*-pivaloyl-*o*-Toluidine and/or *N*-pivaloyl-*o*-benzylaniline. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 509–510.
- [358] SkinEthic® - FAQ / The use of our models. www.skinethic.com
- [359] Piotto, M.; Elbayed, K.; Wieruszeski, J.-M.; Lippens, G. Practical aspects of shimless a high resolution magic angle spinning probe. *J. Magn. Reson.* **2005**, *173*, 84–89

Etude *in situ* par RMN HRMAS sur des épidermes reconstruits du métabolisme et de la réactivité de xénobiotiques allergisants

Résumé

L'allergie de contact est une pathologie de la peau particulièrement répandue dans les pays industrialisés. Aucune thérapie ne permet actuellement de la soigner et seule l'éviction de l'allergène permet de la prévenir. Historiquement, l'évaluation du potentiel sensibilisant des molécules mises sur le marché a toujours été réalisée au moyen de tests sur l'animal. Cependant, le champ d'action de ces tests est aujourd'hui limité en raison de la nouvelle législation européenne sur les cosmétiques. Dans ce contexte, le développement de méthodes alternatives ne reposant pas sur l'utilisation d'animaux devient capital.

L'allergie de contact repose sur une étape chimique clé : la formation d'un complexe antigénique allergène-protéine capable d'activer le système immunitaire cutané. Le but de ce travail de thèse a été d'étudier le comportement *in situ* d'allergènes au sein d'épidermes reconstruits de type SkinEthic®. A l'aide d'une technique d'analyse non invasive, la spectroscopie RMN HRMAS, il a été possible de suivre le devenir de différents allergènes, de leur éventuelle activation par voie métabolique, jusqu'à leur fixation sur les protéines épidermiques.

Mots clés : allergie de contact, allergène, méthode alternative, adduit haptène-protéine, métabolisme, épiderme humain reconstruit, RMN HRMAS

Résumé en anglais

Contact dermatitis is a skin pathology particularly prevalent in industrialized countries. No therapy currently exists and only complete avoidance of the particular allergen can prevent an allergic reaction. Historically, the assessment of skin sensitisation potential of molecules placed on the market was always carried out by animal testing. However, the scope of this testing method is now limited by the new European cosmetics legislation. In this way, the development of alternative methods, not based on animal experimentation, become an important issue.

Contact dermatitis results of a chemical key step: the formation of an antigenic complex allergen-protein complexe able to activate the cutaneous immune system. The aim of this PhD work was to study the *in situ* behaviour of allergens in reconstructed human epidermis (SkinEthic® model). By using an appropriate non-invasive analysis technique, HR-MAS NMR spectroscopy, it has been possible to study the mode of action of different allergens, from their possible activation through the metabolic pathway to the binding with epidermal proteins.

Key words: contact dermatitis, allergen, alternative method, hapten-protein adduct, metabolism, reconstructed human epidermis, HR-MAS NMR