

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

UMR 7177

THÈSE présentée par

Fatma SAHLI

Soutenue le : 17 septembre 2019

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

Discipline/ Spécialité : Chimie organique

**Les allergènes cutanés réagissant au
travers de processus radicalaires : de la
molécule au tissu**

THÈSE dirigée par :

Mme GIMÉNEZ-ARNAU Elena

Chargée de recherche CNRS-Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme NARDELLO-RATAJ Véronique

Professeur, Université Lille 1

Mme TUCCIO-LAURICELLA Béatrice

Maître de conférences, Université Aix-Marseille

EXAMINATEUR :

Mme GROSDÉMANGE-BILLIARD Catherine

Professeur, Université de Strasbourg

MEMBRES INVITÉS :

M LEPOITTEVIN Jean-Pierre

Professeur, Université de Strasbourg

M VILENO Bertrand

Chargé de recherche CNRS-Université de Strasbourg

*À ma mère et mon père,
qui ont fait de moi la personne que je suis.*

À mes sœurs, les meilleures.

À mon frère, Ali, le petit.

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit a été réalisé au laboratoire de Dermatochimie de l'Université de Strasbourg, dirigé par le Professeur Jean-Pierre Lepoittevin, sous l'encadrement du Docteur Elena Giménez-Arnau.

D'une part, je voudrais exprimer toute ma gratitude au Professeur Jean-Pierre Lepoittevin. Vous m'avez chaleureusement accueillie au sein de votre équipe. Vous m'avez accordée votre confiance en partageant votre riche savoir dans différents domaines. Je vous en suis reconnaissante.

De l'autre, je souhaiterais m'adresser au Dr. Giménez-Arnau. Ma chère Elena, ces quelques lignes ne pourront aussi bien te rendre hommage. Merci pour tes conseils, tes connaissances illimitées, ta bonne humeur quotidienne et ta philosophie de vie harmonieuse qui m'ont permis d'effacer les mauvais moments. Merci d'avoir été présente et de m'avoir écoutée. J'ai le sentiment d'avoir mûri tant sur le plan professionnel que sur le plan privé.

Je voudrais saluer le Dr. Bertrand Vileno, qui m'a initiée à la RPE. Merci pour cet apprentissage. Son aide logistique nous a été précieuse, ponctuée de conversations enrichissantes.

Elena et Bertrand, merci pour votre bienveillance et votre patience. Merci d'avoir pris du temps pour corriger ce manuscrit et parfaire les messages que je souhaitais passer, pour vos conseils et pour m'avoir suivie tout au long de ma thèse.

J'adresse mes vifs remerciements au Pr. Véronique Rataj-Nardello et, au Pr. Catherine Grosdemange-Billiard, ainsi qu'au Dr. Béatrice Tuccio-Lauricella. Vous m'avez fait l'honneur de juger mon travail, de profiter de votre expertise et de m'accorder le titre de Docteur de l'Université de Strasbourg.

À tous les membres de l'équipe de Propriétés Optiques et Magnétiques des Architectures Moléculaires (Université de Strasbourg, CNRS UMR 7177), en particulier Maxime Bernard, grâce à qui j'ai appris à utiliser *Lucy*; Nolwenn Lebreton pour sa gentillesse et sa disponibilité ; enfin, Sylvie Choua pour sa bienveillance.

Un grand merci au Professeur Laurent Ruhlmann, directeur du Laboratoire d'Électrochimie et Chimie Physique du Corps Solide (Université de Strasbourg, CNRS UMR 7177), et au Professeur Corinne Baudon pour leur expertise.

À toute l'équipe de Dermatochimie. Valérie, je retiendrai vos précieux conseils. Aux doctorants, post-doctorants et stagiaires. Marion, merci pour ton aide lors de mon arrivée au

laboratoire. Merci pour nos fous rires autour d'un bon petit brunch, d'un déjeuner et de tes fameux « Oyé ! ». Salen, merci pour tes conseils et ton aide lors de mon apprentissage de la RPE. Hassan, mon binôme de paillasse, merci pour nos nombreuses discussions, ton aide précieuse, tes conseils, ton soutien et ton calme. Marie, merci pour tes nombreux conseils avisés et tes bonnes idées qui m'ont permis de rebondir face à certaines situations imprévues. Minh, merci pour ta gentillesse et ton aide. Merci à tous pour ces bons moments passés ensemble !

De même, un grand merci à nos stagiaires Manon, Déborah, Amélie, Norbert, Zoé et Gemma. Merci du fond du cœur d'avoir contribué à l'avancée de ce projet. Je vous souhaite bonne chance pour la suite de vos études. Des projets passionnants vous attendront, je l'espère !

Merci à Maurice, Bruno et Lionel pour leurs analyses de RMN.

À Estefania Oliva et Delphine Garnier pour leurs analyses de spectrométrie de masse, l'aide apportée à la compréhension des résultats et pour le temps qu'ils m'ont consacré.

À ma famille pour son soutien infaillible. Chers parents, merci infiniment de m'avoir permise d'en arriver jusque là aujourd'hui. Je vous dois beaucoup... « Big up ! » à mes sœurs Assia, Katia, Sabrina et mon frère Ali. Vous avez fait l'effort de comprendre mon projet de thèse. Vous m'avez sérieusement épaulée en me motivant sans cesse, en m'indiquant le cap et en m'apprenant que la persévérance serait ma meilleure alliée tout au long de mon parcours universitaire. « Sahly's Gang QLF !!!!! »

Aux P7iens qui m'ont soutenue, de près ou de loin mais avec le cœur. Ahmed, une pensée spéciale ! Davy, merci pour ton renfort et ta bonne humeur ! Dr. Fatou, ton rire exceptionnel et si communicatif ainsi que Cléopâtre faite d'or et de platine.

À mes acolytes de Paris-Sud, Sophie et Semaher, merci pour vos encouragements.

Enfin, j'adresse mes humbles remerciements à tous les collaborateurs de ce projet sans qui rien n'aurait été possible.

Abréviations, acronymes et unités

a	Constante de couplage hyperfine isotrope
A	Ampère
Ac	Acétyle
Ac₂O	Anhydride acétique
AgO₂CCF₃	Trifluoroacétate d'argent
AgOSO₂CF₃	Trifluorométhane sulfonate d'argent
AOP	Adverse Outcome Pathway
Asc	Ascaridol
BF₃.OEt₂	Trifluorure de bore
BPPG	Basal Plan Pyrolytic Graphite electrode
br s	Broad singlet (singulet large)
ca.	<i>De circa</i>
Ca(OCl)₂	Hypochlorite de calcium
cat.	Catalytique
CBD	Δ^9 -tétrahydrocannabinidiol
CBr₄	Tétrabromure de carbone
CCM/TLC	Chromatographie sur couche mince/Thin layer chromatography
CH₂Cl₂	Dichlorométhane
CHCl₃	Chloroforme
CH₃CN	Acétonitrile
CL	Cellule de Langerhans
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CDs	Cellules Dendritiques
COCAT	test d'activation en co-culture cellulaire
Cp₂TiCl₂	Dichlorotitanocène
Cum-OOH	Hydroperoxyde de cumène
d	Doublet
dd	Doublet de doublets
ddd	Doublet de doublet de doublet
dt	Doublet de triplet
Da	Dalton
dd	Doublet dédoublé
DEPMPO	5-Diéthoxyphosphoryl-5-méthyl-1-pyrroline- <i>N</i> -oxyde
DEREK	Deduction and Estimation of Risk from Existing Knowledge
DFT	Density Functional Theory
DIPPMPO	5-(Diisopropoxyphosphoryl)-5-méthyl-1-pyrroline- <i>N</i> -oxyde
DMAPP	Diphosphate de diméthylallyle

DMF	Diméthylformamide
DMPO	5,5-Diméthyl-1-pyrroline- <i>N</i> -oxyde
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNCB	2,4-Dinitrochlorobenzène
DNFB	2,4-Dinitrofluorobenzène
DPRA	Direct Peptide Reactivity Assay
DTT	Dithiothreitol
E	Potentiel
EC₃	Concentration en molécule sensibilisante nécessaire pour obtenir un indice de sensibilisation de 3
ECVAM	Centre Européen de Validation des Méthodes Alternatives
Et	Éthyle
Et₂O	Éther diéthylique
<i>et al.</i>	Et autres
EtOAc	Acétate d'éthyle
EtOH	Éthanol
EPPG	Edge Plan Pyrolytic Graphite electrode
éq.	Équivalent
ECS	Électrode au Calomel Saturé
ESH	Électrode Standard à Hydrogène
Fe(II)	Fer(II)
FGPP	Diphosphate de farnésylgéranyle
FPP	Diphosphate de farnésyle
g	Gramme
<i>g</i>	Facteur de Landé ou facteur <i>g</i>
G	Gauss
GGPP	Diphosphate de géranylgéranyle
Gp	Groupe partant ou groupe protecteur
GPP	Diphosphate de géranyle
GPMT	Guinea Pig Maximisation Test
GO	Oxyde de graphène
GSH	Glutathion
h	Heure
I	Courant
IAA	Iodoacétamide
IPP	Diphosphate d'isopentyle
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
H₂O	Eau
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
H₂SO₄	Acide sulfurique

h-CLAT	Human Cell Line Activation Test
hept	Heptuplet
hfccs	constantes de couplage hyperfines
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HNMe₂	Diméthylamine
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
HSA	Albumine Sérique Humaine
J	Constante de couplage en RMN
kg	Kilogramme
K₂CO₃	Carbonate de potassium
KOH	Hydroxyde de potassium
Kp	Coefficient de partage octanol/eau
L	Litre
LC-ESI-MS/MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem <i>via</i> une source électrospray
LiCl	Chlorure de lithium
Lim-2-OOH	(5 <i>R</i>)-2-méthyl-5-isopropényl-2-cyclohexène-1-hydroperoxyde
(1<i>S</i>, 4<i>R</i>)-Lim-1-OOH	(1 <i>S</i> , 4 <i>R</i>)-1-méthyl-4-isopropényl-2-cyclohexène-1-hydroperoxyde
LLNA	Local Lymph Node Assay
LMCT	Ligand to Metal Charge Transfer
LT	Lymphocyte T
m	Mètre ou multiplet
M	Molaire
m²	Mètre carré
<i>m</i>-CPBA	Acide <i>méta</i> -chloroperbenzoïque
<i>m/z</i>	Rapport masse sur charge
Me	Méthyle
MeOH	Méthanol
mg	Milligramme
MgSO₄	Sulfate de magnésium
min	Minute
mL	Millilitre
mmole	Millimole
mM	Milimolaire
Mn	Manganèse
MNP	2-Méthyl-2-nitrosopropane
mol	Mole
MUSST	Myeloid U937 Skin Sensitization Test
NaBH₄	Borohydrure de sodium

Na₂CO₃	Carbonate de sodium
N-Ac-AA-COOMe/Et	N-Acétyl-acide aminé méthyl ester ou éthyl ester
N-Ac-Cys-COOMe	N-Acétyl-cystéine méthyl ester
N-Ac-His-COOMe	N-Acétyl-histidine méthyl ester
N-Ac-Lys-COOMe	N-Acétyl-lysine méthyl ester
N-Ac-Trp-COOEt	N-Acétyl-tryptophane éthyl ester
N-Ac-Tyr-COOEt	N-Acétyl-tyrosine éthyl ester
NaHCO₃	Hydrogénocarbonate de sodium
ND	Nitrosodurène
NH₄OH	Ammoniaque
nm	nanomètre
Nu	nucléophile
OPP	Diphosphate
PBN	Phényl- <i>N-tertio</i> -butyl-nitrone
(PhSe)₂	Diséléniure de diphényle
PMA	Acide phosphomolybdique
ppm	Partie par million
PPh₃	Triphénylphosphine
PPRA	Peroxidase Peptide Reactivity Assay
POMs	Polyoxométallates
q	Quadruplet
R²	Coefficient de corrélation
RAI	Relative Alkylation Index
rdt	Rendement
REACH	Registration, Evaluation, Authorization, and restriction of Chemical substances
Rf	Rapport frontal
rGO	Oxyde de graphène réduit
RHE	Reconstructed Human Epidermis
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROAT	Repeated Open Application Test
RPE	Résonance Paramagnétique Électronique
s	Singulet
s	Seconde
Sens	Sensibilisateur
S_N	Substitution nucléophile
S_NAr	Substitution nucléophile aromatique
SO₂Cl₂	Chlorure de sulfuryle
t	Triplet
t	Temps
td	Triplet of doublets

t.a.	Température ambiante
<i>t</i>-BuOOH	Hydroperoxyde de <i>tertio</i> -butyle
TiCl₄	Tétrachlorure de titane
TiO(OH)₂	Dioxyde de titane
THC	Δ^9 -Tétrahydrocannabinol
THF	Tétrahydrofurane
td	Triplet dédoublé
TOPKAT	TOxicity Prediction by Computer Assisted Technology
UV	Ultraviolet
v	Volume
v	vitesse
V	Volt
VC	Voltampérométrie cyclique
θ	Température
μL	Microlitre
μV	Microvolt
μA	Microampère
μmole	Micromole
ν	Fréquence
δ	Déplacement chimique
Δ	Chauffage
°C	Degré Celsius
4-DMAP	4-Diméthylaminopyridine
(\pm)-Citr-6-OOH	6-hydroperoxy-3,7-diméthyl-7-èn-1-ol
(\pm)-Citr-7-OOH	(<i>E</i>)-7-hydroperoxy-3,7-diméthyl-5-èn-1-ol

Sommaire

Introduction générale	1
------------------------------	----------

1. L'allergie de contact	2
1.1. La peau	2
1.2. L'allergie de contact : mécanisme et diagnostic	4
1.2.1. Théorie de l'haptène et formation du complexe immunogène	4
1.2.2. La phase de sensibilisation	5
1.2.3. La phase de révélation	8
1.2.4. Diagnostic et traitement	9
1.3. Les allergènes de contact	11
1.3.1. Les haptènes : classification	11
1.3.2. Notions de « pro-haptènes » et de « pré-haptènes »	18
2. Évaluation du potentiel sensibilisant des allergènes	21
2.1. Méthodes <i>in vivo</i>	23
2.2. Méthodes <i>in vitro</i>	25
2.3. Méthodes <i>in silico</i>	26
2.4. Méthodes <i>in chemico</i>	28
3. Présentation du projet de recherche	31
3.1. Les terpènes	31
3.2. Les hydroperoxydes et endoperoxydes allyliques dérivés de l'autoxydation des terpènes	34
3.3. Objectifs de l'étude : projet DEFCEMSKALL	36
3.3.1. Introduction	36
3.3.2. Profil de réactivité chimique par des mécanismes radicalaires	38
3.3.3. Étude <i>in situ</i> de la production de signaux de danger dans un modèle 3D d'épidermes humain reconstitué	40
3.3.4. Étude par voltampérométrie cyclique du pouvoir oxydant des allergènes	42
Références bibliographiques – Introduction	44
Chapitre 1 – Synthèse des composés d'étude	51

Introduction	51
1. Les endoperoxydes et hydroperoxydes allyliques : méthodes d'obtention	51
1.1. Molécules insaturées et autoxydation	52
1.2. Génération et réactions de l'oxygène singulet ¹O₂	53
1.2.1. L'oxygène singulet	54

1.2.2. Réactions principales de l'oxygène singulet	57
1.2.3. Mécanisme de la cycloaddition [4+2] et de la réaction de Schenck	58
1.3. Synthèse d'hydroperoxydes allyliques à partir de substitution nucléophile sur les alcools allyliques	60
2. Synthèse de l'endoperoxyde ascaridole (Asc)	62
2.1. Génération de l'oxygène singulet : conditions expérimentales	63
2.2. Résultats	66
3. Synthèse des hydroperoxydes allyliques dérivés du <i>R</i>-(+)-limonène	66
3.1. Réaction de Schenck sur le <i>R</i> -(+)-limonène	67
3.2. Substitution nucléophile sur le (-)-carvéol en vue de l'obtention du Lim-2-OOH	67
3.3. Synthèse du Lim-1-OOH par substitution nucléophile sur l'alcool correspondant	68
3.3.1. Synthèse de l'alcool correspondant à partir du (+)-2-carène	68
3.3.2. Synthèse de l'alcool correspondant à partir du <i>R</i> -(+)-limonène	69
3.3.3. Substitution nucléophile sur l'alcool correspondant en vue de l'obtention du Lim-1-OOH	76
4. Synthèse des hydroperoxydes allyliques dérivés du (±)-β-citronello	79
4.1. Réaction de Schenck sur le (±)-β-citronello	79
4.2. Synthèse du (<i>E</i>)-7-hydroperoxy-3,7-diméthyl-5-en-1-ol ((±)-Citr-7-OOH)	81
4.3. Synthèse du 6-hydroperoxy-3,7-diméthyl-7-en-1-ol ((±)-Citr-6-OOH)	83
4.3.1. À partir de l'acétate de 6-hydroxy-3,7-diméthyl-7-en-1-yle	83
4.3.2. À partir d'un intermédiaire halogéné	85
4.3.3. À partir d'une <i>N</i> -alkyl- <i>N'</i> -tosylhydrazines	88
Conclusion	90
Partie expérimentale - Chapitre 1	92
Références bibliographiques - Chapitre 1	128
Chapitre 2 - Réactivité vis-à-vis d'acides aminés et d'un environnement peptidique	132

Introduction	132
1. Les acides aminés et l'albumine sérique humaine	135
1.1. Choix des acides aminés et de la protéine modèle	135

1.1.1. Choix des acides aminés	135
1.1.2. Choix de la protéine modèle	139
1.2. Conditions expérimentales	139
1.2.1. Généralités	139
1.2.2. Mode opératoire avec les acides aminés	140
1.2.3. Mode opératoire avec la HSA	140
2. Résultats et discussion	141
2.1. Réactivité de l'ascaridol (Asc)	141
2.1.1. Réactivité vis-à-vis de la <i>N</i> -acétyl-cystéine méthyl ester (<i>N</i> -Ac-Cys-COOMe)	142
2.1.2. Réactivité vis-à-vis de la <i>N</i> -acétyl-tyrosine éthyl ester (<i>N</i> -Ac-Tyr-COOEt)	146
2.1.3. Réactivité vis-à-vis du <i>N</i> -acétyl-tryptophane éthyl ester (<i>N</i> -Ac-Trp-COOEt)	148
2.1.4. Réactivité vis-à-vis de la <i>N</i> -acétyl-histidine méthyl ester (<i>N</i> -Ac-His-COOMe)	150
2.1.5. Réactivité vis-à-vis de la <i>N</i> -acétyl-lysine méthyl ester (<i>N</i> -Ac-Lys-COOMe)	150
2.2. Réactivité du (5<i>R</i>)-2-méthyl-5-isopropényl-2-cyclohexène-1-hydroperoxyde (Lim-2-OOH)	150
2.2.1. Réactivité vis-à-vis de la <i>N</i> -acétyl-cystéine méthyl ester (<i>N</i> -Ac-Cys-COOMe)	150
2.2.2. Réactivité vis-à-vis de la <i>N</i> -acétyl-tyrosine éthyl ester (<i>N</i> -Ac-Tyr-COOEt)	153
2.2.3. Réactivité vis-à-vis du <i>N</i> -acétyl-tryptophane éthyl ester (<i>N</i> -Ac-Trp-COOEt)	154
2.2.4. Réactivité vis-à-vis de la <i>N</i> -acétyl-histidine méthyl ester (<i>N</i> -Ac-His-COOMe)	154
2.2.5. Réactivité vis-à-vis de la <i>N</i> -acétyl-lysine méthyl ester (<i>N</i> -Ac-Lys-COOMe)	156
2.3. Réactivité du (1<i>S</i>-4<i>R</i>)-1-méthyl-4-isopropényl-2-cyclohexène-1-hydroperoxyde ((1<i>S</i>, 4<i>R</i>)-Lim-1-OOH)	157
2.3.1. Réactivité vis-à-vis de la <i>N</i> -acétyl-cystéine méthyl ester (<i>N</i> -Ac-Cys-COOMe)	157
2.3.2. Réactivité vis-à-vis de la <i>N</i> -acétyl-tyrosine éthyl ester (<i>N</i> -Ac-Tyr-COOEt)	157
2.3.3. Réactivité vis-à-vis du <i>N</i> -acétyl-tryptophane éthyl ester (<i>N</i> -Ac-Trp-COOEt)	159
2.3.4. Réactivité vis-à-vis de la <i>N</i> -acétyl-histidine méthyl ester (<i>N</i> -Ac-His-COOMe)	159
2.3.5. Réactivité vis-à-vis de la <i>N</i> -acétyl-lysine méthyl ester (<i>N</i> -Ac-Lys-COOMe)	159
2.4. Réactivité du (E)-7-hydroperoxy-3,7-diméthyl-5-ène-1-ol ((±)-Citr-7-OOH)	159
2.4.1. Réactivité vis-à-vis de la <i>N</i> -acétyl-cystéine méthyl ester (<i>N</i> -Ac-Cys-COOMe)	159
2.4.2. Réactivité vis-à-vis de la <i>N</i> -acétyl-tyrosine éthyl ester (<i>N</i> -Ac-Tyr-COOEt)	161
2.4.3. Réactivité vis-à-vis du <i>N</i> -acétyl-tryptophane éthyl ester (<i>N</i> -Ac-Trp-COOEt)	161
2.4.4. Réactivité vis-à-vis de la <i>N</i> -acétyl-histidine méthyl ester (<i>N</i> -Ac-His-COOMe)	162
2.4.5. Réactivité vis-à-vis de la <i>N</i> -acétyl-lysine méthyl ester (<i>N</i> -Ac-Lys-COOMe)	163
2.5. Réactivité des hydroperoxydes vis-à-vis de la HSA	163
2.5.1. Analyse par spectrométrie Maldi-Tof	163

2.5.2. Analyse par spectrométrie ESI-MS/MS	166
Conclusion	167
Partie expérimentale - Chapitre 2	168
Références bibliographiques - Chapitre 2	178
Chapitre 3 - Mise en évidence d'intermédiaires radicalaires en solution et dans les épidermes humains reconstitués	181

Introduction	181
1. Résonance paramagnétique électronique	181
1.1. Un peu d'histoire	182
1.2. Principe de base de la RPE	182
1.2.1. Notion de spin et de moment magnétique de l'électron	182
1.2.2. Effet Zeeman	183
1.2.3. Les interactions hyperfines	186
1.3. Instrumentation	189
1.4. Le piégeage radicalaire	191
1.4.1. Généralités	192
1.4.2. Analyses des données : développement de boîte à outils	195
1.5. Limitation de la méthode	198
2. Identification des espèces radicalaires issues des composés cibles : études en solution	200
2.1. Les acteurs principaux de l'étude	200
2.1.1. Choix du piègeur de radicaux	200
2.1.2. Synthèses des piègeurs de radicaux	201
2.1.3. Initiateur radicalaire : système Fe(II)/Fe(III)	202
2.1.4. Choix du solvant	203
2.1.5. La méthode	203
2.2. Résultats	205
2.2.1. Étude de l'ascaridol en solution	205
2.2.2. Étude du Lim-2-OOH en solution	208
2.2.3. Étude du (1S, 4R)-Lim-1-OOH en solution	211
2.2.4. Étude du (±)-Citr-7-OOH en solution	214

2.2.5. Étude avec le mélange d'hydroperoxydes (\pm)-Citr-6-OOH et (\pm)-Citr-7-OOH en solution	217
2.3. Conclusion	219
3. Identification des espèces radicalaires issues des composés cibles : études avec un modèle d'épiderme humain reconstitué	221
3.1. Les épidermes humains reconstitués	221
3.2. Procédure générale	222
3.3. Résultats	224
3.3.1. Étude avec l'ascaridol	224
3.3.2. Étude avec les hydroperoxydes dérivés du <i>R</i> -(+)-limonène	226
3.3.3. Étude avec le (\pm)-Citr-7-OOH	229
3.3.4. Étude avec le mélange (\pm)-Citr-6-OOH et (\pm)-Citr-7-OOH en solution	230
3.4. Discussion	232
4. Études en vue de l'identification de l'origine des radicaux carbonés produits	233
4.1. Synthèse du Cum-OOH substitué au ^{13}C	233
4.2. Étude du piégeage radicalaire en solution	235
4.3. Étude sur les RHE	239
4.4. Discussion	241
5. Conclusion...et perspectives	242
Annexes - Chapitre 3	244
Partie expérimentale - Chapitre 3	279
Références bibliographiques – Chapitre 3	292
Chapitre 4 - Mesure du potentiel de réduction des allergènes étudiés par voltampérométrie cyclique	296

Introduction	296
1. Principe de la voltampérométrie cyclique et les différents types d'électrodes de carbone	297

1.1. Voltammétrie cyclique	297
1.2. Les différents types d'électrodes de carbone	306
1.2.1. Électrode de carbone vitreux	308
1.2.2. Électrode de carbone pyrolytique	309
1.2.3. Le noir de carbone	310
2. Présentation générale des polyoxométallates	311
2.1. Description et synthèse des polyoxométallates	312
2.2. Structures classiques des polyoxométallates et leurs dérivés	312
2.2.1. Structure Keggin	312
2.2.2. Structure Wells-Dawson	313
2.2.3. Autres structures	317
2.3. Principales propriétés des polyoxométallates	317
2.4. Domaine d'application des polyoxométallates	319
3. Mesure du potentiel de réduction de l'hydroperoxyde de cumène	320
3.1. Mesure directe	321
3.1.1. Avec une électrode de carbone pyrolytique	321
3.1.2. Avec une électrode de carbone vitreux du type « Radiometer »	323
3.1.3. Avec une électrode de carbone vitreux de Lorraine	324
3.2. Mesure indirecte-modification de l'électrode de carbone vitreux de Lorraine	326
3.2.1. Photoréduction du polyoxométallate de type Dawson {Co ₂ Fe ₂ P ₄ W ₃₀ }	327
3.2.2. Modification des électrodes par le POM@GO	330
4. Mesure du potentiel de réduction des molécules cibles	338
4.1. Mesure du potentiel de l'ascaridol	338
4.2. Mesure du potentiel des hydroperoxydes dérivés du <i>R</i> -(+)-limonène	341
4.3. Mesure du potentiel du (±)-Citr-7-OOH	345
5. Discussions	348
Références bibliographiques - Chapitre 4	350
Activation de la réponse immunitaire	354

Discussion et conclusion générale	360
--	-----

Formulaire	367
-------------------	-----

Introduction générale

L'allergie de contact se définit comme une réactivité accrue de la peau induite par un contact répété avec une substance exogène. Elle est considérée comme l'expression la plus fréquente d'immunotoxicité chez l'homme. D'après une étude danoise, il est estimé que 20 % de la population européenne souffre d'allergie de contact à au moins un allergène.¹ Ce chiffre tend à augmenter en raison de la mise sur le marché d'un nombre toujours croissant de produits chimiques dans les produits de consommation (ménagers, cosmétiques, pharmaceutiques...). La prévalence de l'allergie de contact ne cesse donc de croître dans le monde entier. L'allergie de contact est, en conséquence, un problème majeur de santé publique et professionnelle lié à l'exposition des travailleurs et des consommateurs à des substances pour la plupart répertoriées comme ayant un sérieux impact sur leur qualité de vie.² A l'heure actuelle, il existe plus de 3500 substances chimiques classifiées sensibilisantes.³ Ces substances, d'origine synthétique ou naturelle, sont présentes dans un grand nombre de produits de la vie quotidienne et notamment dans de nombreux produits industriels tels que les cosmétiques, les parfums, les textiles, les produits ménagers, les colorants mais sont présent également dans la nature comme par exemple les plantes. De nos jours, seuls des traitements symptomatiques existent pour soulager les effets cliniques de cette pathologie et le meilleur moyen de les contrer définitivement reste la prévention. Il devient donc indispensable de prédire le potentiel de sensibilisation des composés chimiques avant leur utilisation dans les produits commerciaux. L'Union Européenne (UE) organise des campagnes de prévention notamment avec le 7ème amendement à la Directive Européenne sur les Produits Cosmétiques, aujourd'hui devenue un règlement obligeant toutes industries à étiqueter 26 substances parfumantes présentes dans les produits de consommation (parfums, maquillage...) et figurant parmi les sensibilisants les plus importants affectant gravement la peau.⁴

L'allergie de contact entraîne une détérioration importante de la qualité de vie des patients et, en conséquence, d'un point de vue économique, des journées de travail manquées entraînant la perte de revenus, sans parler des importantes dépenses concernant les visites chez les prestataires de soins de santé ou encore pour les traitements.⁵ De ce fait, diagnostiquer correctement l'allergie de contact est nécessaire afin d'entraîner une amélioration dans la prévention et aussi une réduction des coûts globaux pour le système de soins de santé.^{3,6} La dermatite de contact est en général deux fois plus fréquente chez les femmes que chez les hommes. Celle-ci est pour la plupart due aux parfums, aux conservateurs mais également au nickel qui reste l'allergène de contact le plus répandu.⁷

Ainsi, la compréhension des mécanismes menant aux réactions allergiques et inflammatoires nous semble essentielle afin de pouvoir procéder à l'évaluation complète des risques liés aux composés chimiques.

1. L'allergie de contact

En 1963 deux immunologistes anglais, Gell et Coombs, classèrent pour la première fois l'allergie de contact parmi les réactions d'hypersensibilité de type retardée ou de type IV.⁸ Les hypersensibilités de type I, II et III sont des réactions immunitaires à médiation humorale, liées directement aux anticorps produits par les lymphocytes B. Quant à l'hypersensibilité de type IV, il s'agit d'une réaction immunitaire à médiation cellulaire liée aux lymphocytes T. Elle est provoquée par la présence de xénobiotiques dans la peau et la manifestation clinique apparaît 24 à 72 heures après une seconde exposition à l'allergène.

D'un point de vue clinique, l'allergie de contact se traduit par une réaction inflammatoire résultant d'une sensibilisation antérieure à un produit chimique. Elle se manifeste par des symptômes tels que l'érythème (rougeur), le prurit (démangeaison), l'œdème (gonflement) ou encore par de l'eczéma (*Figure 1*).



Figure 1 : Dermatitis de contact après exposition au parfum présent dans une crème hydratante visage. (Source : Handbook of cosmetic skin care).

La chimie joue un rôle essentiel dans l'allergie de contact. Les bases de la chimie moléculaire et supramoléculaire interviennent tout au long du processus biologique conduisant le patient à un état allergique.

1.1. La peau

La peau est en contact permanent avec l'environnement et constitue la première interface du corps humain avec l'extérieur. Elle recouvre toute la surface du corps humain et, par sa superficie variant de 1,5 à 2 m², mais également par son poids d'environ 4 kilogrammes, constitue l'un des organes les plus importants. Elle nous protège des rayons ultraviolets et des chocs tout en maintenant la température corporelle constante par rétention ou élimination d'eau. Sa perméabilité, son renouvellement constant et son élasticité en font une grande

barrière physique naturelle entre l'organisme et les agressions extérieures de nature physique, biologique ou chimique. Cependant, la peau n'est pas hermétique. Certains composés sont capables de pénétrer dans l'épiderme et peuvent être à l'origine de la sensibilisation cutanée.

La peau des mammifères est composée de trois couches principales : l'épiderme, le derme et l'hypoderme, qui diffèrent suivant leurs spécificités (*Figure 2*).

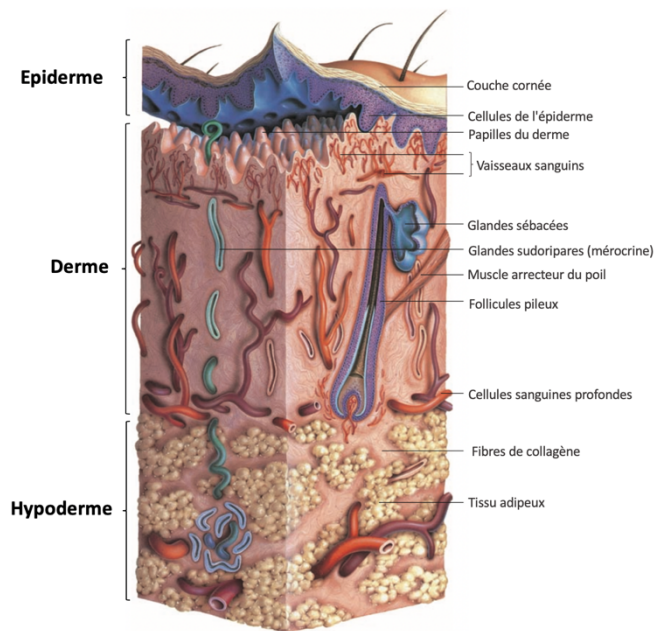


Figure 2 : Représentation schématique tridimensionnelle d'une coupe de peau. (Source : A.J. Geras).

L'épiderme

La couche la plus externe de la peau est l'épiderme. Il s'agit d'un tissu non vascularisé entretenu par diffusion depuis le derme. Les principales cellules de l'épiderme sont les kératinocytes, qui représentent environ 80 % des cellules de cette couche. Les kératinocytes sont produits dans la strate la plus interne, la couche basale, puis ils se différencient dans les couches supérieures, s'aplatissent ensuite, puis meurent pour former la couche cornée.⁹ La couche cornée, la strate la plus externe, est donc un empilement de cellules mortes kératinisées, qui sont éliminées par desquamation permettant à la peau un perpétuel renouvellement.

L'épiderme est également composé de mélanocytes, des cellules de Langerhans et des cellules de Merkel présentes dans les couches les plus profondes. Les fonctions principales de ces cellules sont la pigmentation en produisant de la mélanine, l'immunité grâce à la formation des cellules dendritiques qui ont un rôle essentiel dans le système immunitaire et la

perception sensorielle en raison de l'importante présence de terminaisons nerveuses, respectivement.^{10,11} Ces cellules représentent environ 20 % des cellules de l'épiderme.

L'épiderme et le derme sont séparés par la lame basale, contrôlant le trafic des cellules et des molécules entre ces deux couches. Cette lame est responsable de l'alimentation et de l'élimination des déchets du derme.

Le derme

Le derme, qui correspond à la couche juste en dessous de l'épiderme, est 20 fois plus épais que l'épiderme. Il est principalement constitué de cellules sanguines et de fibroblastes auxquels sont associées des fibres de collagène, d'élastine et de réticuline qui confèrent à la peau force et élasticité.¹¹ Contrairement à l'épiderme, le derme contient un très grand nombre de vaisseaux sanguins permettant la nutrition de l'épiderme.¹²

L'hypoderme

L'hypoderme correspond à la couche la plus profonde de la peau. Il est constitué de cellules adipeuses plus ou moins épaisses selon les individus. Ces cellules sont réparties dans des lobules séparés les uns des autres par des fibres de collagène, d'élastine et de réticuline. Ces fibres identiques à celles du derme maintiennent la nutrition et la tenue de l'hypoderme. Cette couche a pour fonction d'amortir les chocs et permet à la peau de se protéger des variations de température. Il est également constitué de vaisseaux sanguins et de nerfs attribués au derme.^{10,11}

1.2. L'allergie de contact : mécanisme et diagnostic

Le processus physiologique menant au développement d'une allergie de contact à un certain composé se déroule en deux phases distinctes : la phase de sensibilisation, dite asymptomatique, et la phase d'élicitation ou de révélation, dite symptomatique. Cependant, avant l'activation de ces deux phases, une première étape clé de nature chimique est nécessaire. Cette étape consiste en la formation d'un complexe haptène-protéine (complexe immunogène) après que l'allergène ait traversé la couche cornée et pénétré dans l'épiderme.

1.2.1. Théorie de l'haptène et formation du complexe immunogène

Le concept de l'haptène a été introduit pour la première fois en 1935 par Landsteiner et Jacobs.¹³ Les produits allergisants, aussi appelés haptènes, sont des xénobiotiques de faible

poinds moléculaire (< 1000 Da) avec une lipophilie suffisante ($\log P \sim 2$) pour pouvoir franchir la barrière cutanée.^{14,15} Trop petits pour être immunogènes, ils doivent se coupler avec des protéines endogènes de la peau afin de pouvoir activer le système immunitaire. Le couplage entre l'haptène et la protéine forme une entité antigénique, le complexe haptène-protéine, qui ne sera alors plus reconnu comme faisant partie du soi, ce qui entraîne le début du processus immunotoxique caractérisant l'allergie de contact.

La nature exacte des protéines cutanées mises en jeu dans la formation des complexes antigéniques reste inconnue. De nombreuses hypothèses ont été émises. Bien évidemment, toutes ces hypothèses dépendent des propriétés physico-chimiques (lipophilicité et réactivité) des haptènes.¹⁶ Si l'haptène est fortement lipophile, il est capable de se lier directement aux protéines membranaires des cellules de Langerhans (CL) ou bien il peut traverser la membrane de ces cellules pour se lier de préférence aux protéines cytoplasmiques.¹⁷ Les CL sont des cellules dendritiques (CD) présentes dans l'épiderme et qui jouent le rôle de présentatrices d'antigènes. Pour un haptène plus hydrophile, son choix se portera vers les protéines membranaires des CL, ou bien il est également capable de se lier avec les protéines solubles présentes dans le compartiment extracellulaire.¹⁸

Bien que le nombre de protéines pouvant être impliquées soit varié, dans le cas de l'hypersensibilité retardée de type IV nous considérerons uniquement le cas où l'haptène se couple avec les protéines membranaires des CL afin de faciliter la description des différentes étapes de l'allergie de contact.

1.2.2. La phase de sensibilisation

La phase de sensibilisation survient lors d'un premier contact cutané avec le sensibilisant. Cette phase, dite aussi d'induction, n'aboutit à aucun signe clinique. Cependant, elle correspond à l'activation du processus biologique par la création d'une mémoire immunologique. La durée de cette phase est variable et nécessite au moins 3 jours à plusieurs semaines chez l'homme.¹⁶

Elle débute par la pénétration de l'allergène ou haptène dans l'épiderme. Il se lie ensuite à une protéine endogène constituant ainsi un antigène qui sera reconnu comme faisant partie du non-soi. Cet antigène est alors pris en charge par les cellules de Langerhans (CL) (*Figure 3*). Les CL sont des cellules dendritiques (CD) présentatrices d'antigène présentes dans la peau et jouant un rôle essentiel dans la sensibilisation cutanée.¹⁹ Ces cellules forment un réseau contigu au sein de l'épiderme afin qu'aucun xénobiotique ne puisse traverser la peau sans interaction avec leur prolongement cytoplasmique. Cette particularité morphologique leur

permet la transmission de toutes les informations provenant de l'antigène extérieur au système immunitaire. Elles représentent entre 2% et 5% de la population cellulaire épidermique.²⁰

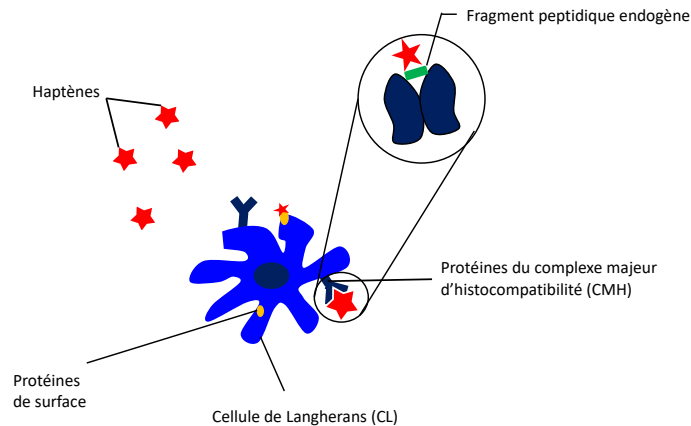


Figure 3 : Fixation de l'haptène sur les cellules de Langerhans (CL).

Une protéine membranaire ou extracellulaire ayant réagi avec un haptène sera alors internalisée par voie d'endocytose par les CL, contrairement à un haptène qui aura franchi la membrane plasmique des CL pour se lier à une protéine cytoplasmique. Les CL vont alors prendre en charge les protéines modifiées quel que soit leur mode de traitement initial, sauf dans le cas où les haptènes sont directement liés au CMH. Ceci constitue l'apprêtement de l'antigène (Figure 4). Cette prise en charge par les CL consiste en une digestion du complexe antigénique en plusieurs fragments peptidiques par des endopeptidases présentes dans les lysosomes. Enfin, l'antigène hapténisé, autrement dit, les peptides portant la modification chimique induite par l'haptène, ou épitopes, se fixeront aux protéines du CMH (II). Ce complexe nouvellement formé et nommé receptosome sera alors externalisé à la surface de ces cellules.

A ce stade où les CL dont les protéines du CMH sont directement couplées à l'haptène, ou à un fragment peptidique modifié par l'haptène, la reconnaissance du motif antigénique va pouvoir avoir lieu.

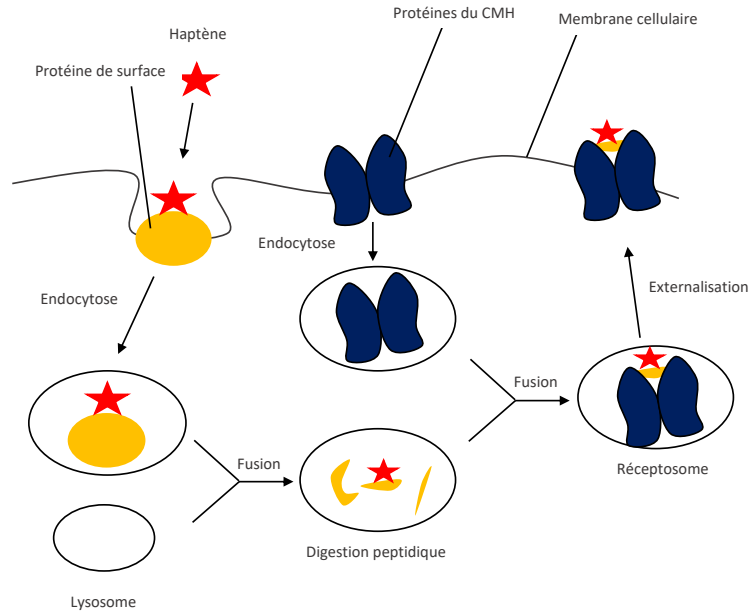


Figure 4 : Apprêtement de l'haptène par les cellules de Langerhans.

Durant cette prise en charge, les CL commencent à sécréter des cytokines et des glycoprotéines. Cette sécrétion va entraîner le détachement des CL des cellules kératinocytaires voisines et faciliter leur migration de l'épiderme vers le derme. Elles quittent alors le derme pour migrer *via* les vaisseaux lymphatiques afférents vers les ganglions lymphatiques proximaux. C'est au cours de cette migration que les CL vont perdre leur morphologie dendritique. Elles deviennent plus arrondies et perdent leurs fonctions de capteur d'antigène pour acquérir de nouvelles fonctions leur permettant d'entrer en contact avec les lymphocytes T naïfs.

Les fonctions principales des CL sont en conséquence, l'internalisation, le traitement, le transport et la prise en charge des antigènes rencontrés dans la peau.²⁰ En tant que telles, les CL jouent en conséquence, un rôle central dans l'induction des réponses immunitaires cutanées.²¹

Une fois arrivées dans les ganglions lymphatiques proximaux, les CL vont présenter le peptide hapténisé aux récepteurs (TCR) présents à la surface des lymphocytes T naïfs complémentaires à l'épitope. Suite à cette reconnaissance, ces cellules T naïves vont se différencier par expansion clonale et proliférer pour former deux familles distinctes, les lymphocytes T dit « mémoires » et les lymphocytes T « effecteurs », tous les deux spécifiques de l'antigène. Les lymphocytes T effecteurs ont pour rôle de sécréter des substances pro-inflammatoires dirigées contre l'antigène et les lymphocytes T mémoires seront, quant à eux, activés lors d'une rencontre ultérieure avec la substance allergisante.

Les lymphocytes T mémoires et effecteurs quittent ensuite les ganglions *via* les canaux lymphatiques efférents pour migrer dans les tissus mais également dans l'épiderme et le derme. A ce point, aucun signe clinique n'est visible et l'individu est sensibilisé au xénobiotique. Tout est mis en place pour qu'une réponse immunitaire puisse avoir lieu lors d'un prochain contact avec le même haptène (*Figure 5*).¹⁵

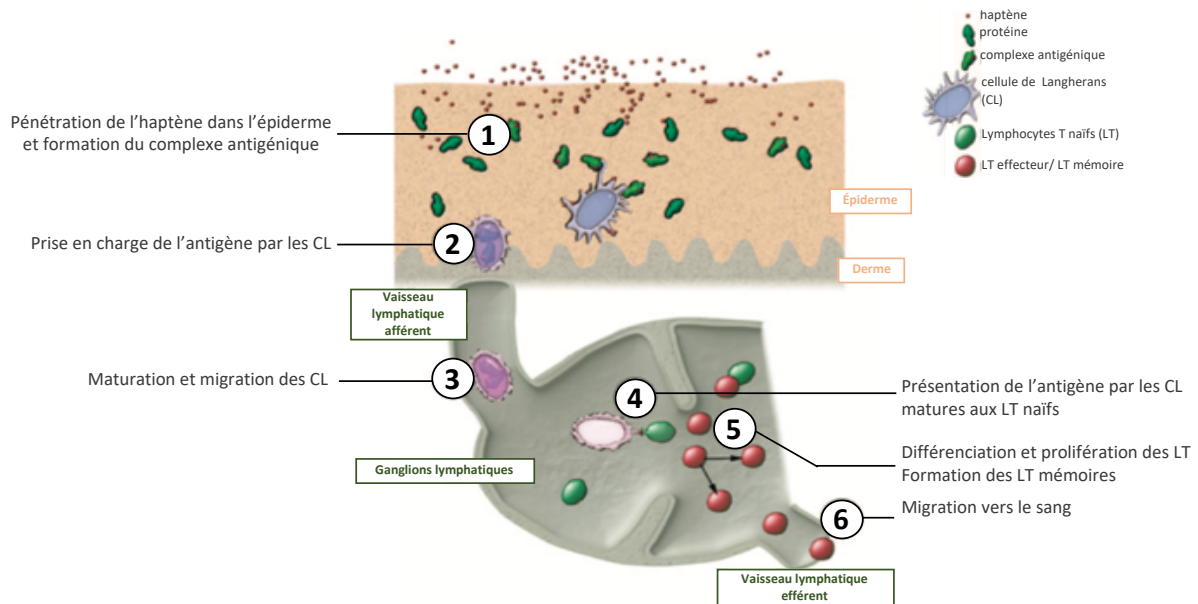


Figure 5 : Phase de sensibilisation.¹⁵

1.2.3. La phase de révélation

Lors d'un second contact avec la substance allergisante, les CL vont une nouvelle fois prendre en charge l'antigène d'une manière identique à celle de la phase de sensibilisation. Toutefois, les peptides hapténisés seront présentés directement aux lymphocytes T mémoires présents dans le derme et l'épiderme depuis la phase de sensibilisation. Ainsi débute une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires aboutissant à l'activation d'autres cellules, notamment les kératinocytes, qui vont alors proliférer et sécréter d'autres cytokines inflammatoires. Ainsi, le relargage massif de cytokines provoque l'apparition des premiers symptômes au niveau du site de contact (apparition de rougeurs, prurits, œdèmes...).

L'allergie de contact est donc classée parmi les hypersensibilités retardées car ce n'est qu'après 12 heures, à la suite d'un deuxième contact avec l'allergène que peuvent apparaître les premiers symptômes, et ce temps de latence peut varier entre 24 heures et 72 heures (*Figure 6*).¹⁵

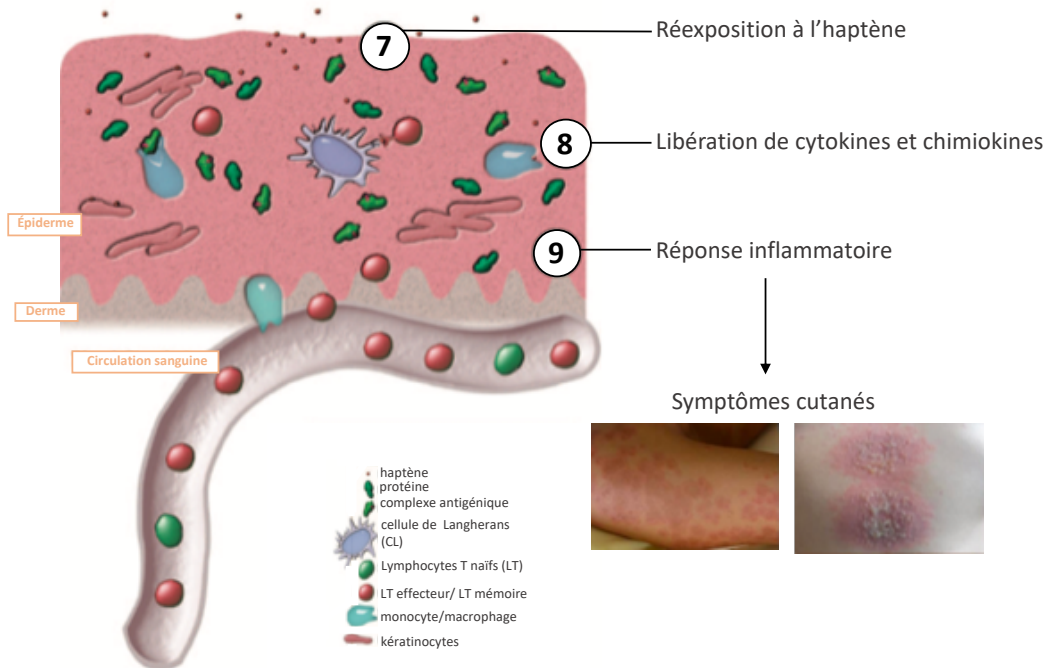


Figure 6 : Phase de revelation.¹⁵ (Source photos : Handbook of cosmetic skin care).

1.2.4. Diagnostic et traitement

Développés dans les années 60, les tests épicutanés, autrement appelés « patch tests », restent la meilleure alternative possible au dépistage d'une dermatite de contact.

Ce test consiste en l'application sur la peau (en général sur le dos ou le bras du patient) de la substance allergisante afin de reproduire la réaction allergique. Il se déroule en deux phases. Le patch contient la substance connue comme étant sensibilisante. Elle est déposée dans une petite cupule correspondant à une petite chambre occlusive disposée sur un sparadrap hypoallergénique afin d'assurer que le produit reste bien en contact avec la peau. Ce dispositif autocollant ne doit être ni mouillé ni retiré pendant 48 heures. Après cette durée, le test est décollé du patient afin d'effectuer une première lecture des résultats. Celle-ci se réalise 15 à 30 minutes après le retrait du matériel du test épicutané. Par la suite, une seconde lecture est préconisée après 72 heures voir 96 heures. Cette lecture peut être renouvelée après 7 jours pour certains allergènes (corticoïdes).²²

Si le test s'avère être positif le patient est donc allergique à la substance, et a été préalablement sensibilisé (Figure 7). Le degré de réponse suit une classification qui est la suivante²³ :

- réaction faiblement positive : érythème, infiltration, papules

- réaction fortement positive (++) : érythème plus prononcé, infiltration, papules plus intenses et vésicules
- réaction violemment positive (+++) visible par les lésions suivantes : érythème intenses, œdème et vésicules coalescentes ou bulles
- réaction d'irritation (IR) caractérisée par l'absence d'œdème, par un aspect fripé, la présence de papules, pustules, hypopion, vésicules, pétéchies ou bien de nécrose

La batterie standard européenne utilisée sur le patient comprend les substances allergisantes les plus fréquemment mises en cause. D'autres batteries plus spécifiques existent dans le cas par exemple des cosmétiques, des résines epoxy, des corticoïdes, parmi bien d'autres. Il existe également des batteries spécifiques selon les pays et les allergènes les plus incriminés.

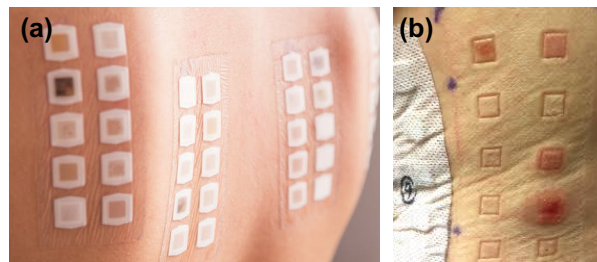


Figure 7 : Pose (a) et résultats (b) d'un test épicutané.

Dans de nombreux cas, il est nécessaire de tester les produits apportés par les patients tel quels ou bien de les diluer suivant des règles de bonne pratique pour éviter un effet irritant.

La pertinence d'une réaction positive ou incertaine du test épicutané peut être évaluée à l'aide du Repeated Open Application Test (ROAT). Le ROAT est un test d'exposition standardisé imitant l'utilisation quotidienne d'un produit (cosmétiques...) contenant l'allergène de contact. Introduit par Hannuksela et Salo, le ROAT consiste en une exposition ouverte avec le produit du patient ou bien avec un allergène suspect dilué dans un véhicule approprié (vaseline, alcool...) à une concentration non irritante.²⁴ Une surface cutanée 5×5 ou 3×3 est utilisée dans l'avant-bras ou le haut du bras en évitant la zone près du coude. Une application de 20 µL/9 cm² deux fois par jour pendant deux semaines est recommandée.

Dans un cadre expérimental, le ROAT peut en outre être utilisé pour déclencher une dermatite de contact allergique, dans des conditions standardisées, en réponse à des doses spécifiées d'un allergène de contact afin de déterminer un seuil de déclenchement et une relation dose-réponse.²⁵

Concernant les soins médicaux proposés, il existe des traitements anti-inflammatoires aux corticoïdes permettant de soulager les symptômes. Cependant le meilleur remède reste aujourd'hui l'éviction totale de l'allergène et la prévention.

1.3. Les allergènes de contact

Chaque jour, nous sommes exposés à une multitude de produits chimiques, synthétiques ou naturels. Parmi cette multitude, des responsables de sensibilisations cutanées dans la vie de tous les jours comme par exemple les métaux (nickel, cobalt, chrome), les cosmétiques, les parfums et les végétaux.

La chimie joue un rôle primordial dans l'allergie de contact. Comme décrit précédemment, la sensibilisation cutanée commence lors d'une interaction chimique entre une protéine cutanée et la molécule sensibilisante ayant pénétré dans la peau. Cette interaction repose sur la nature des groupements fonctionnels présents sur l'allergène. Ainsi, différents types de liaisons peuvent se former tels que les liaisons de coordination ou des liaisons covalentes. La formation de ces liaisons repose en général sur un mécanisme chimique à deux électrons, mais ce mécanisme peut être aussi radicalaire. La plupart du temps, l'allergène présente une fonction chimique électrophile capable de réagir avec des résidus nucléophiles des acides aminés constituant les protéines. Ces fonctions réactives sont directement présentes dans la molécule ou elles peuvent apparaître après une étape de métabolisation ou d'oxydation. Il en résulte alors les concepts de « pro-haptène » et de « pré-haptène ».

1.3.1. Les haptènes : classification

Les haptènes sont des petites molécules de poids moléculaire faible (<1000 Da) incapables d'activer le système immunitaire. Ils doivent réagir avec une protéine porteuse épidermique pour former un complexe antigénique haptène-protéine. Les haptènes sont en conséquence classés selon le type de liaisons formées avec les protéines.

En chimie, il existe différents types de liaisons chimiques classées suivant leur niveau d'énergie, caractérisant la stabilité de la liaison. On distingue, d'une façon générale, les liaisons faibles (interactions de Van der Waals, les liaisons hydrogènes, interactions électrostatiques...) facilement réversibles, avec des énergies allant de quelques joules à 50 kJ.mol⁻¹, et les liaisons dites fortes avec des énergies supérieures à 200 kJ.mol⁻¹. Ces dernières sont beaucoup plus stables. Les liaisons de coordination et les liaisons covalentes

sont des interactions fortes intervenant dans la formation du complexe haptène-protéine (Figure 8).²⁶

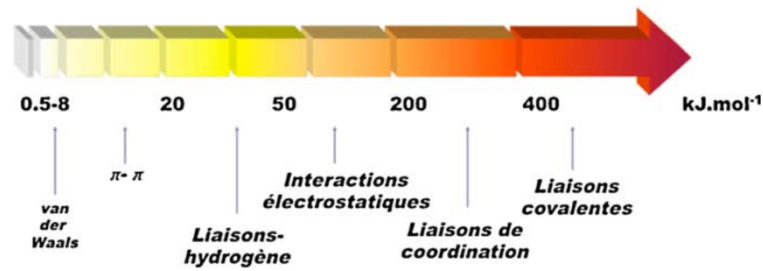


Figure 8 : Niveau d'énergie des différentes liaisons chimiques.²⁶

Les liaisons de coordination

Les sels de métaux tels que le nickel, le chrome, ou bien le cobalt, réagissent avec les protéines cutanées *via* la formation de liaisons de coordination.²⁷ Ces liaisons se forment entre des métaux pauvres en électrons et des atomes des chaînes latérales des acides aminés riches en électrons, principalement des hétéroatomes tels que l'azote, l'oxygène ou encore le soufre. La stabilisation du métal par ce type de liaison permet la formation d'un complexe de coordination relativement stable pour être reconnu par le système immunitaire. Ces édifices se caractérisent par un nombre de ligands et une géométrie variable qu'ils plébiscitent selon la nature du métal mais aussi selon son degré d'oxydation (Figure 9).²⁶

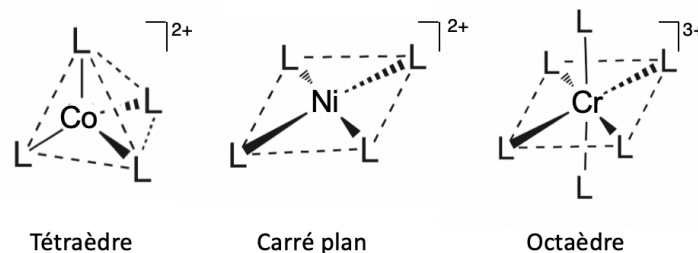


Figure 9 : Exemples de géométries de complexes de coordination formés entre un métal et un ligand L.²⁶

Le nickel, le cobalt et le chrome sont les principaux métaux impliqués dans des réactions de sensibilisation et d'allergie de contact ultérieure. Les bijoux fantaisies par exemple peuvent contenir des sels de nickel (II) souvent responsables d'allergie de contact. Sous sa forme métallique, le chrome n'est pas sensibilisant mais ses sels hexavalents (VI) et trivalents (III) le sont. Ces sels sont principalement présents dans les objets métalliques (aciers inoxydables...), le ciment ou même dans le cuir (maroquinerie, industrie de la chaussure...).

Les sels de cobalt sont des sensibilisants cutanés fréquemment présents dans les pigments colorés (chlorure de cobalt utilisée dans les encres, vernis...) ou encore dans les filières métallurgiques.²⁷

Les liaisons covalentes

Avec une énergie généralement supérieure à 400 kJ.mol^{-1} , les liaisons covalentes sont plus fortes que les liaisons de coordination et en conséquence difficilement réversibles. C'est principalement par un mécanisme dit à « deux électrons » de type nucléophile-électrophile entre les protéines cutanées et l'haptène que se forme la liaison covalente et ainsi le complexe immunogène. Il s'agit d'un partage d'électrons entre un atome riche en électrons (nucléophile) avec un atome ou groupe d'atomes pauvre en électrons (électrophile). Le nucléophile apporte les deux électrons de la liaison en les partageant avec l'électrophile. Mais aussi, les deux électrons nécessaires à la formation de la liaison covalente peuvent résulter de la mise en commun d'un électron de chacun des partenaires. Il s'agit alors d'un mécanisme de type radicalaire (*Figure 10*).²⁸

Mécanisme à deux électrons




→ Formation complexe haptène-protéine


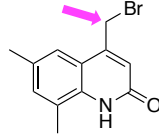
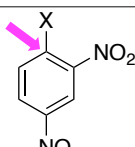
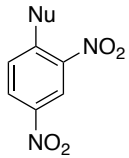
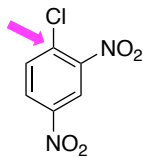


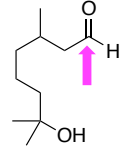

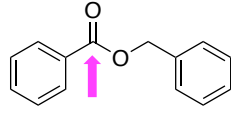


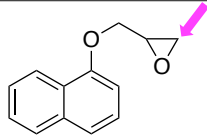

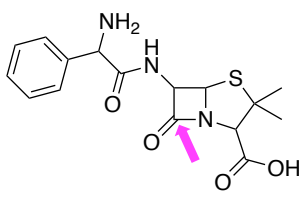
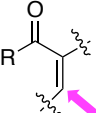
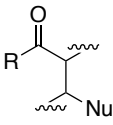
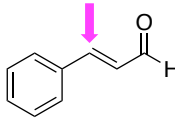
Mécanisme radicalaire



Figure 10 : Formation de liaisons covalentes entre les protéines et les haptènes.

La plupart des haptènes sont des électrophiles réagissant avec les chaînes latérales nucléophiles des acides aminés constituant les protéines de la peau. C'est le cas notamment pour la lysine et la cystéine. Toutefois, l'histidine, la méthionine, la tyrosine ou le tryptophane qui présentent des hétéroatomes nucléophiles peuvent également interagir *via* ce mécanisme réactionnel. Dans la littérature, plusieurs groupes chimiques électrophiles réagissant avec les fonctions nucléophiles des protéines sont décrits (*Tableau 1*).²⁹

Tableau 1 : Classification des haptènes en fonction des sites électrophiles présents dans leur structure moléculaire et mécanismes réactionnels avec les nucléophiles et exemples.²⁹
 ( = fonction chimique électrophile, Nu = nucléophile).

Type d'haptène et site électrophile	Mécanisme	Produit	Exemple d'haptène
 halogénure d'alkyle X= Cl, Br, I	substitution nucléophile	$R-CH_2-Nu$	 4-bromométhyl-6,8-diméthyl-2(1H)quinolone
 halogénure d'aryle X= F, Cl, Br, I	substitution nucléophile aromatique		 2,4-dinitrochlorobenzène (DNCEB)
 aldéhyde : R'= H cétone : R'= alkyle ou aryle	addition nucléophile		 hydroxycitronellal
 ester : R'= OR'' amide : R'= NHR''	addition élimination	$R-C(=O)-Nu$	 benzoate de benzyle
 époxyde	substitution nucléophile		 oxyde de glycidyle et de naphthyle
 lactone : X= O lactame : X= NH	addition élimination	$HX-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-C(=O)-Nu$	 ampicilline
 aldéhyde, cétone ou ester α,β -insaturés R= H, R' ou OR'	addition nucléophile de type 1,4 Michaël		 aldéhyde cinnamique

Il existe essentiellement, dans le cas des haptènes électrophiles, trois types de mécanismes intervenant dans la formation de liaisons covalentes dans le cadre de l'interaction haptène-protéine : l'addition nucléophile, la substitution nucléophile sur un centre saturé et la substitution nucléophile sur un centre insaturé.

L'addition nucléophile de type 1,2 repose sur l'addition d'un atome nucléophile sur un centre électrophile et ce sans départ de groupe. Cela concerne principalement le groupement carbonyle (aldéhydes ou cétones) qui est très électrophile. Des composés allergisants présentant ces groupements chimiques sont très largement présents dans les parfums et cosmétiques en raison de leurs propriétés odorantes (*Figure 11*).

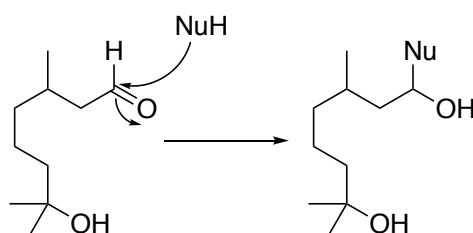


Figure 11 : Exemple d'addition nucléophile 1,2 sur l'hydroxycitronellal.

Il existe de nombreux cas connus d'interaction par addition nucléophile de type 1,4 ou de Michael. Des composés ayant une double ou une triple liaison activée par un groupe attracteur d'électrons tel qu'un groupe carbonyle, peuvent être attirés par une protéine nucléophile. C'est de loin la réaction d'hapténisation la plus courante observée avec les allergènes d'origine végétale. Un exemple courant est celui de l' α -méthylène- γ -butyrolactone tulipalin A qui s'est avérée être responsable de l'allergie de contact aux bulbes de tulipes (*Figure 12*).

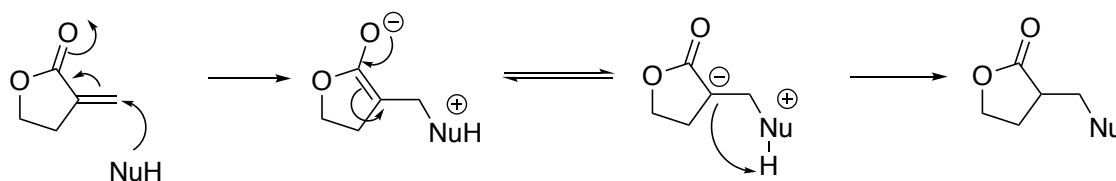


Figure 12 : Exemple d'addition nucléophile 1,4 ou addition de Michael sur la tulipalin A (α -méthylène- γ -butyrolactone).

La formation du complexe haptène-protéine repose dans certains cas sur la substitution nucléophile sur un centre saturé, autrement nommée substitution nucléophile de type 2 (S_N2). Ceci ne peut avoir lieu que si l'attaque du nucléophile sur le centre électrophile pauvre en

électrons, comportant déjà quatre liaisons simples, provoque le départ d'un groupement dit « partant ».

Les groupes glycidyle dans les composants des résines époxy réagissent selon ce mécanisme. Les résines époxy sont des allergènes connus et très répandus, souvent à l'origine de sensibilisations chez les travailleurs utilisant des adhésifs (*Figure 13*).³⁰

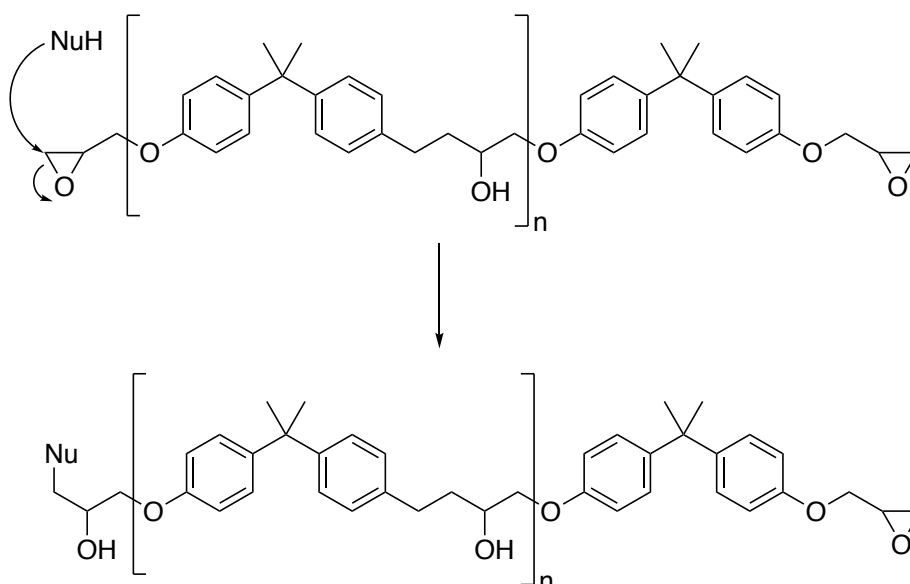


Figure 13 : Exemple de S_N2 dans le cas des résines de type époxy dérivées du bisphénol A ($n > 0$).

Cette réaction peut aussi se produire sur un site dit « insaturé » dû à la présence de liaisons multiples. Cependant le mécanisme est différent. La présence d'une liaison multiple génère la formation d'un intermédiaire saturé qui, par le départ d'un groupe partant, reforme un composé insaturé. Ce mécanisme est rencontré très souvent dans le cas des composés aromatiques contenant des groupements électroattracteurs qui vont favoriser la structure intermédiaire. Deux composés classés comme sensibilisants extrêmes, le 2,4-dinitrofluorobenzène (DNFB) et le 2,4-dinitrochlorobenzène (DNFB), utilisés dans le traitement des pelades, réagissent *via* un mécanisme d'addition-élimination correspondant à une substitution nucléophile aromatique (*Figure 14*).³¹

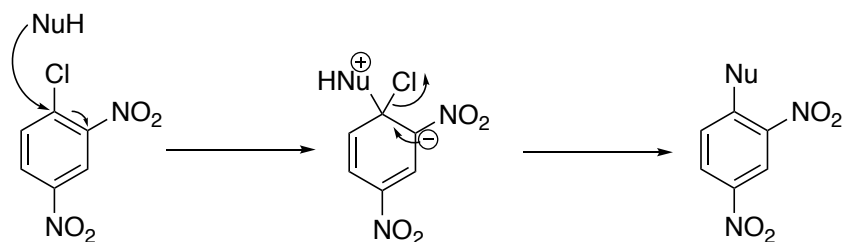


Figure 14 : Exemple de substitution nucléophile aromatique dans le cas du DNCB.

Certains antibiotiques comme la pénicilline, ou des anesthésiques locaux tel que la lidocaïne, suivent ce mécanisme d'action. Les céphalosporines, qui appartiennent à la classe des β -lactames, réagissent avec les protéines nucléophiles *via* une addition-élimination sur un centre insaturé (Figure 15).³¹

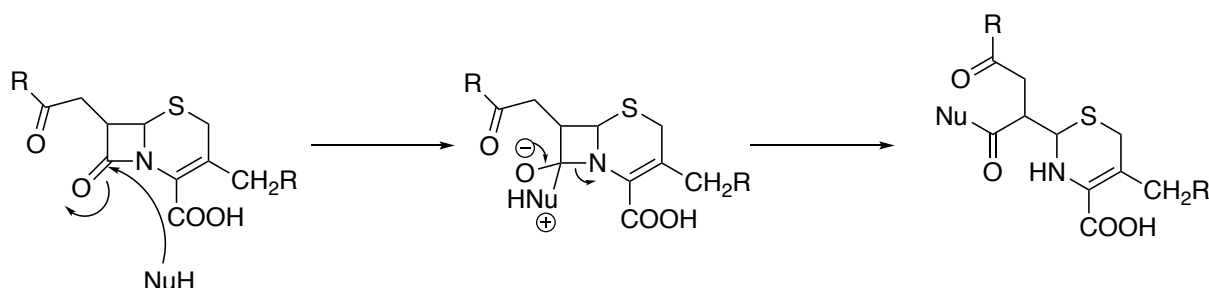


Figure 15 : Réaction d'addition-élimination dans le cas des céphalosporines.

Pendant longtemps, la seule voie de formation de l'espèce antigénique considérée était celle de l'addition d'un résidu nucléophile d'une protéine sur une fonction électrophile de l'haptène par les mécanismes classiques à deux électrons que nous venons de décrire. Or, nous savons aujourd'hui que l'intervention de mécanismes radicalaires est également considérée dans le cadre de la formation de la liaison covalente du complexe haptène-protéine.

Il existe de nombreuses molécules allergisantes qui sont non électrophiles et qui peuvent modifier les protéines cutanées au travers de mécanismes de type radicalaire. C'est le cas notamment des produits d'oxydation de nombreux terpènes d'origine naturelle. Les premières études rapportées sur ces produits concernent les dérivés de l'autoxydation du Δ^3 -carène, responsables de la sensibilisation à l'essence de térébenthine. La térébenthine est une oléorésine récoltée à partir du Pin maritime (*Pinus palustris*). Ces produits d'oxydation, notamment des hydroperoxydes allyliques très allergisants, réagissent certainement *via* des mécanismes radicalaires avec les protéines cutanées (Figure 16).²⁹ En effet, certains acides aminés sont susceptibles de réagir par voie radicalaire, comme la cystéine, ainsi que les

acides aminés présentant une chaîne latérale aromatique, tels que la tyrosine, le tryptophane ou encore l'histidine.³²

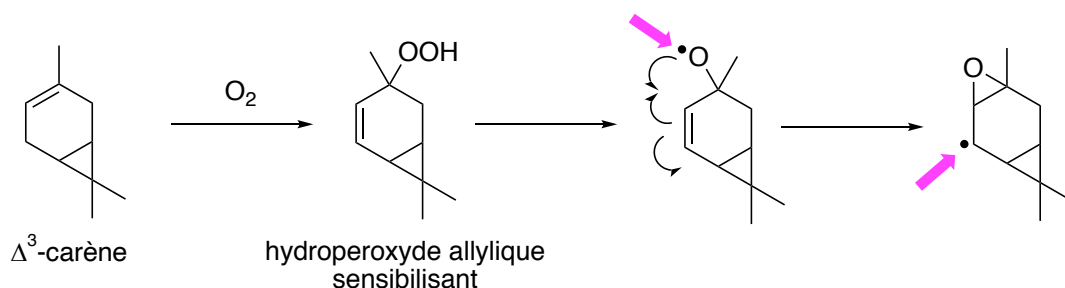


Figure 16 : Exemple d'haptène pouvant réagir par un mécanisme radicalaire, cas du Δ^3 -carène.²⁹

Dans ce manuscrit de thèse, une étude minutieuse sera consacrée aux hydroperoxydes allyliques sensibilisants dérivés de l'autoxydation de certains terpènes.

1.3.2. Notions de « pro-haptènes » et de « pré-haptènes »

Il existe souvent des allergènes où la fonction chimique capable de réagir avec les acides aminés constituant les protéines n'apparaît qu'après une étape de métabolisation, on parle de pro-haptènes, ou d'oxydation, on parle alors de pré-haptènes.³³

Les pro-haptènes

Les pro-haptènes sont des molécules initialement non réactives dans le cadre de la sensibilisation cutanée qui nécessitent une transformation métabolique au préalable pour le devenir. Par cette transformation métabolique, ces molécules se procurent les fonctions chimiques électrophiles nécessaires leur permettant de se lier aux protéines nucléophiles et pouvant devenir de cette façon allergisantes.

La peau est un organe complexe qui, pour se défendre face aux substances xénobiotiques lipophiles, possède tout un système enzymatique très développé capable de les détoxifier.³⁴ Pour ce faire, deux types d'enzymes rentrent en jeu : les enzymes de phase I, telles que les mono-oxygénases à cytochromes P-450, les alcools et aldéhydes déshydrogénases, les peroxydases ou encore les monoamines oxydases, qui sont responsables de réactions de fonctionnalisation (i.e. oxydation) de ces xénobiotiques, et les enzymes de phase II, comme les sulfotransférases, les *N*-acétyltransférases ou bien les glutathion-S-transférases qui par réaction de conjugaison permettent d'obtenir des métabolites

hydrosolubles donc éliminables par voie rénale. L'élimination des xénobiotiques se fait principalement par excrétion dans la bile ou dans les urines, qui sont composées à plus de 95% d'eau. C'est au cours de ce processus de détoxification que des espèces réactives peuvent se former et induire ainsi une sensibilisation cutanée.³⁴

L'alcool cinnamique, dégageant une agréable odeur de jacinthe et issu de l'essence de cannelle, et l'eugénol, qui est présent dans de nombreux produits naturels tel que les feuilles de laurier ou la cannelle giroflée, sont des exemples de pro-haptènes (*Figure 17*).

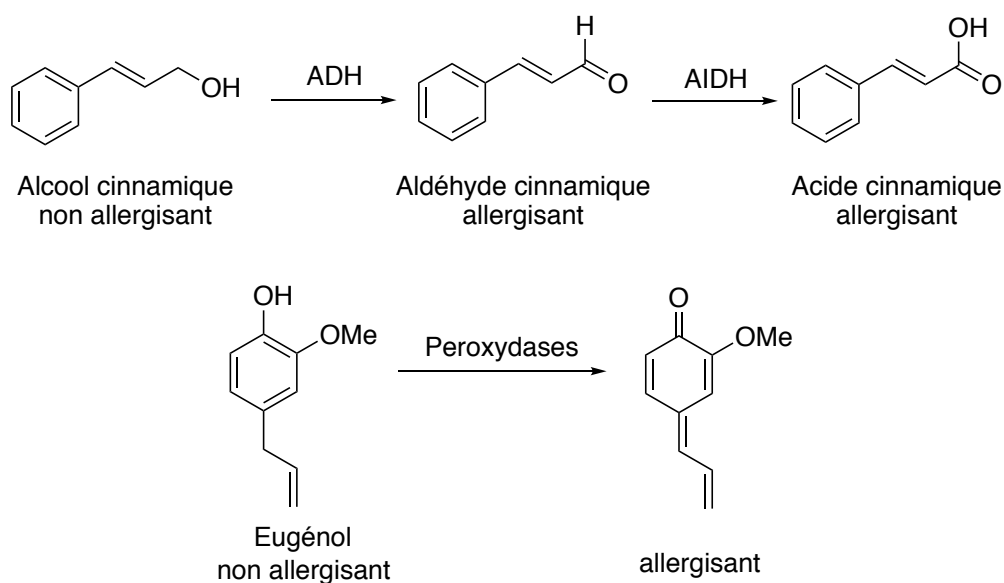


Figure 17 : Exemples de pro-haptènes pouvant être activés par des alcool deshydrogénases (ADH et AIDH) et par les peroxydases.

Les pré-haptènes

Afin de clarifier la classification des molécules sensibilisantes et d'approfondir les recherches sur la manière dont les molécules non réactives réagissent avec les protéines pour former des antigènes, Lepoittevin a suggéré, en 2006, d'introduire une nouvelle classe d'haptène, appelée «pré-haptène», caractérisant les molécules sensibilisantes non réactives devenues "haptènes" par transformation chimique et ce sans recourir à un système enzymatique spécifique.³³ Ainsi, les molécules non réactives transformées en composés réactifs par oxydation à l'air (autoxydation) ou par photoactivation par exemple, font partie de cette catégorie.

Plusieurs molécules suivent ce type de transformations chimiques, les plus recensées étant les terpènes. Les terpènes ont la particularité de s'oxyder facilement lors de leur exposition à l'air pour former des hydroperoxydes allyliques qui possèdent pour la plupart un potentiel sensibilisant élevé. La colophane en est un exemple. Issue de résines de conifères (pin, sapin...) elle est utilisée dans une large variété de produits comme les chaussures, les bottes en caoutchouc, sur certains papiers, dans la colle des timbres ou des sparadraps, mais également dans les cosmétiques (mascaras, vernis à ongles...) ou dans les produits d'entretien en raison de ses propriétés adhésives, émulsifiantes et isolantes.^{35,36} Elle est constituée d'un mélange complexe d'une centaine de composés, l'acide abiétique étant le composant principal. Elle possède une très faible activité allergénique. Cependant, la colophane forme des produits d'oxydation allergisants lorsqu'elle est exposée à l'air (*Figure 18*). Ainsi, l'acide 15-hydroperoxyabiétique (15-HPA), issu de l'autoxydation de l'acide abiétique, est le responsable majeur du pouvoir sensibilisant de la colophane. Lors de tests épicutanés sur des patients allergiques à la colophane en utilisant l'ester méthylique de l'acide 15-HPA isolé par chromatographie, une réaction positive à l'hydroperoxyde avait été constatée chez 57% des sujets.³⁷

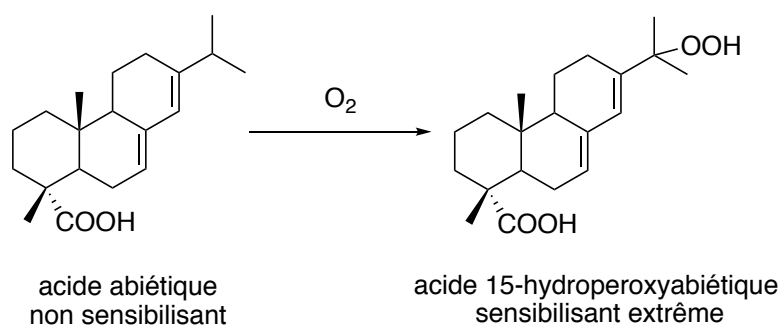


Figure 18 : Exemple de pré-haptène, l'acide abiétique s'oxyde lorsqu'il est exposé à l'air et devient l'acide 15-hydroperoxyabiétique.

Un autre exemple de pré-haptène bien plus controversé et non terpénique est la *para*-phénylènediamine (PPD). Il s'agit d'un des ingrédients majeurs de la composition de colorants capillaires ou de textiles entraînant des dermatites sévères du visage et du cuir chevelu.³⁸ Elle est responsable également de nombreux cas d'allergie aux tatouages éphémères au henné. Elle est ajoutée à la composition afin de rendre les colorations plus foncées (*Figure 19*).

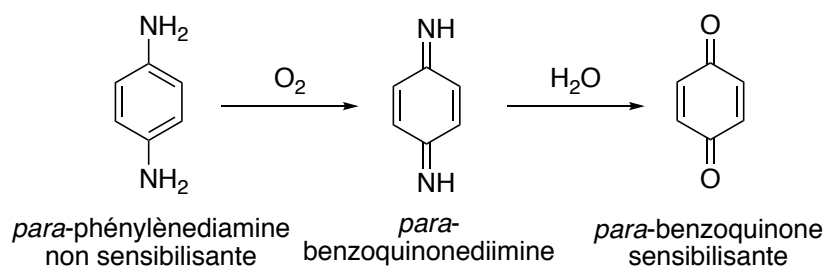


Figure 19 : Oxydation de la *para*-phénylènediamine.

Depuis 2005, la législation européenne interdit cette substance dans les cosmétiques en contact avec la peau. Cependant, elle demeure présente dans les colorations capillaires sous réserve de la concentration employée dans les préparations prêtes à l'emploi qui ne doit pas dépasser 10 %.⁴

Ce travail de thèse a porté sur les pré-haptènes et, plus particulièrement, sur les terpènes. Les terpènes sont des produits naturels issus majoritairement des plantes. Ils sont à l'origine de leurs propriétés olfactives, d'où leur utilisation en parfumerie et en cosmétique, mais ils jouent également le rôle de régulateurs de croissance.

2. Évaluation du potentiel sensibilisant des allergènes

Dû à l'augmentation de la prévalence de l'allergie de contact, il est de nos jours primordial de prédire les molécules qui peuvent induire une sensibilisation cutanée avant leur mise sur le marché. Étant une maladie incurable, il est ainsi impératif de pouvoir contrôler la présence de ces substances allergènes dans les produits de consommation afin de prendre des mesures préventives.

Les directives et la législation européennes demandent aujourd'hui à l'industrie de procéder à une évaluation des risques liés aux produits chimiques afin de protéger la santé humaine et l'environnement. La législation REACH (Enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des substances chimiques) du Parlement Européen et du Conseil à compter du 1er juin 2007 devait permettre la collecte d'informations sur plus de 30 000 composés sur une période de onze ans.³⁹ En outre, REACH encourage l'industrie à utiliser des tests alternatifs à ceux conduits sur des animaux pour réaliser une évaluation de la toxicité.

En 2013, les essais sur des animaux pour l'évaluation de la toxicité des ingrédients utilisés dans les cosmétiques ont été interdits, comme il avait été indiqué dans le 7ème amendement de la directive européenne sur les produits cosmétiques.⁴ Aujourd'hui et en conséquence, plusieurs méthodes alternatives à l'expérimentation animale ont été développées pour évaluer

le potentiel sensibilisant des produits chimiques et ont été approuvées par le Centre Européen de Validation des Méthodes Alternatives (ECVAM), conjointement avec l'établissement de lignes directrices de l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE). Ces méthodes reposent sur différentes étapes physiologiques conduisant à une sensibilisation de la peau. Ce sont à la fois des méthodes qualitatives et quantitatives qui ont été mises en place au cours de la dernière décennie afin de détecter dans un premier temps les substances causant une dermatite de contact puis de les classer en fonction de leur capacité à induire la sensibilisation.

La mise en commun des connaissances sur les mécanismes chimiques et biologiques liés à la sensibilisation cutanée a permis de cartographier les différents paramètres prometteurs permettant d'évaluer le potentiel sensibilisant. Ainsi, l'Adverse Outcome Pathway (AOP) est un aperçu de cet ensemble commun de critères, répertoriés dans le but de perfectionner et de guider les stratégies de détection du potentiel sensibilisant d'une substance. Les informations ont été rassemblées pour chaque méthode de test en collaboration avec les développeurs (Figure 20).⁴⁰

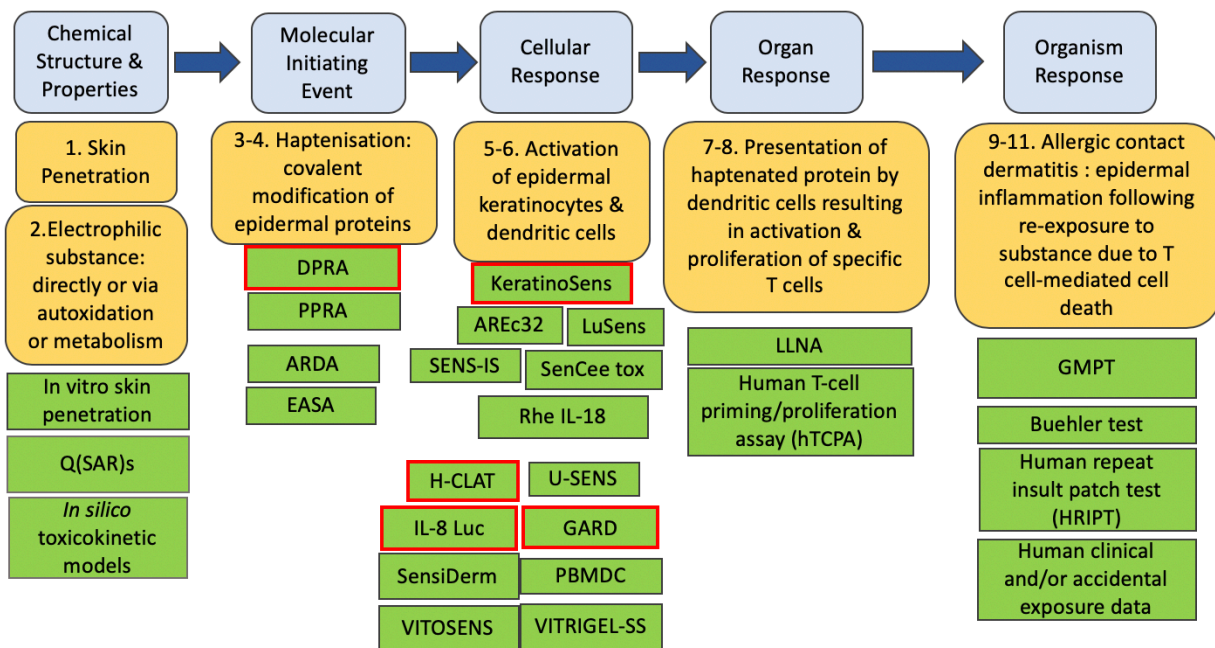


Figure 20 : Méthodes alternatives à l'expérimentation animale et leur correspondance à l'AOP établie pour la sensibilisation cutanée. Chacune des méthodes alternatives développées ne permettent l'étude que d'une étape clé à la fois. Les méthodes présentées dans les cadres rouges constituent celles actuellement validées par l'OCDE.⁴⁰

Dans cette section de l'introduction générale, seules les méthodes d'évaluation de l'allergénicité des composés chimiques qui nous ont semblées les plus pertinentes sont présentées.

2.1. Méthodes *in vivo*

Les méthodes *in vivo* (études sur l'animal) sont, d'un point de vue historique, les méthodes de détection des produits allergisants les plus anciennes. Après diverses études réalisées sur des volontaires humains, le cochon d'Inde était devenu l'animal de choix pour les tests de sensibilisation prédictifs depuis plusieurs décennies.

L'équipe de Buehler mit en place dans les années 60 une méthode consistant à évaluer le potentiel d'élicitation dû à un sensibilisant cutané.⁴¹ Ce test consiste en une application topique de la substance à tester. Cette application est répétée après un délai de 12 jours, temps nécessaire à l'induction de la sensibilisation. Ainsi, la lecture s'effectue lors de la phase d'élicitation durant laquelle apparaît les symptômes cliniques (rougeurs, erythèmes...). L'apparition de rougeur ou d'œdème chez plus de 15 % des cochons d'Inde en comparaison avec les animaux contrôles permet d'affirmer le pouvoir sensibilisant de la molécule testée. Au total, 30 animaux sont utiles pour ce test : un groupe témoin de 10 animaux et un groupe de test composé de 20 animaux. C'est sur une durée de 30 à 32 jours que ce test est réalisé.⁴²

Le test de maximisation du cochon d'Inde ou Guinea Pig Maximization Test (GPMT), développé par Magnusson et Kligman, repose sur le même principe que celui développé par Buehler.⁴³ Cette fois-ci, les cochons d'Inde sont exposés à la substance étudiée par injection intradermique. La lecture des résultats dans le GPMT est plus rapide que dans le test de Buehler (22 à 23 jours contre 29 à 30 jours). Cependant, ces deux méthodes sollicitent un nombre important de cobayes.

Dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés dans le test de Buehler et dans le GPMT, mais également dans l'espoir d'avoir les résultats de tests plus rapidement, Kimber et Basketter ont développé dans les années 90 une nouvelle méthode basée sur la souris.⁴⁴ L'essai des ganglions lymphatiques locaux ou LLNA (Local Lymph Node Assay) permettait de détecter la prolifération lymphocytaire au sein des ganglions drainant le site où a été appliquée la molécule à tester.⁴⁵ C'était donc pour la première fois qu'était développé un essai basé sur la phase de sensibilisation et non sur la phase d'élicitation. La molécule étudiée est appliquée par voie topique sur le dos de l'oreille de la souris une fois par jour pendant trois jours consécutifs. Au bout du sixième jour, de la thymidine tritiée, un radioisotope, est injectée par voie intraveineuse à l'animal. Cinq heures plus tard, l'animal est sacrifié et les ganglions lymphatiques proximaux de l'oreille de la souris sont excisés. Ainsi, la prolifération des lymphocytes est mesurée par son taux de radioactivité en utilisant la β -scintillation (*Figure 21*).⁴⁶

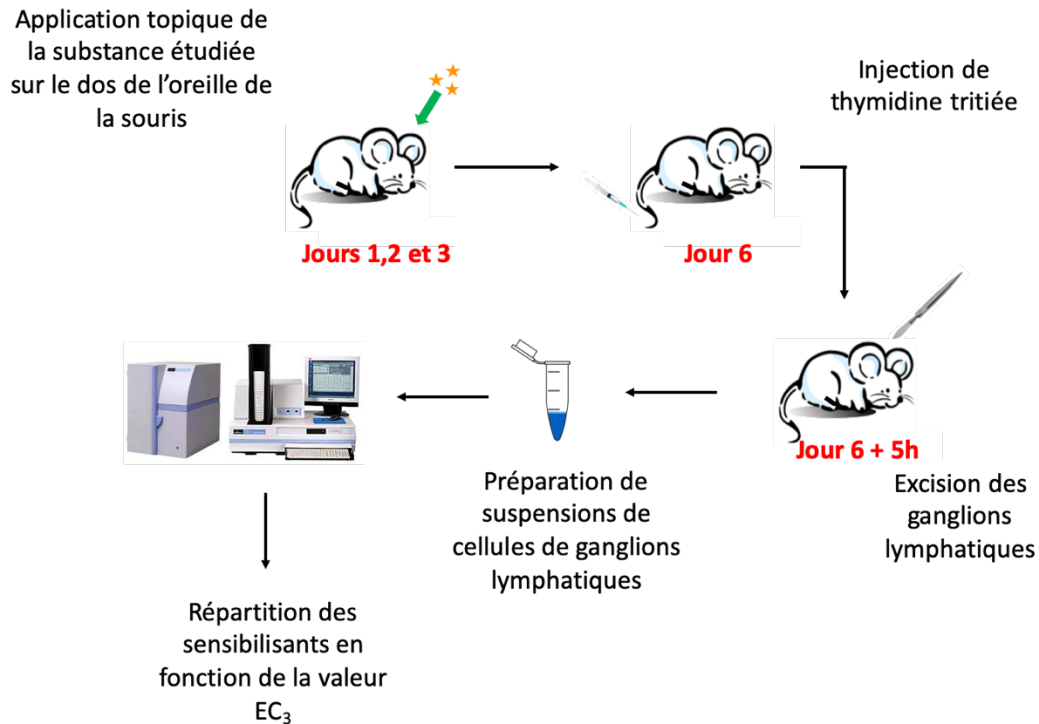


Figure 21 : Protocol expérimental du LLNA.

En pratique, une substance chimique capable de provoquer une prolifération de lymphocytes trois fois supérieure au témoin sera considérée comme sensibilisante. Les composés peuvent alors être classés en fonction de leur valeur d' EC_3 correspondant à la dose nécessaire pour provoquer un index de stimulation de trois (Tableau 2).

Tableau 2 : Classification du potentiel sensibilisant des composés chimiques en utilisant les valeurs EC_3 du LLNA.

Valeur de EC_3 (%)	Potentiel de sensibilisation
$EC_3 > 100$	Non sensibilisant
$10 \leq EC_3 \leq 100$	Faible
$1 \leq EC_3 \leq 10$	Modéré
$0.1 < EC_3 < 1$	Fort
$EC_3 < 0.1$	Extrême

Les méthodes *in vivo* ont été largement utilisées pendant de nombreuses années mais sont aujourd'hui interdites. En effet, le règlement Européen sur les produits cosmétiques No

1223/ 2009 établissant des règles concernant la composition, l'étiquetage et l'emballage des produits cosmétiques, met en place l'interdiction de tester les produits cosmétiques ainsi que leurs ingrédients sur les animaux (interdiction de l'expérimentation) et de les mettre à la suite sur le marché.⁴ En parallèle, la réglementation européenne REACH souhaite un contrôle des substances chimiques extrêmement préoccupantes mises sur le marché européen.³⁹

Au vu de ces interdictions et à la demande de l'Union Européenne, des méthodes dites « alternatives » aux tests sur les animaux ont alors été développées.

2.2. Méthodes *in vitro*

Au cours des années 2000, les méthodes *in vitro* font leur apparition. Elles reposent essentiellement sur l'utilisation soit de cellules dendritiques soit de kératinocytes. C'est l'activation de ces cellules qui sera alors exploitée pour évaluer le potentiel sensibilisant d'une molécule. Ainsi, les essais Human Cell Line Activation Test (h-CLAT), Myeloid U-937 Skin Sensitization Test (MUSST) et le KeratinoSens® ont été développés.

Le h-CLAT mesure l'expression des protéines de surface CD86 et CD54 des cellules dendritiques. La présence d'allergènes conduit en effet à une surexpression des CD54 et CD86 à la surface des cellules THP-1 aujourd'hui utilisées comme modèle de cellules dendritiques.⁴⁷ C'est en utilisant la cytométrie en flux après une exposition de 24 heures avec la substance à tester que la surexpression est mesurée. Les cellules THP-1 sont d'abord incubées avec le composé chimique à tester durant 24 heures. Un marquage fluorescent d'anticorps spécifiques, soit des protéines CD54, soit des protéines CD86, est réalisé ensuite. La fluorescence est mesurée par cytométrie de flux puis comparée aux contrôles. Ainsi, des résultats d'intensité de fluorescence relative (RFI) sont établis. Dans le cas où les cellules THP-1 incubées en présence de l'allergène expriment 1,5 fois plus les protéines CD86 et CD54 que le contrôle (RFI >150 %), la substance testée est alors répertoriée sensibilisante. Ce test a été validé par l'OCDE sous la ligne directrice 442E en Juillet 2016.⁴⁸

En parallèle, Python et *al.* développèrent le MUSST reposant sur le même principe que le h-CLAT.⁴⁹ Dans cet essai, ce sont les cellules U-937 de la lignée cellulaire myéloïde humaine qui sont utilisées. Les cellules U-937 sont exposées à la molécule à tester durant 48 heures. Puis, grâce à un anticorps fluorescent spécifique des protéines CD86 la fluorescence est mesurée et comparée aux contrôles. Ainsi, un résultat d'intensité de fluorescence relative (RFI) est établi. Dans le cas où la molécule testée induit de manière significative l'activation de l'expression des protéines CD86 de 1,2 fois plus que le contrôle (RFI > 120 %), elle est alors répertoriée comme étant sensibilisante.

Le test KeratinoSens[®] repose sur l'utilisation de la lignée cellulaire de kératinocytes humains HaCaT qui après modification génétique et en présence de substance sensibilisante, sont capables de produire de la luciférase.^{50,51} Cette enzyme est fluorescente lorsque son substrat, la luciférine, est présente. L'évaluation du sensibilisant s'effectue donc grâce à l'induction de la luciférase. Après 48 heures d'incubation avec le composé à tester, le substrat de la luciférase, la luciférine, est ajouté et la luminescence est mesurée après 20 minutes. L'activité de la luciférase est ensuite corrélée à la concentration nécessaire pour induire une activation de 1,5. Un taux d'activation (EC 1,5) supérieur à 1,5 fois par rapport à un témoin (correspondant à une augmentation de 50% de l'activité du gène) est considéré comme induisant une réponse immunogène. C'est sous la ligne directrice 442D que ce test a été validé par l'OCDE.⁵²

Aujourd'hui, de nouvelles stratégies prometteuses reposent sur l'exploitation de peaux humaines reconstituées. Suite à l'exposition de ces modèles 3D de peau à des sensibilisants, l'activation des cellules de Langerhans est étudiée dans le but de déterminer le potentiel sensibilisant des composés testés.⁵³ Plus récemment, le test SENS-IS a été développé. Il est basé sur la surveillance de la surexpression quantitative de biomarqueurs spécifiques de l'irritation et de la sensibilisation après application de produits chimiques sur des modèles 3D d'épidermes humains reconstitués (EpiskinTM).⁵⁴

2.3. Méthodes *in silico*

Les méthodes *in silico* (modèles informatiques) reposent essentiellement sur les relations de structure-activité des composés allergisants. Ainsi, leurs propriétés physico-chimiques peuvent être corrélées avec le pouvoir sensibilisant des allergènes. Pour ce faire, des outils informatiques ont été développés permettant la prédiction du potentiel sensibilisant des allergènes cutanés. Il existe à l'heure actuelle, trois approches différentes reposant sur les relations de structure-activité.⁵⁵

Les bases de données

Les bases de données regroupent un nombre important de cas d'allergie signalés dans les différents hôpitaux. Elles sont principalement liées aux données cliniques et non chimiques. C'est de cette façon que Benezra *et al.* avaient élaboré une première base de données en regroupant toutes les observations publiées dans le Journal of Investigative Dermatology de 1975 à 1982. Le programme ainsi obtenu, nommé PROPHET, permettait déjà dans les

années 80 de rechercher des composés par structure chimique.⁵⁶ Cependant, PROPHET ne recueillait que des cas de dermatite de contact atypiques en ne reflétant pas les allergènes les plus pertinents de la population en général.

Les logiciels informatiques experts

Les logiciels dit « experts » reposent sur la comparaison entre les motifs moléculaires de l'allergène supposés être réactifs avec ceux répertoriés en guise d'alertes structurales.^{57,58} D'autres paramètres sont également pris en compte, notamment la capacité de l'allergène à pénétrer l'épiderme ou encore à réagir avec les protéines. Parmi les logiciels experts, le Deductive Estimation of Risk from existing Knowledge (DEREK) et le TOxicity Prediction by Komputer Assisted Technology (TOPKAT) ont été développés. DEREK a été élaboré à partir de 294 molécules désignées comme allergènes par le GPMT. Les cycles hétérocycliques ou aromatiques, les fonctions ionisables et les fonctions chimiques réactives y sont répertoriés.⁵⁹ Le TOPKAT est également basé sur les résultats des études du GPMT. Il est en plus capable de prédire si une molécule polyaromatique peut être un sensibilisant cutané et, pour les structures aliphatiques, il est capable de distinguer le degré de puissance de l'allergène (faible, modéré ou fort).⁶⁰ Ces deux logiciels continuent à être mis à jour régulièrement par de nouvelles données. Cependant, ils présentent quelques limitations notamment dans leur incapacité à intégrer les pré-haptènes et les pro-haptènes, nécessitant une étape préalable de transformation chimique pour devenir réactifs.

Les méthodes quantitatives basées sur la relation structure-activité

Le QSAR ou relation quantitative structure-activité (Quantitative structure activity relationships) permet une corrélation entre la structure chimique et l'activité biologique et ce de manière quantitative. De cette façon le test du RAI (Relative Alkylation Index) avait été mis au point dans les années 1990. Dans le domaine de l'allergie de contact, il s'agit de la méthode QSAR la plus utilisée. Ce test repose essentiellement sur la réactivité des produits chimiques (SN₂, accepteurs de Michael...) avec les protéines. Les molécules sont répertoriées selon leurs classes chimiques et elles sont caractérisées par une équation permettant la prédiction du potentiel sensibilisant.^{61,62} Cette équation tient compte de trois éléments essentiels que sont la dose appliquée de la molécule testée, sa lipophilie mais aussi sa réactivité chimique.⁶³

$$\text{RAI} = a \times \log(k) + b \times \log(P) + \log(D)$$

avec k la constante cinétique de la réaction entre la molécule testée et le nucléophile modèle, P le coefficient de partage octanol/eau, D la dose du produit à tester et a , b et c le poids de chacun des paramètres.

Le RAI était uniquement basé au départ sur les résultats des études du GPMT, mais il a très rapidement été mis à jour par les données issues du LLNA. Le RAI présente tout de même des limitations malgré une précision du potentiel sensibilisant correcte. Il ne permet pas l'évaluation de deux allergènes issus de familles chimiques distinctes. En d'autres termes, aucune corrélation ne peut être faite entre deux classes chimiques différentes.

La plupart de ces méthodes sont recommandées par l'OCDE et même une boîte à outils a été développée en tant que logiciel fournissant une approche permettant de prédire le potentiel sensibilisant des composés chimique.^{64,65}

Tous ces logiciels complétant les méthodes *in silico*, basés essentiellement sur les mécanismes de réaction de l'interaction haptène-protéine, sont d'une grande utilité mais peuvent tout de même être limités par des résultats contradictoires issus de méthodes *in vivo* telles que le LLNA.⁶⁶

2.4. Méthodes *in chemico*

Étant donné que la réactivité des haptènes vis-à-vis des protéines cutanées est une première étape clé dans l'induction de toute sensibilisation cutanée, il a été émis l'hypothèse que cette réactivité pourrait être utilisée afin d'évaluer le potentiel de sensibilisation des produits chimiques. Par conséquent, l'équipe de Gerberick en collaboration avec l'équipe de Lepoittevin ont eu l'idée de développer en 2004 un test basé sur la réactivité peptidique appelé Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA).⁶⁷

La procédure consiste en l'incubation de la molécule à tester avec un peptide pendant 24 heures à température ambiante. Puis, la déplétion du peptide est mesurée par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) couplée à une détection UV. Une déplétion précise observée du peptide corrèle théoriquement avec l'allergène ayant réagi et donc avec son potentiel sensibilisant. Lors du développement du DPRA, le glutathion (GSH) et trois peptides synthétiques avaient été sélectionnés. La séquence principale des peptides synthétiques était *N*-Ac-Arg-Phe-Ala-Ala-X-Ala-Ala, avec X représentant la cystéine, l'histidine ou la lysine. Ensuite, en raison de la faible réactivité observée du peptide contenant l'histidine vis-à-vis des molécules cibles, celui-ci avait été abandonné. Aujourd'hui, le produit chimique doit être testé en l'incubant dans des proportions peptide/molécule avec un ratio 1 : 10 et 1 : 50 avec les peptides cystéine (Pep-Cys) et lysine (Pep-Lys) respectivement. Sur 82 molécules

testées dans les premiers essais du DPRA, si une déplétion de plus de 10 % était observée pour l'un de ces peptides, la molécule était alors répertoriée en tant que sensibilisante.

Pour permettre ensuite la classification de ces molécules répertoriées sensibilisantes en fonction de leur potentiel sensibilisant, un arbre décisionnel a été élaboré par la suite. Cet arbre décisionnel se base sur les données de déplétion peptidiques obtenues avec Pep-Cys et Pep-Lys, et permet, en fonction de ces mesures de classer les composés chimiques en plusieurs catégories : non sensibilisants, sensibilisants faibles, sensibilisants modérés et sensibilisants forts (Figure 22).⁶⁸

Ces premiers essais avec 82 molécules avaient confirmé une bonne précision du DPRA concernant la prédiction des allergènes de l'ordre de 89 %, ainsi qu'une bonne corrélation entre le pouvoir sensibilisant des molécules mesurés à l'aide du LLNA et leur réactivité envers les peptides.

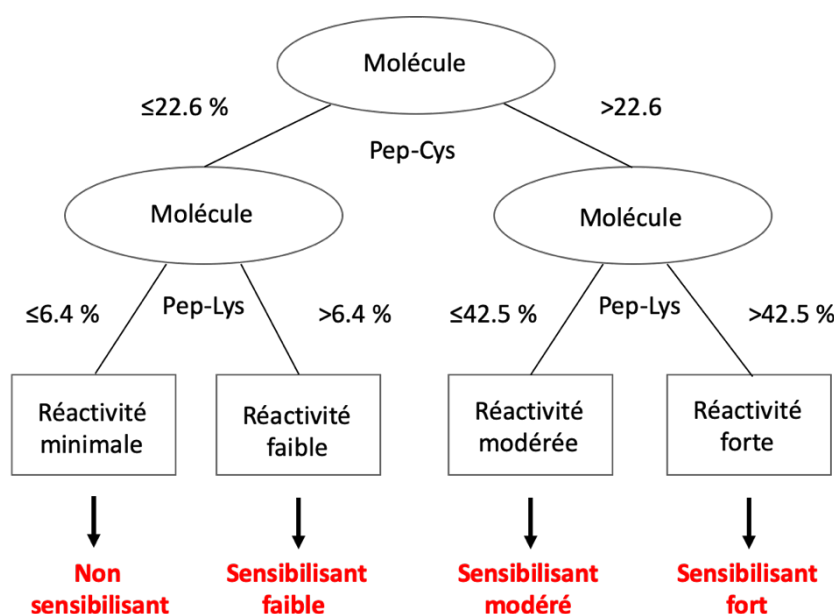


Figure 22 : Arbre décisionnel de classification des allergènes selon la méthode du DPRA.⁶⁸

Ces données ont démontré qu'il existe en effet une corrélation significative entre le pouvoir de sensibilisation d'un produit chimique et sa capacité à réagir avec des peptides contenant des acides aminés nucléophiles tels que la cystéine et la lysine. Le DPRA a été accepté et validé par l'OCDE en février 2015 sous la ligne directrice 442C.⁶⁹

Cependant, le DPRA présentait à ce stade quelques limitations notamment dans la difficulté pour la prédiction des sensibilisants faibles et le manque d'information sur le type d'adduits formés. De plus, le DPRA était uniquement compatible avec les haptènes dont la structure permet de réagir directement avec des peptides. Dans certains cas, des pré-

haptènes pouvaient être détectés mais les pro-haptènes ne l'étaient pas à moins qu'un système enzymatique ait été ajouté à l'analyse pour les convertir en molécules réactives.⁶⁸

En conséquence, dans un deuxième temps, l'équipe de Gerberick développa à partir du DPRA, le Peroxidase Peptide Reactivity Assay (PPRA).⁷⁰ Le PPRA est une approche pragmatique pour l'activation enzymatique des pro-haptènes basée sur l'utilisation du binôme peroxydase de raifort-peroxyde d'hydrogène (HRP/H₂O₂) comme système d'oxydation.

Le Pep-Cys est incubé pendant 24 heures en présence de HRP/H₂O₂ et de la molécule à tester. Après incubation, la déplétion peptidique est mesurée par HPLC couplée à une détection par spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS), rapide et compatible avec le criblage à haut débit (*Figure 23*).

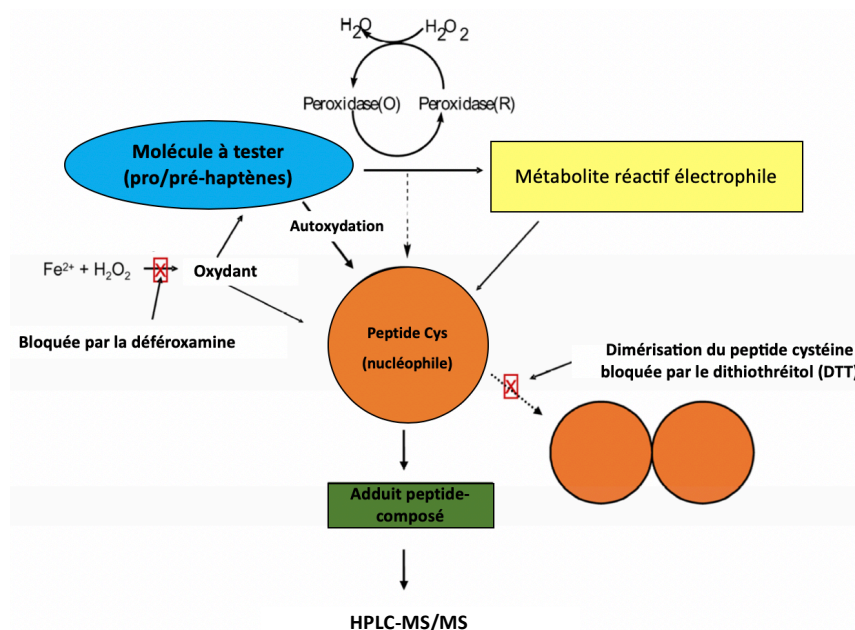


Figure 23 : Schéma du Peroxidase Peptide Reactivity Assay (PPRA) avec le Pep-Cys.

En présence du Pep-Cys, de la déféroxamine, agent chélateur de fer, est introduite afin d'inhiber la réaction de Fenton qui conduirait à la formation d'espèces radicalaires oxygénées. D'autre part, du dithiothréitol est ajouté avant chaque analyse HPLC-MS/MS pour réduire les éventuels dimères du peptide cystéine pouvant se former dans ce milieu oxydant pouvant ainsi perturber les mesures de déplétion. En comparaison avec les évaluations de la réactivité « directe » sans HRP/H₂O₂, des augmentations statistiquement significatives de la déplétion des peptides pour tous les comportements examinés ont été observées à la suite de la co-incubation avec HRP/H₂O₂.

Cette méthode permet de différencier les pré- et les pro-haptènes. La distinction repose sur la réaction des pré-haptènes avec le peptide cystéine en présence ou non du système oxydant HRP/H₂O₂. Quant au pro-haptène, ils réagissent avec le peptide cystéine uniquement en présence du système oxydant HRP/H₂O₂.⁷⁰

Les résultats obtenus avec le test du PPRA permettent donc de compléter ceux obtenus avec le DPRA.

Il existe d'autres méthodes *in chemico* basées sur la spectroscopie de masse ou l'utilisation de glutathion mais le DPRA est la seule méthode *in chemico* validée représentant la première étape clé définie pour la sensibilisation cutanée, à savoir la modification covalente par l'haptène des protéines de l'épiderme.

Enfin, il est de nos jours admis qu'une seule méthode alternative permettant l'estimation du potentiel sensibilisant n'est pas suffisante pour rejoindre les événements importants présentés par l'AOP de la sensibilisation cutanée, ce qui signifie que des stratégies visant à combiner les résultats de ces méthodes doivent être développées.⁷¹

3. Présentation du projet de recherche

Comme décrit précédemment, il existe des molécules sensibilisantes non électrophiles suspectées de modifier les protéines cutanées par des mécanismes radicalaires. Ceci concerne particulièrement les hydroperoxydes allyliques dérivés de l'autoxydation de terpènes naturels largement utilisés pour leurs propriétés odorantes dans les parfums et les cosmétiques. Des endoperoxydes issus de l'autoxydation de terpènes sont suspectés d'induire également ces mécanismes radicalaires.

3.1. Les terpènes

Les terpènes sont des composés d'origine naturelle largement utilisés dans la production de parfums fins et dans une grande variété de produits cosmétiques, domestiques et industriels. Le terme terpène provient de la térébenthine (*Balsamum terebinthinae*). La « térébenthine », appelée résine de pin, est une oléorésine visqueuse au parfum agréable qui coule lors de la découpe de l'écorce de bois de plusieurs espèces de pin (*Pinaceae*). La térébenthine contient des "acides résiniques" et certains hydrocarbures, appelés à l'origine terpènes. Traditionnellement, tous les composés naturels constitués de sous-unités d'isoprène et provenant pour la plupart de plantes sont désignés sous le nom de terpène.⁷²

Les terpènes constituent le groupe le plus important de produits naturels issus des cellules végétales. Comprenant au moins 30000 composés, ils ont un très large éventail de types de structure.⁷³ À part leurs propriétés odorantes, ils sont impliqués dans les fonctions métaboliques essentielles des végétaux. En raison de leur alternance de liaisons simples et de liaisons doubles, ils sont sujets à des réactions d'autoxydation.

Dans la nature, les terpènes se présentent principalement sous forme d'hydrocarbures, d'alcools et de leurs glycosides, d'éthers, d'aldéhydes, de cétones, d'acides carboxyliques et d'esters de formule générale $(C_5H_8)_n$. Leur unité structurale de base correspond au 2-méthylbutane, généralement appelé unité isoprène, qui constitue le squelette carboné des terpènes. Par conséquent, les terpènes sont aussi dénommés isoprénoïdes. L'isoprène est présent sous forme de diphosphate d'isopentyle (IPP) et de diphosphate de diméthylallyle (DMAPP). Les voies de biogenèse des isoprénoïdes par la règle de l'isoprène ont été proposées par Ruzicka en 1953.⁷⁴ La partie isopropyle du 2-méthylbutane est définie comme la tête et le résidu éthyle comme la queue. En fonction du nombre de sous-unités d'isoprène, plus d'une centaine de squelettes de carbone de monoterpènes ($n=2$, $C_{10}H_{16}$), de sesquiterpènes ($n=3$, $C_{15}H_{24}$), de diterpènes ($n=4$, $C_{20}H_{32}$), de sesterterpènes ($n=5$, $C_{25}H_{40}$) de triterpènes ($n=6$, $C_{30}H_{48}$) ou de tétraterpènes ($n=8$, $C_{40}H_{64}$) sont connus. Dans le cas des monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes et sesterterpènes, les unités isoprène sont liées les unes aux autres de la tête aux pieds. Les triterpènes et tétraterpènes, par contre, contiennent une connexion bout à bout au centre (*Figure 24*).

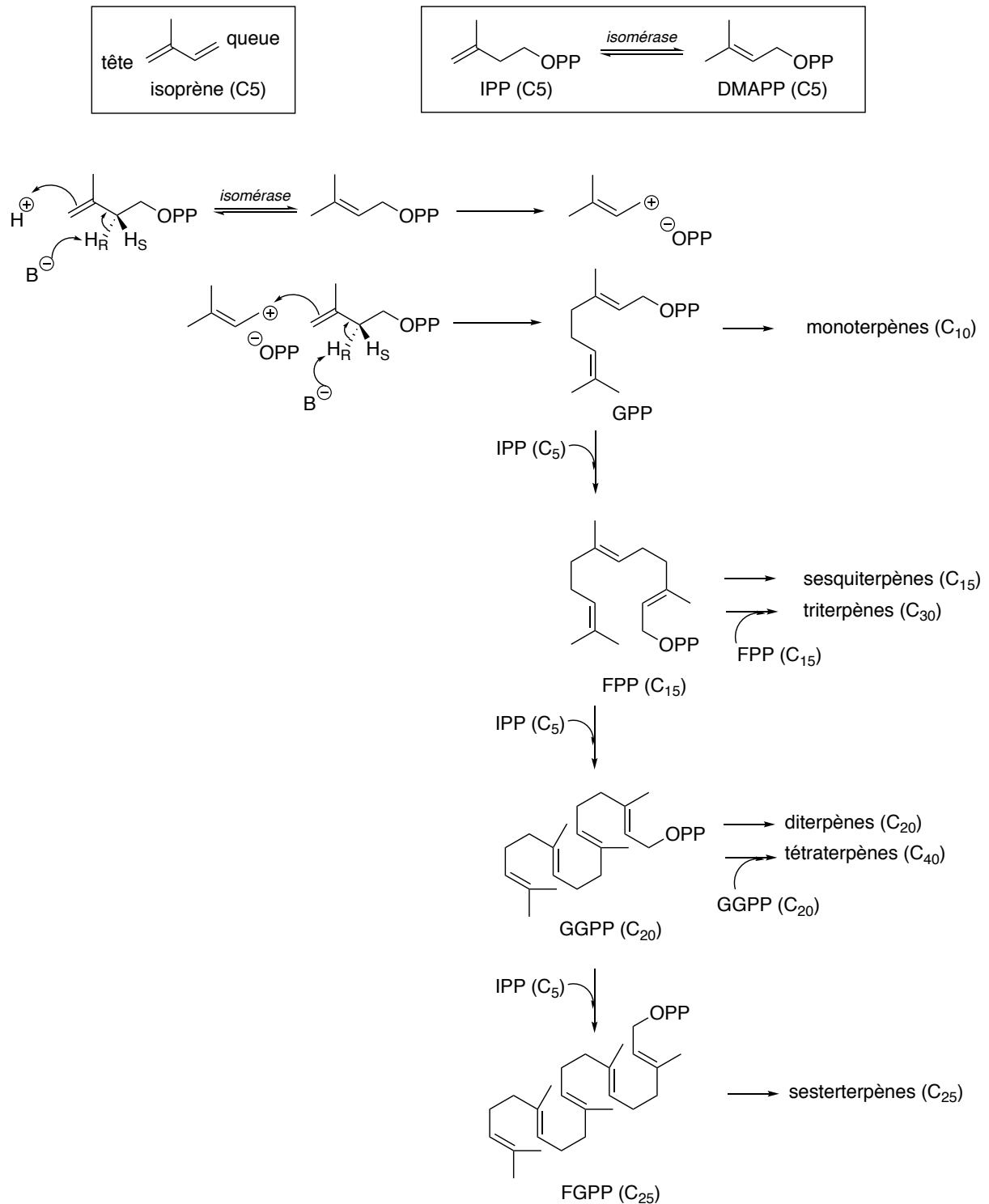


Figure 24 : Biosynthèse des terpènes (GPP=diphosphate de géranyle, FPP=diphosphate de farnésyle, GGPP = diphosphate de géranylgéranyle, FGPP= diphosphate de farnésylgéranyle).

On suppose généralement que les biogenèses des terpènes cycliques et polycycliques impliquent des ions carbéniums intermédiaires. Dans le cas simple des monoterpènes monocycliques tels que le limonène, le cation allylique restant après la séparation de l'anion

pyrophosphate se cyclise en un carbocation tertiaire stable qui par déprotonation fournit le *R*-limonène ou le *S*-limonène (Figure 25).

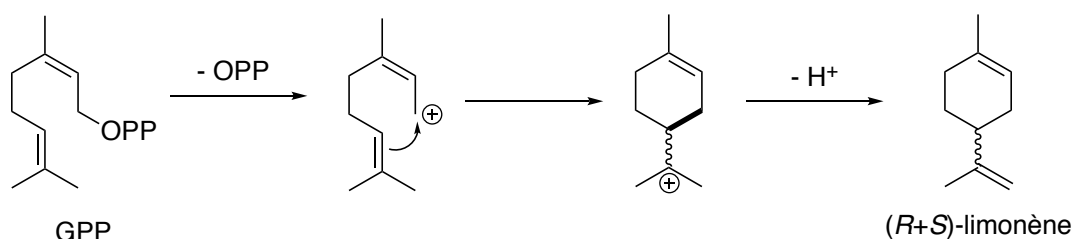


Figure 25 : Biogenèse du (R+S)-limonène.

3.2. Les hydroperoxydes et endoperoxydes allyliques dérivés de l'autoxydation des terpènes

Depuis les 20 dernières années, des dermatites de contact liées à des produits dérivés de l'autoxydation de composés non allergènes sont recensées. On peut s'attendre à ce que la plupart des composés organiques présentant des positions allyliques oxydables s'autoxydent lorsqu'ils sont exposés à l'air. En effet, les premières études datant du milieu du 20^{ème} siècle relatent ces faits en prouvant qu'un hydroperoxyde dérivé de l'autoxydation du Δ^3 -carène était responsable du potentiel allergénique de la térébenthine.⁷⁵

L'autoxydation est une réaction en chaîne radicalaire dans laquelle l'abstraction d'atomes d'hydrogène en position allylique avec une addition d'oxygène forme des hydroperoxydes (R-OOH) en tant que produits d'oxydation primaires. Une fois que les R-OOH sont formés, ils peuvent donner lieu à des antigènes spécifiques et agir en tant que sensibilisants cutanés.⁷⁶ La première étape d'initiation radicalaire est probablement induite par la lumière du jour, la chaleur ou une quantité catalytique de métal. Ainsi, cette initiation du processus d'autoxydation génère des radicaux R^{*} à partir de composés organiques. Lors de l'étape de propagation, deuxième étape du processus, les radicaux R^{*} sont capables de réagir avec l'oxygène à l'état triplet $^3\text{O}_2$ pour former des radicaux peroxyde ROO^{*}. Ces derniers peuvent extraire un hydrogène d'un composé organique pour former un hydroperoxyde et un nouveau radical R^{*}. L'abstraction d'hydrogène est une étape plus lente, favorisée par la présence d'hydrogènes labiles tels que les hydrogènes en position allylique dans les terpènes. Enfin, la dernière étape de terminaison concerne l'interaction entre deux radicaux R^{*}, entre un radical R^{*} et ROO^{*} ou bien entre deux radicaux ROO^{*} pour former une substance non radicalaire, autrement dit un produit diamagnétique (Figure 26).⁷⁷

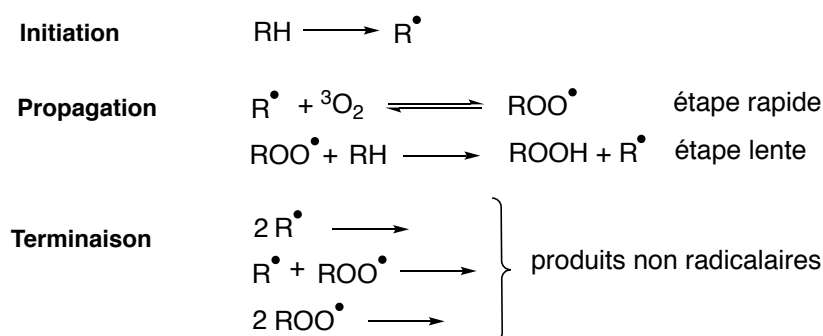


Figure 26 : Mécanisme général de l'autoxydation.

Ainsi, il a été démontré que le linalol (Figure 27) et le limonène (Figure 28) s'oxydaient facilement pour former des hydroperoxydes allyliques identifiés comme étant des sensibilisants puissants lors d'essais prédictifs sur les animaux.^{78,79} Les études cliniques menées en Europe ont également montré des réactions allergiques fréquentes aux hydroperoxydes du linalol et du *R*-(+)-limonène. Les résultats à l'issue des patch tests réalisés sur 2900 patients ont dévoilé 5.2 % de réactions positives au limonène oxydé à 3 % dans la vaseline (0.33 %) et 6.9 % présentait une réaction positive aux patch tests avec du linalol oxydé à 6.0 % (0.06 %) dans la vaseline.^{80,81} Par ailleurs, des tests ROAT ont montré que l'exposition répétée du linalol oxydé à de faibles concentrations induit une dermatite de contact chez les patients sensibilisés.⁸²

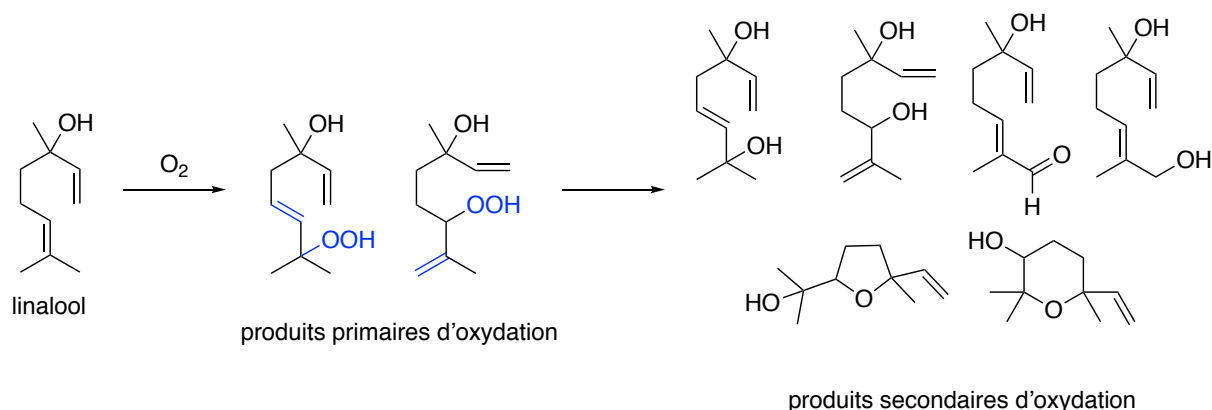


Figure 27 : Produits d'oxydation mis en évidence après autoxydation du linalol.⁷⁹

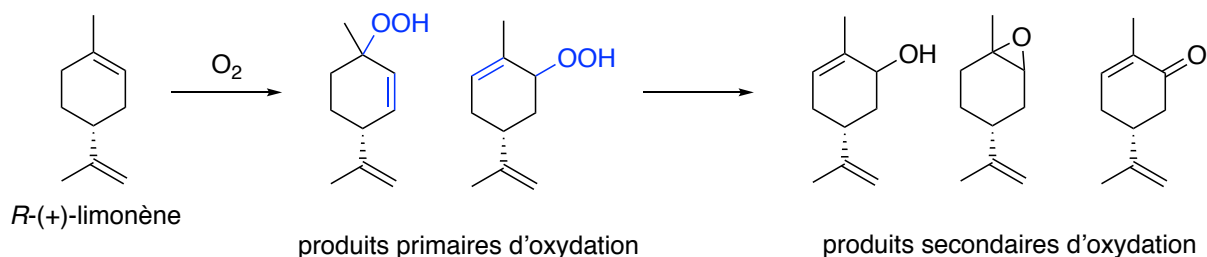


Figure 28 : Produits d'oxydation mis en évidence après autoxydation du *R*-(+)-limonène.

Les produits d'autoxydation secondaires correspondent à des époxydes, des cétones ou encore des diols issus de différents réarrangements.

Les hydroperoxydes allyliques dérivés de l'autoxydation du linalol et du limonène ne sont pas des composés électrophiles. Cependant, ils peuvent facilement former des intermédiaires radicalaires par clivage de la liaison O-O de la fonction chimique de l'hydroperoxyde, par le biais d'un mécanisme de transition électronique, conduisant à des radicaux oxygénés puis carbonés.

3.3. Objectifs de l'étude : Projet DEFCEMSKALL

3.3.1. Introduction

Le projet DEFCEMSKALL a visé à comprendre comment la réactivité chimique des allergènes par le biais de mécanismes de type radicalaire peut modifier spécifiquement l'environnement épidermique en fournissant des informations aux cellules immunitaires qui activeront ensuite le système immunitaire inné. Cette activation se traduira ensuite par l'apparition de symptômes cliniques caractérisant l'allergie de contact. Nous pensons que la réactivité chimique intrinsèque est le déclencheur essentiel qui fournit des informations au système immunitaire et alerte les mécanismes de défense de l'organisme. Cependant, la question de savoir précisément comment la réactivité chimique influence à la fois la réponse immunitaire, les processus de défense de la peau et le potentiel de la maladie reste une lacune à combler dans le domaine de l'allergie cutanée.

Une approche stratégique intégrée de trois actions a été donc proposée :

- *in chemico*, en menant des études de réactivité vis-à-vis des acides aminés pour établir un profil de réactivité complet suscitant des réactions radicalaires

- *in situ*, en étudiant la formation, le comportement et la décomposition des intermédiaires radicalaires formés dans un modèle 3D d'épiderme humain reconstitué (RHE)
- *in cellulo*, par l'examen de leur capacité à activer le système immunitaire inné, à savoir les cellules dendritiques dans leur contexte naturel kératinocytaire.

Ce projet de thèse DEFCHMSKALL s'inscrit dans le cadre d'une ANR internationale avec l'Allemagne. Toutes les études de synthèse, de réactivité et de mise en évidence de radicaux ont été faites au sein du laboratoire de Dermatochimie et du laboratoire POMAM (Propriétés Optiques et Magnétiques des Architectures Moléculaires, Université de Strasbourg, CNRS-UMR 7177) de Strasbourg. Les molécules, une fois synthétisées, ont été envoyées aux partenaires allemands qui se sont chargés des études « *in cellulo* » sur leur capacité à activer le système immunitaire, à savoir les cellules dendritiques dans leur contexte naturel kératinocytaire, et de confirmer l'effet ou stress oxydant induit par ces allergènes. Ces dernières études ont été réalisées en collaboration et au sein du Department of Environmental Toxicology de l'Université de Trèves (Allemagne).

Dans ce manuscrit, seuls les études réalisées au sein du laboratoire de Dermatochimie et du laboratoire POMAM sont présentées.

Les études ont porté sur les hydroperoxydes allyliques sensibilisants dérivés de l'autoxydation du *R*-(+)-limonène (**Lim-1-OOH**, **Lim-2-OOH**) et du (±)-β-citronellol ((±)-**Citr-6-OOH**, (±)-**Citr-7-OOH**) et sur un endoperoxyde, l'ascaridol (**Asc**) issu de l'autoxydation de l'α-terpinène (*Figure 29*).

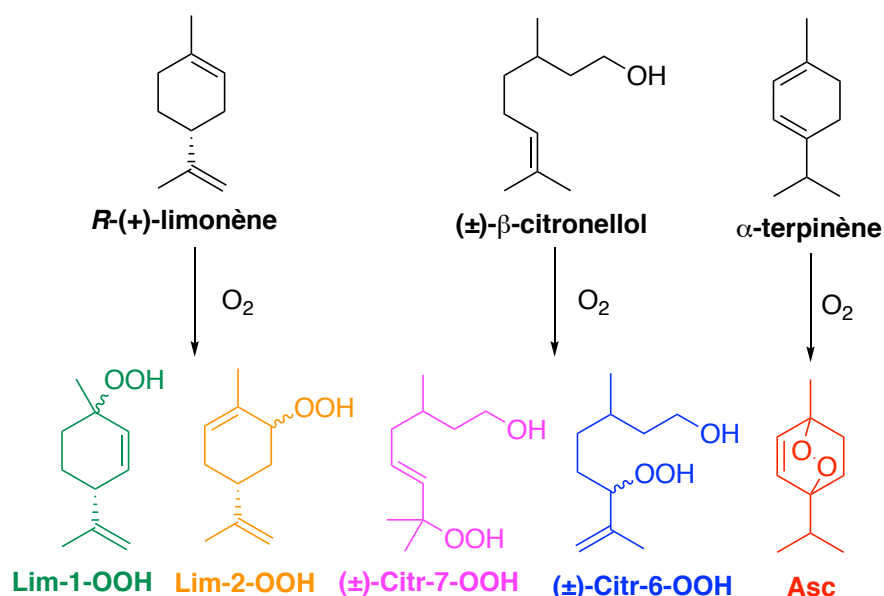


Figure 29 : Composés cibles.

Le *R*-(+)-limonène est le principal constituant odorant du genre *Citrus* qui évoque une senteur de citron. Il s'agit d'un sensibilisant très faible dans le test du LLNA mais il est capable de former de puissants produits d'oxydation allergéniques au contact de l'air.⁸³ Le citronellol, est présent dans les huiles de rose et de géranium. Le pouvoir sensibilisant élevé du citronellol autoxydé est principalement attribué au Citr-6-OOH et au Citr-7-OOH.⁸⁴ Ce comportement est similaire à celui du linalol présentant une structure chimique très proche.⁷⁹ Enfin, l'ascaridol est un endoperoxyde qui a été récemment signalé comme un sensibilisant potentiel avec des réactions cutanées concomitantes à l'huile de l'arbre à thé oxydée.⁸⁵

Les hydroperoxydes allyliques Lim-1-OOH, Lim-2-OOH et le mélange (±)-Citr-6-OOH/(±)-Citr-7-OOH ont été classés comme sensibilisants forts et modérés à l'issu du LLNA avec des valeurs de EC₃ comprises entre 0,3 et 2,3 %, alors que le *R*-(+)-limonène et le (±)-β-citronellol sont classés comme non sensibilisants (*Tableau 3*).^{37,86} Concernant l'ascaridol, il a été recensé comme étant un sensibilisant moyen.⁸⁷

Tableau 3 : Valeurs de EC₃ du LLNA pour les composés cibles.

Terpène	EC ₃ (%) ^a	Molécules cibles	EC ₃ (%) ^a
<i>R</i> -(+)limonène	30	Lim-1-OOH	0.33
		Lim-2-OOH	0.83
α-terpinène	8.9	Ascaridol	1.8
(±)-β-citronellol	43.5	(±)-Citr-6-OOH/(±)-Citr-7-OOH	2.3

a) EC₃ correspond à la concentration de produit chimique nécessaire pour induire une prolifération de lymphocytes T trois fois supérieure au contrôle. Classification du potentiel sensibilisant en fonction des valeurs de EC₃ : < 0.1% sensibilisant extrême ; 0.1 < EC₃ < 1 sensibilisant fort ; 1 ≤ EC₃ ≤ 10 sensibilisant modéré ; 10 ≤ EC₃ ≤ 100 sensibilisant faible ; EC₃ > 100 non sensibilisant.

3.3.2. Profil de réactivité chimique par des mécanismes radicalaires

La production des composés d'intérêt par autoxydation des terpènes correspondants n'est pas toujours reproductible, incluant notamment de faibles rendements ainsi qu'une séparation difficile des molécules souhaitées à partir des mélanges d'oxydation. Afin de mener nos études, nous avons en conséquence développé des voies de synthèse, courtes et reproductibles, conduisant à la production de ces composés. Celles-ci reposent essentiellement sur la réaction de Schenck « ène » ou sur une substitution nucléophile SN₁ /

SN₂ à partir d'alcools correspondants.^{88,89} Les voies de synthèses seront exposées dans le premier chapitre de ce manuscrit.

Nous pensons que ces composés forment des antigènes *via* des mécanismes de type radicalaire, commençant par le clivage de la liaison O-O de faible énergie de dissociation (175 kJ.mol⁻¹).⁹⁰ Ce clivage est un processus simple donnant naissance à des radicaux alkoxy (RO[•]) et peroxy (ROO[•]) instables. Au vu de leur instabilité et grâce à la présence de doubles liaisons, ils vont subir des réarrangements radicalaires divers tels que la cyclisation intramoléculaire, l'abstraction d'hydrogène allylique ou encore une β -scission et ainsi former des radicaux carbonés R[•] plus stables et de durée de vie plus longue.⁹¹

Des études préliminaires de réactivité ont été menées au laboratoire de Dermatochimie avec les hydroperoxydes dérivés du linalol vis-à-vis des acides aminés. Le suivi des réactions par RMN et par chromatographie en phase liquide combinée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) avaient prouvé que différents adduits covalents peuvent être formés impliquant des processus radicalaires entre certains acides aminés (cystéine, tryptophane, histidine) et des radicaux carbonés dérivés de l'hydroperoxyde (*Figure 30*).^{88,92} Il s'agit là d'une information substantielle car elle révèle que plusieurs intermédiaires radicalaires réactifs peuvent être issus de ces composés en fonction de leur structure chimique, et que différentes modifications chimiques de protéines potentiellement immunogènes pourraient ainsi conduire à une sensibilisation.

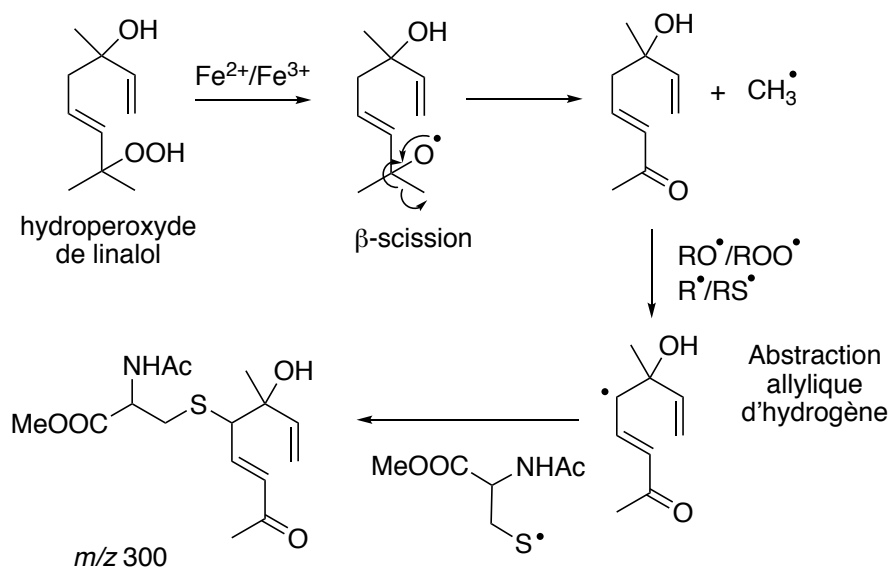


Figure 30 : Mécanisme proposé pour la formation d'un adduit observé par LC/MS-MS entre un hydroperoxyde de linalol et la N-Ac-Cys-COOMe.

Dans un deuxième chapitre, ces études de réactivité dans le cadre des composés d'intérêt de ce travail seront présentées. Le but était d'établir un profil chimique de réactivité complet des dérivés d'autoxydation du *R*-limonène, du (\pm)- β -citronellol et de l'ascaridol vis-à-vis des acides aminés connus pour être impliqués dans les réactions radicalaires.

3.3.3. Étude *in situ* de la production de signaux de danger dans un modèle 3D d'épiderme humain reconstitué

La résonance paramagnétique électronique (RPE) est l'un des principaux outils d'investigation utilisé pour l'étude des espèces radicalaires. Au cours des 60 dernières années, la RPE a été utilisée avec succès en biologie pour comprendre un grand nombre de processus physiologiques allant de la détection à la caractérisation *in vivo*, d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote et à l'évaluation de l'état d'oxydoréduction dans des tissus biologiques.^{93,94} La RPE a également été utilisée avec succès à des fins dermatologiques en permettant la détection des radicaux libres dans des peaux irradiées par les rayons UV, dans la recherche concernant les mélanomes et dans l'imagerie *in vivo*, une méthode non invasive capable de mesurer la distribution et la décomposition des radicaux libres directement dans la peau de volontaires humains.^{95,96} Par ailleurs, la spectroscopie de RPE a été également appliquée pour sonder la génération de radicaux libres initiée par les UV dans des cellules issues de biopsies cutanées et les substituts cutanés dérivés, par exemple, du tissu de prépuce néonatal humain comprenant des kératinocytes et des fibroblastes.^{97,98}

Depuis plusieurs années, le laboratoire de Dermatochimie s'intéresse à l'identification et à la caractérisation des espèces radicalaires dérivées d'hydroperoxydes allyliques impliqués dans des sensibilisations de contact.⁹⁹ La technique de piégeage de spin associée à la RPE, spécifiquement utilisée pour l'identification des radicaux transitoires RO \cdot / ROO \cdot / R \cdot dans les systèmes chimiques et biologiques, nous permet aujourd'hui une identification des radicaux réactifs potentiels issus des molécules cibles.⁸⁸ En raison de leur courte durée de vie, la grande majorité des radicaux libres (ROS, RNS ...) ne sont pas détectables directement par RPE. Ainsi, le piégeage de spin consiste à convertir les radicaux de courte durée de vie en radicaux plus stables, avec une durée de vie plus longue, en les piégeant avec un piègeur de spin de façon à être identifiés par RPE. La plupart des piègeurs de spin correspondent à des composés diamagnétiques comme les dérivés de type nitrone tels que la phényl-*N*-tert-butyl-nitrone (PBN), le 5,5-diméthyl-1-pyrroline-*N*-oxyde (DMPO), le 5-diéthoxyphosphoryl-5-méthyl-1-pyrroline-*N*-oxyde (DEMPO) ou encore le 5-(diisopropoxyphosphoryl)-5-méthyl-1-pyrroline-*N*-oxyde (DIPPMPO) (*Figure 31*).

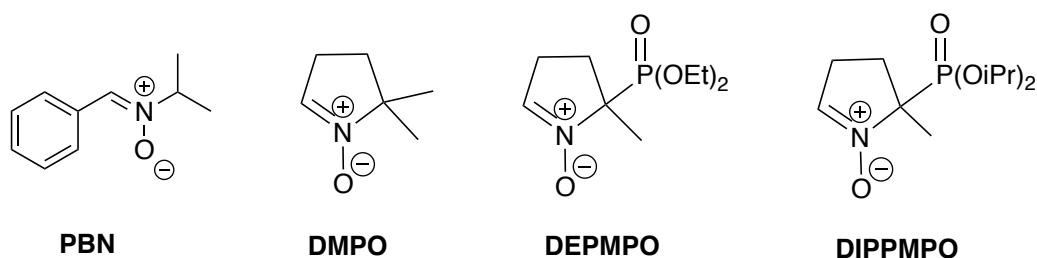


Figure 31 : Piégeurs de spin de type nitronium.

Les adduits de spin sont formés par l'addition de radicaux sur le carbone en alpha du groupe nitronium du piègeur de spin (Figure 32).⁸⁸

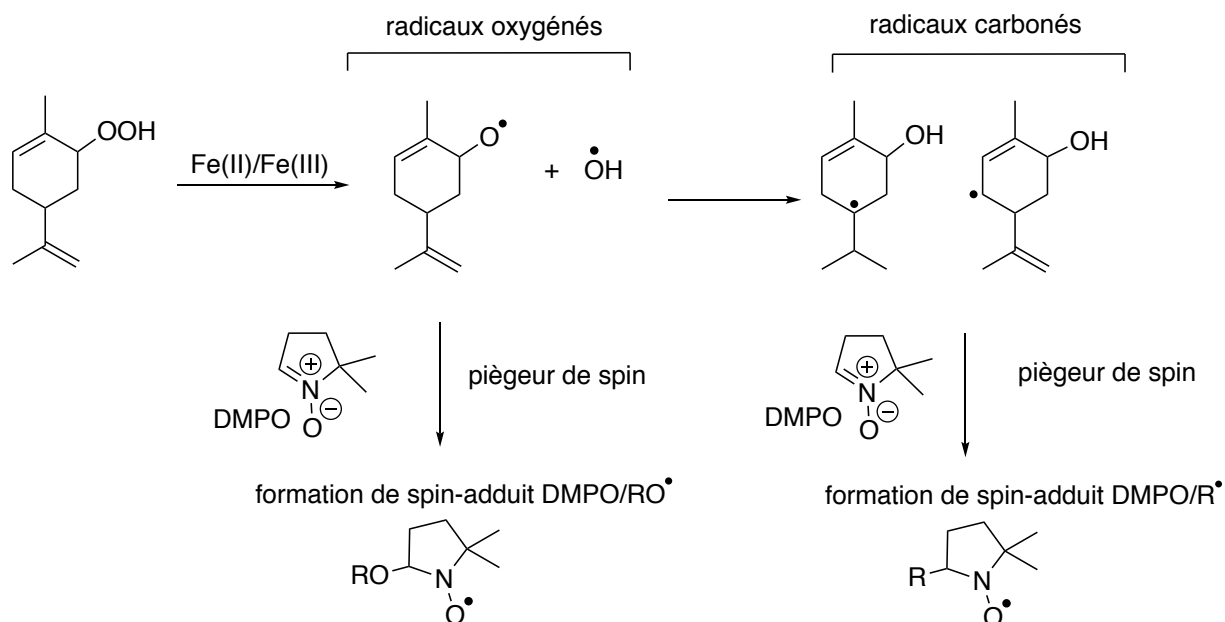


Figure 32 : Réactivité d'un hydroperoxyde dérivé du limonène : radicaux oxygénés/ carbonés potentiels révélés par des études de RPE avec piégeage à spin (DMPO), dans un milieu H₂O ou H₂O/CH₃CN.⁸⁸

Une méthodologie de piégeage de spin a récemment été développée au laboratoire pour étudier la formation de radicaux issus de peroxydes organiques dans un modèle 3D d'épiderme humain reconstitué (EpiSkinTM, Lyon, France) beaucoup plus proche de ce qui peut se passer *in vivo*.¹⁰⁰ Les RHE consistent en des cultures de kératinocytes multicouches normales, ceux-ci étant le type cellulaire majeur dans l'épiderme et jouant un rôle clé dans les réactions inflammatoires de la peau. En utilisant l'hydroperoxyde de cumène (Cum-OOH) en tant que preuve de concept, en incubant dans le milieu de test ou par application topique, il a été démontré que des radicaux carbonés sont principalement formés dans l'épiderme et ceci

par des réactions rédox suggérant un rôle clé des radicaux carbonés dérivés du Cum-OOH dans le processus de formation d'antigène. Ici, cette méthodologie ouvrant des perspectives nouvelles et des aperçus mécanistiques pour la compréhension moléculaire des processus de sensibilisation aux précurseurs des intermédiaires radicalaires, a été utilisée pour étudier la formation de radicaux *in situ* dans des RHE à partir des composés cibles. L'objectif principal était la détection et la caractérisation des adduits formés en présence de piègeurs de spin et l'étude du devenir des composés d'études dans ce modèle 3D de peau humaine.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le laboratoire POMAM (Université de Strasbourg, CNRS UMR 7177) et sera exposé dans le troisième chapitre.

3.3.4. Étude par voltampérométrie cyclique du pouvoir oxydant des allergènes

Parallèlement, ces molécules cibles constituant des allergènes potentiels peuvent être de puissants oxydants capables d'interférer avec l'équilibre redox des cellules. Leurs potentiels d'oxydo-réduction, jamais étudiés auparavant à notre connaissance, ont été mesurés par voltampérométrie cyclique en collaboration avec le laboratoire Électrochimie et Chimie Physique du Corps Solide (Université de Strasbourg, CNRS UMR 7177). D'un point de vue théorique, un potentiel est appliqué à une solution contenant la molécule à tester et le courant résultant dû à la réaction de réduction est mesuré. Ainsi, dans toutes les premières études préliminaires nous avons appliqué un potentiel à une solution de tampon phosphate contenant du Cum-OOH avec une électrode de carbone et le courant résultant dû à la réaction de réduction avait été mesuré, sans succès. Un travail préalable sur l'électrode de carbone, en conséquence, a été ensuite effectué. Celle-ci a été modifiée avec un catalyseur, le graphène avec le polyoxométalate de Dawson, qui permet un transfert d'électrons beaucoup plus rapide. Du nafion a été ajouté afin de stabiliser la surface de dépôt, s'agissant également d'un bon conducteur. Une réponse voltampérométrique a alors été observée directement proportionnelle à la concentration en hydroperoxyde.

Ainsi, un potentiel a été mesuré pour le Cum-OOH. De la même façon, et pour la première fois, les potentiels de réduction des allergènes à l'étude dans ce travail de thèse ont été mesurés avec succès en présence et en l'absence de catalyseur.

L'objectif principal de ce travail de thèse a été de fournir un ensemble de données spectroscopiques et de mécanismes réactionnels susceptibles d'éclairer s'il existe ou pas une spécificité liée à la fixation d'un radical précis avec un acide aminé donné. Ces données seront, en conséquence, corrélées, dans une conclusion générale, avec les études réalisées *in cellulo* sur leur capacité à activer le système immunitaire, à savoir les cellules dendritiques dans leur contexte naturel kératinocytaire et de confirmer l'effet ou stress oxydant induit par ces allergènes. Ces dernières études ont été réalisées en collaboration et au sein du Department of Environmental Toxicology de l'Université de Trèves (Allemagne).

Références bibliographiques
Introduction générale

1. Thyssen, J. P.; Linneberg, A.; Johansen, J. D. The epidemiology of contact allergy in the general population- prevalence and main findings. *Contact Dermatitis* **2007**, *57*, 287-299.
2. Bennike, N. H.; Heisterberg, M. S.; White, I. R.; Mahler, V.; Silvestre-Salvador, J. F.; Giménez-Arnau, A.; Johansen, J. D. Quality of life and disease severity in dermatitis patients with fragrance allergy - a cross-sectional European questionnaire study. *Contact dermatitis* **2019**, *81*, 89-96.
3. Scheynius, A. Immunological aspects. Dans : *Allergic contact dermatitis: the molecular basis*. Lepoittevin, J. -P.; Basketter, D. A.; Goossens, A.; Karlberg, A.-T, Eds., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **1998**, 4-18.
4. Regulation (EC) No 1223/ 2009 of the European Parliament and of the Council of the 30 November 2009 on cosmetic products. *Off. J. Eur. Union*. **2009**, L342, 59-209.
5. Eberting, C.L.; Chen, J. K. Allergic contact dermatitis in atopic dermatitis. *The Dermatologist* **2016**, 39-43.
6. Kohl, L.; Blondeel, A.; Song, M. Allergic contact dermatitis from cosmetics retrospective analysis of 819 patch-tested patients. *Dermatology* **2002**, *204*, 334-337.
7. 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.; *et al.* 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.
8. Rajan, T. V. The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions. *TRENDS Immunol.* **2003**, *24*, 376-379.
9. Madison, K.C. Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **2003**, *121*, 231-241.
10. Bouvier, V.; Crest, M. Les complexes de Merkel. De l'histologie ancienne au mécanisme moléculaire du toucher. *Nouvelles Magazines* **2014**, *30*, 828-830.
11. Crickx, B. Comprendre la peau. *Ann. Dermatol. Venereol.* **2005**, *132*, 8S3-8S103.
12. Dréno, B. Anatomie et physiologie de la peau et de ses annexes. *Ann. Dermatol. Venereol.* **2009**, *136*, S247-S251.
13. Landsteiner, K.; Jacobs, J. Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. *J. Exp. Med.* **1935**, *61*, 643-656.
14. Chipinda, I.; Hettick, J. M.; Siegel, P. D. Haptenation: chemical reactivity and protein binding. *J. Allergy* **2011**, 1-12.
15. 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.

-
16. Rustemeyer, T.; van Hoogstraten, I. M. W.; Von Blomberg, B. M. E.; Gibbs, S.; Scheper, R. J. Mechanisms of irritant and allergic contact dermatitis. Dans : *Contact Dermatitis 5th Ed.* Johansen, J. D., Frosch, P. J., Lepoittevin, J. -P. Eds. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **2011**, 43-91.
17. York, I. A.; Rock, K. L. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu. Rev. Immunol.* **1996**, *14*, 369-396.
18. Selby, D. M.; Singer, D. F.; Anderson, R. W.; Coligan, J. E.; Linderman, J. J. ; Nairn, R. Antigen-presenting cell lines internalize peptide antigens *via* fluid-phase endocytosis. *Cell. Immunol.* **1995**, *163*, 47-54.
19. Schmitt, R. J. La présentation antigénique au niveau de la peau. Rôle des cellules de Langerhans. *Annal. Dermatol. Venerol.* **1990**, *117*, 405-413.
20. Breathnach, S. Origin, cell lineage, ontogeny, tissue distribution and kinetics of Langerhans cells. Dans : *Epidermal Langerhans cells.* Shuler, G, CRC Press Inc., **1991**, 13-47.
21. Kimber, I.; Cumberbatch, M. Dendritic cells and cutaneous immune responses to chemical allergens. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1992**, *117*, 137-146.
22. Johansen, J.D.; Kristiina Aalto-Korte, K.; Agner, T.; Andersen, K. E.; Bircher, A.; Bruze, M.; Cannavó, A.; Giménez-Arnau, A.; Gonçalo, M.; Goossens, A.; John, S. M.; Lidén, C.; Lindberg, M.; Mahler, V.; Matura, M.; Rustemeyer, T.; Serup, J.; Spiewak, R.; Thyssen, J.P.; Vigan, M.; White, I.R.; Wilkinson, M.; Uter, W. European Society of Contact Dermatitis guideline for diagnostic patch testing-recommendations on best practice. *Contact Dermatitis* **2015**, *73*, 195-221.
23. Vigan, M. Lecture des tests épicutanés. *Ann. Dermatol. Venereol.* **2009**, *136*, 606-609.
24. Hannuksela, M.; Salo, H. The repeated open application test (ROAT). *Contact Dermatitis* **1986**, *14*, 221-227.
25. Bennike, N. H.; Palangi, L.; Bråred Christensson, J.; Nilsson, U.; Zachariae, C.; Johansen, J. D.; Hagvall, L. Allergic contact dermatitis caused by hydroperoxides of limonene and dose-response relationship-a repeated open application test (ROAT) study. *Contact Dermatitis* **2019**, *80*, 208-216.
26. Lepoittevin, J. -P. Les bases chimiques de l'allergie de contact. *Rev. Fr. Allergol.* **2011**, *51*, 208- 211.
27. Lidén, C.; Bruze, M.; Menné, T. Thyssen, J. P. Metals. Dans : *Contact Dermatitis 5th Ed.* Frosch, P. J.; Menné, T.; Lepoittevin, J. -P. Eds., Spinger-Verlag, Berlin, Heidelberg, Allemagne, **2011**, 643-679.
28. Lepoittevin, J. -P.; Benezra, C. Chimie de l'allergie de contact : pourquoi une molécule est-elle allergisante ? *Rev. Fr. Allergol.* **1991**, *31*, 235-241.
29. Lepoittevin, J. -P. Molecular aspects in allergic and irritant contact dermatitis. Dans : *Contact Dermatitis 5th Ed.* Frosch, P. J.; Menné, T.; Lepoittevin, J. -P. Eds., Spinger-Verlag, Berlin, Heidelberg, Allemagne, **2011**, 91-110.

-
30. Bangsgaard, N.; Thyssen, J. P.; Menné, T.; Andersen, K. E.; Mortz, C. G.; Paulsen, E.; Sommerlund, M.; Veien, N. K.; Laurberg, G.; Kaaber, K.; Thormann, J.; Andersen, B. L.; Danielsen, A.; Avnstorp, C.; Kristensen, B.; Kristensen, A. O.; Vissing, S.; Nielsen, N. H.; Johansen, J. D. Contact allergy to epoxy resin: risk occupations and consequences. *Contact Dermatitis* **2012**, *67*, 73-78.
31. Lepoittevin, J. -P. ; Le Coz, C. Dictionnaire des allergènes de contact. Eds. Springer-Verlag, France, Allemagne, **2009**, pp.66, pp.107.
32. Smith, C. K.; Hotchkiss, S. A. M. Xenobiotics as skin sensitizers: Metabolic activation and detoxification, and protein-binding mechanisms. Dans : *Allergic Contact Dermatitis: Chemical and Metabolic Mechanisms*, Eds. Taylor & Francis, London, **2001**, 119-205.
33. Lepoittevin, J. -P. Metabolism versus chemical transformation or pro- versus prehapten? *Contact Dermatitis* **2006**, *54*, 73-74.
34. Lepoittevin, J. -P. Métabolisme cutané. Dans : Diagnostic de l'allergie aux médicaments : tests cutanés. GERDA, John Libbey Eurotex, Paris, **2005**, 31-42.
35. Crépy, M. N. Dermatoses professionnelles à la colophane. *Documents pour le médecin du travail* **2002**, *89*, 75-82.
36. Karlberg, A.T; Gäfvert, E. Isolated colophony allergens as screening substances for contact allergy. *Contact Dermatitis* **1996**, *35*, 201-207.
37. Bråred Christensson, J.; Matura, M.; Bäcktorp, C.; Börje, A.; Nilsson, J. L. G.; Karlberg, A.-T. Hydroperoxides form specific antigens in contact allergy. *Contact Dermatitis* **2006**, *55*, 230-237.
38. Encabo, D.; Romero-Perez, D.; Silvestre Salvador, J. F. Allergic contact dermatitis due to paraphenylenediamine. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, **2018**, *109*, 602-609.
39. Regulation, E.C. No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), 1999. *Off. J. Eur. Union* **2006**, *L396*, 25-849.
40. Reisinger, K.; Hoffmann, S.; Alépée, N.; Ashikaga, T.; Barroso, J.; Elcombe, C.; Gellatly, N.; Galbiati, V.; Gibbs, S.; Groux, H.; *et al.* Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* **2015**, *29*, 259-270.
41. Buehler, E. V. Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig. *Arch. Dermatol.*, **1965**, *91*, 171-175.
42. OECD. *Test No 406: Skin sensitization*. OECD Guidelines for the testing of chemicals, Section 4; OECD Publishing, **1992**.
43. 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.
44. Kimber, I.; Basketter, D. A. The murine local lymph node assay: a commentary on collaborative studies and new directions. *Food Chem. Toxicol.* **1992**, *30*, 165-169.
45. Gerberick, G. F.; Ryan, A. C.; Dearman, R. J.; Kimber, I. Local lymph node assay (LLNA) for detection of sensitization capacity of chemicals. *Methods* **2007**, *4*, 54-60.

46. Kimber, I.; Weisenberger, C. A murine local lymph node assay for the identification of contact allergens. *Arch. Toxicol.* **1989**, *63*, 274-282.
47. Sakaguchi, H.; Ashikaga, T.; Miyazawa, M.; Yoshida, Y.; Ito, Y.; Yoneyama, K.; Hirota, M.; Itagaki, H.; Toyoda, H.; Suzuki, H. Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT) II. An inter-laboratory study of the h-CLAT. *Toxicol. In Vitro* **2006**, *20*, 774-784.
48. OECD. *Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation*. OECD Guidelines for the testing of chemicals, Section 4; OECD Publishing, **2016**.
49. Python, F.; Goebel, C.; Aeby, P. Assessment of the U937 cell line for the detection of contact allergens. *Toxicol. Appl. Pharm.* **2007**, *220*, 113-124.
50. Natsch, A.; Bauch, C.; Foertsch, L.; Gerberick, G. 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.
51. Emter, R.; Ellis, G.; Natsch, A. Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. *Toxicol. Appl. Pharm.* **2010**, *245*, 281-290.
52. OECD. *Test No. 442D: In vitro skin sensitization: ARE-Nrf2 luciferase*. OECD Guidelines for the testing of chemicals, Section 4, OECD Publishing, **2015**.
53. 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.
54. Cottrez, F.; Boitel, E.; Ourlin, J.-C.; Peiffer, J.-L.; Fabre, I.; Henaoui, I.-S.; Mari, B.; Vallauri, A.; Paquet, A.; Barbry, P.; Auriault, C.; Aeby, P.; Groux, H. SENS-IS, a 3D reconstituted epidermis based model for quantifying chemical sensitization potency: Reproducibility and predictivity results from an inter-laboratory study. *Toxicol. In Vitro* **2016**, *32*, 248-260.
55. Lepoittevin, J. -P. Development of structure-activity relationships (SARs) in allergic contact dermatitis. *Cell. Biol. Toxicol.* **1999**, *15*, 47-55.
56. 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.
57. Barratt, M. D.; Basketter, D. A.; Chamberlain, M.; Admans, G. D.; Langowski, J. J. An expert system rulebase for identifying contact allergens. *Toxicol. In Vitro* **1994**, *8*, 1053-1060.
58. Fedorowicz, A.; Singh, H.; Soderholm, S.; Demchuk, E. Structure-activity models for contact sensitization. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 954-969.
59. 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.
60. 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.

-
61. 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.
62. Patlewicz, G.; Roberts, D. W.; Walker, J. D. QSARs for the skin sensitization potential of aldehydes and related compounds. *QSAR Comb. Sci.* **2003**, *22*, 196-203.
63. 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.
64. « [https : www.qsartoolbox.org/](https://www.qsartoolbox.org/) ».
65. « [https : www.echemportal.org/](https://www.echemportal.org/)».
66. Roberts, D. W.; Patlewicz, G.; Dimitrov, S. D.; Low, L. K.; Aptula, A. O.; Kern, P. S.; Dimitrova, G. D.; Comber, M. I. H. *et al.* A mechanistic evaluation of an external validation study using reaction chemistry principles. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20*, 1321-1330.
67. 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.
68. 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.
69. OECD. *Test No. 442C: In Chemico* skin sensitization: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). OECD Guidelines for the testing of chemicals, Section 4, OECD Publishing, **2015**.
70. 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.
71. Del Bufalo, A.; Pauloin, T.; Alepee, N.; Clouzeau, J.; Detroyer, A.; Eilstein, J.; Gomes, C.; Nocairi, H.; Piroird, C.; Rousset, F.; Tourneix, F.; Basketter, D.; Martinozzi Teissier, S. Alternative integrated testing for skin sensitization: assuring consumer safety. *Appl. in Vitro Toxicol.* **2018**, *4*, 30-43.
72. Breitmaier, E. Terpenes: Importance, general structure, and biosynthesis. Dans: *Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2006**, 1-9.
73. Degenhardt, J.; Köllner, T. G.; Gershenzon, J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1621-1637.
74. Ruzicka, L. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia* **1953**, *9*, 357-396.
75. Hellerstrom, S.; Thyresson, N.; Blohm, S. G.; Widmark, G. On the nature of the eczematogenic component of oxidized delta- Δ^3 -carene. *J. Invest. Dermatol.* **1955**, *24*, 217-224.

-
76. Bråred Christensson, J.; Matura, M.; Bäcktorp, C.; Börje, A.; Nilsson, J. L.; Karlberg, A.-T. Hydroperoxides form specific antigens in contact allergy. *Contact Dermatitis* **2006**, *55*, 230-237.
77. Frankel, E.N. Chemistry of autoxidation: mechanism, products and flavor significance. Dans : *Flavor chemistry of fats and oils*. Min DB, Smouse TH, Eds. American oil Chemists Society, Urbana, Etats-Unis, **1985**, 1-37.
78. Karlberg, A.-T.; Börje, A.; Duus Johansen, J.; Lidén, C.; Rastogi, S.; Roberts, D.; Uter, W.; White, I. R. Activation of non-sensitizing or low-sensitizing fragrance substances into potent sensitizers-prehaptens and prohaptens. *Contact Dermatitis* **2013**, *69*, 323-334.
79. Sköld, M.; Börje, A.; Harambasic, E.; Karlberg, A.-T. Contact allergens formed on air exposure of linalool. Identification and quantification of primary and secondary oxidation products and the effect on skin sensitization. *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, *17*, 1697-1705.
80. Bråred Christensson, J.; Andersen, K. E.; Bruze, M.; Duus Johansen, J.; Garcia-Bravo, B.; Giménez-Arnau, A.; Goh, C. L.; Nixon, R.; White, I. R. An international multicentre study on the allergenic activity of air-oxidized *r*-limonene. *Contact Dermatitis* **2013**, *68*, 214-223.
81. Bråred Christensson, J.; Andersen, K. E.; Bruze, M.; Duus Johansen, J.; Garcia-Bravo, B.; Giménez-Arnau, A.; Goh, C.-L.; Nixon, R.; White, I. R. Air-oxidized linalool-a frequent cause of fragrance contact allergy. *Contact Dermatitis* **2012**, *67*, 247-259.
82. Andersch Björkman, Y.; Hagvall, L.; Siwmark, C.; Niklasson, B.; Karlberg, A.-T.; Bråred Christensson, J. Air-oxidized linalool elicits eczema in allergic patients - a repeated open application test study: roat of oxydized linalool. *Contact Dermatitis* **2014**, *70*, 129-138.
83. Bråred Christensson, J.; Andersen, K. E.; Bruze, M.; Duus Johansen, J.; Garcia-Bravo, B.; Giménez-Arnau, A.; Goh, C. L.; Nixon, R.; White, I. R. Positive patch test reactions to oxidized limonene: exposure and relevance. *Contact Dermatitis* **2014**, *71*, 264-272.
84. Rudbäck, J.; Hagvall, L.; Börje, A.; Nilsson, U.; Karlberg, A.-T. Characterization of skin sensitizers from autoxidized citronellol-impact of the terpene structure on the autoxidation process. *Contact Dermatitis* **2014**, *70*, 329-339.
85. Christoffers, W. A.; Blömeke, B.; Coenraads, P.-J.; Schuttelar, M.-L. The optimal patch test concentration for ascaridole as a sensitizing component of tea tree oil. *Contact Dermatitis* **2014**, *71*, 129-137.
86. Nilsson, U.; Bergh, M.; Shao, L. P.; Karlberg, A.-T. Analysis of contact allergenic compounds in oxidized *d*-limonene. *Chromatographia* **1996**, *42*, 199-205.
87. Rudbäck, J.; Andresen Bergström, M.; Börje, A.; Nilsson, U.; Karlberg, A.-T. α -Terpinene, an antioxidant in tea tree oil, autoxidizes rapidly to skin allergens on air exposure. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 713-721.
88. Kao, D.; Chaintreau, A.; Lepoittevin, J. -P.; Giménez-Arnau, E. Synthesis of allylic hydroperoxides and EPR spin-trapping studies on the formation of radicals in iron systems as potential initiators of the sensitizing pathway. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 6188-6200.

-
89. Giménez-Arnau, E.; Haberkorn, L.; Grossi, L.; Lepoittevin, J. -P. Identification of alkyl radicals derived from an allergenic cyclic tertiary allylic hydroperoxide by combined use of radical trapping and ESR studies. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 5535-5545.
90. Luo, Y-R. BDEs of O-X bonds. Dans : *Comprehensive handbook of chemical bond energies*. Taylor & Francis group, LLC, Boca Raton, États-Unis, **2007**, 255-368.
91. Dussault, PH. Reactions of hydroperoxides and peroxides. Dans : *Active oxygen in chemistry*. Foote CS, Selverstone Valentine J, Greenberg A, Liebman JF, Eds., Chapman & Hall, NewYork, États-Unis, **1995**, 141-203.
92. Kao, D.; Chaintreau, A.; Lepoittevin, J. -P.; Giménez-Arnau, E. Mechanistic studies on the reactivity of sensitizing allylic hydroperoxides: investigation of the covalent modification of amino acids by carbon-radical intermediates. *Toxicol. Res.* **2014**, *3*, 278-289.
93. Gallez, B.; Baudalet, C.; Jordan, B. F. Assessment of tumor oxygenation by electron paramagnetic resonance: principles and applications. *NMR in Biomed.* **2004**, *17*, 240-262.
94. Swartz, H. M., Khan, N., Khramtsov, V. V. Use of electron paramagnetic resonance spectroscopy to evaluate the redox state *in vivo*. *Antioxid. Redox Signal.* **2007**, *9*, 1757-1771.
95. He, G.; Samouilov, A.; Kuppusamy, P.; Zweier, J. L. *In vivo* EPR imaging of the distribution and metabolism of nitroxide radicals in human skin. *J. Magn. Res.* **2001**, *148*, 155-164.
96. Plonka, P. M. Electron paramagnetic resonance as a unique tool for skin and hair research. *Exp. Dermatol.* **2009**, *18*, 472-484.
97. Jurkiewicz, B. A.; Buettner, G. R. EPR detection of free radicals in UV-irradiated skin: mouse versus human. *Photochem. Photobiol.* **1996**, *64*, 918-922.
98. Fuchs, J.; Groth, N.; Herrling, T.; Zimmer, G. Electron paramagnetic resonance studies on nitroxide radical 2,2,5,5-tetramethyl-4-piperidin-1-oxyl (TEMPO) redox reactions in human skin. *Free Radic. Biol. Med.* **1997**, *22*, 967-976.
99. Giménez-Arnau, E.; Haberkorn, L.; Grossi, L.; Lepoittevin, J. -P. Identification of radical species derived from allergenic 15-hydroperoxyabiatic acid and insights into the behaviour of cyclic tertiary allylic hydroperoxides in (III) systems. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 5680-5691.
100. Kuresepi, S.; Vileno, B.; Turek, P.; Lepoittevin, J. -P.; Giménez-Arnau, E. *Free Radic. Res.* **2018**, *52*, 171-179.

Chapitre 1

Synthèse des composés d'étude

Introduction

Dans le but d'établir un profil de réactivité des produits allergisants issus de l'autoxydation des terpènes, nous avons étudié la réactivité vis-à-vis de divers acides aminés de cinq composés répertoriés sensibilisants : le 1,4-péroxy-*p*-menth-2-ène autrement appelé ascaridol (**Asc**) dérivé de l' α -terpinène, le (5*R*)-2-méthyl-5-isopropényl-2-cyclohexène-1-hydroperoxyde (**Lim-2-OOH**) et le (1*S*, 4*R*)-1-méthyl-4-isopropényl-2-cyclohexène-1-hydroperoxyde ((**1*S*, 4*R***)-**Lim-1-OOH**) issus du *R*-(+)-limonène, le (*E*)-7-hydroperoxy-3,7-diméthyl-5-ène-1-ol ((\pm)-**Citr-7-OOH**) et le 6-hydroperoxy-3,7-diméthyl-7-ène-1-ol ((\pm)-**Citr-6-OOH**) issus du β -(\pm)-citronellol (*Figure 1*).

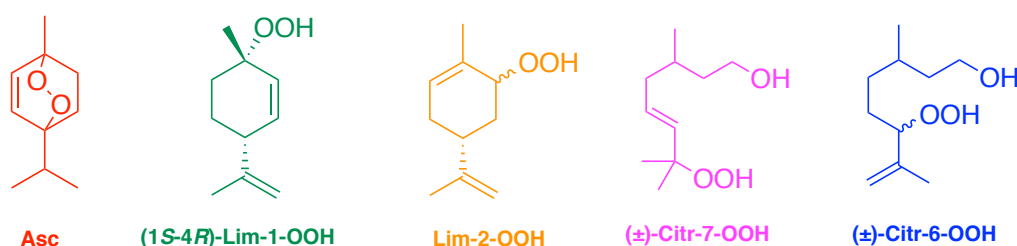


Figure 1 : Structure chimique des composés à l'étude.

La production des composés cibles par autoxydation de terpènes naturels n'est pas toujours reproductible, incluant notamment de faibles rendements ainsi qu'une séparation difficile des molécules souhaitées à partir des mélanges d'oxydation. Dans le but de réaliser les études de réactivité, il a fallu développer des voies de synthèse courtes et reproductibles, permettant l'obtention des composés à l'étude.

Dans ce chapitre, il s'agira dans un premier temps d'étudier les diverses méthodes permettant l'obtention des endoperoxydes et hydroperoxydes allyliques. Dans un second temps, nous présenterons les différentes étapes de synthèse nous permettant l'obtention des composés étudiés.

1. Les endoperoxydes et hydroperoxydes allyliques : méthodes d'obtention

Les propriétés des peroxydes sont principalement dues à la présence de deux atomes d'oxygène liés entre eux (-O-O-) correspondant au groupement chimique « peroxy ». Les peroxydes organiques sont nombreux et se classent selon diverses familles suivant leur structure chimique.¹ Dans le cas de notre étude, nous nous sommes intéressés à deux familles

de peroxydes, celle des endoperoxydes et d'autre part celle des hydroperoxydes allyliques. Un endoperoxyde correspond à un peroxyde cyclique formé par l'addition 1,4 d'oxygène diatomique sur un cycle d'hydrocarbure aromatique. De cette façon, le cycle benzénique est remplacé par un dioxabicyclo [2.2.2] octadiène, généralement au milieu des autres cycles. Les endoperoxydes sont des composés dont la liaison oxygène-oxygène (O-O) joue souvent un rôle clé dans leur activité sur le plan chimique et biologique. Les nombreuses sources d'endoperoxydes marines et terrestres présentent une bioactivité très étendue, beaucoup d'entre eux étant ciblés comme candidats-médicaments.²

Les hydroperoxydes ont pour formule générale R-OOH où R est un groupe organique. Les hydroperoxydes suscitent un intérêt considérable en biochimie car ces espèces réactives sont générées par divers processus enzymatiques et non enzymatiques.³ La grande polyvalence des hydroperoxydes est principalement due au fait que, outre le peroxyde d'hydrogène et l'oxygène moléculaire, ils servent de source d'oxygène dans différents types de réactions d'oxydation. Les oxydations asymétriques devenant de plus en plus importantes au cours des dernières années, il était intéressant de développer des hydroperoxydes chiraux et de les synthétiser sous une forme énantiomériquement pure afin de les utiliser comme oxydants et comme inducteurs asymétriques dans divers types de réactions d'oxydation.⁴

Les hydroperoxydes et les endoperoxydes peuvent facilement se décomposer par le biais de processus exothermiques en raison de l'instabilité et de la réactivité intrinsèque de la liaison O-O. Ils sont en effet capables de former des radicaux libres pour initier des réactions chimiques. Il s'agit de composés très instables pouvant être amenés à se décomposer rapidement et dans certains cas de manière explosive.⁵

La stabilité des hydroperoxydes dépend, en grande partie, de la taille du groupe R et du niveau de substitution du carbone porteur de la fonction hydroperoxyde. Moins de cinq atomes de carbone rendent l'hydroperoxyde potentiellement explosif, alors qu'un groupe R important et un niveau de substitution élevé signifient généralement que l'hydroperoxyde est plus stable.⁶

1.1. Molécules insaturées et autoxydation

Plusieurs méthodes de synthèse de peroxydes sont disponibles. Toutes ces méthodes utilisent des réactifs dans lesquels la liaison oxygène-oxygène est déjà présente pour construire la liaison carbone-oxygène.^{7,8}

L'oxygène atmosphérique est un agent oxydant qui réagit facilement avec de nombreuses molécules organiques. Ce processus s'appelle l'autoxydation. Il joue, par exemple, un rôle crucial dans l'oxydation des acides gras dans l'industrie alimentaire. Exposée dans l'introduction de ce manuscrit (Introduction générale, Section 3.2.), l'autoxydation est une réaction radicalaire en chaîne entre un composé organique et l'oxygène moléculaire conduisant à une multitude de produits d'oxydation. Cela nécessite que le composé soit en contact avec de l'oxygène moléculaire mais également avec un initiateur tel que des ions métalliques, de la chaleur ou des rayons ultraviolets, permettant l'initiation de cette réaction d'autoxydation.

L'obtention d'hydroperoxydes allyliques ou d'endoperoxydes par autoxydation conduit très souvent à la formation d'une quantité multiple de produits dont la séparation est très fastidieuse. Par exemple, l'étude de l'autoxydation du linalol a permis de caractériser les divers produits formés. Ainsi, divers alcools allyliques, furanes et hydroperoxydes allyliques ont pu être identifiés (*Figure 2*).⁹

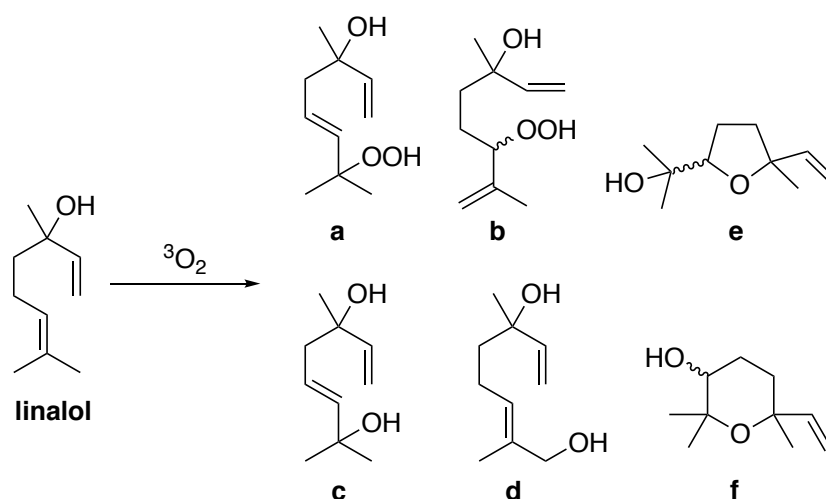


Figure 2 : Produits issus de l'autoxydation du linalol : après 45 semaines d'exposition à l'air, un rendement de 15% a été obtenu pour les composés **a** et **b** ; après 50 semaines, 20% du composé **c** est obtenu ; après 79 semaines d'exposition, **d** est obtenu avec un rendement de 4 %. Les composés **e** et **f** sont des produits d'oxydation secondaires.

1.2. Génération et réactions de l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$

L'oxygène singulet a été le centre d'intérêt de nombreux chimistes. Son utilisation couvre divers domaines tels que la chimioluminescence, la photocarcinogénicité, l'ozolyse, l'action photodynamique, la photosynthèse, la dégradation des polymères, mais également l'environnement.

1.2.1. L'oxygène singulet

Pour comprendre la réactivité chimique du dioxygène, il est nécessaire de discuter tout d'abord de sa configuration électronique. A l'état fondamental, la molécule de dioxygène est paramagnétique et triplet ($^3\text{O}_2$). Elle contient deux électrons non appariés de spin parallèle dans deux orbitales moléculaires différentes ($\pi 2p^*$) de haute énergie (HOMO). Par conséquent, elle se comporte chimiquement comme un biradical, qui réagit lentement avec la plupart des molécules organiques, les processus d'autoxydation en étant un exemple. À l'état excité, l'oxygène triplet $^3\text{O}_2$ devient l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$, c'est-à-dire diamagnétique et contient deux électrons antiparallèles dans la même orbitale moléculaire. Étant donné que les deux électrons occupent une seule orbitale HOMO, il devrait admettre des réactions à deux électrons (Figure 3). L'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ est très instable. Il s'agit d'une espèce particulièrement réactive vis-à-vis des composés organiques avec une durée de vie de l'ordre de quelques secondes. Sa présence dans le milieu réactionnel conduit essentiellement à des réactions d'oxydation.

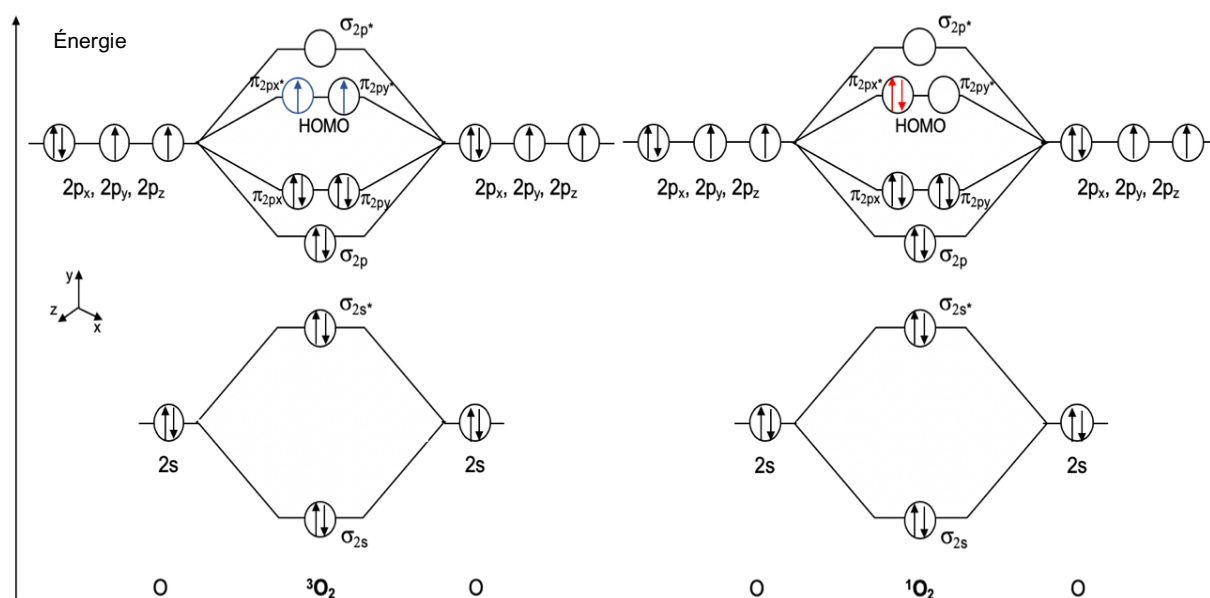


Figure 3 : Diagrammes d'orbitales moléculaires de l'oxygène triplet $^3\text{O}_2$, les spins (représentés en bleu) sont dans deux orbitales différentes $\pi_{2p_x}^*$ et $\pi_{2p_y}^*$ et de l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$, les deux spins (représentés en rouge) se trouvent dans la même orbite $\pi_{2p_x}^*$.

Contrairement à l'oxygène moléculaire à l'état fondamental, l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ a trouvé une utilité en synthèse considérable car il peut subir des réactions sélectives avec une grande variété de molécules riches en électrons telles que les oléfines, les diènes conjugués, les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les phénols et les sulfures.¹⁰

Il existe deux voies principales permettant la production de l'oxygène à l'état singulet $^1\text{O}_2$, photochimique et chimique n'impliquant pas de lumière. Les deux voies présentent des avantages et des inconvénients, bien que la voie photochimique soit souvent la plus utilisée.¹¹

Source photochimique

L'oxygène singulet pourrait être produit directement à partir d'oxygène à l'état triplet lors de la photoirradiation à une longueur d'onde de 765 nm. Or, la photosensibilisation de l'oxygène à l'état triplet $^3\text{O}_2$ reste la méthode la plus largement employée pour la génération de l'oxygène à l'état singulet $^1\text{O}_2$.¹² Cette méthode est très polyvalente car elle peut être réalisée dans une large gamme de solvants et à basse température si des produits d'oxydation instables sont préparés. Elle nécessite la présence de photosensibilisants tels que des colorants (le bleu de méthylène ou le rose de Bengale) ou des pigments naturels porphyriniques ou phtalocyanines, également utilisés lors de photothérapie en oncologie. Initialement, le sensibilisateur à l'état fondamental singulet ($^1\text{Sens}$) absorbe un photon afin d'être converti en un état électroniquement excité ($^3\text{Sens}$). Cet état, normalement triplet, transfère de l'énergie à l'oxygène paramagnétique qui devient l'oxygène à l'état singulet $^1\text{O}_2$. Durant ce processus, le sensibilisateur est régénéré (Figure 4).¹¹

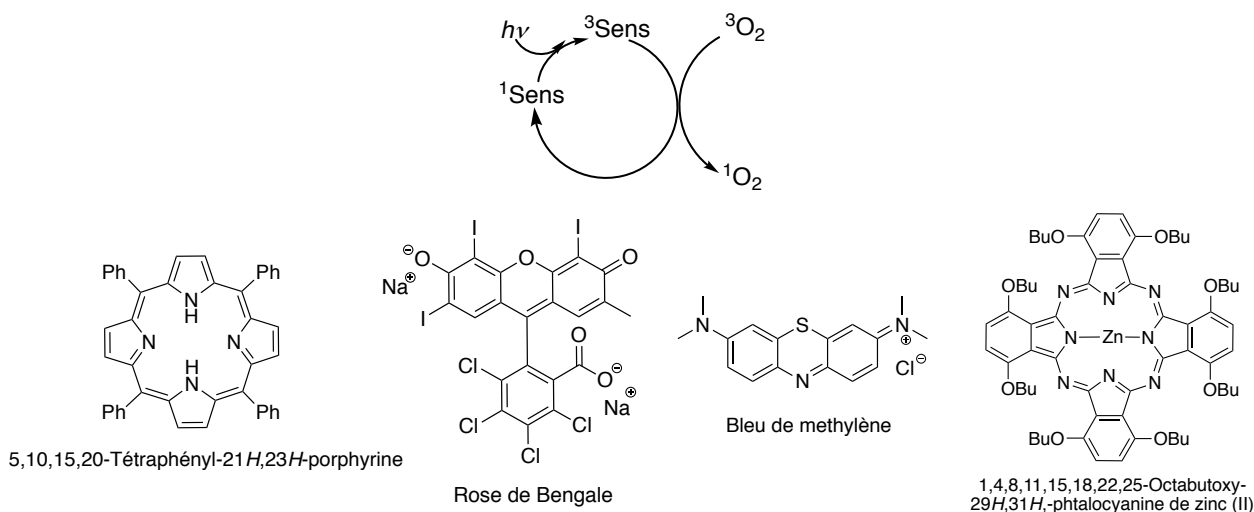


Figure 4 : Exemples de photosensibilisateurs permettant la génération de l'oxygène à l'état singulet $^1\text{O}_2$.

Cependant, le processus de photosensibilisation nécessite des appareillages pas toujours disponibles dans les laboratoires de recherche et des alternatives chimiques ont été développées.

Source chimique

Des oxydants facilement disponibles tel que le peroxyde d'hydrogène, pourraient constituer une alternative intéressante au procédé photochimique habituel. Ainsi, le traitement de l'hypochlorite de sodium par le peroxyde d'hydrogène permet la génération rapide et quantitative de l'oxygène à l'état singulet.^{10,13} Malencontreusement, le pouvoir oxydant élevé de l'anion hypochlorite provoque des réactions secondaires avec les substrats. Par ailleurs, une fraction non négligeable de l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ est perdue. Cette réaction n'a donc reçu que peu d'applications en synthèse organique, mais elle s'est avérée très efficace pour la génération d'oxygène singulet gazeux requis par le puissant laser à iode chimique.^{10,14}

La décomposition d'ozonides de phosphites est aussi une source chimique d'oxygène singulet $^1\text{O}_2$. Les peroxomolybdates produisent également de l'oxygène singulet avec un bon rendement.¹⁵ L'une des méthodes les plus propres de production d'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ en l'absence d'oxydants réactifs est la décomposition d'endoperoxydes aromatiques (en particulier du naphthalène substitué). Ces composés subissent la réaction inverse de Diels-Alder pour donner de l'oxygène singulet et le composé aromatique résultant avec un rendement presque quantitatif (*Figure 5*).¹⁶

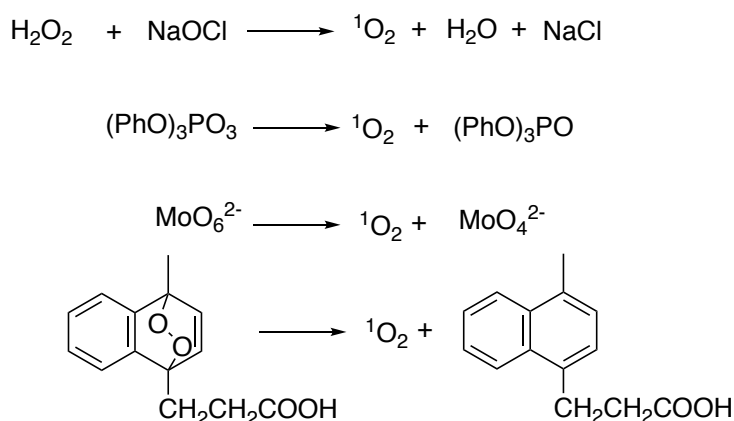


Figure 5 : Exemples de méthodes chimiques générant l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$.

Cependant, ces sources chimiques d'oxygène singulet présentent des inconvénients, notamment dans le fait que de nombreux substrats ne piègent pas efficacement l'oxygène singulet de sorte qu'il devient nécessaire d'utiliser un excès important de réactif pour obtenir des conversions importantes des substrats. Aussi, certaines méthodes employées utilisent des agents oxydants puissants, qui peuvent produire des réactions secondaires parasites. En outre, ces méthodes sont souvent utiles lorsque la lumière ne peut pas être utilisée.

D'autre part, un autre moyen tout aussi efficace de production de l'oxygène singulet repose sur la disproportionation du peroxyde d'hydrogène catalysée par du molybdate de sodium.

1.2.2. Réactions principales de l'oxygène singulet

La réaction de l'oxygène singulet avec les doubles liaisons C=C peut être classée en trois catégories : (1) la cycloaddition [4 + 2] sur des diènes conjugués pour produire des endoperoxydes ; (2) la réaction avec des éthers énoliques, des énamines et des alcènes riches en électrons ne présentant pas d'hydrogènes allyliques et possédant une orientation appropriée pour donner des 1,2-dioxétanes ; (3) la réaction de Schenck ou réaction ène avec des alcènes pour former des hydroperoxydes allyliques (*Figure 6*). Ces réactions sont très douces et utiles en raison de leurs rendements élevés et de leur spécificité.

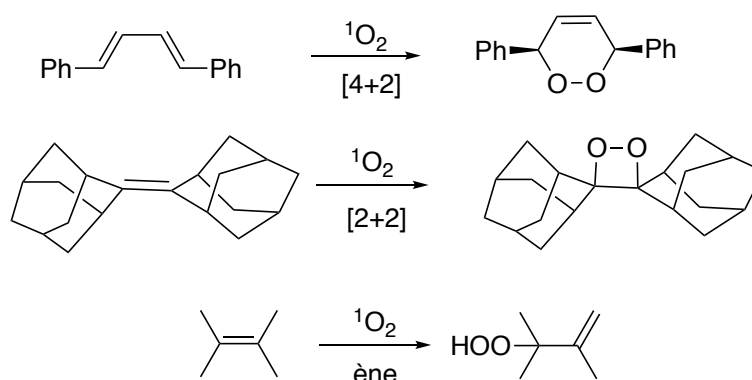


Figure 6 : Réactions de cycloaddition [4 + 2] et [2 + 2], et réaction ène d'addition de l'oxygène singulet sur des alcènes.

L'oxygène singulet réagit avec les conformations *s-cis* des composés 1,3-diènes pour former des endoperoxydes selon un processus très analogue à la réaction de Diels-Alder dans le cas de la cycloaddition [4 + 2].¹¹ Les cycloadditions d'oxygène singulet peuvent également se produire avec des substrats riches en électrons ou avec des oléfines dans lesquelles les réactions enzymatiques en compétition sont structurellement exclues, comme indiqué ci-dessus dans le figure 6 pour la adamantylideneadamantane.¹¹ Les produits sont des dioxétanes, qui ont été étudiés de manière exhaustive en raison de leur capacité à se décomposer avec émission de lumière. La réaction ène concerne les oléfines contenant des hydrogènes allyliques. Ces oléfines sont oxydées en formant des hydroperoxydes allyliques en même temps qu'un déplacement de la double liaison.^{11,17}

Dans ce travail de thèse nous nous sommes intéressés aux réactions de cycloaddition [4 + 2] et à la réaction de Schenck.

1.2.3. Mécanisme de la cycloaddition [4 + 2] et de la réaction de Schenck

Cycloaddition [4 + 2]

Les mécanismes réactionnels de la cycloaddition [4 + 2] faisant intervenir l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ ont été caractérisés par des controverses sur l'identité des espèces intermédiaires impliquées dans la formation du produit final. Des études mécanistiques ont abordé la question de la réactivité concertée par rapport à la réactivité séquentielle, ainsi que la détection et la caractérisation structurale des intermédiaires de réaction possibles (*Figure 7*).^{18,19} Compte tenu de l'analogie formelle avec la réaction classique de Diels-Alder, il a été supposé pendant de nombreuses années un mécanisme de réaction synchrone (**a**) ou asynchrone (**b**). Cependant, des études cinétiques ont montré que de telles endoperoxydations peuvent se produire en passant par des intermédiaires de type perepoxyde (**c**).¹⁹

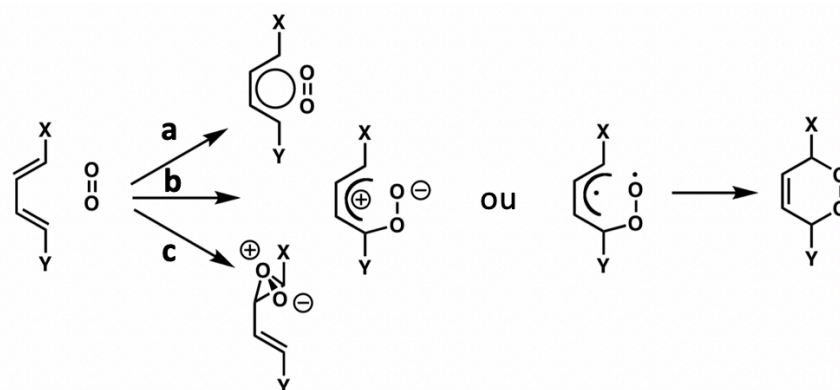


Figure 7 : Mécanismes possibles pour les cycloadditions [4 + 2] d'oxygène singulet.

L'étude énergétique des états excités de la rencontre entre l'oxygène singulet et le *cis*-1,3-butadiène ont permis de privilégier un mécanisme par étape conduisant tout d'abord à la formation d'un exciplex (*Figure 8*).^{18,19}

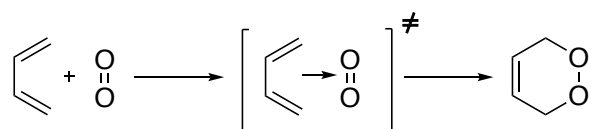


Figure 8 : Formation de l'intermédiaire exciplex.

Ainsi, en fonction de la structure du substrat, l'exciplex peut avoir un caractère zwitterionique et/ou diradical. Il est donc considéré qu'il est approprié d'utiliser le concept exciplex pour la description mécanistique de la cycloaddition [4 + 2].¹⁸

Réaction de Schenck

Mise au point par Schenck dans les années 40 puis retravaillée par Foote dans les années 60, la réaction-ène permet la formation d'hydroperoxydes allyliques à partir de substrats présentant des atomes d'hydrogènes allyliques.²⁰ Cette réaction a suscité la curiosité des chimistes en raison de sa stéréochimie et de sa régiosélectivité. Le mécanisme de réaction reste controversé et très discuté pour savoir si cette réaction fait appel à un mécanisme concerté ou à un mécanisme par étapes. Initialement, c'est un mécanisme concerté qui a été proposé puis il s'est opposé à un mécanisme séquentiel.

Il a été rapporté que plusieurs intermédiaires peuvent être impliqués dans ces mécanismes, notamment un intermédiaire zwitterionique, un biradical, un exciplex et un pérépoxyde. Pour certains auteurs, l'intermédiaire le plus probable est un pérépoxyde même si celui-ci a l'air de se former à partir d'un intermédiaire exciplex (*Figure 9*). L'intermédiaire pérépoxyde permet d'expliquer la régiosélectivité et la stéréosélectivité observées en fonction du substrat oxydé.^{21,22}

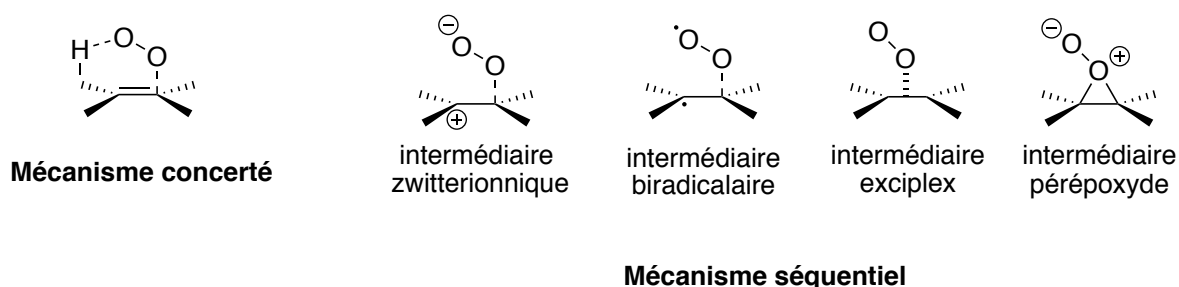


Figure 9 : Intermédiaires réactionnels proposés pour la réaction de Schenck selon le type de mécanisme, concerté ou séquentiel.

Plusieurs facteurs interviennent dans le mécanisme de cette réaction, la gêne stérique, les effets électroniques et les liaisons hydrogène en sont les principaux.

Théoriquement, la réaction de Schenck conduit majoritairement à la formation de l'hydroperoxyde sur le carbone le plus substitué en raison de la différence d'énergie entre les états de transition lors de l'abstraction de l'hydrogène allylique. Ainsi, l'état de transition où la liaison C-O est portée par un atome de carbone tertiaire a une énergie inférieure à celle où la liaison C-O est portée au niveau d'un atome de carbone secondaire, l'état de transition favorable étant celui de faible énergie. Ceci peut être expliqué par la décompression stérique des interactions 1,3 entre l'atome d'oxygène et le substituant R. Dans le cas où la liaison C-O est formée au niveau d'un atome de carbone secondaire, la présence de répulsion stérique explique alors l'énergie plus élevée de l'état de transition (*Figure 10*).

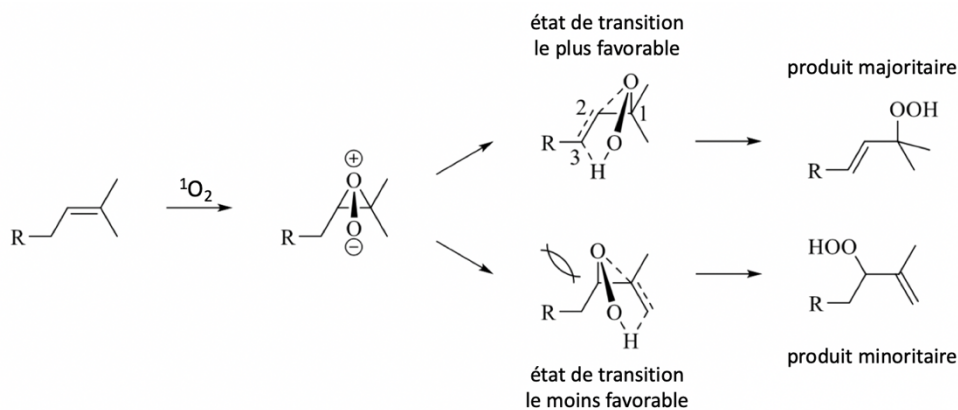


Figure 10 : Mécanisme de la réaction de Schenck au travers d'un pérépoxyde intermédiaire.

En conséquence, l'encombrement stérique joue un rôle clé.²² Plus le substituant R est un groupe volumineux, plus le pourcentage de produit majoritaire est élevé.

1.3. Synthèse d'hydroperoxydes allyliques à partir de substitution nucléophile sur des alcools allyliques

Plusieurs méthodes de synthèse d'hydroperoxydes à partir d'alcools sont disponibles. Toutes utilisent des réactifs dans lesquels la liaison oxygène-oxygène est déjà présente pour construire la liaison carbone-oxygène.^{4,7} Généralement, deux voies de synthèse chimiques sont décrites dans la littérature permettant l'obtention d'hydroperoxydes allyliques à partir d'alcools allyliques primaires et secondaires ou bien à partir d'alcools allyliques tertiaires correspondants.

Le peroxyde d'hydrogène et l'anion de peroxyde d'hydrogène sont tous deux des nucléophiles puissants qui peuvent être utilisés dans des réactions de substitution conjointement avec des alcools, des carboxylates, des halogénures ou bien des sulfonates pour donner des hydroperoxydes. Dans un premier cas, la fonction hydroxyle est tout d'abord transformée en halogénure ou en sulfonate, qui sont de bons groupes partants, puis est remplacée par l'anion du peroxyde d'hydrogène nucléophile dans des conditions basiques.²³ Les hydroperoxydes primaires et secondaires sont donc principalement préparés *via* une substitution nucléophile $\text{S}_{\text{N}}2$ (Figure 11).

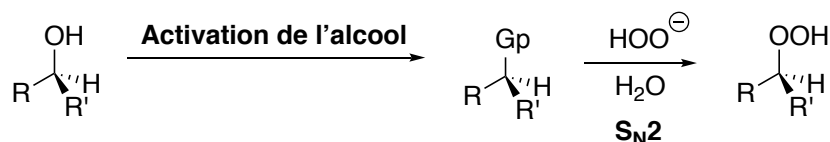


Figure 11 : Synthèse d'hydroperoxydes primaires et secondaires. (avec R = groupe allylique, R' = H et Gp = groupe partant).

Les rendements sont parfois faibles en raison de la sensibilité en milieu basique de ces hydroperoxydes (Figure 12).²³

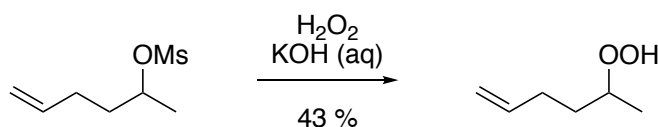


Figure 12 : Exemple de synthèse d'hydroperoxyde à partir d'un sulfonate et de peroxyde d'hydrogène.²³

Dans un second cas, les hydroperoxydes tertiaires sont préparés grâce une substitution nucléophile $\text{S}_{\text{N}}1$ en utilisant du peroxyde d'hydrogène en milieu acide, favorisant de cette façon la formation de carbocations tertiaires stables (Figure 13).

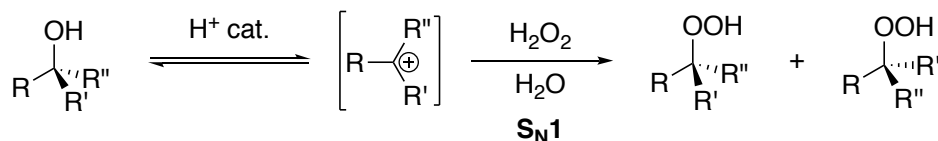


Figure 13 : Synthèse d'hydroperoxydes tertiaires (avec R = groupe allylique, alkyles R', R'' = alkyle).

Des rendements plus élevés en hydroperoxydes primaires, secondaires et tertiaires peuvent être obtenus par réaction de bromures, d'iodures ou de chlorures avec du peroxyde d'hydrogène en présence de trifluoroacétate d'argent ou de tétrafluoroborate d'argent.^{24,25} Un précipité d'halogénure d'argent se forme à l'issue de cette réaction (Figure 14).

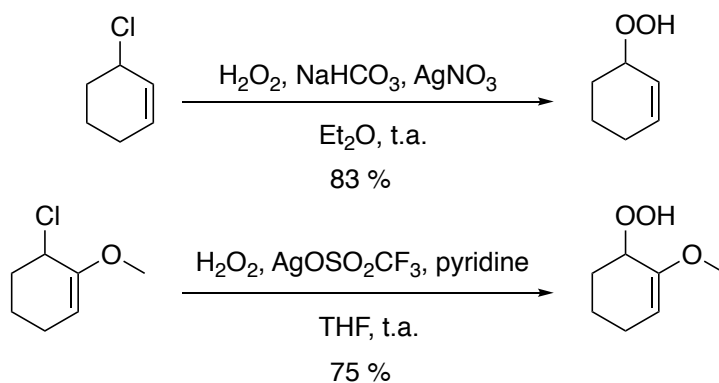


Figure 14 : Exemples de synthèse d'hydroperoxydes allyliques à l'aide d'une substitution nucléophile assistée par l'ion argent.²⁴

Les hydroperoxydes allyliques étudiés dans cette thèse ont été synthétisés en utilisant des réactions de substitution nucléophile de type S_N1 et S_N2. La substitution a pu être réalisée sur des alcools, des bromures et des chlorures précurseurs en utilisant l'anion du peroxyde d'hydrogène.

2. Synthèse de l'endoperoxyde ascaridol (Asc)

L'ascaridol a été décrit en tant que sensibilisant potentiel avec des réactions cutanées concomitantes liées à l'autoxydation de l' α -terpinène présent dans l'huile d'arbre à thé.²⁶ Il s'agit d'un exemple rare d'endoperoxyde naturel et thermiquement stable.

La première synthèse de l'ascaridol a été réalisée par Schenck et Ziegler par irradiation de l' α -terpinène.²⁷ Au cours des années suivantes, la synthèse a été améliorée par le choix de couples de photosensibilisants/solvants les plus appropriés, l'éthanol chlorophyllien, le bleu de méthylène avec l'isopropanol ou encore le méthanol en présence de rose-Bengale. Un grand nombre d'études mécanistiques a été effectué sur l' α -terpinène en tant qu'accepteur typique dans une réaction de transfert d'oxygène photosensibilisée.

La méthode choisie ici pour la synthèse de l'ascaridol repose sur la génération de l'oxygène singulet par voie chimique en employant le système peroxyde d'hydrogène-molybdate de sodium H₂O₂/MoO₄²⁻. La production de l'oxygène singulet a lieu dans une microémulsion. Une microémulsion est une microdispersion de deux phases non miscibles solvant aqueux/solvant organique.

2.1. Génération de l'oxygène singlet : conditions expérimentales

Comme présenté dans la section 1.2.1 de ce chapitre, une méthode chimique efficace de production d'oxygène singlet $^1\text{O}_2$ repose sur la disproportionation du peroxyde d'hydrogène catalysée par du molybdate de sodium ($\text{H}_2\text{O}_2 / \text{MoO}_4^{2-}$) dans un milieu alcalin. Il s'agit d'un moyen chimique efficace permettant la production d'oxygène singlet $^1\text{O}_2$ de manière quantitative mis au point par Aubry (*Figure 15*).²⁸

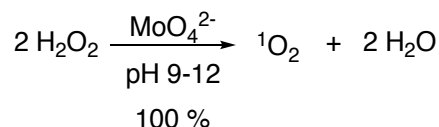


Figure 15 : Réaction de disproportionation du peroxyde d'hydrogène par le molybdate de sodium en milieu alcalin.

La réaction entre le peroxyde d'hydrogène et les ions molybdates conduit à la formation de différents intermédiaires peroxomolybdiques. Ainsi, quatre espèces de peroxomolybdates $\text{MoO}_{4-n}(\text{O}_2)_n^{2-}$, à savoir les mono-, di-, tri et tétra-peroxomolybdates, sont formés successivement par augmentation de la concentration de peroxyde d'hydrogène (*Figure 16*).²⁹ C'est en utilisant la RMN ^{95}Mo que ces différentes espèces de peroxomolybdates ont été identifiées.³⁰ Ces intermédiaires mono-, di-, tri- et tétraperoxomolybdates se forment en fonction du pH et de la concentration en peroxyde d'hydrogène lors de la réaction.

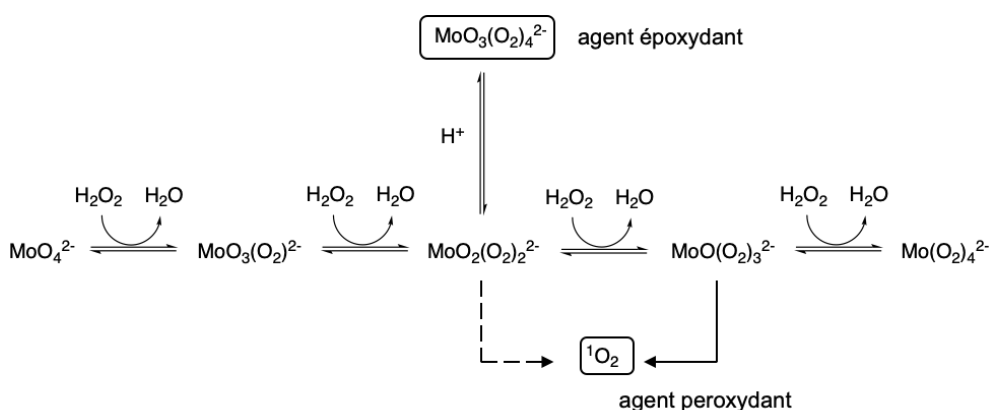


Figure 16 : Différents peroxomolybdates formés en mélangeant l'anion molybdate avec du peroxyde d'hydrogène dans des solutions aqueuses basiques ou légèrement acides.²⁹

Toutes les espèces ainsi dérivées du molybdate se trouvent être en équilibre lent. En utilisant les constantes d'équilibre entre tous les composés peroxo, un diagramme de prédominance montrant les complexes peroxo prédominants en fonction du pH et de la

concentration de peroxyde d'hydrogène sur une échelle logarithmique a été établi. Les limites séparant les différents domaines correspondent aux conditions pour lesquelles les concentrations des complexes situés de part et d'autre de la ligne sont égales. La zone interne correspond aux conditions pour lesquelles la concentration des espèces indiquées est prédominante (Figure 17).³¹

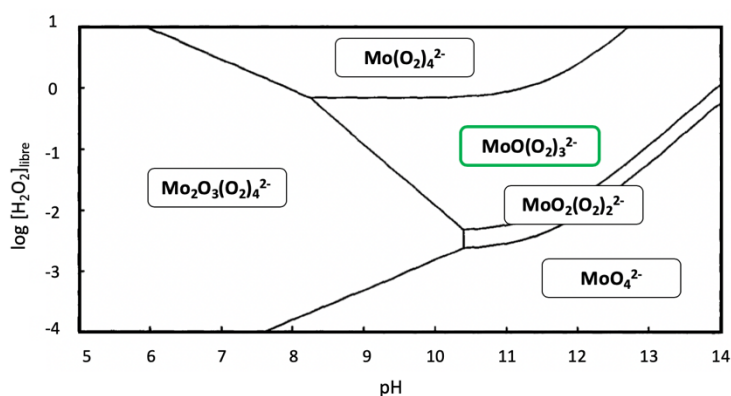


Figure 17 : Diagramme de prédominance du système $\text{H}_2\text{O}_2/\text{MoO}_4^{2-}$ en fonction du pH et de la concentration en peroxyde d'hydrogène libre ($T = 0^\circ \text{C}$, $[\text{Na}_2\text{MoO}_4] = 1 \text{ M}$). L'encadré vert correspond aux conditions optimales pour générer $^1\text{O}_2$.³¹

En comparaison avec des études cinétiques, il a été conclu que les meilleures conditions pour la génération d'oxygène singulet coïncident avec la zone encadrée en vert correspondant à la prévalence du triperoxomolybdate $\text{MoO}(\text{O}_2)_3^{2-}$.

En pratique, le peroxyde d'hydrogène est ajouté par fractions de manière à ce que la concentration en H_2O_2 introduite soit le double de celle des ions molybdate pour favoriser la formation du triperoxomolybdate rouge-orange $\text{MoO}(\text{O}_2)_3^{2-}$, précurseur de l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$, et pour éviter la formation du tétraoxomolybdate rouge-brun $\text{Mo}(\text{O}_2)_4^{2-}$, qui ne génère pas de $^1\text{O}_2$. De cette façon, le mélange réactionnel se décolore au fur et à mesure jusqu'à l'apparition d'une couleur jaune signe de la génération de l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$. C'est à dire lorsque le diperoxomolybdate $\text{MoO}_2(\text{O}_2)_2^{2-}$ devient le peroxomolybdate dominant. Ce changement de couleur est le critère visuel pour un ajout supplémentaire d'une autre fraction de H_2O_2 .¹⁰

En outre ses propriétés de peroxydation grâce à l'intermédiaire $\text{MoO}(\text{O}_2)_3^{2-}$, le système $\text{H}_2\text{O}_2 / \text{MoO}_4^{2-}$ présente également des propriétés d'époxydation des doubles liaisons avec la formation du tétraperoxidomolybdate $\text{Mo}_2\text{O}_3(\text{O}_2)_4^{2-}$ en milieu neutre ou acide auxquelles les alcools allyliques sont très sensibles (Figure 18).³¹

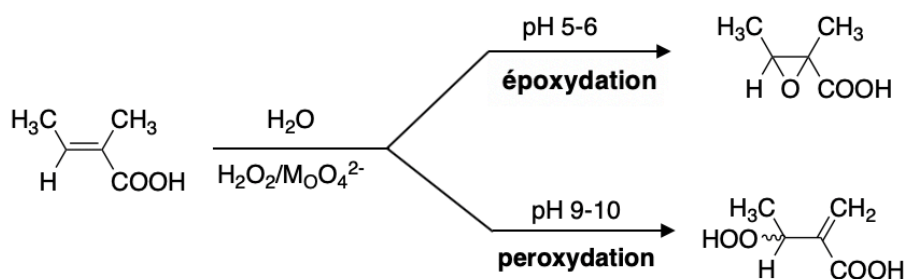


Figure 18 : Réaction de compétition entre l'époxydation et la peroxydation d'une double liaison en fonction du pH.³¹

Étant donné que toutes ces espèces peroxy sont en équilibre lent, il est primordial de maintenir le pH entre 9 et 12 et la concentration de peroxyde d'hydrogène (0,1-0,5 mol L⁻¹) dans les conditions optimales de production de l'oxygène singulet pour limiter ainsi l'action époxydante des peroxomolybdates.

Bien que la réaction d'époxydation se produit beaucoup plus rapidement que la peroxydation, une compétition entre ces deux réactions peut avoir lieu lors de l'ajout de nouvelle fraction de peroxyde d'hydrogène provoquant une baisse du pH. De ce fait, une stratégie a été développée pour éviter la réaction secondaire d'époxydation. Elle utilise des microémulsions qui sont des microdispersions stables d'eau et d'un solvant organique non miscible. Les réactifs hydrophiles (H₂O₂, Na₂MoO₄) et le substrat organique sont solubilisés séparément dans les compartiments aqueux et organiques de la microémulsion, respectivement.^{29,31} De façon microscopique, la microémulsion est constituée de microgouttelettes d'eau stabilisées par une monocouche de surfactant (dodécyle de sodium) et de cosurfactant (butanol) dans un solvant organique (dichlorométhane). La disproportionation du peroxyde d'hydrogène se réalise normalement dans l'eau ou en milieu polaire. Le peroxyde d'hydrogène et le molybdate de sodium étant hydrophiles, ils sont bloqués dans les microgouttelettes où ils produisent l'oxygène à l'état singulet. La génération chimique de ¹O₂ a donc lieu dans la phase aqueuse. Malgré sa courte durée de vie dans l'eau (≈ 4 μs), l'oxygène singulet est en mesure d'atteindre la phase organique avant sa désactivation, car la distance moyenne parcourue par ¹O₂ dans l'eau (≈ 200 nm) est beaucoup plus grande que la taille typique des microgouttelettes (≈ 10 nm) formés sous agitation vigoureuse du système biphasique.²⁹ Ce dernier étant petit et non chargé est capable de diffuser à partir de la phase aqueuse vers la phase organique où il rencontrera rapidement le composé insaturé mis en jeu (Figure 19).²⁹

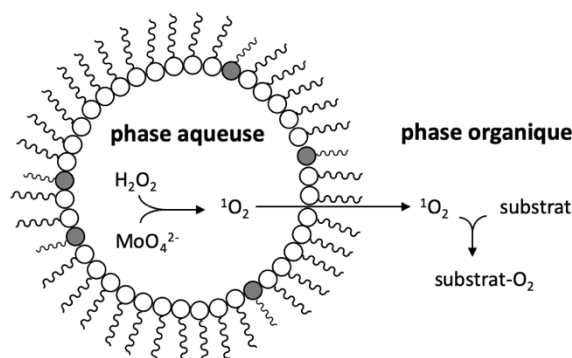


Figure 19 : Représentation schématique d'une microémulsion eau-huile utilisée pour la génération de l'oxygène singulet.²⁹

2.2. Résultats

La réaction de cycloaddition [4+2] entre l' α -terpinène et l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$, généré chimiquement dans une microémulsion grâce au système $\text{H}_2\text{O}_2/\text{MoO}_4^{2-}$, nous a permis l'obtention de l'ascaridol (**Asc**) avec un rendement de 44 % (Figure 20).

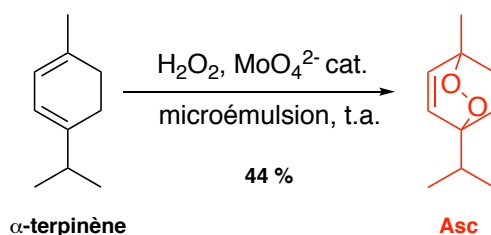


Figure 20 : Synthèse de l'ascaridol.

De cette façon, l'oxygène singulet joue le rôle de diénophile qui va s'ajouter au diène conjugué passant par les états intermédiaires décrits dans la section 1.2.3. de ce chapitre. Ainsi, le dérivé cyclique est formé. La réaction est favorisée car le diénophile, l'oxygène singulet, possède des atomes d'oxygène attracteurs appauvrissant la liaison π . Cette dernière va réagir sur le diène riche en électrons en raison de la présence des groupements alkyles donateurs d'électrons qui l'entourent.

3. Synthèse des hydroperoxydes allyliques dérivés du *R*-(+) limonène

Diverses méthodes ont été testées dans le but d'obtenir les composés **Lim-1-OOH** et **Lim-2-OOH**.

3.1. Réaction de Schenck sur le *R*-(+)-limonène

Dans le but d'obtenir les deux hydroperoxydes issus de l'autoxydation du *R*-(+)-limonène, il nous semblait judicieux tout d'abord d'employer la réaction de Schenck en générant chimiquement l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ dans une microémulsion par le système $\text{H}_2\text{O}_2/\text{MoO}_4^{2-}$, comme décrit précédemment pour la synthèse de l'ascaridol (Figure 21). Or, un mélange d'hydroperoxydes allyliques de polarité très proche a été obtenu. Bien qu'une tentative de purification très difficile ait été menée, aucune isolation de composé n'a pu être obtenue du fait que ces composés possèdent le même facteur de rétention sur chromatographie sur couche mince qu'importe l'éluant utilisé.

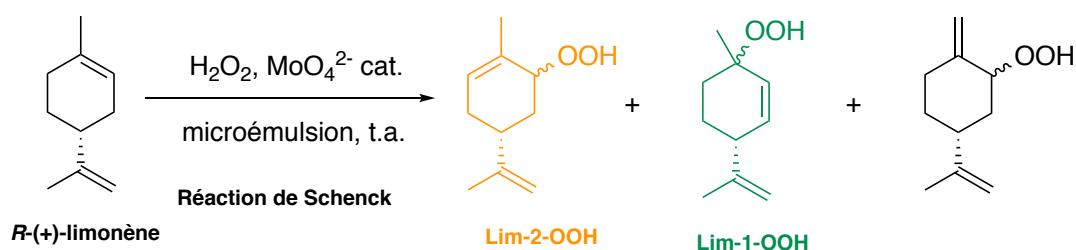


Figure 21 : Réaction de Schenck sur le *R*-(+)-limonène.

C'est par RMN du proton et grâce à la littérature que la caractérisation des différents produits obtenus a pu être réalisée. Nous avons donc décidé de synthétiser les différents hydroperoxydes cibles dérivés du *R*-(+)-limonène de façon indépendante. Les hydroperoxydes allyliques secondaires peuvent être synthétisés par substitution nucléophile $\text{S}_{\text{N}}2$ à partir de l'alcool correspondant. Quant aux hydroperoxydes allyliques tertiaires, ils sont obtenus par substitution nucléophile $\text{S}_{\text{N}}1$ à partir de l'alcool précurseur.

3.2. Substitution nucléophile sur le (-)-carvéol en vue de l'obtention du Lim-2-OOH

La procédure expérimentale qui a été suivie repose sur la publication de Kao et *al.*²⁵ Le (-)-carvéol a été traité avec une solution aqueuse d'eau oxygénée en présence d'une quantité catalytique d'acide sulfurique concentré (98 %). Après deux jours sous agitation vigoureuse à 0 °C, le produit impur a été obtenu. Puis, il a été purifié par chromatographie sur gel de silice neutralisé en raison de sa dégradation sur gel de silice. Finalement, après une seule étape, le **Lim-2-OOH** est obtenu avec un rendement de 47 % (Figure 22).²⁵

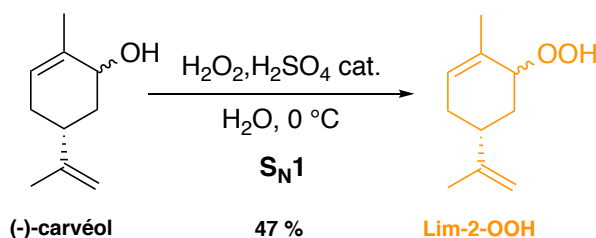


Figure 22 : Synthèse du **Lim-2-OOH** par une substitution nucléophile de type $\text{S}_{\text{N}}1$ sur le (-)-carvéol.²⁵

Durant cette réaction faisant appel à des conditions acides, un carbocation secondaire se forme bien qu'il soit moins stable et favorable comparé à un carbocation tertiaire. Bien que cette substitution nucléophile $\text{S}_{\text{N}}1$ soit décrite et favorisée pour des alcools tertiaires, il a été montré par Kao et *al.*²⁵ que cette dernière était possible sur des alcools secondaires.

3.3. Synthèse du Lim-1-OOH par substitution nucléophile sur l'alcool correspondant

Comme présenté dans la section précédente, les hydroperoxydes allyliques tertiaires peuvent être obtenus en réalisant une substitution nucléophile de type $\text{S}_{\text{N}}1$ à partir de l'alcool correspondant. De ce fait, au vu de l'obtention du **Lim-1-OOH**, la stratégie de synthèse s'est appuyée sur la synthèse de l'alcool correspondant. Plusieurs procédures ont été adoptées au vu de la synthèse de cet alcool. Tout d'abord, nous discuterons de la stratégie de synthèse de l'alcool intermédiaire à partir du (+)-2-carène et, dans un second temps, à partir du *R*-(+)-limonène. Puis, nous verrons la procédure de synthèse appliquée pour la génération de l'hydroperoxyde tertiaire souhaité.

3.3.1. Synthèse de l'alcool correspondant à partir du (+)-2-carène

Dans un premier temps, comme décrit dans la littérature par Johansson et *al.*, nous avons essayé de synthétiser le **Lim-1-OOH** à partir du (+)-2-carène en commençant par une époxydation de la double liaison avec de l'acide *mé*ta-chloroperbenzoïque produisant ainsi le carène-1,2-époxyde (**1**) (Figure 23).³²

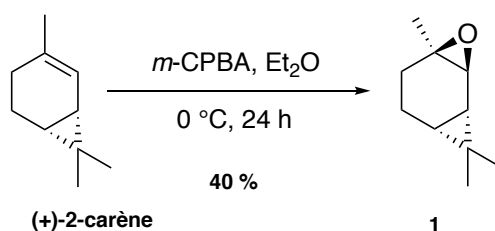


Figure 23 : Synthèse du carène-1,2-époxyde (**1**) à partir du (+)-2-carène.

Au cours de cette réaction, un seul diastéréoisomère est obtenu. En effet, la formation de l'époxyde n'a lieu préférentiellement que sur la face opposée au groupement cyclopropane en raison de l'éventuelle gêne stérique générée dans le cas contraire.

Le composé (**1**) produit l'alcool (1*R*,4*R*)-1-méthyl-4-isopropényl-2-cyclohexène-1-ol (**2**) en utilisant de l'oxyde de titane dihydroxyde comme catalyseur acide, préparé préalablement par hydrolyse du tétrachlorure de titane suivie d'un ajout lent d'ammoniaque (Figure 24).³³

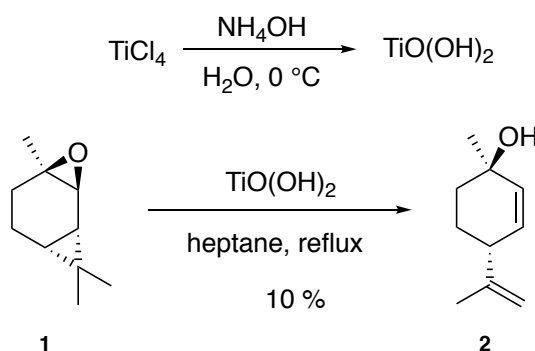


Figure 24 : Voie de synthèse permettant l'obtention du (1*R*,4*R*)-1-méthyl-4-isopropényl-2-cyclohexène-1-ol (**2**).

Bien que cette réaction ait été décrite dans la littérature avec un rendement de 56 %, nous n'avons pas pu dépasser 10 % de rendement. Après diverses tentatives d'amélioration de cette synthèse, en faisant varier la température et le nombre d'équivalents d'oxyde de titane dihydroxyde, cette voie a été abandonnée au profit de celle utilisant le *R*-(+)-limonène comme produit de départ.

3.3.2. Synthèse de l'alcool correspondant à partir du *R*-(+)-limonène

Le motif structural de base du **Lim-1-OOH** est le *R*-(+)-limonène (4-isopropényl-1-méthylcyclohexène). Il nous a donc semblé judicieux de l'utiliser en tant que produit de départ. Comme indiqué précédemment, la stratégie de synthèse de cet hydroperoxyde repose tout d'abord sur la synthèse de l'intermédiaire alcool précurseur. Il se trouve que cet alcool est

utilisé dans la synthèse actuelle du Δ^9 -tétrahydrocannabinol (THC) et le Δ^9 -tétrahydrocannabidiol (CBD) à partir du *R*-(+)-limonène (Figure 25).³⁴

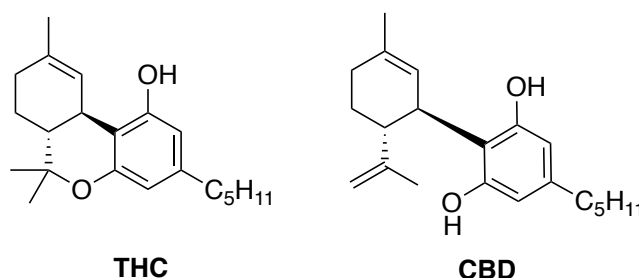


Figure 25 : Structures moléculaires du THC et du CBD.³⁴

Le THC est le principal constituant psychoactif du cannabis dont les principaux effets pharmacologiques comprennent de la psychose, l'analgésie, l'affaiblissement moteur et l'hypothermie. Le CBD est le principal constituant pharmacologique non psychoactif du cannabis, avec une perte d'activité psychotrope attribuée à une affinité 100 fois plus faible pour les deux récepteurs cannabinoïdes. En dépit de son manque d'activité psychotrope, le CBD a montré des applications thérapeutiques en tant qu'antioxydant anti-arthritique et neuroprotecteur.³⁵

Ainsi, dans la littérature deux méthodes sont décrites pour la synthèse de l'alcool cible : la première utilise le diséléniure de diphenyle et la deuxième un intermédiaire β -aminoalcool. Toutefois, la première étape de synthèse reste commune à ces deux méthodes. En effet, une étape d'oxydation est nécessaire pour former tout d'abord un mélange d'isomères correspondant au limonène-1,2-époxyde. Ainsi, le *R*-(+)-limonène est oxydé en présence d'acide *m*éta-chloroperbenzoïque *via* une réaction de Prilezhaev conduisant à un mélange avec un ratio 1 : 1 correspondant au (1*S*, 2*R*, 4*R*)- et (1*R*, 2*S*, 4*R*)-limonène-1,2-époxydes (**3**) et (**4**) (Figure 26).³⁴

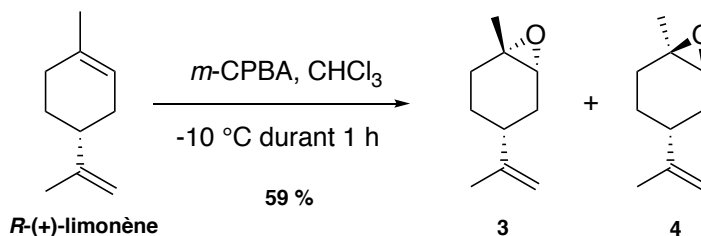


Figure 26 : Synthèse des limonène-1,2-époxydes (**3**) et (**4**).

En raison des difficultés liées à la séparation de ce mélange de diastéréoisomères (**3**) et (**4**), il a été utilisé en tant que tel pour la suite des études.

Méthode 1 : utilisation du diséléniure de diphényle

Les limonène-1,2-époxydes (**3**) et (**4**) ont été, dans un premier temps, convertis en séléniures par réaction avec du diséléniure de diphényle dans des conditions réductrices en présence de borohydrure de sodium. Lors cette étape, l'anion sélénium qui est un excellent nucléophile va permettre l'ouverture des époxydes (**3**) et (**4**) pour former l'hydroxy-séléniure correspondant.

Le traitement du mélange d'époxydes (**3**) et (**4**) avec du diséléniure de diphényle permet l'ouverture transdiaxiale de chaque époxyde avec une régiospécificité complète. Ainsi le (1*R*, 2*S*, 4*R*)-limonène-1,2-époxyde (**4**) donne un séléniure tertiaire et le (1*S*, 2*R*, 4*R*)-limonène-1,2-époxyde (**3**) un séléniure secondaire. Ce mélange de séléniures intermédiaires tertiaire et secondaire est oxydé directement avec du peroxyde d'hydrogène en sélénoxydes correspondants. Le sélénoxyde tertiaire subit une élimination régiospécifique de l'acide phénylsélénique pour générer la fonction méthylène exocyclique du (1*S*, 5*R*)-2-méthylène-5-isopropényl-cyclohexan-1-ol (**6**). Cet alcool monoterpénique (**6**), présent naturellement comme constituant principal de l'huile de gingembre, a été obtenu avec un rendement global de 54 % (*Figure 27*).

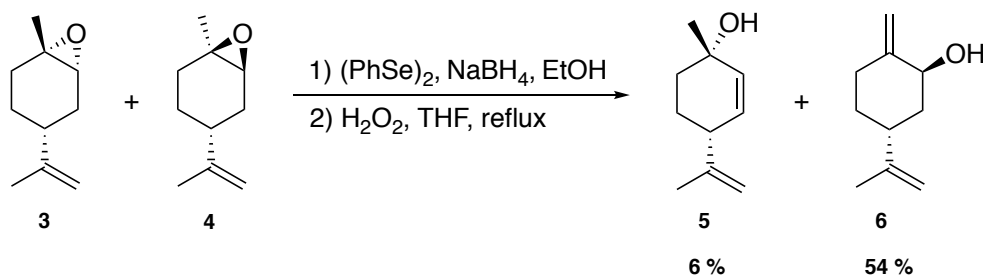


Figure 27 : Synthèse de l'alcool précurseur (**5**) à partir du mélange d'époxydes (**3**) et (**4**) en présence de diséléniure de diphényle.

Quant au séléniure secondaire précurseur, son sélénoxyde formé prend une conformation dans laquelle le substituant sélénium est en position équatoriale en raison de son rapprochement avec l'hydrogène au groupe hydroxyle voisin permettant la stabilité de cet intermédiaire (*Figure 28*).³⁶ La thermolyse de ce sélénoxyde secondaire conduit au (1*S*, 4*R*)-1-méthyl-4-isopropényl-2-cyclohexène-1-ol (**5**) désiré mais avec un rendement seulement de 6 %. Ce rendement peut être expliqué en raison d'un contrôle difficile de la thermolyse.

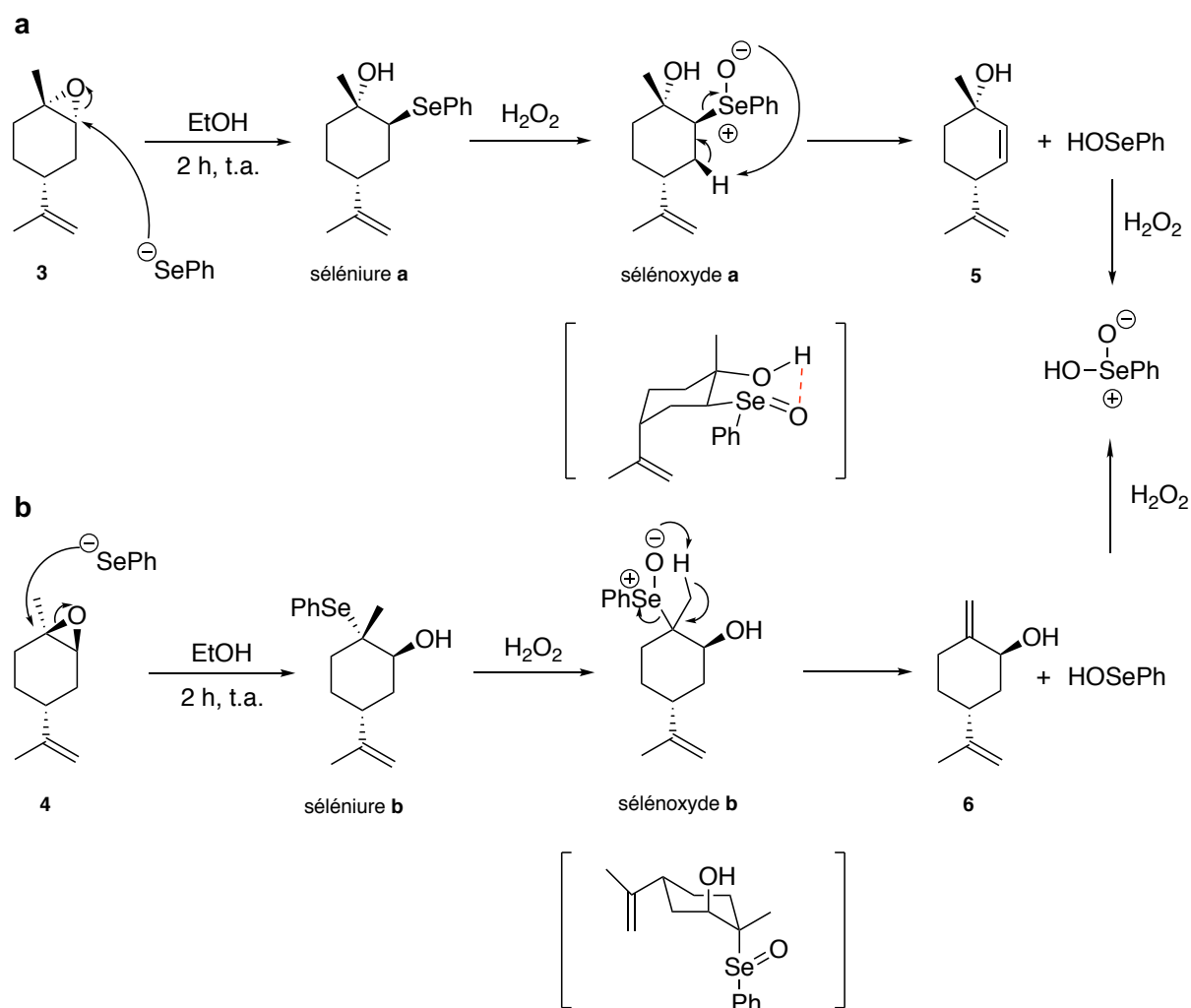


Figure 28 : Mécanisme réactionnel permettant l'obtention de l'alcool précurseur (**5**) et de l'alcool non désiré (**6**).

Dans la littérature, il a été montré que l'élimination de l'acide phénylsélénique que subissait le sélénoxyde tertiaire était favorisée lorsque la réaction avait lieu à température ambiante générant le composé (**6**).³⁶ Après une multitude d'essais reposant sur un contrôle de la température, le rendement de l'alcool (**5**) n'a pas réussi cependant à être amélioré. De ce fait, une autre stratégie de synthèse a été mise en place.

Méthode 2 : utilisation d'une amine secondaire cyclique - la morpholine

L'ouverture d'un époxyde peut avoir lieu facilement grâce à l'utilisation d'une amine, conduisant ainsi à la formation d'un β -aminoalcool.

Les β -aminoalcools dérivés du limonène-1,2-époxyde sont facilement synthétisés et peuvent être isolés avec une grande pureté et d'excellents rendements.³² Il s'agit ici dans notre cas d'une méthode qui permet sur l'ouverture sélective des noyaux époxydes.³⁷

Cette réaction repose sur les différences conformationnelles entre les deux époxydes (**3**) et (**4**) résultants en une résolution cinétique des isomères. Comme le montre la *Figure 29*, un seul β -aminoalcool est obtenu sélectivement par attaque nucléophile de la morpholine sur le mélange de limonène-1,2-époxydes (**3**) et (**4**) (*Figure 29*).

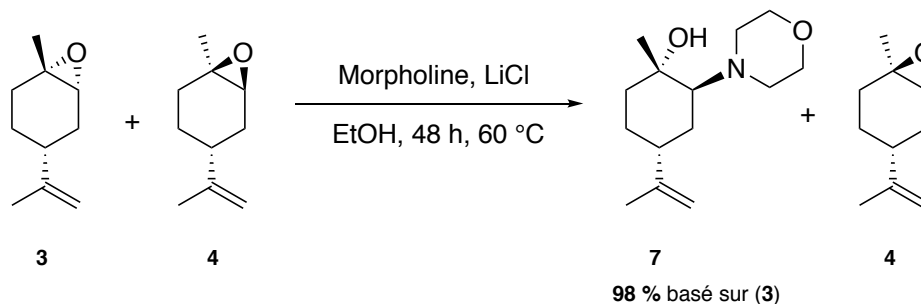


Figure 29 : Synthèse du β -aminoalcool (**7**).

L'attaque, correspondant à une substitution nucléophile S_N2 , a lieu par approche axiale du nucléophile sur l'époxyde. Pour les deux isomères (**3**) et (**4**), le groupe isopropényle préfère l'orientation équatoriale. Pour (**3**), une réaction de type S_N2 avec une amine nucléophile peut être envisagée au niveau du carbone C-2 moins encombré dans un état de transition thermiquement stable de type fauteuil. Le groupe isopropényle équatorial en position C-4 fournit une barrière d'énergie considérable et empêche le retournement de conformation de se produire. Le nucléophile se limite donc à attaquer (**3**) à partir de la direction axiale en conservant la conformation de la chaise dans l'état de transition, conduisant à une ouverture de cycle de manière régio- et stéréospécifique. En revanche, l'isomère (**4**) doit subir un retournement en anneau pour permettre l'attaque par l'arrière par une S_N2 traditionnelle au niveau de l'atome de carbone C-2 or son état de transition est défavorable et énergiquement « semblable à un bateau ». Par conséquent, l'isomère (**4**) ne peut pas réagir (*Figure 30*).^{37,38} Ainsi, le (1*R*, 2*S*, 4*R*)-limonène-1,2-époxyde (**4**) est isolé en tant que sous-produit de cette réaction et le (1*S*, 2*S*, 4*R*)-1-méthyl-4-isopropényl-2-(4'-morpholinyl)cyclohexan-1-ol (**7**) a pu être isolé par extraction successive reposant sur la protonation et déprotonation de l'amine avec un rendement de 98 % à partir du composé (**3**).

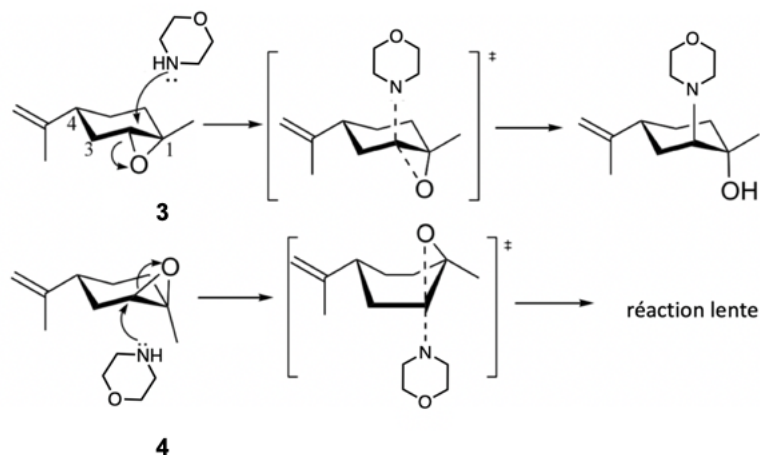


Figure 30 : Ouverture sélective du limonène-1,2-époxyde (**3**).³⁷

Le composé (**7**) a été par la suite oxydé avec du peroxyde d'hydrogène pour former le (1*S*, 2*S*, 4*R*)-1-méthyl-4-isopropényl-2-(4'-oxido-4'-morpholinyl)cyclohexan-1-ol (**8**) (Figure 31).³⁹

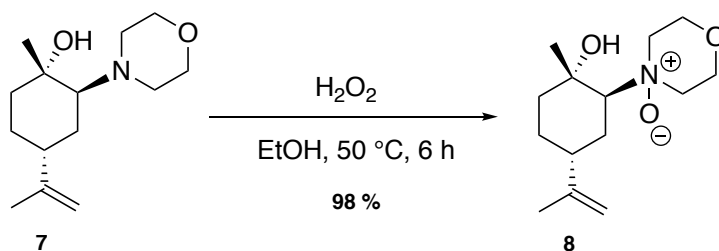


Figure 31 : Oxydation du (1*S*, 2*S*, 4*R*)-1-méthyl-4-isopropényl-2-(4'-morpholinyl)cyclohexan-1-ol (**7**).

Ce composé (**8**) sera alors soumis à une élimination de Cope en chauffant à reflux en présence de silice pour fournir le (1*S*, 4*R*)-1-méthyl-4-isopropényl-2-cyclohexèn-1-ol (**5**) (Figure 32).³⁹

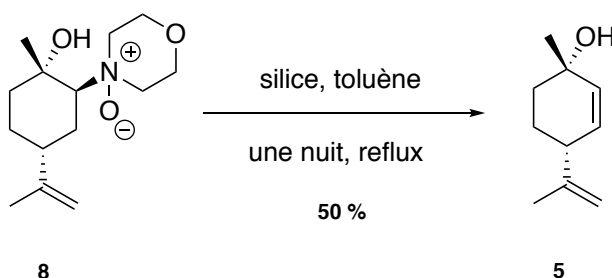


Figure 32 : Synthèse du (1*S*, 4*R*)-1-méthyl-4-isopropényl-2-cyclohexèn-1-ol (**5**).

Dans la première partie de ce processus, l'amine attaque le peroxyde d'hydrogène, en formant N-OH et en cassant la liaison O-O faible. La liaison O-H de l'amine oxydé est ensuite déprotonée, entraînant la formation du N-oxyle (**8**). Il est nécessaire de savoir qu'il existe des

charges opposées dans le *N*-oxyde sur des atomes adjacents s'agissant ainsi d'un « zwitterion ». En outre, l'amine de départ doit être tertiaire pour ce processus d'élimination de Cope. Ainsi, le *N*-oxyde est une base faible ($pK_a = 4,5$ environ, aussi forte que la pyridine). Lorsqu'il est suffisamment chauffé (i.e. $120\text{ }^\circ\text{C}$), une réaction d'élimination se produit conduisant à la formation d'un alcène ainsi que d'une hydroxylamine substituée (Figure 33).

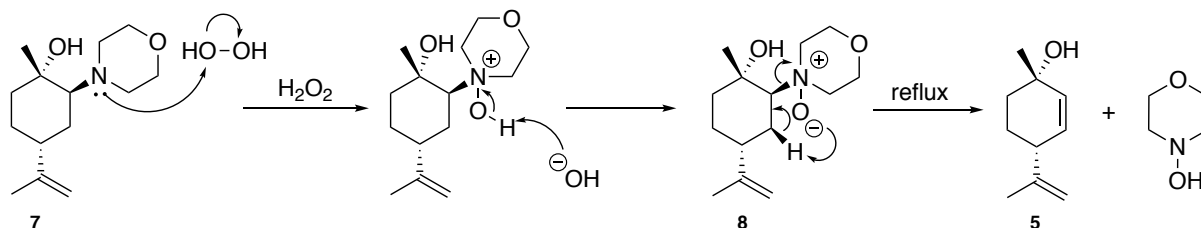


Figure 33 : Mécanisme de l'élimination de Cope.

Méthode 3 : utilisation d'une amine secondaire non cyclique - la diméthylamine

De la même façon, la diméthylamine a été utilisée dans le cadre de la synthèse de l'intermédiaire alcool (1*S*,4*R*)-1-méthyl-4-isopropényl-2-cyclohexène-1-ol (**5**) (Figure 34).³⁴

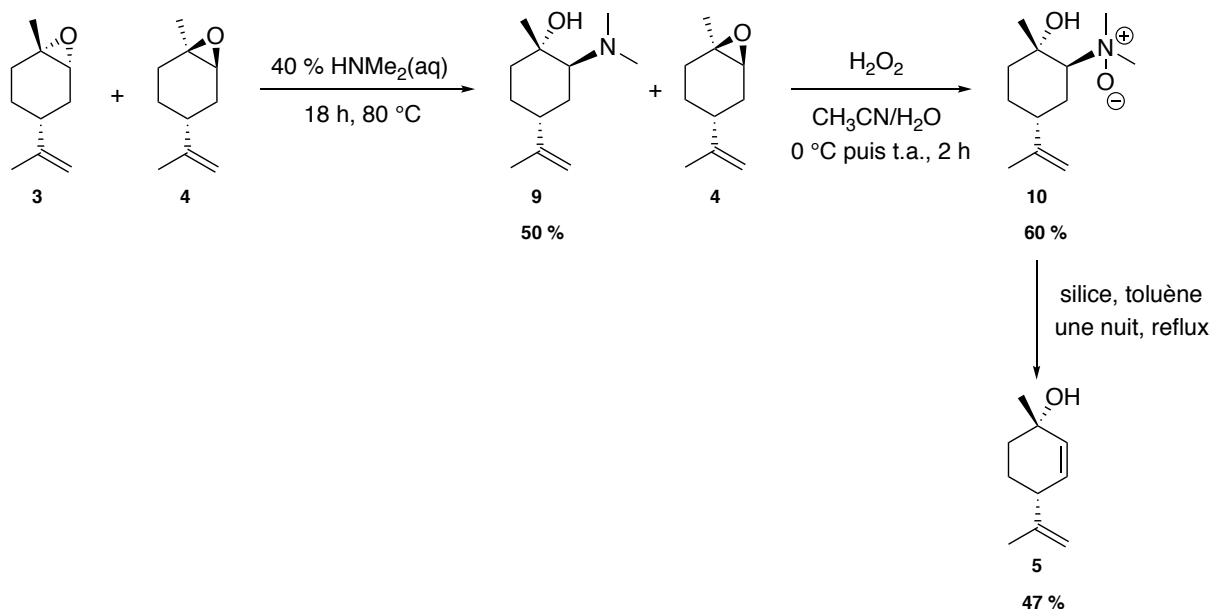


Figure 34 : Synthèse du (1*S*, 4*R*)-1-méthyl-4-isopropényl-2-cyclohexène-1-ol (**5**) en passant par un β-aminoalcool à partir de la diméthylamine.

De manière identique à la méthode 2 décrite précédemment, le (1*S*, 2*R*, 4*R*)-limonène-1,2-époxyde (**3**) a été ouvert de manière régiosélective à l'aide de la diméthylamine en solution aqueuse pour générer un β-aminoalcool pur avec un rendement de 50 % basé sur (**3**). Le

composé (4) est récupéré. L'énantiosélectivité de l'ouverture de l'époxyde provient de l'énergie associée aux états de transition respectifs nécessaires pour obtenir l'ouverture axiale de l'époxyde adoptant une structure de transition privilégiée semblable à une chaise, tandis que le limonène-1,2-époxyde (4) doit prendre une structure de transition en bateau défavorisé comme état de transition. L'amine tertiaire (9) subit alors une oxydation afin de générer (1S, 2S, 4R)-1-méthyl-4-isopropényl-2-diméthylamino-oxido-cyclohexan-1-ol (10) avec un rendement de 60 % suivi de sa pyrolyse pour former le (1S, 4R)-1-méthyl-4-isopropényl-2-cyclohexène-1-ol (5) avec un rendement de 60 % *via* une élimination de Cope.

En plus de contourner l'utilisation du sélénium, cette voie de synthèse préconisant l'utilisation d'une amine fournit, à partir du mélange limonène-1,2-époxyde (3) et (4), le (1S,4R)-1-méthyl-4-isopropényl-2-cyclohexène-1-ol (5) avec un rendement de synthèse amélioré (14 % avec la morpholine et 4 % avec la diméthylamine en quatre étapes) par rapport à la voie du sélénioxyde (3 % en deux étapes).

La voie préconisant l'utilisation de la morpholine a été privilégiée pour la suite des études par rapport à la diméthylamine en raison des meilleurs rendements obtenus, mais également en raison de la facilité à purifier les produits résultants. En effet, l'utilisation de la diméthylamine génère des produits secondaires provoquant une purification plus laborieuse lors des différentes étapes de synthèse.

3.3.3. Substitution nucléophile sur l'alcool correspondant en vue de l'obtention du Lim-1-OOH

L'alcool précurseur (5) a été traité avec une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène (35 %) en présence d'une quantité catalytique d'acide sulfurique concentré (98 %) en suivant la procédure adoptée par Calandra et *al.*⁴⁰ La réaction est suivie par chromatographie sur couche mince et, au bout de quelques heures, le composé (5) est totalement converti en hydroperoxyde. Ce dernier a été purifié par chromatographie sur gel de silice avec un rendement de 50% (*Figure 35*).

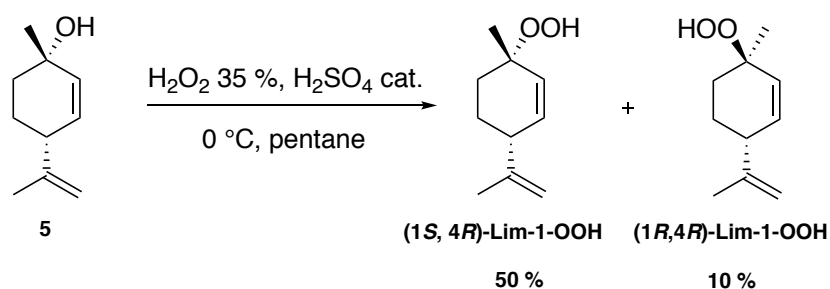


Figure 35 : Synthèse du **(1S, 4R)-Lim-1-OOH** et du **(1R, 4R)-Lim-1-OOH**.

Cependant, au cours de cette étape de synthèse, un carbocation tertiaire est formé et de cette façon deux diastéréoisomères sont obtenus. Trois fractions sont récupérées à l'issue de la purification par colonne sur gel de silice, le **(1S-4R)-1-méthyl-4-isopropényl-2-cyclohexène-1-hydroperoxide** (**(1S, 4R)-Lim-1-OOH**) et le **(1R-4R)-1-méthyl-4-isopropényl-2-cyclohexène-1-hydroperoxide** (**(1R, 4R)-Lim-1-OOH**) et une fraction contenant un mélange de ces deux composés.

Étant donné que la RMN du proton et du carbone n'est pas suffisante pour attribuer la stéréochimie du carbone en position 1 de ces composés, nous avons réalisé deux spectres de RMN multidimensionnelle Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (NOESY) pour chacun des composés purifiés. La NOESY décrit une interaction entre deux noyaux de spins à travers l'espace. Dans notre cas, il était question d'observer si une corrélation avait lieu ou pas entre le proton de l'hydroperoxyde et le méthyle de l'isopropényle. Si une corrélation est observée cela voudrait dire qu'il s'agit du composé présentant une conformation S en position 1. Dans le cas contraire, il s'agirait de la conformation R (Figure 36).

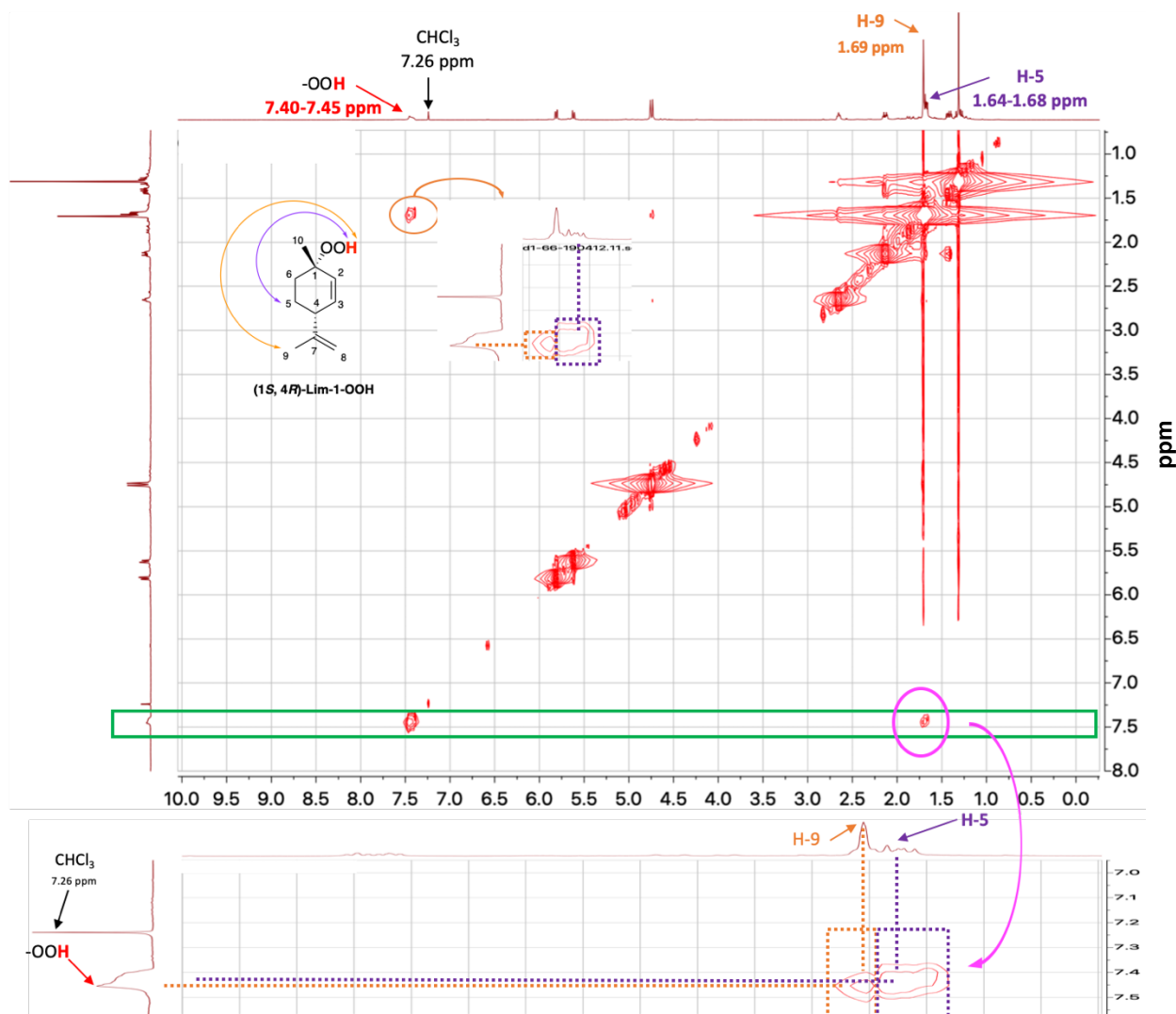


Figure 36 : NOESY du composé majoritaire montrant une corrélation entre le proton de l'hydroperoxyde et le méthyle en position 9 et les protons en H-5.

La NOESY montre une corrélation entre le méthyle en position 9 et le proton de l'hydroperoxyde. Ceci confirme qu'il s'agit du **(1S, 4R)-Lim-1-OOH** comme l'ont décrit Calandra et *al.*⁴⁰ Ceci peut s'expliquer par le fait que le peroxyde d'hydrogène attaquerait en position axiale formant un intermédiaire réactionnel plus stable que le produit obtenu. On parle alors d'attaque axiale (**A**) (Figure 37). Alors que dans le cas (**B**) il est en position équatoriale, représentant le produit le plus stable. Or, les attaques axiales ne sont pas régies par la stabilité du produit final, mais c'est la stabilité de l'intermédiaire qui est primordiale. L'obtention du **(1S, 4R)-Lim-1-OOH** est majoritaire sans doute en raison de son intermédiaire qui présente une importante énergie d'activation par rapport au conformère (**B**).

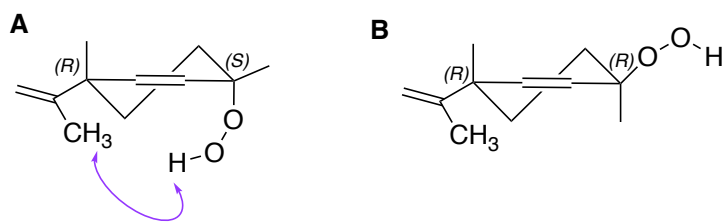


Figure 37 : Conformation demi-chaise du (1S, 4R)-Lim-1-OOH (A) et du (1R, 4R)-Lim-1-OOH (B).

Bien que cette analyse NOESY eût été déjà réalisée par Uchiyama et *al.*, elle n'avait pas été concluante et aucune information relevant de la stéréochimie n'avait pu être proposée par RMN.⁴¹ Cependant, il avait réussi à montrer que la photo-oxydation du *d*-limonène suivie d'une réduction avec triphénylphosphine avait donné les composés (1S, 4R)-1-méthyl-4-isopropényl-2-cyclohexène-1-ol (**5**) et (1R, 4R)-1-méthyl-4-isopropényl-2-cyclohexène-1-ol (**2**). Une oxymercuration du composé (**5**) suivie d'un traitement avec du borohydrure de sodium avait donné le (1S,4R)-*p*-mentha-2-ène-1,8-diol. Les spectres de RMN du proton et du carbone du (1S, 4R)-*p*-mentha-2-ène-1,8-diol étaient identiques à ceux de l'alcool, dérivé du (1S, 4R)-Lim-1-OOH par hydrolyse alcaline puis réduction avec de la triphénylphosphine. Ce résultat avait établi que la stéréochimie relative de (1S, 4R)-Lim-1-OOH est identique à celle de (1S,4R)-*p*-mentha-2-ène-1,8-diol.

4. Synthèse des hydroperoxydes allyliques dérivés du (±)-β-citronellol

Il a été rapporté dans la littérature que les hydroperoxydes issus de l'autoxydation du (±)-β-citronellol, attribués au (±)-Citr-6-OOH et au (±)-Citr-7-OOH, présentent une activité de sensibilisation élevée.⁴² Nous nous sommes donc intéressés à la synthèse individuelle de ces deux composés.

4.1. Réaction de Schenck sur le (±)-β-citronellol

La réaction de Schenck entre le (±)-β-citronellol et l'oxygène singulet ¹O₂ généré chimiquement par la réaction de disproportionation du peroxyde d'hydrogène, catalysée par le molybdate de sodium dans une microémulsion, mène à la formation d'un mélange d'hydroperoxydes composé du (±)-Citr-6-OOH et du (±)-Citr-7-OOH (Figure 38).

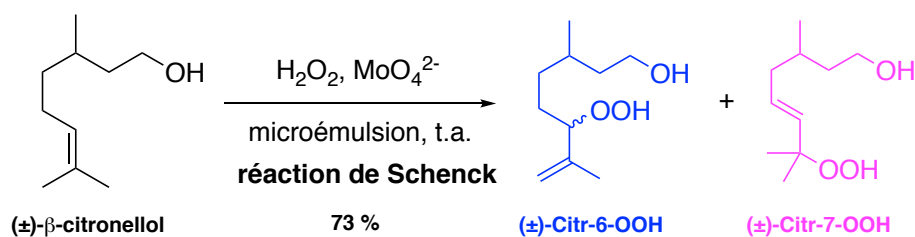


Figure 38 : Réaction de Schenck sur le (±)-β-citronellol.

La RMN du proton nous a permis de déterminer un rapport de 6 : 4 entre les composés **(±)-Citr-6-OOH** et **(±)-Citr-7-OOH**, respectivement. Le (±)-β-citronellol, possédant un alcène trisubstitué avec un groupement diméthyle géminale, permet d'obtenir les hydroperoxydes allyliques à des positions différentes. En théorie, nous nous attendions à obtenir le **(±)-Citr-7-OOH** majoritairement en raison de la taille volumineuse du substituant en position 4. Or, c'est le **(±)-Citr-6-OOH** qui est obtenu en majorité. Ceci peut s'expliquer en raison de la libre rotation de la liaison C₃-C₄ du **(±)-Citr-7-OOH**. Les deux isomères de position ayant le même facteur de rétention sur CCM, leur séparation n'a pas pu être effectuée. Une séparation sur gel de silice imprégnée de nitrate d'argent a été également réalisée mais en vain.

Toutes les tentatives visant à séparer le **(±)-Citr-6-OOH** de l'isomère **(±)-Citr-7-OOH** par chromatographie sur colonne (gel de silice, gel de silice imprégné de nitrate d'argent, alumine) ont été infructueuses. Kao et *al.*²⁵ avaient suggéré la dérivatisation chimique des hydroperoxydes allyliques dérivés du linalol par la protection de la fonctionnalité hydroperoxyde sous forme de silyléther et, en raison de la gêne stérique d'un groupe volumineux tel que le *tertio*-butyldiphénylsilyle, favoriserait la protection sélective de l'un des hydroperoxydes. Cette méthode s'était révélée être un succès puisqu'un seul des deux hydroperoxydes dérivés du linalol avait pu être isolé.²⁵ De ce fait, la protection sous forme d'éther de silyle a été réalisée sur le mélange d'hydroperoxydes allyliques dérivée du (±)-β-citronellol, dans les conditions de Kao et *al.* Les premiers essais n'ont pas abouti à la protection sélective de l'un des deux hydroperoxydes ni à la protection d'un des deux hydroperoxydes. Le produit de départ est récupéré comme tel après 7 jours. Malgré quelques tentatives d'amélioration des conditions expérimentales, plusieurs fractions ont été récupérées après une purification par chromatographie sur gel de silice contenant du produit de départ n'ayant pas réagi. De plus, il était très difficile d'éliminer complètement l'excès de chlorure de *tertio*-butyldiphénylsilane. Il a donc été nécessaire de synthétiser ces composés individuellement.

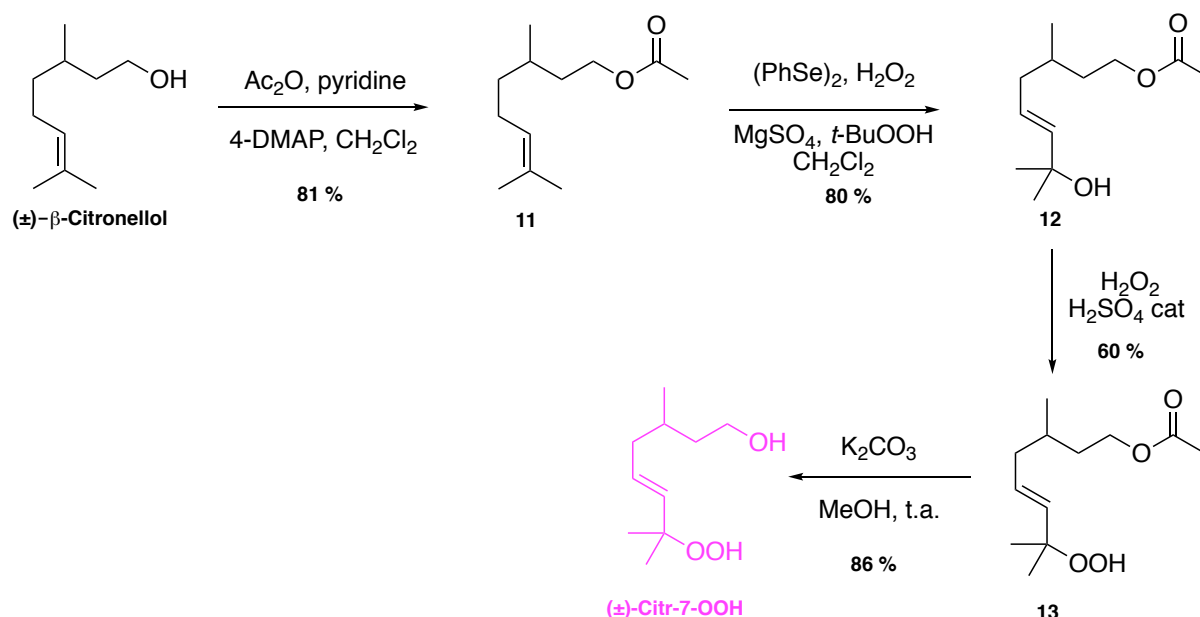
4.2. Synthèse du (*E*)-7-hydroperoxy-3,7-diméthyl-5-octèn-1-ol ((±)-Citr-7-OOH)

Comme présenté dans la section 1.3. de ce chapitre, le ((±)-Citr-7-OOH, hydroperoxyde allylique tertiaire, peut être synthétisé à partir de l'alcool précurseur en réalisant une substitution nucléophile de type S_N1. De ce fait, au vue de l'obtention du ((±)-Citr-7-OOH, la stratégie de synthèse s'est appuyée sur la synthèse de l'alcool correspondant. Le motif structural de base de ce composé est le (±)-β-citronellol. Il nous a donc semblé astucieux de l'utiliser en tant que réactif de départ.

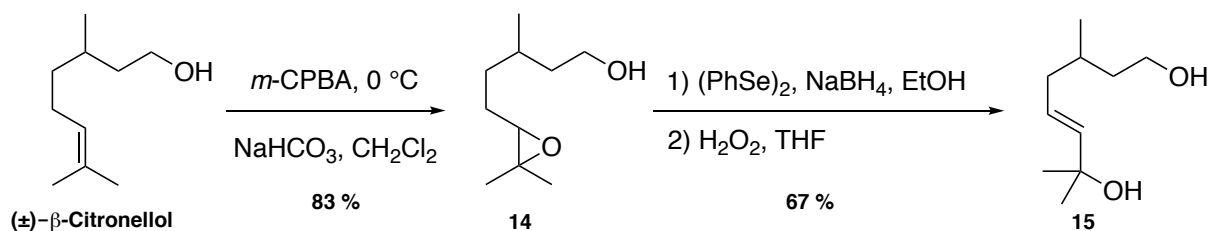
Le ((±)-Citr-7-OOH a été synthétisé en 4 étapes à partir du (±)-β-citronellol. Tout d'abord, une protection de l'alcool primaire *via* un groupement acétate a été réalisée. On a utilisé pour cela l'anhydride acétique, à froid, en présence de pyridine et d'un catalyseur nucléophile, la 4-diméthylaminopyridine. La réaction se fait aisément avec conversion complète du (±)-β-citronellol. Ainsi, l'acétate de 3,7-diméthyl-6-octèn-1-yle (**11**) est obtenu avec un rendement de 81 %. Le choix du groupement protecteur s'est porté sur sa capacité à résister aux conditions acides permettant la synthèse de l'hydroperoxyde souhaité (H₂O₂/H₂SO₄) (*Figure 39*).

L'acétate de (*E*)-7-hydroxy-3,7-diméthyl-5-octèn-1-yle (**12**) a été ensuite obtenu à partir de l'acétate de 3,7-diméthyl-6-octèn-1-yle (**11**) selon le protocole décrit par l'équipe de Mori.⁴³ L'addition d'une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène à 35 % à une solution de diséléniure de diphenyle permet la génération *in situ* de l'acide phénylsélénique qui s'additionne sur la liaison C=C afin de former un β-hydroxysélénure. La présence de sulfate de magnésium permet de séquestrer l'eau mais également d'atteindre une régiosélectivité Markovnikoff totale. L'oxydation du sélénure par l'hydroperoxyde de *tertio*-butyle donne un sélénioxyde thermiquement instable qui élimine l'acide phénylsélénique pour donner l'alcool allylique avec un rendement de 80 %.⁴⁴

La conversion de l'alcool (**12**) en hydroperoxyde (**13**) s'effectue *via* une S_N1 en formant un carbocation tertiaire stable grâce à l'acide sulfurique (98 %) en quantité catalytique et en présence de peroxyde d'hydrogène avec un rendement de 60 %.⁴⁵ Enfin, le ((±)-Citr-7-OOH a été obtenu par clivage du groupement acétyle en présence de carbonate de potassium dans du méthanol (*Figure 39*).

Figure 39 : Synthèse du (\pm) -Citr-7-OOH.

Nous avons également tenté de former l'hydroperoxyde (\pm) -Citr-7-OOH sans effectuer la protection de l'alcool primaire. En suivant la méthode de Sharpless, nous avons tout d'abord synthétisé l'alcool précurseur (*E*)-3,7-diméthyl-5-octène-1,7-diol (**15**) à partir du 6,7-époxy-3,7-diméthyl-octan-1-ol (**14**).⁴⁴ Le diséléniure de diphenyle génère dans les conditions employées l'anion sélénium qui est un excellent nucléophile. Ce dernier va permettre l'ouverture de l'époxyde (**14**) pour former un hydroxyséléniure. Ce dernier n'est pas isolé mais il est oxydé par un excès de peroxyde d'hydrogène en sélénoxyde instable qui se décompose en alcool allylique (**15**) avec un rendement de 67 % (Figure 40).

Figure 40 : Synthèse du (*E*)-3,7-diméthyl-5-octène-1,7-diol (**15**).

Ainsi, une fois le (*E*)-3,7-diméthyl-5-octène-1,7-diol (**15**) obtenu, nous avons pensé que les conditions oxydantes menant à la formation de l'hydroperoxyde nous conduiraient à la formation d'un carbocation tertiaire plus stable que le carbocation issu de l'alcool primaire. Or, lors de cette étape, nous n'avons pas pu détecter la formation du (\pm) -Citr-7-OOH mais une dégradation du produit de départ.

4.3. Synthèse du 6-hydroperoxy-3,7-diméthyl-7-octèn-1-ol ((±)-Citr-6-OOH)

De la même façon, la synthèse du ((±)-Citr-6-OOH repose dans un premier temps en la synthèse de son alcool précurseur. Nous avons envisagé une synthèse de l'hydroperoxyde à partir de l'alcool secondaire correspondant en s'appuyant sur la synthèse du **Lim-2-OOH** formé à partir de l'alcool secondaire (-)-carvéol précurseur.

4.3.1. À partir de l'acétate de 6-hydroxy-3,7-diméthyl-7-octèn-1-yle

Le premier essai a été réalisé suivant la même philosophie que pour la synthèse menant au ((±)-Citr-7-OOH.

Le ((±)-β-citronellol est d'abord converti en son époxyde avec de l'acide *méta*-chloroperbenzoïque avec un rendement 83 %, puis la fonction alcool est acétylée avec de l'anhydride acétique pour donner l'acétate de 6,7-époxy-3,7-diméthyl-1-yl (**16**) avec un rendement de 76 %. L'alcool allylique (**17**) est obtenu avec un rendement de 63 % par ouverture de l'époxyde (**16**) en présence de dichlorobis(2,4-cyclopentadièn-1-yl)titane, un réactif de transfert d'électrons utilisé par l'équipe de Justicia et al. (Figure 41).⁴⁶

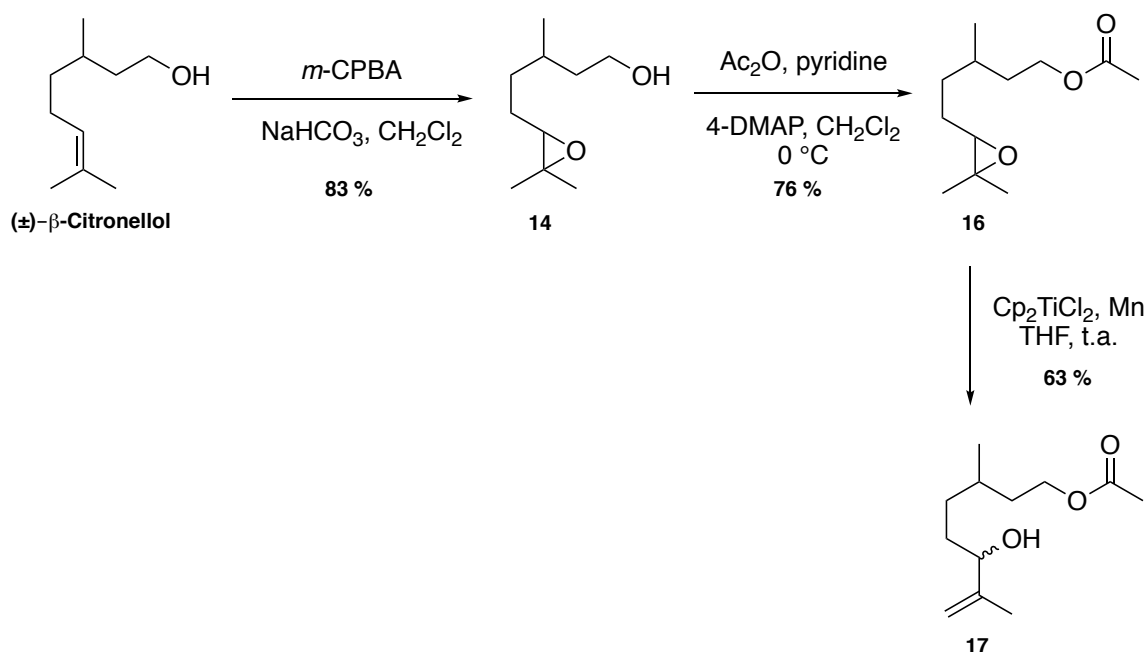


Figure 41 : Synthèse de l'acétate de 6-hydroxy-3,7-diméthyl-7-octèn-1-yle (**17**).

L'ouverture de l'époxyde (**16**) conduit au radical β -titanoxy tertiaire le plus stable en position 7, puis un hydrogène en position bêta est éliminé pour former la double liaison C=C. Le groupe titanoxo est clivé par lavage acide pour former l'acétate de 6-hydroxy-3,7-diméthyl-7-octèn-1-yle (**17**) (Figure 42).

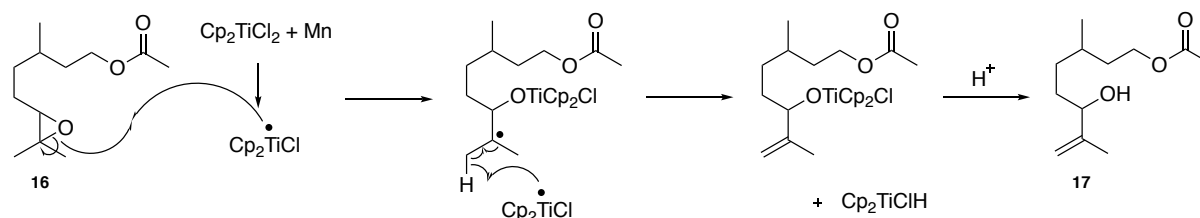


Figure 42 : Mécanisme d'ouverture de l'époxyde conduisant à l'alcool.⁴⁶

Ensuite, la même méthode employée pour l'obtention du (\pm)-Citr-7-OOH a été initialement testée. Ici, le carbocation formé par élimination d'une molécule d'eau en position 6 et stabilisé par mésomérie et est susceptible de réagir avec le peroxyde d'hydrogène en solution aqueuse. Cependant, aucune des conditions testées (temps de réaction jusqu'à 72 h, ajout d'acide sulfurique et/ou de peroxyde d'hydrogène, ajout de co-solvants, températures de 0 °C à température ambiante) n'ont permis d'observer la conversion du produit de départ en hydroperoxyde (**18**) (Figure 43).

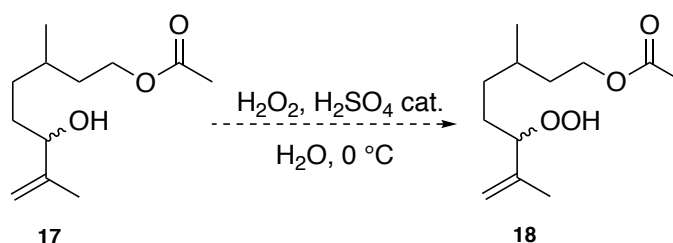


Figure 43 : Essai de substitution de l'alcool (**17**) via une S_N1 .

Pour remédier à ce problème, nous avons décidé d'essayer la méthode employant une solution étherée « anhydre » de peroxyde d'hydrogène. Cette solution est préparée par extraction au diéthyl éther d'une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène à 35 %. La phase étherée récupérée est séchée sur du sulfate de magnésium. Ces réactions sont conduites sous haute protection, derrière un écran de protection, Pexiglas® disposé sous une sorbonne fermée. Cette méthode avait été décrite pour la synthèse de l'hydroperoxyde de linalyle à partir de l'acétate de linalyle en présence de trifluoroborane (Figure 44).⁴⁷ Elle s'était avérée inefficace sur le linalol comme réactif de départ.

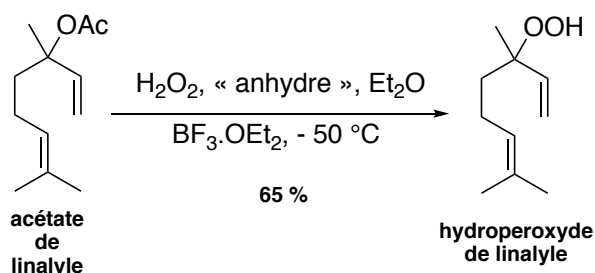


Figure 44 : Synthèse de l'hydroperoxyde de linalyle à l'aide de trifluoroborane.⁴⁷

De ce fait, cette méthode a été reproduite sur le diacétate de 3,7-diméthyl-7-octèn-1,6-diyle (**19**). Aucune conversion du produit de départ n'a été observée malgré les divers essais réalisés en variant le nombre d'équivalents de trifluoroborane par rapport à la solution étherée « anhydre » de peroxyde d'hydrogène. Durant cette étape, la formation du carbocation tertiaire en position 6 devrait être favorisée devant celle d'un carbocation primaire en position 1 (Figure 45).

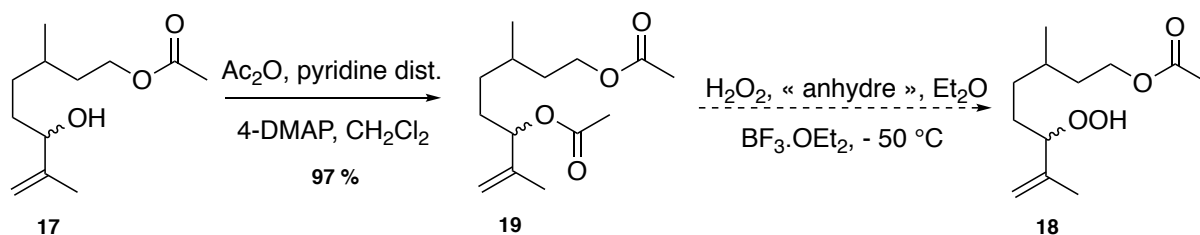


Figure 45 : Voie de synthèse de l'hydroperoxyde (**18**) à partir de diacétate de 3,7-diméthyl-7-octèn-1,6-diyle (**19**).

La réactivité ici est donc différente de celle de l'alcool allylique tertiaire (**12**), le carbocation secondaire issu de (**17**) et de (**19**) ne se formant probablement pas en raison de la récupération totale du produit de départ lors de cette étape de synthèse. De ce fait, d'autres stratégies de synthèse ont donc été développées dans le but d'obtenir l'hydroperoxyde (**±**)-Citr-6-OOH.

4.3.2. À partir d'un intermédiaire halogéné

Bromure

Une méthode alternative a été employée en passant par le bromure (**20**) pour avoir un bon groupe partant lors de la réaction de substitution nucléophile $\text{S}_{\text{N}}2$. L'alcool allylique est converti en son bromure correspondant par une réaction d'Appel. L'alcool est activé par la

triphenylphosphine et un ion bromure vient faire partir l'oxyde de triphenylphosphine pour donner (**20**) avec un rendement de 62 %.

L'essai de déplacement du bromure par le peroxyde d'hydrogène est ensuite mené selon la procédure décrite par Kao et *al.*²⁵ Le bromure est additionné à une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène à 50 % dans laquelle est dissout du trifluoroacétate d'argent pour bénéficier d'un effet « push-ball ». Le peroxyde d'hydrogène attaque sur le carbone en position 6 (push) et l'ion Ag⁺ facilite le départ du brome (pull). Inévitablement, un mélange d'hydroperoxydes a été une nouvelle fois récupéré à l'issue de la purification par chromatographie sur gel de silice du mélange réactionnel. La RMN du proton nous a permis de déterminer un ratio 2 : 1 conformément aux isomères (**18**) et (**21**) (Figure 46).

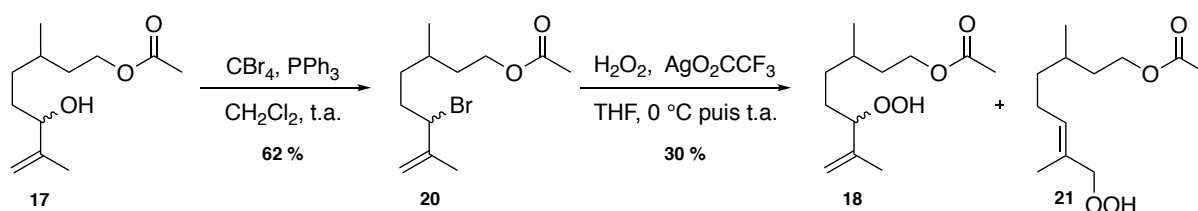


Figure 46 : Synthèse alternative en passant par un intermédiaire bromure (**20**).

Chlorure

En parallèle, une autre voie a été explorée en passant par l'acétate de 6-chloro-3,7-diméthyl-7-octèn-1-yle (**22**), un intermédiaire chlorure. Le chlorure est *a priori* moins réactif que le bromure mais il est également moins encombré. Ainsi, deux méthodes ont été testées dans le but d'obtenir l'intermédiaire chloré.

Le chlorure est synthétisé à partir de l'acétate avec un rendement de 72 % selon la méthode décrite par Zhao et Mainmone.⁴⁸ Dans cette réaction, le chlorure de sulfuryle se décompose en dioxyde de soufre et en dichlore, lequel s'additionne sur la double liaison C=C pour former le chloronium, puis le proton le plus accessible est éliminé pour donner le chlorure allylique (Figure 47).

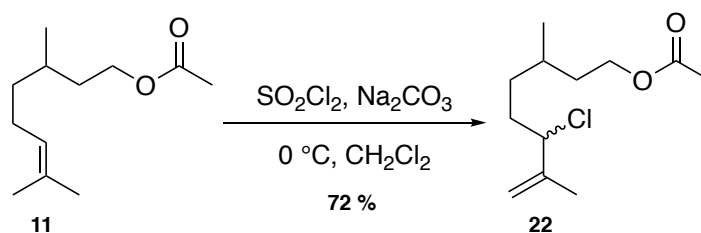


Figure 47 : Synthèse du 6-chloro-3,7-diméthyl-7-octèn-1-yle (**22**) à l'aide du chlorure de sulfuryle.

De la même façon, en présence d'hypochlorite de calcium, le composé (**22**) a pu être obtenu avec un rendement de 46 % (*Figure 48*).⁴⁹ Au vu du meilleur rendement et du temps de réaction plus rapide, la méthode employant le chlorure de sulfuryle a été privilégiée dans la suite des étapes.

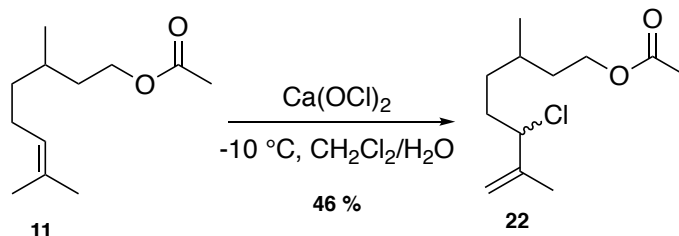


Figure 48 : Synthèse du 6-chloro-3,7-diméthyl-7-octèn-1-yle (**22**) grâce à l'hypochlorite de calcium.

Une fois le composé (**22**) obtenu, il est additionné à une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène à 50 % dans laquelle est dissout du trifluorométhanesulfonate d'argent. La force motrice de la réaction provient de la formation d'un précipité d'halogénure d'argent. Nous avons à nouveau inévitablement obtenu un mélange d'hydroperoxydes. Par RMN du proton, on a pu identifier et prouver qu'il s'agissait des mêmes isomères (**18**) et (**21**) obtenus lorsque le précurseur bromure est utilisé (*Figure 49*).

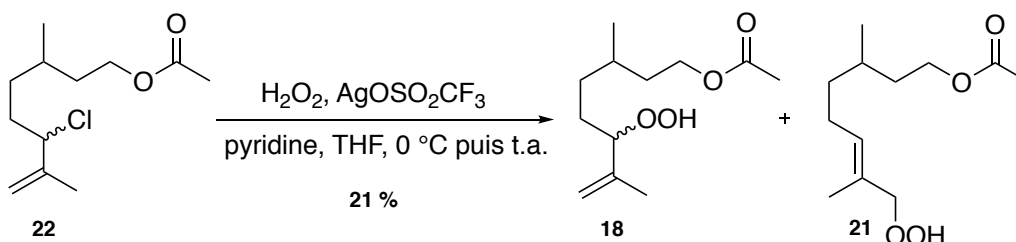


Figure 49 : Synthèse de l'hydroperoxyde (**18**) à partir du dérivé chlorure (**22**).

Quel que soit l'halogène employé, les composés finaux obtenus sont identiques. La formation du composé (**21**) peut être expliquée suivant le mécanisme suivant (*Figure 50*).

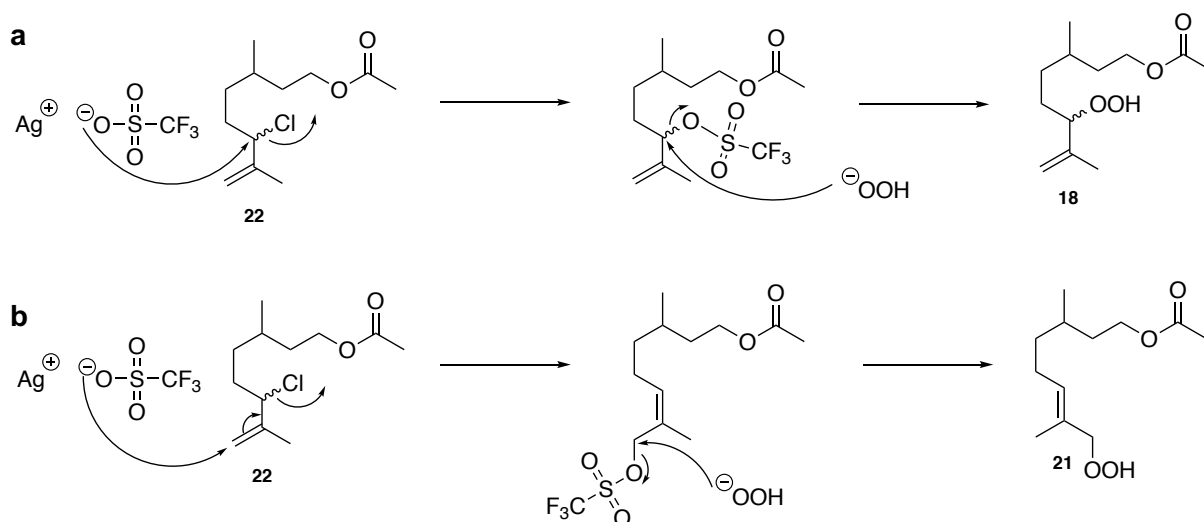


Figure 50 : Mécanisme réactionnel conduisant à la formation de **(18)** et **(21)**.

Ainsi, le sulfonate de trifluorométhane serait susceptible d'effectuer sur substitution nucléophile $\text{S}_{\text{N}}2$ en position 6. Mais il est capable également de s'additionner sur l'alcène en position 8 par une $\text{S}_{\text{N}}2'$ provoquant l'élimination du groupement chlorure.

Nous avons tout de même soumis ce mélange **(18)** et **(21)** à la déprotection du groupement acétyle selon les conditions classiques en présence de carbonate de potassium (Figure 51).

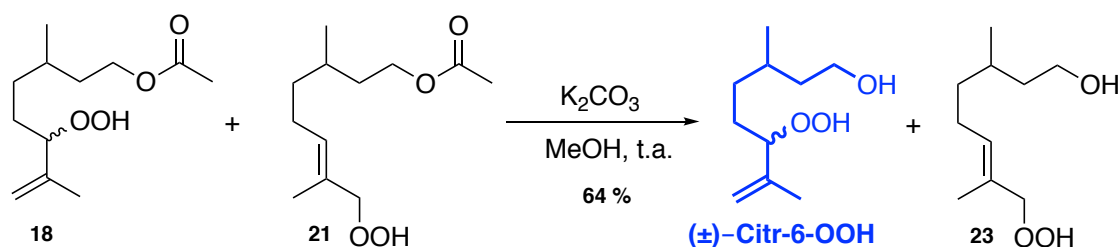


Figure 51 : Déprotection des hydroperoxydes **(18)** et **(21)** permettant la formation du **(±)-Citr-6-OOH** et du composé **(23)**.

Une nouvelle fois, le **(±)-Citr-6-OOH** est obtenu mais en présence d'un isomère présentant la fonction hydroperoxyde, en position 8. Ce composé présente un facteur de rétention identique au **(±)-Citr-6-OOH** ne permettant pas sa séparation.

4.3.3. A partir d'une *N*-alkyl-*N'*-tosylhydrazine

Une autre possibilité d'obtention des hydroperoxydes repose sur la synthèse de précurseurs de type hydrazine. Les *N*-alkyl-*N'*-tosylhydrazines s'oxydent facilement par

association du peroxyde d'hydrogène avec du peroxyde de sodium conduisant aux hydroperoxydes correspondants avec des rendements élevés (Figure 52).⁵⁰

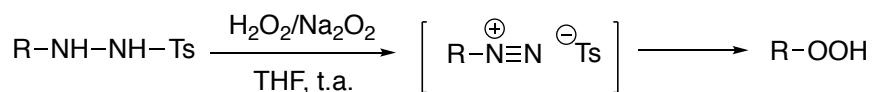


Figure 52 : Schéma de synthèse d'un hydroperoxyde à partir d'une hydrazine.⁵⁰

En parallèle aux études en présence d'un halogénure intermédiaire, nous avons également pensé à fournir le (\pm)-Citr-6-OOH à partir de l'hydrazine correspondante en position 6 comme décrit dans la littérature (Figure 53).^{50,51}

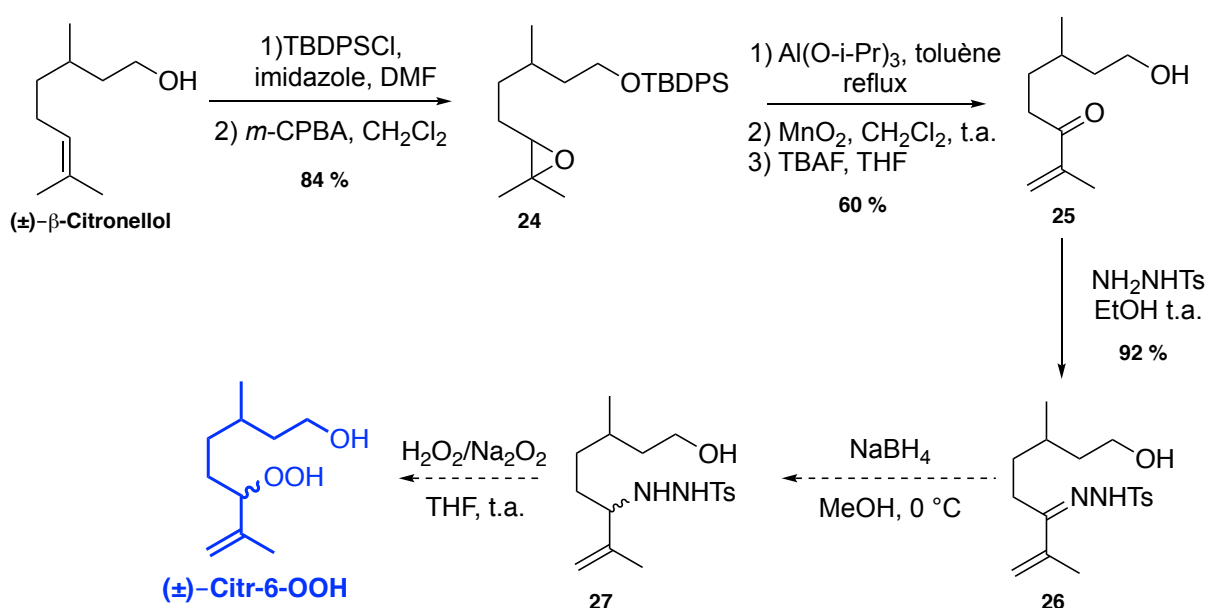


Figure 53 : Voie de synthèse alternative pour l'obtention du (\pm)-Citr-6-OOH à partir d'une hydrazine.

Ainsi, nous avons dans un premier temps protégé la fonction alcool primaire avec du chlorure de *tertio*-butyldiphénylsilyle. Ensuite, une étape oxydation de l'alcène a lieu à l'aide de l'acide *méta*-chloroperbenzoïque avec un rendement de 84 % sur les deux étapes. Par la suite, le 3,7-diméthyl-1-hydroxy-7-octèn-6-one (**25**) est obtenu dans un premier temps par l'ouverture de l'époxyde qui conduit à la formation de l'alcool correspondant en position 6 qui a été dans un second temps réduit avec de l'oxyde de manganèse. Enfin, la déprotection de l'alcool en position 1 a été réalisé.

La formation de l'hydrazone (**26**) est réalisée en présence de *para*-toluènesulfonyl hydrazide avec un rendement de 92 % ne nécessitant aucune purification comme décrit par Tang et *al.*⁵² Nous avons voulu réduire cette hydrazone en hydrazine avec du borohydrure de

sodium, mais en vain. Lors de cette étape, la conversion de l'hydrazone n'a pas lieu. Après diverses tentatives de perfectionnement de cette étape de synthèse, la réduction ne s'est pas effectuée.

Dans la littérature, il a été préconisé de se placer à pH = 3.5 en présence de cyanoborohydrure de sodium car il s'agirait d'un réducteur bien plus efficace pour la réduction des *para*-tosylhydrazones.^{51,53} De même, il a été décrit que le remplacement du cyanoborohydrure de sodium par de la pyridine-borane pour la réduction des *para*-tosylhydrazones fournissait un produit beaucoup plus propre en plus d'être expérimentalement plus pratique.⁵¹ Malheureusement, nous n'avons pas été capable de reproduire toutes nos méthodes. Dans tous ces essais, le produit de départ a été récupéré et aucune dégradation de ce produit n'a été remarquée.

La présence de l'alcool en position 1 ou la présence du groupement alcène en position 7 pourraient bloquer la réduction. Malheureusement, par manque de temps et suite à l'obtention du mélange d'hydroperoxydes (**±**)-Citr-6-OOH et (**23**), cette voie de synthèse a été interrompue et la dernière étape n'a pas pu être réalisée. Il aurait été intéressant d'avoir une protection de l'alcool afin de vérifier l'hypothèse que ce dernier empêcherait la réduction.

Conclusion

Ce premier chapitre présente les diverses voies de synthèse qui ont été étudiées dans le but d'obtenir les cinq composés d'étude.

Ainsi, l'**Asc** dérivé de l' α -terpinène a été obtenu *via* une réaction de cycloaddition [4+2] en une étape de synthèse.

En suivant la même procédure que pour la synthèse de l'**Asc**, la réaction de Schenck, mis au profit du *R*-(+)-limonène et du (\pm)- β -citronellol, n'a pas pu nous fournir les composés souhaités en termes de pureté. Un mélange d'hydroperoxydes impossible à séparer a été récupéré pour ces deux terpènes lors de chacune de nos tentatives.

Une autre alternative a dû être trouvée pour pouvoir fournir les quatre composés cibles restants. Celle-ci reposait essentiellement sur la synthèse des alcools intermédiaires précurseurs aux hydroperoxydes attendus. Cela s'est avéré possible pour la synthèse du **Lim-2-OOH** à partir du (-)-carvéol. De même, le (**1S, 4R**)-**Lim-1-OOH** a été synthétisé à partir de l'alcool correspondant et la synthèse du (**±**)-Citr-7-OOH développée à partir de l'acétate de (*E*)-7-hydroxy-3,7-diméthyl-5-octèn-1-yle (**12**).

En ce qui concerne le **(±)-Citr-6-OOH**, sa synthèse s'est avérée être bien plus complexe. En effet, à partir de l'alcool précurseur, l'hydroperoxyde ne semble pas être généré. Par contre, *via* une S_N2 depuis l'intermédiaire bromure ou chlorure, le **(±)-Citr-6-OOH** s'est formé. Or, après diverses tentatives dans le but d'obtenir le **(±)-Citr-6-OOH** pur, ce dernier n'a malheureusement pas pu être obtenu individuellement, la difficulté majeure étant de le purifier des différents mélanges d'oxydation obtenus par action du peroxyde d'hydrogène en raison d'un facteur de rétention commun. En conséquence, pour la suite des études, nous avons décidé de travailler avec le mélange d'hydroperoxydes **(±)-Citr-6-OOH** et **(±)-Citr-7-OOH** obtenus à partir de la réaction de Schenck sur le (±)-β-citronellol.

Partie expérimentale

Chapitre 1

1. Materials and methods

1.1. Reagents and solvents

All air and/or moisture sensitive reactions were carried out on flame dried glassware under an argon atmosphere.

Tetrahydrofuran, dichloromethane and diethyl ether were dried by passing through activated alumina columns under argon pressure using a dry solvent station (Glass Technology GT S100 devices). Anhydrous acetonitrile was obtained by distillation under an inert atmosphere of argon and kept on molecular sieves (4 Å). Dimethylformamide was distilled under reduced pressure and stored on molecular sieves (4 Å).

All other solvents were used without previous purification.

R-(+)-Limonene, α -terpinene, (-)-carveol, β -(\pm)-citronellol were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and were used without purification. All other commercially available reagents were also purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and used as received.

1.2. Follow-up of the reactions

The reactions were followed by analytical thin layer chromatography (TLC) performed on glass-backed precoated silica gel plates (Merck 60 F254). After elution, the plates were visualized under ultraviolet light (254 nm). When necessary they were immersed in a cerium phosphomolybdic acid solution (PMA/Ce) followed by heating. PMA/Ce solution was prepared by mixing phosphomolybdic acid (2 g), cerium (IV) sulfate (0.8 g), sulfuric acid (4.8 mL) and distilled water (72.5 mL).

1.3. Purification of products

Column chromatography purifications were carried out using silica gel 60 (Merck, Geduran, 40-63 μ m) or previously neutralized silica gel.

Neutralized silica was prepared by adding to an homogenous distilled water solution of silica 60 a saturated solution of sodium hydrogen carbonate up to a pH of about 8. After decantation, the silica precipitate was washed several times with water to reach a pH of about 7, filtered and dried in an oven at least for 24 hours.

1.4. Characterization of products

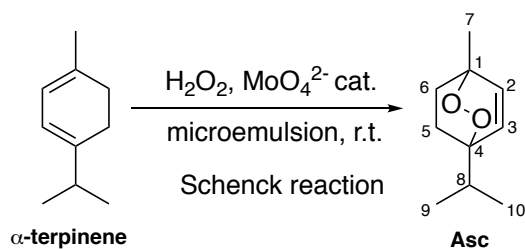
Proton (^1H NMR) and carbon (^{13}C NMR) nuclear magnetic resonance spectra were recorded on Bruker Avance spectrometers at 300 MHz for ^1H and 75 MHz for ^{13}C or at 500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C . Chemical shifts (δ) are reported in parts per million (ppm). The residual solvent peak was used as reference values. For ^1H NMR: $\text{CDCl}_3 = 7.26$ ppm. For ^{13}C NMR: $\text{CDCl}_3 = 77.16$ ppm.

Multiplicities are indicated as s (singlet), br s (broad singlet), d (doublet), dd (doublet of doublets), ddd (doublet of doublet of doublet), t (triplet), q (quadruplet), hept (heptuplet), td (triplet of doublets), dt (doublet of triplets), dq (doublet of quadruplets) and m (multiplet). Constant couplings (J) are given in Hertz (Hz). Signal attributions were determined either on the basis of unambiguous chemical shifts or coupling patterns. Heteronuclear single quantum correlation (HSQC) and heteronuclear multiple bond correlation, (HMBC) experiments were performed when necessary to complete spectral assignment.

Mass spectrometry (MS) analyses were performed on a Bruker Daltonics microTOF spectrometer (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) equipped with an orthogonal electrospray (ESI) interface. Calibration was performed using a solution of 10 mM sodium formate. Samples solutions were introduced into the spectrometer source with a syringe pump (Harvard type 55 1111: Harvard Apparatus Inc., South Natick, MA, USA) with a flow rate of $4 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

$[\alpha]_D^{22}$ values were measured on a Polarimeter "Model 341" from PerkinElmer for optical rotation measurements to $\pm 85^\circ$ at a wavelength of 589 nm (Na lamp).

2. Synthesis of ascaridol (1,4-peroxy-*p*-menth-2-ene) (**Asc**)



A microemulsion was prepared by adding sodium molybdate (2.3 g in 12 mL of distilled water) dropwise into a suspension of sodium dodecyl sulfate (19 g) in butanol (23 mL) and dichloromethane (133 mL). The microemulsion became clear after 25 min stirring.

A solution of α -terpinene (3.3 g, 24.5 mmol, 1.0 eq) in the microemulsion (50 mL) was treated at room temperature with a first portion of hydrogen peroxide (35% wt in water, 1 mL). The brick red mixture was stirred for about 10 min until it became light yellow. Other thirteen portions of hydrogen peroxide (35 % wt in water, 1 mL each) were successively added every 10 min. A total of 14 mL of aqueous hydrogen peroxide were used (35 % wt in water, 159.6 mmol, 6.5 eq). The light-yellow mixture was stirred overnight at room temperature becoming completely clear. The solvent was removed under reduced pressure and the crude product obtained dissolved in dichloromethane (100 mL). The suspension was stirred vigorously for 45 min and filtered. The filtrate was evaporated under reduced pressure and the recovered oil was diluted in ethyl acetate (20 mL) and washed with distilled water (3×100 mL). The aqueous layers were extracted with ethyl acetate (3×30 mL). The combined organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated under reduced pressure. Purification by column chromatography on silica gel (petroleum ether/EtOAc 9:1) furnished ascaridole (**Asc**) as a yellow oil (1.82 g, 10.8 mmol, 44 % yield).

Formula: $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_2$

Molar mass: 168.24

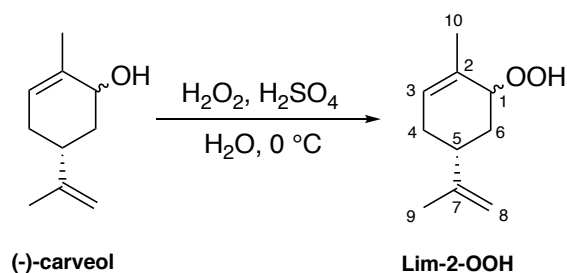
CAS number: 512-85-6

TLC: $R_f = 0.61$ (petroleum ether/EtOAc 9:1); Rev: PMA/Ce

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.99 (d, $^3J_{\text{H}_9/\text{H}_{10}-\text{H}_8} = 7.0$ Hz, 6 H, **H-9** and **H-10**), 1.36 (s, 3 H, **H-7**), 1.50-1.52 (m, 2 H, **H-5** or **H-6**), 1.91 (hept, $^3J_{\text{H}_8-\text{H}_9/\text{H}_{10}} = 6.9$ Hz, 1 H, **H-8**), 1.99-2.05 (m, 2 H, **H-5** or **H-6**), 6.40 (d, $^3J_{\text{H}_2/\text{H}_3-\text{H}_3/\text{H}_2} = 8.5$ Hz, 1 H, **H-2** or **H-3**), 6.48 (d, $^3J_{\text{H}_2/\text{H}_3-\text{H}_3/\text{H}_2} = 8.5$ Hz, 1 H, **H-2** or **H-3**)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 17.3 (C-9 or C-10), 17.4 (C-9 or C-10), 21.5 (C-7), 25.7 (C-6), 29.6 (C-5), 32.2 (C-8), 74.5 (C-1), 79.9 (C-4), 133.2 (C-2 or C-3), 136.5 (C-2 or C-3)

3. Synthesis of (5*R*)-2-methyl-5-isopropenyl-2-cyclohexene-1-hydroperoxide (Lim-2-OOH)



To an aqueous solution of hydrogen peroxide (50 % wt in water, 85 mL) were added, at 0 °C some drops of concentrated sulfuric acid and (-)-carveol (97 %, 6.0 g, 38.2 mmol, 1.0 eq). The reaction mixture was vigorously stirred at 0 °C during 2 days, followed by extraction with pentane (5 × 200 mL). The organic layers were combined, dried over magnesium sulfate, filtered, and evaporated under reduce pressure. The crude product was purified by column chromatography on neutralized silica gel (pentane/ Et_2O 8:2) to obtain (5*R*)-2-methyl-5-isopropenyl-2-cyclohexene-1-hydroperoxide (**Lim-2-OOH**) as a clear oil (3.02 g, 17.95 mmol, 47 %).

Formula: $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_2$

Molar mass: 168.23

CAS number: 1045725-54-9

TLC: $R_f = 0.51$ (pentane/ Et_2O 8:2); Rev: PMA/Ce

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm):

Mixture of two diastereomers: 1.40-1.51 (m, 2 × 1 H, 2 × H-6), 1.74 (s, 2 × 3 H, 2 × H-9), 1.75 (s, 2 × 3 H, 2 × H-10), 2.13-2.38 (m, 2 × 4 H, 2 × H-5, 2 × H-4 and 2 × H-6), 4.36 (s, 1 H, H-1), 4.53 (m, 1 H, H-1), 4.74 (s, 2 × 2 H, 2 × H-8), 5.64 (m, 1 H, H-3), 5.75 (d, 1 H, $^3J_{\text{H}3-\text{H}4} = 5.0$ Hz, H-3), 7.67 (s, 1 H, OOH), 8.02 (s, 1 H, OOH)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm):

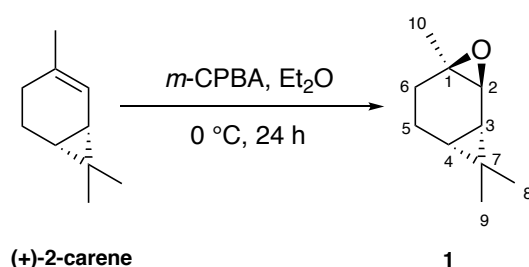
Mixture of two diastereomers: 19.3 (C-10), 21.4 (C-10), 20.6 (C-9), 21.0 (C-9), 31.0 (C-4 or C-6), 31.3 (C-4 or C-6), 32.4 (C-4 or C-6), 32.6 (C-4 or C-6), 35.3 (C-5), 40.7 (C-5), 82.7 (C-1),

84.4 (C-1), 109.2 (C-8), 109.4 (C-8), 127.2 (C-3), 129.4 (C-3), 129.8 (C-2), 132.9 (C-2), 148.8 (C-7), 149.3 (C-7)

4. Synthesis of (1*S*, 4*R*)-1-methyl-4-isopropenyl-2-cyclohexen-1-hydroperoxide ((1*S*, 4*R*)-Lim-1-OOH)

Preliminary assays from (+)-2-carene

Carene-1,2-epoxide (1)



A solution of (+)-2-carene (500 mg, 3.67 mmol, 1.0 eq) in anhydrous diethyl ether (20 mL) at 0 °C was treated with 3-chloroperoxybenzoic acid (880 mg, 5.09 mmol, 1.4 eq) and stirred at 0 °C during 24 h. After this time, the reaction was allowed to warm to room temperature and washed with a saturated solution of sodium hydrogenocarbonate (2 × 15 mL), distilled water (1 × 15 mL) and a sodium chloride saturated solution (1 × 15 mL). The organic phase was dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (pentane/Et₂O 9:1) to give carene-1,2-epoxide (1) as a yellow oil (221.8 mg, 1.46 mmol, 40 % yield).

Formula: C₁₀H₁₆O

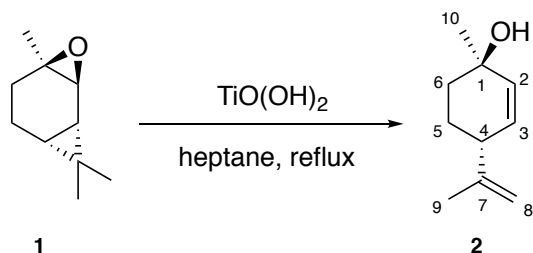
Molar mass: 152.24

CAS number: 20053-58-1

TLC: R_f = 0.69 (pentane/ Et₂O 6:2); Rev: PMA/Ce

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.61-0.64 (m, 1 H, H-5), 0.98-1.02 (m, 1 H, H-5) 1.03 (s, 3H, H-8 or H-9), 1.05 (s, 3 H, H-8 or H-9), 1.23 (s, 3 H, H-10), 1.50-1.55 (m, 1 H, H-4), 1.63-1.66 (m, 2 H, H-6), 1.84-1.91 (m, 1 H, H-3), 3.0 (d, 1 H, ³J_{H2-H3} = 1.35 Hz, H-2)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 16.6 (C-8 or C-9), 16.7 (C-8 or C-9), 20.9 (C-7), 21.2(C-4), 22.0 (C-10), 23.9 (C-5), 27.3 (C-3), 29.1(C-6), 58.1 (C-2), 58.4 (C-1)

(1*R*, 4*R*)-1-Methyl-4-isopropenyl-2-cyclohexen-1-ol (2)

Preparation of titanium oxide dihydroxide: Titanium tetrachloride (3.5 mL, 31.9 mmol) was added drop by drop to 50 mL of deionized water at 0 °C. After 45 min stirring, the resulting solution was neutralized by slowly adding an ammonium hydroxide solution until pH about 7 to create a white precipitate corresponding to $\text{TiO}(\text{OH})_2$ gel. The $\text{TiO}(\text{OH})_2$ gel was then completely washed with deionized water until no chloride ions were detected by a silver nitrate solution.

Carene-1,2-epoxide (**1**) (220 mg, 1.50 mmol, 1.0 eq) was dissolved in heptane (10 mL) under an argon atmosphere. Previously prepared titanium oxide dihydroxide (14.7 mg, 0.15 mmol, 0.1 eq) was then added and the reaction mixture was stirred at reflux overnight. After this time, the mixture was dissolved in diethyl ether (10 mL) then washed with a saturated solution of sodium hydrogenocarbonate (1 × 10 mL) and distilled water (1 × 10 mL). The organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated under reduce pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (pentane/ Et_2O 8:2) to obtain (1*R*, 4*R*)-1-methyl-4-isopropenyl-2-cyclohexen-1-ol (**2**) as a yellow oil (21.7 mg, 0.14 mmol, 10 % yield).

Formula: $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$

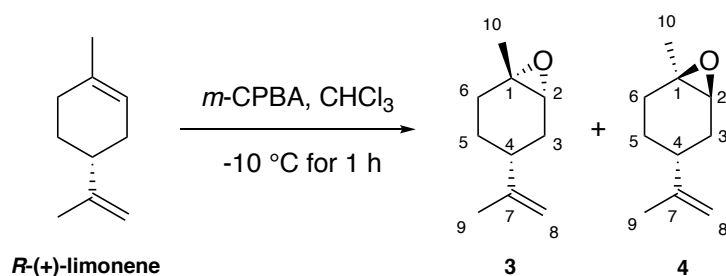
Molar mass: 152.24

CAS number: 52154-82-2

TLC: $R_f = 0.4$ (pentane/ Et_2O 6:2); Rev: PMA/Ce

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.29 (s, 3 H, **H-10**), 1.53-1.58 (m, 1 H, **H-5**), 1.64-1.67 (m, 1 H, **H-6**) 1.73 (s, 3 H, **H-9**), 1.76-1.81 (m, 1 H, **H-6**), 1.86-1.92 (m, 1 H, **H-5**), 2.71-2.75 (m, 1 H, **H-4**), 4.66 (br s, 1 H, **H-8**), 4.78 (br s, 1 H, **H-8**), 5.61 (dd, 1 H, $^3J_{\text{H}_3-\text{H}_2} = 10.1$ Hz, $^3J_{\text{H}_3-\text{H}_4} = 3.4$ Hz, **H-3**), 5.70 (d, 1 H, $^3J_{\text{H}_2-\text{H}_3} = 10.0$ Hz, **H-2**)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 21.4 (**C-9**), 25.1 (**C-5**), 29.1 (**C-10**), 36.2 (**C-6**), 42.6 (**C-4**), 68.8 (**C-1**), 111.1 (**C-8**), 130.9 (**C-3**), 134.6 (**C-2**), 147.4 (**C-7**)

Complete synthesis from *R*-(+)-limoneneLimonene-1,2-epoxide (**3**) and (**4**)

To a solution of (*R*)-(+)-limonene (5.0 g, 36.7 mmol, 1.0 eq) in chloroform (40 mL) was added dropwise a solution of 3-chloroperbenzoic acid (77 %, 6.33 g, 36.7 mmol, 1.0 eq) in chloroform (100 mL) over 30 min at 0 °C. The solution was stirred for 1 hour at -10 °C, then at room temperature for 1 h. Sodium hydroxide (1.0 M, 40 mL, 40.0 mmol) was added. The organic layer was washed with sodium carbonate (2 × 50 mL), brine (50 mL), dried over magnesium sulfate and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (pentane/Et₂O 9:1) to give limonene-1,2-epoxide as a mixture of diastereoisomers (**3**) and (**4**) and as a yellow oil (3.3 g, 21.68 mmol, 59 % yield).

Formula: C₁₀H₁₆O

Molar mass: 152.23

CAS number: mixture of (**3**) and (**4**) 203719-54-4

TLC: R_f = 0.6 (pentane/Et₂O 9:1); Rev: PMA/Ce

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm):

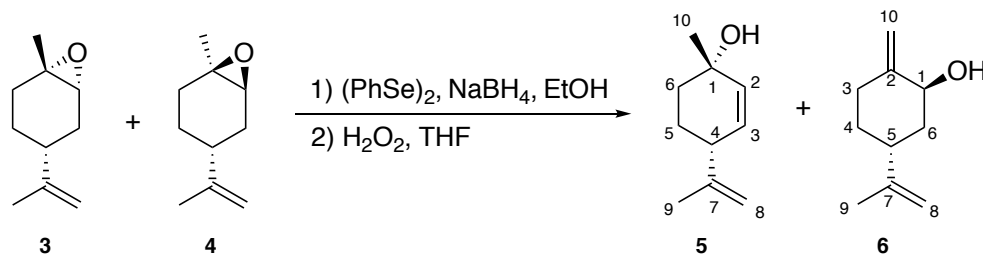
Mixture of two diastereoisomers: 1.15-1.26 (m, 2 H, **H-6**) 1.29 (s, 3 H, **H-10**), 1.31 (s, 3 H, **H-10**), 1.34-1.39 (m, 2 H, **H-6**), 1.66 (s, 3 H, **H-9**), 1.68 (s, 3 H, **H-9**), 1.70-1.76 (m, 2 H, **H-3**), 1.82-1.89 (m, 4 H, **H-5**), 1.99-2.15 (m, 2 × 2 H, **H-3** and 2 × **H-4**), 2.98 (d, 1 H, ³J_{H2-H3} = 5.35, **H-2**), 3.05 (s, 1 H, **H-2**), 4.65 (s, 2 H, **H-8**), 4.71 (s, 2 H, **H-8**)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm):

Mixture of two diastereoisomers: 20.3 (**C-9**), 21.2 (**C-9**), 23.2 (**C-10**), 24.4 (**C-10**), 24.4 (**C-6**), 26.0 (**C-6**), 28.7 (**C-5**), 29.9 (**C-5**), 30.8 (2 × **C-3**), 36.3 (**C-4**), 40.8 (**C-4**), 57.5 (**C-1**), 57.7 (**C-1**), 59.4 (**C-2**), 60.7 (**C-2**), 109.1 (**C-8**), 109.2 (**C-8**), 149.1 (**C-7**), 149.3 (**C-7**)

Method 1: using diphenyl diselenide

(1*S*, 4*R*)-1-methyl-4-isopropenyl-2-cyclohexen-1-ol (5) and (1*S*, 5*R*)-2-methylene-5-isopropenyl-cyclohexan-1-ol (6)



Sodium borohydride (500 mg, 13.2 mmol, 2.0 eq) was added portion-wise to a stirred suspension of diphenyl diselenide (2.05 g, 6.56 mmol, 1.0 eq) in anhydrous ethanol (50 mL) under an argon atmosphere. The mixture was stirred and after it turned colorless a solution of limonene-1,2-epoxide mixture (**3**) and (**4**) (1.08 mL, 6.56 mmol, 1.0 eq) in anhydrous ethanol (3.5 mL) was added dropwise. The mixture was stirred and heated to reflux for 2 h. After this time, the reaction was quenched with a solution of hydrochloric acid (1 M, 20 mL) and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (3 × 30 mL). The combined organic phases were washed with a saturated solution of hydrogenocarbonate sodium (1 × 20 mL), distilled water (1 × 20 mL), and brine (1 × 20 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in anhydrous tetrahydrofuran (30 mL) and hydrogen peroxide (30 % wt in water, 5.6 mL) was added dropwise at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 1 h and then heated to reflux for 2 h. The temperature was allowed to cooled down to room temperature and the reaction mixture was stirred overnight. The reaction was then quenched with water (10 mL), and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (3 × 10 mL). Combined organic phases were washed with water (2 × 15 mL) and brine (2 × 15 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduce pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (pentane/EtOAc 10:1). Two isomers were obtained corresponding to (1*S*, 4*R*)-1-methyl-4-isopropenyl-2-cyclohexen-1-ol (**5**) (65.3 mg 0.42 mmol, 6 %) and (1*S*, 5*R*)-2-methylene-5-isopropenyl-cyclohexan-1-ol (**6**) corresponding to (542.6 mg, 5.56 mmol, 54 % yield).

Formula: C₁₀H₁₆O

Molar mass: 152.24

CAS number: **5:** 22972-51-6; **6:** 2102-62-7

TLC: **5:** $R_f = 0.33$ **6:** $R_f = 0.27$ (pentane/EtOAc 10:1); Rev: PMA/Ce

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm):

5 : 1.29 (s, 3 H, **H-10**), 1.52 (br s, 1 H, -OH), 1.56-1.65 (m, 2 H, **H-6**), 1.73 (s, 3 H, **H-9**), 1.76-1.83 (m, 2 H, **H-5**), 2.64-2.66 (m, 1 H, **H-4**), 4.74-4.75 (br s, 1 H, **H-8**), 4.77-4.78 (br s, 1 H, **H-8**), 5.65 (d, 1 H, $^3J_{\text{H}_3\text{-H}_2} = 10.0$ Hz, **H-3**), 5.70 (d, 1 H, $^3J_{\text{H}_2\text{-H}_3} = 10.0$ Hz, **H-2**)

6: 1.24-1.33 (m, 1H, **H-4**), 1.49-1.54 (m, 1 H, **H-3**), 1.72 (s, 3 H, **H-9**), 1.82-1.87 (m, 1 H, **H-3**), 1.98 (dd, 1 H, $^3J_{\text{H}_6\text{-H}_1} = 10.5$ Hz, $^3J_{\text{H}_6\text{-H}_5} = 3.3$ Hz, **H-6**), 2.20 (m, 1 H, **H-6**), 2.44-2.56 (m, 1 H, **H-5**), 4.46 (dd, 1 H, $^3J_{\text{H}_1\text{-H}_6} = 10.0$ Hz, $^3J_{\text{H}_1\text{-H}_6} = 2.9$ Hz, **H-1**), 4.70 (br s, 2 H, **H-8**), 4.76 (m, 1 H, **H-10**), 4.85 (m, 1 H, **H-10**)

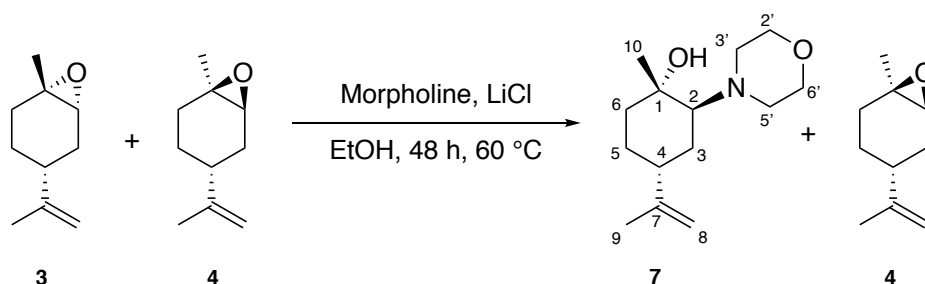
^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm):

5: 21.0 (**C-9**), 25.0 (**C-5**), 29.5 (**C-10**), 36.8 (**C-6**), 43.6 (**C-4**), 68.6 (**C-1**), 110.7 (**C-8**), 132.3 (**C-3**), 134.0 (**C-2**), 148.3 (**C-7**)

6: 21.1 (**C-9**), 30.0 (**C-3**), 32.7 (**C-4**), 38.2 (**C-6**), 39.1 (**C-5**), 72.5 (**C-1**), 109.0 (**C-8**), 110.0 (**C-10**), 149.6 (**C-7**), 149.9 (**C-2**)

Method 2: using morpholine

(1*S*, 2*S*, 4*R*)-1-Methyl-4-isopropenyl-2-(4'-morpholinyl)cyclohexan-1-ol (**7**)



The limonene-1,2-epoxide mixture (**3**) and (**4**) previously obtained (26.4 g, 174.0 mmol, 1.0 eq) was dissolved in ethanol (80 mL) and lithium chloride (11.8 g, 28.0 mmol, 0.16 eq) was added while stirring. Morpholine (22.8 g, 26.0 mmol, 0.15 eq) was then added and the reaction mixture heated at 60 °C for 48 h. The reaction was cooled down to room temperature and the solvent was evaporated under reduce pressure. The obtained residue was dissolved in dichloromethane (80 mL). The organic layer was washed with distilled water (2 × 50 mL) and extracted with hydrochloric acid (2 M, 2 × 100 mL). The acidic aqueous layer was basified to pH about 10 by addition of sodium hydroxide then extracted with diethyl ether (3 × 200 mL). The organic layer was washed with distilled water (2 × 200 mL), dried with magnesium sulfate

and evaporated under reduce pressure to give (1*S*, 2*S*, 4*R*)-1-methyl-4-isopropenyl-2-(4'-morpholinyl)cyclohexan-1-ol (**7**) (20.4 g, 85.2 mmol, 98 % based on **3**) as a yellow oil. Unreacted compound (**4**) was also obtained (11.8 g, 77.5 mmol).

Formula: C₁₄H₂₅NO₂

Molar mass: 239.36

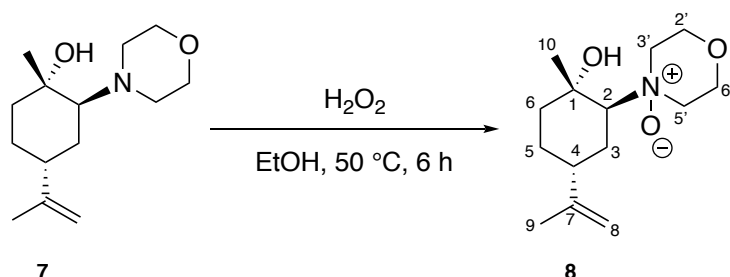
CAS number: 367512-42-3

TLC: R_f = 0.39 (pentane/ EtOAc 7:3); Rev: PMA/Ce

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.20 (s, 3 H, **H-10**), 1.49-1.60 (m, 4 H, **H-6** and **H-5**), 1.74 (s, 3 H, **H-9**), 1.92-1.97 (m, 1 H, **H-3**), 2.08-2.13 (m, 1 H, **H-3**), 2.43-2.53 (m, 4 H, **H-3'** and **5'**), 2.71-2.75 (m, 2 × 1 H, **H-2** and **H-4**), 3.44 (s, 1 H, -OH), 3.65-3.74 (m, 4 H, **H-2'** and **H-6'**), 4.84 (m, 1 H, **H-8**), 4.90 (m, 1 H, **H-8**)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 22.5 (**C-9**), 22.6 (**C-10**), 24.7 (**C-3**), 25.1 (**C-5**), 35.8 (**C-6**), 39.1 (**C-4**), 45.6 (**C-3'** and **C-5'**), 67.6 (**C-2'** and **C6'**), 67.7 (**C-2**), 72.9 (**C-1**), 111.3 (**C-8**), 145.6 (**C-7**)

(1*S*, 2*S*, 4*R*)-1-Methyl-4-isopropenyl-2-(4'-oxido-4'-morpholinyl)cyclohexan-1-ol (8**)**

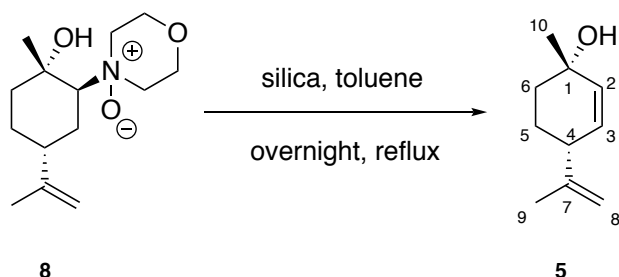


(1*S*, 2*S*, 4*R*)-1-Methyl-4-isopropenyl-2-(4'-morpholinyl)cyclohexan-1-ol (**7**) (20.0 g, 84.0 mmol, 1.0 eq) was dissolved in ethanol (113 mL). Hydrogen peroxide (35 % wt in water, 42 mL, 478.8 mmol, 5.7 eq) was added dropwise and the mixture was stirred at 50 °C for 6 h. After this time, 5 % palladium on carbon (150 mg, 1.40 mmol, 0.02 eq) was added in order to decompose the excess of peroxide. The reaction mixture was stirred over night at room temperature. Peroxide test strips indicated the absence of peroxides in the mixture after this time. The reaction mixture was then filtered on celite to remove the palladium on carbon and the solvent was evaporated under reduce pressure to give (1*S*, 2*S*, 4*R*)-1-methyl-4-isopropenyl-2-(4'-oxido-4'-morpholinyl)cyclohexan-1-ol (**8**) as a yellow oil (20.9 g, 82.0 mmol, 98 % yield).

Formula: C₁₄H₂₅NO₃**Molar mass:** 255.36**CAS number:** 790220-87-0**TLC:** R_f = 0.11 (pentane/ EtOAc 7:3); Rev: PMA/Ce

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.56 (s, 3 H, **H-10**), 1.51-1.62 (m, 2 H, **H-5**), 1.69-1.73 (m, 2 H, **H-6**), 1.76 (s, 3 H, **H-9**), 1.84 (dd, 1 H, ³J_{H3-H2} = 13.4 Hz, ³J_{H3-H4} = 2.5 Hz, **H-3**), 1.94-1.98 (m, 1 H, **H-3**), 2.20-2.24 (m, 1 H, **H-4**), 2.62 (s, 1 H, -OH), 3.26 (dd, 1 H, ³J_{H2-H3} = 13.5 Hz, ³J_{H2-H3} = 3.4 Hz, **H-2**), 3.35-3.73 (m, 8 H, **H-2'**, **H-3'**, **H-5'** and **H-6'**), 4.83 (br s, 1 H, **H-8**), 5.02 (br s, 1 H, **H-8**)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 22.5 (**C-9**), 23.4 (**C-10**), 24.6 (**C-3**), 25.1 (**C-5**), 39.2 (**C-6**), 39.8 (**C-4**), 59.4 (**C-3'** or **C-5'**), 61.3 (**C-3'** or **C-5'**), 61.4 (**C-2'** or **C-6'**), 65.2 (**C-2'** or **C-6'**), 73.7(**C-1**), 80.2 (**C-2**), 112.2 (**C-8**), 114.0 (**C-7**)

(1S, 4R)-1-Methyl-4-isopropenyl-2-cyclohexen-1-ol (5)

(1S, 2S, 4R)-1-Methyl-4-isopropenyl-2-(4'-oxido-4'-morpholinyl)cyclohexan-1-ol (**8**) (27.6 g, 108.1 mmol, 1.0 eq) was dissolved in toluene (350 mL) and silica (6.6 g) was then added. The mixture was heated at reflux overnight with a Dean-Stark glassware system to remove water from the reaction. The mixture was afterwards filtered to remove silica and the filtrate was evaporated under reduce pressure to give a brown oil. This oil was dissolved in dichloromethane and washed with hydrochloric acid (2 M, 60 mL) and distilled water (60 mL) then dried over magnesium sulfate and filtered. The solvent was removed under reduced pressure. Purification by column chromatography on silica gel was necessary to obtain (1S, 4R)-1-methyl-4-isopropenyl-2-cyclohexen-1-ol (**5**) (8.3 g, 54.0 mmol, 50 % yield) as a yellow oil.

Formula: C₁₀H₁₆O**Molar mass:** 152.24**CAS number:** 22972-51-6

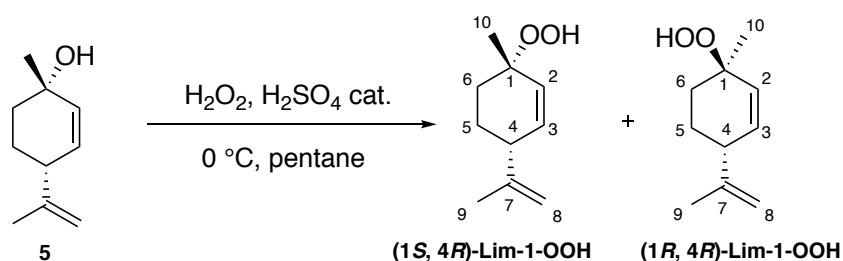
TLC: $R_f = 0.57$ (pentane/Et₂O 8:2); Rev : PMA/Ce

$[\alpha]_D^{22}$: +58.5 (1.0, CH₂Cl₂), lit. $[\alpha]_D^{22}$: +53.8 (1.0, CH₂Cl₂)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): See the description in page 99

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): See the description in page 99

(1S, 4R)-1-Methyl-4-isopropenyl-2-cyclohexen-1-hydroperoxide ((1S, 4R)-Lim-1-OOH) and (1R, 4R)-1-methyl-4-isopropenyl-2-cyclohexen-1-hydroperoxide ((1R, 4R)-Lim-1-OOH)



(1S,4R)-1-Methyl-4-isopropenyl-2-cyclohexen-1-ol (**5**) (4.0 g, 26.27 mmol, 1.0 eq) in pentane (150 mL) was added to a solution of hydrogen peroxide (35 % wt in water, 150 mL) and concentrated sulfuric acid (20 drops). The mixture was stirred vigorously at 0 °C until TLC showed no remaining starting material. Then, the phases were separated. The aqueous layer was extracted with pentane (3 × 100 mL). The combined organic layers were washed with distilled water (2 × 150 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on neutralized silica gel (pentane/Et₂O 8:2) to isolate the two isomers (1S-4R)-1-methyl-4-isopropenyl-2-cyclohexen-1-hydroperoxide (**(1S, 4R)-Lim-1-OOH**) (1.96 g, 11.6 mmol, 45 % yield) and (1R-4R)-1-methyl-4-isopropenyl-2-cyclohexen-1-hydroperoxide (**(1R, 4R)-Lim-1-OOH**) (450 mg, 2.67 mmol, 10 % yield).

Formula: C₁₀H₁₆O₂

Molar mass: 168.24

CAS number: (1S, 4R)-Lim-1-OOH: 77026-87-0; (1R, 4R)-Lim-1-OOH: 77026-88-1

TLC: (1S, 4R)-Lim-1-OOH: $R_f = 0.71$; (1R, 4R)-Lim-1-OOH: $R_f = 0.69$ (pentane/ Et₂O 6:2); Rev: PMA/Ce

HRMS (ESI): m/z calculated for C₁₀H₁₆O₂ [M + Na]⁺: 191.10; found 191.10

$[\alpha]_D^{22}$ (1S, 4R)-Lim-1-OOH: +38.6 (1.0, CH₂Cl₂);

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm):

(1S, 4R)-Lim-1-OOH: 1.29 (s, 3 H, **H-10**), 1.37-1.43 (m, 1 H, **H-6**), 1.64-1.68 (m, 2 H, **H-5**), 1.69 (s, 3 H, **H-9**), 2.09-2.14 (m, 1 H, **H-6**), 2.62-2.66 (m, 1 H, **H-4**), 4.71-4.72 (m, 1 H, **H-8**), 4.73-4.75 (m, 1 H, **H-8**), 5.60 (dd, 1 H, $^3J_{\text{H}_3-\text{H}_2} = 10.2$ Hz, $^3J_{\text{H}_3-\text{H}_4} = 1.15$ Hz, **H-3**), 5.79 (d, 1 H, $^3J_{\text{H}_2-\text{H}_3} = 10.0$ Hz, **H-2**), 7.40-7.45 (br s, 1 H, -OOH)

(1R, 4R)-Lim-1-OOH: 1.31 (s, 3 H, **H-10**), 1.39-1.62 (m, 2 H, **H-6**), 1.72 (s, 3 H, **H-9**), 1.82-1.98 (m, 2 H, **H-5**), 2.74-2.78 (m, 1 H, **H-4**), 4.67 (br s, 1 H, **H-8**), 4.78 (m, 1 H, **H-8**), 5.69 (dd, 1 H, $^3J_{\text{H}_3-\text{H}_2} = 10.1$ Hz, $^3J_{\text{H}_3-\text{H}_4} = 2.15$ Hz, **H-3**), 5.80 (d, 1 H, $^3J_{\text{H}_2-\text{H}_3} = 10.0$ Hz, **H-2**), 7.5 (br s, 1 H, -OOH)

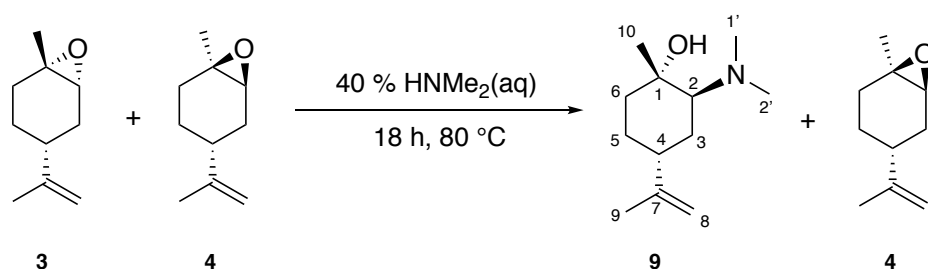
^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm):

(1S, 4R)-Lim-1-OOH: 21.0 (**C-9**), 24.6 (**C-5**), 24.8 (**C-10**), 31.2 (**C-6**), 43.7 (**C-4**), 79.5 (**C-1**), 111.1 (**C-8**), 129.5 (**C-3**), 136.0 (**C-2**), 147.9 (**C-7**)

(1R, 4R)-Lim-1-OOH: 21.2 (**C-9**), 25.0 (**C-5**), 29.1 (**C-10**), 32.7 (**C-6**), 42.7 (**C-4**), 80.8 (**C-1**), 111.1 (**C-8**), 130.2 (**C-3**), 134.6 (**C-2**), 147.4 (**C-7**)

Method 3: using dimethylamine

(1S, 2S, 4R)-1-Methyl-4-isopropenyl-2-dimethylamino-cyclohexan-1-ol (9)



The limonene-1,2-epoxide mixture (**3**) and (**4**) (5.5 mL, 5.1 g, 33.5 mmol, 1.0 eq) was added to dimethylamine (40% aqueous, 20 mL, 165.0 mmol, 4.9 eq) and the biphasic solution obtained refluxed overnight. The reaction mixture was then cooled down to room temperature and extracted with diethyl ether (3 x 50 mL). The organic layers were combined, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated under reduced pressure to give an orange oil. This oil was subjected to column chromatography on silica gel (pentane /EtOAc 6:4) to give the amino alcohol (1S,2S,4R)-1-methyl-4-isopropenyl-2-dimethylamino-cyclohexan-1-ol (**9**) (1.76

g, 8.9 mmol, 50 % based on **3**) as a colorless oil. Unreacted compound (**4**) was also obtained (10.4 g, 68.3 mmol).

Formula: C₁₂H₂₃NO

Molar mass: 197.32

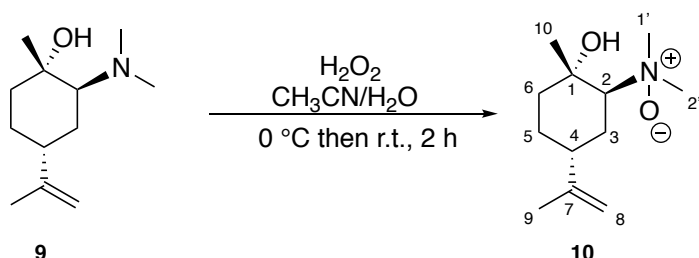
CAS number: 78478-85-0

TLC: R_f = 0.22 (CHCl₃/ MeOH 9:1); Rev: PMA/Ce

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.21 (s, 3 H, **H-10**), 1.49-1.59 (m, 4 H, **H-6** and **H-5**), 1.73 (s, 3 H, **H-9**), 1.89-1.95 (m, 1 H, **H-3**), 2.00-2.04 (m, 1 H, **H-3**), 2.29 (s, 2 × 3 H, **H-1'** and **2'**), 2.47 (dd, 2 H, ³J_{H2-H3} = 12.65 Hz, ³J_{H2-H3} = 3.35 Hz, **H-2**), 3.50 (s, 1 H, -OH), 4.84 (s, 1 H, **H-8**), 4.92 (m, 1 H, **H-8**)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 22.1 (**C-10**), 22.6 (**C-9**), 23.5 (**C-3**), 25.3 (**C-5**), 36.2 (**C-6**), 39.0 (**C-4**), 43.9 (**C-1'** and **C-2'**), 66.3 (**C-2**), 72.9 (**C-1**), 111.1 (**C-8**), 145.8 (**C-7**)

(1S, 2S, 4R)-1-Methyl-4-isopropenyl-2-dimethylamino-oxido-cyclohexan-1-ol (10)



(1S, 2S, 4R)-1-Methyl-4-isopropenyl-2-dimethylamino-cyclohexan-1-ol (**9**) (1.76 g, 8.95 mmol, 1.0 eq) was dissolved in acetonitrile (45 mL) and distilled water (30 mL) and the solution was cooled on an ice bath. Hydrogen peroxide (30% in water, 25 mL, 244.7 mmol, 27.3 eq) was added dropwise and the ice bath removed. The reaction was followed by TLC (25% methanol in chloroform) and was complete after stirring at room temperature for two hours. The reaction mixture was cooled down on ice and sodium sulfite (30.9 g, 245 mmol) was added portion wise to avoid overheating the solution. The peroxide was deemed quenched when a colorless solution was obtained upon mixing a droplet of reaction mixture with a droplet of aqueous sodium iodide. The salts were filtered and washed with chloroform (250 mL). The filtrate and washings were combined and separated. The aqueous layer was washed with chloroform (2 x 250 mL). The opaque organic layers were combined and dried with anhydrous magnesium sulfate and clarified upon drying. Magnesium sulfate was removed by filtration and

the solvent evaporated under reduced pressure to yield a viscous yellow oil corresponding to (1*S*, 2*S*, 4*R*)-1-methyl-4-isopropenyl-2-dimethylamino-oxido-cyclohexan-1-ol (**10**) (1.13 g, 5.3mmol, 60 % yield).

Formula: C₁₂H₂₃NO₂

Molar mass: 213.17

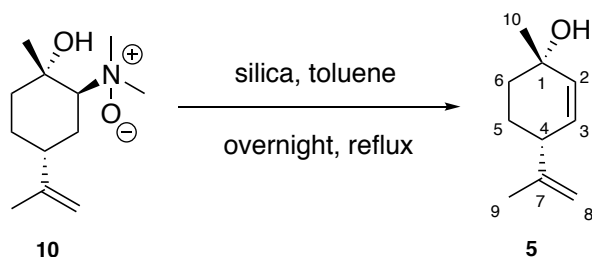
CAS number: 1415961-21-5

TLC: R_f = 0.1 (pentane/ EtOAc 7:3); Rev: PMA/Ce

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.49-1.54 (m, 2 H, **H-5**), 1.56 (s, 3 H, **H-10**), 1.66-1.70 (m, 1 H, **H-6**), 1.73 (s, 3 H, **H-9**), 1.76-1.80 (m, 1 H, **H-6**), 1.82-1.92 (m, 1 H, **H-4**), 1.94 (m, 1 H, **H-3**), 2.09 (dd, 1 H, ³J_{H3-H2} = 13.1 Hz, ³J_{H3-H4} = 2.5 Hz, **H-3**), 2.56 (s, 1 H, -OH), 3.16 (s, 3 H, **H-1'** or **H-2'**), 3.25 (s, 3 H, **H-1'** or **H-2'**), 3.50 (d, 1 H, ³J_{H2-H3} = 13.5 Hz, **H-2**), 4.80 (br s, 1 H, **H-8**), 5.00 (br s, 1 H, **H-8**)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 22.4 (**C-9**), 22.7 (**C-10**), 24.6 (**C-4**), 29.3 (**C-6**), 38.9 (**C-3**), 39.6 (**C-5**), 53.9 (**C-1'** or **C-2'**), 61.9 (**C-1'** or **C-2'**), 73.5 (**C-2**), 78.4 (**C-1**), 112.1 (**C-8**), 144.1 (**C-7**)

(1*S*, 4*R*)-1-Methyl-4-isopropenyl-2-cyclohexen-1-ol (5)



(1*S*, 2*S*, 4*R*)-1-Methyl-4-isopropenyl-2-dimethylamino-oxido-cyclohexan-1-ol (**10**) (1.0 g, 4.69 mmol, 1.0 eq) was dissolved in toluene (20 mL) then silica (400 mg) was added. The mixture was stirred at reflux overnight in a Dean Stark glassware system to remove water from the reaction. After this time, the mixture was filtered to remove silica and the filtrate was evaporated under reduce pressure to give a brown oil. This oil was dissolved in dichloromethane and washed with hydrochloric acid (2 M, 15 mL) and distilled water (15 mL) and then dried on magnesium sulfate. The solvent was removed under reduced pressure. Purification by column chromatography afforded a pure product corresponding to (1*S*, 4*R*)-1-methyl-4-isopropenyl-2-cyclohexen-1-ol (**5**) (350 mg, 2.3 mmol, 47 % yield).

Formula: C₁₀H₁₆O

Molar mass: 152.24

CAS number: 22972-51-6

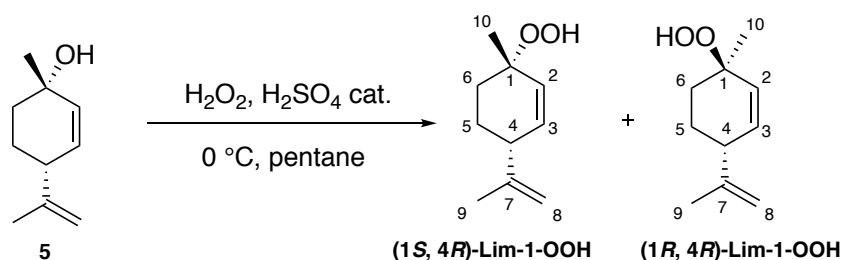
TLC: R_f = 0.57 (pentane/Et₂O 8:2); Rev: PMA/Ce

$[\alpha]_D^{22}$: +58.5 (1.0, CH₂Cl₂), lit. $[\alpha]_D^{22}$: +53.8 (1.0, CH₂Cl₂)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): See the description of **5** in page 99

¹³C NMR (125MHz, CDCl₃) δ (ppm): See the description of **5** in page 99

(1S, 4R)-1-Methyl-4-isopropenyl-2-cyclohexen-1-hydroperoxide ((1S, 4R)-Lim-1-OOH)
and **(1R, 4R)-1-methyl-4-isopropenyl-2-cyclohexen-1-hydroperoxide ((1R, 4R)-Lim-1-OOH)**



(1S,4R)-1-Methyl-4-isopropenyl-2-cyclohexen-1-ol (**5**) (4.0 g, 26.27 mmol, 1.0 eq) in pentane (150 mL) was added to a solution of hydrogen peroxide (35 % wt in water, 150 mL) and concentrated sulfuric acid (20 drops). The mixture was stirred vigorously at 0 °C until TLC showed no remaining starting material. Then, the phases were separated. The aqueous layer was extracted with pentane (3 × 100 mL). The combined organic layers were washed with distilled water (2 × 150 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on neutralized silica gel (pentane/Et₂O 8:2) to isolate the two isomers (1S, 4R)-1-methyl-4-isopropenyl-2-cyclohexen-1-hydroperoxide (**(1S, 4R)-Lim-1-OOH**) (1.96 g, 11.6 mmol, 45 % yield) and (1R, 4R)-1-methyl-4-isopropenyl-2-cyclohexen-1-hydroperoxide (**(1R, 4R)-Lim-1-OOH**) (450 mg, 2.67 mmol, 10 % yield).

Formula: C₁₀H₁₆O₂

Molar mass: 168.24

CAS number: (1S, 4R)-Lim-1-OOH: 77026-87-0; (1R, 4R)-Lim-1-OOH: 77026-88-1

TLC: (1S, 4R)-Lim-1-OOH: $R_f = 0.71$; (1R, 4R)-Lim-1-OOH: $R_f = 0.69$ (pentane/ Et₂O 6:2);

Rev: PMA/Ce

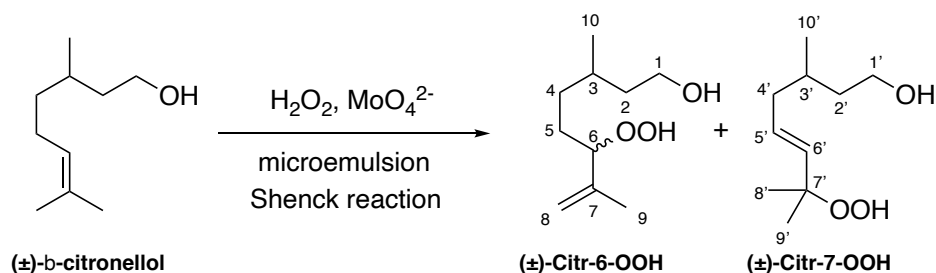
HRMS (ESI): m/z calculated for C₁₀H₁₆O₂ [M + Na]⁺: 191.10 ; found 191.10

$[\alpha]_D^{22}$ (1S, 4R)-Lim-1-OOH: +38.6 (1.0, CH₂Cl₂);

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): See the description of (1S, 4R)-Lim-1-OOH and (1R, 4R)-Lim-1-OOH in page 103

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): See the description of (1S, 4R)-Lim-1-OOH and (1R, 4R)-Lim-1-OOH in page 103

5. Synthesis of 6-hydroperoxy-3,7-dimethyloct-7-en-1-ol ((±)-Citr-6-OOH) and (E)-7-hydroperoxy-3,7-dimethyloct-5-en-1-ol ((±)-Citr-7-OOH)



A microemulsion was prepared by adding sodium molybdate (2.3 g in 12 mL of distilled water) dropwise into a suspension of sodium dodecyl sulfate (19 g) in butanol (23 mL) and dichloromethane (133 mL). The microemulsion became clear after 25 min stirring. A solution of β -(±)-citronellol (3.42 g, 21.9 mmol, 1.0 eq) in the microemulsion (50 mL) was treated at room temperature with a first portion of hydrogen peroxide (30 % wt in water, 1 mL). The brick red mixture was stirred for about 20 min until it became light yellow. Other thirteen portions of hydrogen peroxide (30 % wt in water, 1 mL each) were successively added every 20 min. A total of 14 mL of aqueous hydrogen peroxide were used (137.1 mmol, 6.3 eq). The light-yellow mixture was stirred overnight at room temperature becoming completely clear. After this time, the solvent was removed under reduced pressure and the crude product obtained dissolved in dichloromethane (100 mL). The suspension was stirred vigorously for about 45 min and filtered. The filtrate was evaporated under reduced pressure and the recovered oil was diluted in ethyl acetate (20 mL) and washed with water (3 × 100 mL). The aqueous layers were extracted with ethyl acetate (3 × 30 mL). The organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated under reduced pressure. Purification by column chromatography on silica gel (petroleum ether/EtOAc 9:1) furnished the mixture of compounds

chromatography on silica gel (petroleum ether/EtOAc 9:1) furnished the mixture of compounds (\pm)-Citr-6-OOH and (\pm)-Citr-7-OOH (ratio 6/4) as a yellow oil (3.4 g, 18.1 mmol, 73 % yield). (\pm)-Citr-6-OOH was obtained as a mixture of diastereoisomers ratio 1:1.

Formula: C₁₀H₂₀O₃

Molar mass: 188.27

CAS number: (\pm)-Citr-7-OOH: 81113-73-7; (\pm)-Citr-6-OOH: 81113-74-8

TLC: R_f = 0.35 (petroleum ether /EtOAc 6:4); Rev: PMA/Ce

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm):

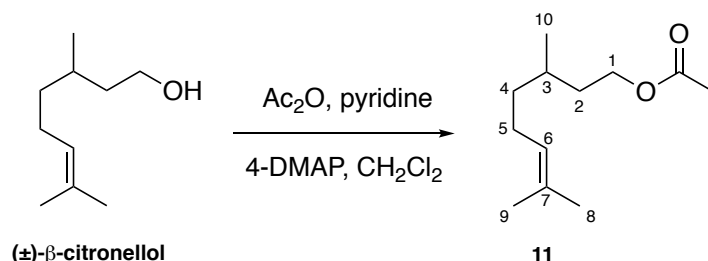
(\pm)-Citr-6-OOH (mixture of two diastereoisomers) and (\pm)-Citr-7-OOH: 0.90 (d, 3 H, ³J_{H10-H3} = 6.8 Hz, **H-10** and **H10'**), 1.07-1.26 (m, 0.6 H, **H-4**), 1.32 (s, 2 \times 0.4 H, **H-8'** and **H-9'**), 1.35-1.43 (m, 2 H, **H-5**), 1.49-1.64 (m, 3 H, **H-2**, **H-3**, **H-3'** and **H-2'**), 1.72 (s, 0.6 H, **H-9**), 1.93-2.09 (m, 0.4 H, **H-4'**), 3.62-3.72 (m, 2 H, **H-1** and **H-1'**), 4.28 (td, 0.6 H, ³J_{H6-H5} = 6.95 Hz, ⁴J_{H6-H4} = 3.1 Hz, **H-6**), 5.52-5.56 (d, 0.4 H, ³J_{H6-H5} = 15.75 Hz, **H-6'**), 4.99-5.01 (m, 0.6 H, **H-8**), 5.64 - 5.70 (m, 0.4 H, **H-5'**), 7.96 (br s, 0.4 H, -OOH), 8.34 (br s, 0.3 H, -OOH), 8.40 (br s, 0.3 H, -OOH)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm):

(\pm)-Citr-6-OOH (mixture of two diastereoisomers) and (\pm)-Citr-7-OOH: 17.2 (**C-9**), 17.3 (**C-9**), 19.6 (**C-10**), 19.7 (**C-10**), 19.9 (**C-10'**), 24.5 (2C, **C-9'** and **C-8'**), 28.1(**C-5**), 28.2 (**C-5**), 29.2 (**C-3**), 29.4 (**C-3**), 29.7 (**C-3'**), 32.8 (**C-4**), 32.90 (**C-4**), 39.2 (**C-2'**), 39.6 (**C-2**), 39.7 (**C-2**), 39.9 (**C-4'**), 61.1 (**C-1'**), 61.12 (**C-1**), 61.14 (**C-1**), 82.2 (**C-7'**), 89.8 (**C-6**), 90.0 (**C-6**), 114.3 (**C-8**), 114.5 (**C-8**), 130.2 (**C-5'**), 135.1 (**C-6'**), 143.8 (**C-7**), 144.0 (**C-7**)

6. Synthesis of (*E*)-7-hydroperoxy-3,7-dimethyloct-5-en-1-ol ((\pm)-Citr-7-OOH)

3,7-Dimethyloct-6-en-1-yl acetate (**11**)



A solution of (\pm)- β -citronellol (5.0 g, 32.0 mmol, 1.0 eq) in dichloromethane (150 mL) was cooled to 0 °C and successively treated with pyridine previously distilled (10.3 mL, 127.8 mmol, 4.0 eq), 4-(dimethylamino)pyridine (390 mg, 3.2 mmol, 0.1 eq) and acetic anhydride (9 mL,

96.1 mmol, 3.0 eq). After 45 min of stirring at this temperature, the reaction mixture was diluted with dichloromethane (50 mL) and washed with hydrochloric acid (1M, 150 mL), distilled water (150 mL), a saturated sodium bicarbonate solution (150 mL), and brine (150 mL). Combined organic layers were dried over magnesium sulfate and the solvent was evaporated under reduced pressure. Purification by column chromatography on silica gel (pentane/Et₂O 8:2) furnished 3,7-dimethyloct-6-en-1-yl acetate (**11**) as a colourless oil (5.30 g, 26.73 mmol, 84 % yield).

Formula: C₁₂H₂₂O₂

Molar mass: 198.31

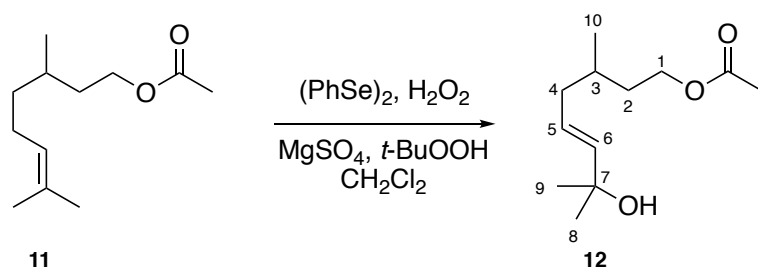
CAS number: 150-84-5

TLC: R_f = 0.81 (pentane/Et₂O 8:2); Rev: PMA/Ce

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.89 (d, 3 H, ³J_{H10-H3} = 6.7 Hz, **H-10**), 1.12-1.56 (m, 5 H, **H-2**, **H-3** and **H-4**), 1.58 (s, 3 H, **H-8**), 1.66 (s, 3 H, **H-9**), 1.89-2.00 (m, 2 H, **H-5**), 2.02 (s, 3 H, -COCH₃), 4.03-4.12 (m, 2 H, **H-1**), 5.07 (t, ³J_{H6-H5} = 7.1 Hz, 1 H, **H-6**)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 17.2 (**C-9**), 19.5 (-COCH₃), 21.2 (**C-10**), 27.47 (**C-5**), 25.8 (**C-8**), 29.5 (**C-3**), 35.5 (**C-2**), 37.1 (**C-4**), 63.1 (**C-1**), 124.66 (**C-6**), 131.44 (**C-7**), 171.3 (-C=O)

(E)-7-Hydroxy-3,7-dimethyloct-5-en-1-yl acetate (**12**)



A solution of diphenyl diselenide (11.8 g, 37.8 mmol, 1.5 eq) in anhydrous dichloromethane (100 mL) was cooled to 0 °C and treated with hydrogen peroxide (35 % wt in water, 4.0 mL, 42.0 mmol, 1.7 eq). After stirring vigorously at this temperature for 30 min, anhydrous magnesium sulfate (5.0 g, 41.5 mmol, 1.6 eq) was added and the reaction mixture stirred at 0 °C for 30 min. The ice bath was after this time removed, 3,7-dimethyloct-6-en-1-yl acetate (**11**) (5.0 g, 25.2 mmol, 1.0 eq) was added and the mixture was stirred vigorously for 15 h at room temperature. The reaction mixture was then cooled down again to 0 °C and chilled *tert*-butyl

hydroperoxide (15 mL, 149.1 mmol, 5.9 eq) was added. After removing the ice bath, the reaction mixture was stirred at room temperature for 20 h and filtered after this time. The filtrate was concentrated under reduce pressure. Then the orange residue was dissolved in diethyl ether (60 mL) washed with sodium carbonate (60 mL), distilled water (60 mL), sodium hydrogenocarbonate (60 mL) and brine (60 mL), dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography on silica gel (pentane/Et₂O 8:2) furnished 7-hydroxy-3,7-dimethyloct-5-en-1-yl acetate (**12**) as a yellow oil (4.3 g, 20.2 mmol, 80 % yield).

Formula: C₁₂H₂₂O₃

Molar mass: 214.31

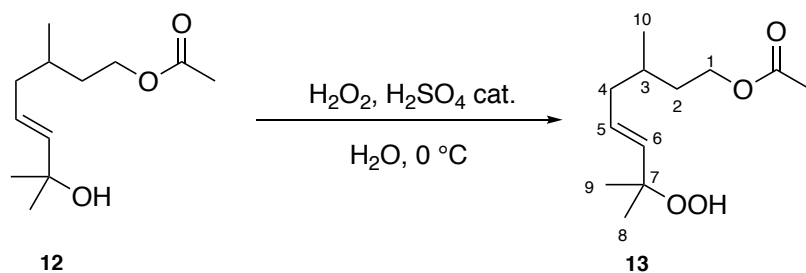
CAS number: 91464-78-7

TLC: R_f = 0.28 (pentane/Et₂O 8:2); Rev: PMA/Ce

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.90 (d, 3 H, ³J_{H10-H3} = 6.7 Hz, **H-10**), 1.30 (s, 6 H, **H-8** and **H-9**), 1.41-1.47 (m, 1 H, **H-3**), 1.59-1.69 (m, 2 H, **H-2**), 1.88-2.06 (m, 5 H, **H-4** and -COCH₃), 4.05-4.13 (m, 2 H, **H-1**), 5.54-5.64 (m, 2 H, **H-5** and **H-6**)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 19.5 (-COCH₃), 21.2 (**C-10**), 30.0 (2C, **C-9** and **C-8**), 30.2 (**C-3**), 35.1(**C-2**), 39.6 (**C-4**), 63.0 (**C-1**), 70.8(**C-7**), 125.1 (**C-5**), 140.0 (**C-6**), 171.4 (-C=O)

(E)-7-Hydroperoxy-3,7-dimethyloct-5-en-1-yl acetate (13)



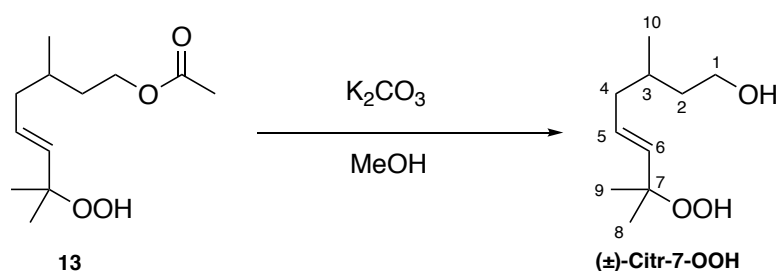
To an aqueous solution of hydrogen peroxide (50 % wt in water, 140 mL) were added, at 0 °C, 10 drops of concentrated sulfuric acid and 7-hydroxy-3,7-dimethyloct-5-en-1-yl acetate (**12**) (2.0 g, 9.33 mmol, 1.0 eq). The reaction mixture was vigorously stirred at 0 °C during 15 h. After this time, the reaction mixture was extracted with dichloromethane (3 × 100 mL). The organic layers were combined, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on neutralized silica gel (pentane/EtOAc 8:2) to obtain (*E*)-7-hydroperoxy-3,7-dimethyloct-5-en-1-yl acetate (**13**) as a colourless oil (1.30 g, 5.60 mmol, 60 %).

Formula: C₁₂H₂₂O₄**Molar mass:** 230.30**CAS number:** 105987-64-2**TLC:** R_f = 0.6 (pentane/Et₂O 8:2); Rev: PMA/Ce

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.91 (d, 3 H, ³J_{H10-H3} = 6.5 Hz, **H-10**), 1.33 (s, 6 H, **H-8** and **H-9**), 1.41-1.48 (m, 1 H, **H-3**), 1.62-1.70 (m, 2 H, **H-2**), 1.93-2.10 (m, 5 H, **H-4** and -COCH₃), 4.08-4.13 (m, 2 H, **H-1**), 5.54-5.68 (m, 2 H, **H-5** and **H-6**), 7.64 (s, 1 H, -OOH)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 19.6 (-COCH₃), 21.2 (**C-10**), 24.5 (2C, **C-9** and **C-8**), 30.0 (**C-3**), 35.0 (**C-2**), 39.7 (**C-4**), 63.0 (**C-1**), 82.2 (**C-7**), 129.8 (**C-5**), 135.4 (**C-6**), 171.6 (**C=O**)

(*E*)-7-hydroperoxy-3,7-dimethyloct-5-en-1-ol ((±)-Citr-7-OOH)



A solution of (*E*)-7-hydroperoxy-3,7-dimethyloct-5-en-1-yl acetate (**13**) (1.30 g, 5.60 mmol, 1.0 eq) in anhydrous methanol (25 mL) was treated with potassium carbonate (3.90 g, 28.2 mmol, 5.0 eq) and stirred for 2.5 h at room temperature. The reaction mixture was then diluted with distilled water and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (3 × 50 mL). The organic layers were combined, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on neutralized silica gel (petroleum ether/EtOAc 6:4) and furnished (*E*)-7-hydroperoxy-3,7-dimethyloct-5-en-1-ol (**(±)-Citr-7-OOH**) as a colourless oil (932.6 mg, 4.95 mmol, 88 % yield).

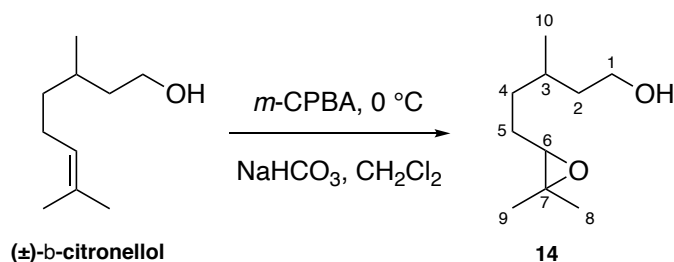
Formula: C₁₀H₂₀O₃**Molar mass:** 188.27**CAS number:** 81113-73-7**TLC:** R_f = 0.33 (petroleum ether/EtOAc 6:4); Rev: PMA/Ce**HRMS (ESI):** *m/z* calculated for C₁₀H₂₀O₃ [M + Na]⁺: 211.12 ; found : 211.13

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.91 (d, 3 H, $^3J_{\text{H}_{10}\text{-H}_3} = 6.7$ Hz, **H-10**), 1.33 (s, 6 H, **H-8** and **H-9**), 1.36-1.43 (m, 1 H, **H-3**), 1.58-1.78 (m, 2 H, **H-2**), 1.93-2.09 (m, 2 H, **H-4**), 3.63-3.73 (m, 2 H, **H-1**), 5.53-5.70 (m, 2 H, **H-5** and **H-6**), 7.78 (s, 1 H, -OOH)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 19.9 (**C-10**), 24.5 (2C, **C-9** and **C-8**), 29.7 (**C-3**), 39.2 (**C-2**), 39.9 (**C-4**), 61.1 (**C-1**), 82.2(**C-7**), 129.8 (**C-5**), 135.4 (**C-6**)

Other steps described in Chapter 1:

6,7-Epoxy-3,7-dimethyl-octan-1-ol (**14**)



A suspension of sodium hydrogenocarbonate (4 g, 47.6 mmol, 3.8 eq) and β - (\pm) -citronellol (2.0 g, 12.8 mmol, 1.0 eq) in dichloromethane (50 mL) was stirred and cooled to 0 °C. Then, 3-chloroperbenzoic acid (77 %, 2.65 g, 15.4 mmol, 1.2 eq) was added to the reaction mixture and the temperature allowed to warm up to room temperature. After stirring 1 h at room temperature, the excess of 3-chloroperbenzoic acid was neutralized by the addition of saturated solution of sodium hydrogenocarbonate (20 mL). The aqueous layer was separated and extracted with dichloromethane (2 \times 75 mL). The organic layers were combined, washed with distilled water (100 mL), a saturated solution of sodium chloride (100 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to give 2.18 g of crude oil. Purification by column chromatography on silica gel (pentane/EtOAc 6:4) furnished a mixture of diastereoisomers 6,7-epoxy-3,7-dimethyl-octan-1-ol (**14**) as a colourless oil (1.84 g, 10.6 mmol, 83 % yield).

Formula: $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_2$

Molar mass: 172.27

CAS number: 1564-98-3

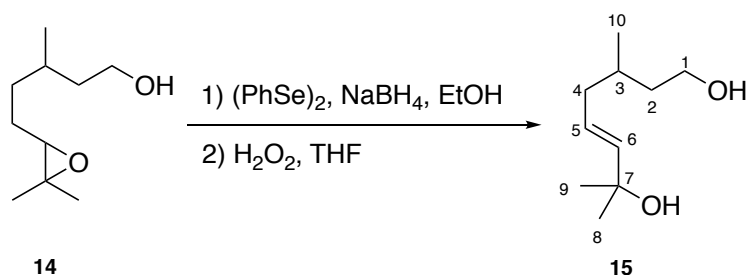
TLC: $R_f = 0.5$ (pentane/EtOAc 6:4); Rev: PMA/Ce

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm):

Mixture of two diastereoisomers: 0.89 (d, 3 H, $^3J_{\text{H}_{10}\text{-H}_3} = 6.6$ Hz, **H-10**), 1.23 (s, 3 H, **H-8**), 1.27 (s, 3 H, **H-9**), 1.31-1.42 (m, 2 H, **H-4**), 1.45-1.54 (m, 2 H, **H-5**), 1.55-1.65 (m, 3 H, **H-2** and **H-3**), 2.68 (t, 1 H, $^3J_{\text{H}_6\text{-H}_5} = 6.2$ Hz, **H-6**), 3.59-3.69 (m, 2 H, **H-1**)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm):

Mixture of two diastereoisomers: 18.7(C-8), 18.8 (C-8), 19.5 (C-9), 19.7 (C-9), 24.9 (2 C, C-10), 26.3 (C-5), 26.5 (C-5), 29.3 (C-3), 29.5 (C-3), 33.7 (C-4), 33.8 (C-4), 39.6 (C-2), 39.8 (C-2), 58.5 (C-7), 58.6 (C-7), 60.9 (2 C, C-1), 64.7 (C-6), 64.8 (C-6)

(E)-3,7-Dimethyl-5-octene-1,7-diol (15)

Diphenyl diselenide (855 mg, 2.73 mmol, 0.5 eq) was dissolved in 30 mL of absolute ethanol. Sodium borohydride (228 mg, 6.02 mmol, 1.1 eq) was added in small portions while stirring under an argon atmosphere. The mixture was stirred until the bright yellow solution turned out to be colourless. 6,7-Epoxy-3,7-dimethyl-octan-1-ol (**14**) was then added (915.0 mg, 5.31 mmol, 1.0 eq) and the reaction mixture was refluxed for 2 h at 60 °C. The solution was cooled down to 0 °C and 20 mL of anhydrous tetrahydrofuran was added. Hydrogen peroxide (30 % wt in water, 5.5 mL, 53.8 mmol, 10.1 eq) was added over a period of 1 h at this temperature. The reaction, followed by TLC, showed that after 2 h, the reaction was complete. The reaction mixture was then diluted with distilled water (20 mL) and extracted with diethyl ether (3 × 30 mL). The organic phase was washed several times with a saturated solution of sodium hydrogenocarbonate (2 × 50 mL) dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give an orange oil. Purification by column chromatography on silica gel (pentane/EtOAc 6:4) furnished (E)-3,7-dimethyl-5-octene-1,7-diol (**15**) as a colourless oil (615.1 mg, 3.57 mmol, 67 % yield).

Formula: $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_2$

Molar mass: 172.27

CAS number: 1564-99-4

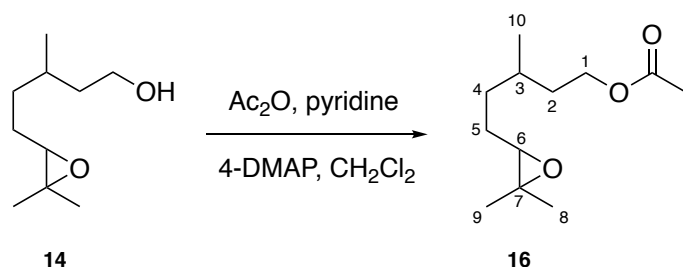
TLC: R_f = 0.14 (pentane/EtOAc 6:4); Rev: PMA/Ce

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.89 (d, 3 H, $^3J_{\text{H}_{10}-\text{H}_3}$ = 6.7 Hz, H-10), 1.30 (s, 6 H, H-8 and H-9), 1.58-1.71 (m, 3 H, H-2 and H-3), 1.87-1.93 (m, 1 H, H-4), 2.01-2.06 (m, 1 H, H-4), 3.63-3.72 (m, 2 H, H-1), 5.55-5.63 (m, 2 H, H-5 and H-6)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 19.6 (C-10), 29.98 (C-8 or C-9), 29.94 (C-8 or C-9), 30.0 (C-3), 39.4 (C-4), 39.8 (C-2), 61.1 (C-1), 70.8 (C-7), 125.4 (C-5), 139.7 (C-6)

7. Synthesis of 6-hydroperoxy-3,7-dimethyloct-7-en-1-ol ((±)-Citr-6-OOH)

6,7-Epoxy-3,7-dimethyloct-1-yl-acetate (**16**)



A solution of 6,7-epoxy-3,7-dimethyl-octan-1-ol (**14**) (817 mg, 4.74 mmol, 1.0 eq) in dichloromethane (20 mL) was cooled down to 0 °C and successively treated with previously distilled pyridine (1.5 mL, 18.96 mmol, 4.0 eq), 4-dimethylaminopyridine (58.0 mg, 0.48 mmol, 0.1 eq), and acetic anhydride (1.5 mL, 15.6 mmol, 3.3 eq). After 45 min of stirring at this temperature, the reaction mixture was diluted with dichloromethane (20 mL) and washed in turn with hydrochloric acid (1M, 20 mL), distilled water (20 mL), a saturated solution of sodium hydrogenocarbonate (20 mL) and brine (20 mL). The organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated under reduced pressure. Purification by column chromatography on silica gel (pentane/ Et_2O 8:2) furnished a mixture of diastereoisomers 6,7-epoxy-3,7-dimethyloct-1-yl-acetate (**16**) as a colourless oil (713.9 g, 3.6 mmol, 76 % yield).

Formula: $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_2$

Molar mass: 198.31

CAS number: 1787-98-0

TLC: $R_f = 0.80$ (pentane/ EtOAc 7:3); Rev: PMA/Ce

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm):

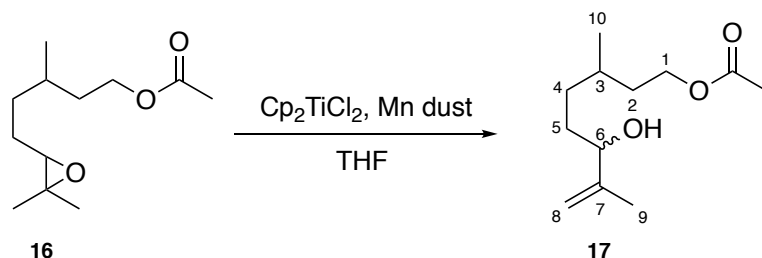
Mixture of two diastereoisomers: 0.91 (d, 3 H, $^3J_{\text{H}_{10}-\text{H}_3} = 6.6$ Hz, **H-10**), 1.25 (s, 3 H, **H-8**), 1.29 (s, 3 H, **H-9**), 1.34-1.43 (m, 2 H, **H-4**), 1.44-1.54 (m, 2H, **H-5**), 1.56-1.69 (m, 3 H, **H-2** and **H-3**), 2.03 (s, 3 H, $-\text{COCH}_3$), 2.68 (t, 1 H, $^3J_{\text{H}_6-\text{H}_5} = 6.2$ Hz, **H-6**), 4.04-4.14 (m, 2 H, 2 × **H-1**)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm):

Mixture of two diastereoisomers: 18.77 (C-8), 18.81 (C-8), 19.4 (C-9), 19.5 (C-9), 21.2

(COCH₃), 25.0 (**C-10**), 26.4 (**C-5**), 26.5 (**C-5**), 29.80 (**C-3**), 29.82 (**C-3**), 33.57 (**C-4**), 33.61 (**C-4**), 35.37 (**C-2**), 35.54 (**C-2**), 58.36 (**C-7**), 58.46 (**C-7**), 62.90 (**C-1**), 62.94 (**C-1**), 64.59 (**C-6**), 64.62 (**C-6**), 171.4 (2 × **C=O**)

6-Hydroxy-3,7-dimethyloct-7-en-yl-acetate (**17**)



Anhydrous tetrahydrofuran (200 mL) was added to a mixture of commercial dichlorotitanocene (6.20 g, 25.0 mmol, 2.5 eq) and manganese dust (4.30 g, 80.0 mmol, 8.0 eq) under an argon atmosphere and the suspension was stirred at room temperature until it turned lime green (after about 3 min). A solution of 6,7-epoxy-3,7-dimethyloct-1-yl-acetate (**16**) (2.10 g, 10.0 mmol, 1.0 eq) in tetrahydrofuran (10 mL) was then added and the mixture was stirred for 24 h. After this time the reaction was quenched with a saturated solution of potassium hydrogen sulfate (80 mL) and extracted with ethyl acetate (2 × 150 mL). The combined organic layers were washed with brine (2 × 80 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and the solvent removed under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (pentane/EtOAc 7:3) to obtain a mixture of diastereoisomers 6-hydroxy-3,7-dimethyloct-7-en-yl-acetate (**17**) as a yellow oil (1.35g, 6.30 mmol, 63% yield).

Formula: C₁₂H₂₂O₃

Molar mass: 214.31

CAS number: 240434-69-9

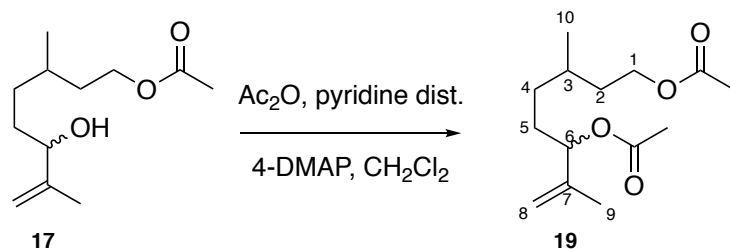
TLC: R_f = 0.55 (pentane/EtOAc 7:3); Rev: PMA/Ce

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm):

Mixture of two diastereoisomers: 0.91 (d, 3 H, ³J_{H10-H3} = 6.6Hz, **H-10**), 1.06-1.33 (m, 2 H, **H-4**), 1.37-1.48 (m, 2 H, **H-5**), 1.50-1.61 (m, 3 H, **H-2** and **H-3**), 1.71 (s, 3 H, **H-9**) 2.03 (s, 3 H, COCH₃), 4.03 (t, 1 H, ³J_{H6-H5} = 6.5 Hz, **H-6**), 4.06-4.14 (m, 2 H, **H-1**), 4.83 (s, 1 H, **H-8**), 4.91-4.93 (m, 1 H, **H-8**)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm):

Mixture of two diastereoisomers: 17.5 (**C-9**), 17.6 (**C-9**), 19.5 (COCH_3), 21.2 (**C-10**), 29.9 (**C-3**), 30.0 (**C-3**), 32.2 (**C-4**), 32.3 (**C-4**), 32.6 (**C-5**), 32.7 (**C-5**), 35.5 (**C-2**), 35.6 (**C-2**), 63.0 (**C-1**), 63.1 (**C-1**), 76.2 (**C-6**), 76.4 (**C-6**), 111.2 (**C-8**), 111.4 (**C-8**), 147.58 (**C-7**), 147.7 (**C-7**), 171.37 ($-\text{C}=\text{O}$), 171.39 ($-\text{C}=\text{O}$)

3,7-Dimethyloct-7-ene-1,6-diyl diacetate (19)

A solution of 6-hydroxy-3,7-dimethyloct-7-en-yl-acetate (**17**) (200 mg, 0.93 mmol, 1.0 eq) in anhydrous dichloromethane (6 mL) was cooled down to 0 °C and successively treated with pyridine (300 μL , 3.72 mmol, 4.0 eq), 4-dimethylaminopyridine (11.5 mg, 0.093 mmol, 0.1 eq) and acetic anhydride (263 μL , 2.79 mmol, 3.0 eq). After 45 min of stirring at this temperature, the reaction mixture was diluted with dichloromethane (6 mL) and washed in turn with hydrochloric acid (1M, 6 mL), distilled water (6 mL), a saturated solution of sodium hydrogenocarbonate (6 mL), and brine (6 mL). The combined organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated under reduced pressure to give a colourless oil corresponding to 3,7-dimethyloct-7-ene-1,6-diyl diacetate (**19**) as a mixture of diastereoisomers (232 mg, 0.91 mmol, 97 % yield).

Formula: $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{O}_4$

Molar mass: 256.34

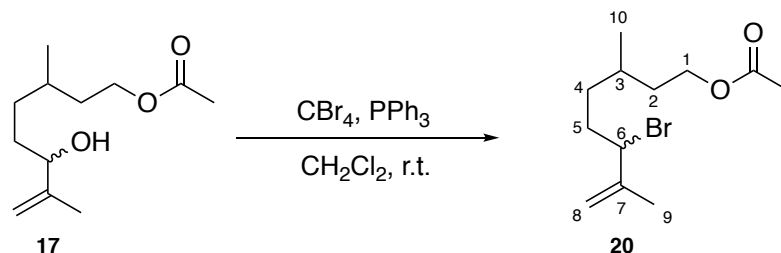
TLC: $R_f = 0.57$ (pentane/ Et_2O 8:2); Rev: PMA/Ce

 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm):

Mixture of two diastereoisomers: 0.90 (d, 3 H, $^3J_{\text{H}10-\text{H}3} = 6.55$ Hz, **H-10**), 1.08-1.30 (m, 2 H, **H-4**), 1.37-1.49 (m, 2 H, **H-5**), 1.52-1.68 (m, 3 H, **H-2** and **H-3**), 1.71 (s, 3 H, **H-9**), 2.03 (s, 3 H, $-\text{COCH}_3$), 2.06 (s, 3 H, $-\text{COCH}_3$), 4.03-4.13 (m, 2 H, **H-1**), 4.88 (s, 1 H, **H-8**), 4.93 (s, 1 H, **H-8**), 5.13 (t, 1 H, $^3J_{\text{H}6-\text{H}5} = 6.75$ Hz, **H-6**)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm):

Mixture of two diastereoisomers: 18.1 (**C-9**), 18.2 (**C-9**), 19.48 (COCH_3), 19.49 (COCH_3), 21.2 (**C-10**), 21.3 (COCH_3), 21.4 (COCH_3), 29.71 (**C-5**), 29.74 (**C-5**), 29.92 (**C-3**), 29.97 (**C-3**), 32.34 (**C-4**), 32.42 (**C-4**), 35.45 (**C-2**), 35.48 (**C-2**), 62.95 (**C-1**), 62.96 (**C-1**), 77.7 (2C, 2 \times **C-6**), 112.9 (**C-8**), 113.2 (**C-8**), 143.1 (**C-7**), 143.2 (**C-7**), 171.38 ($-\text{C}=\text{O}$), 171.39 ($-\text{C}=\text{O}$)

3,7-Dimethyl-6-bromo-7-octen-1- acetate (20)

In a flame dried twin neck round-bottom flask under an argon atmosphere was dissolved 6-hydroxy-3,7-dimethyloct-7-en-yl-acetate (**17**) (500 mg, 2.33 mmol, 1.0 eq) and triphenylphosphine (1.84 g, 7.00 mmol, 3.0 eq) in anhydrous dichloromethane (25 mL). While the solution was stirred at room temperature, tetrabromomethane (2.32 g, 7.00 mmol, 3.0 eq) was added in small portions. The reaction mixture became orange and then dark yellow. The reaction mixture was kept under stirring at room temperature overnight. After this time, the solvent was evaporated under reduced pressure to give a dark beige solid before being redissolved in diethyl ether (30 mL). The solution was cooled down in a bath of acetone and dry ice in order to precipitate triphenylphosphine oxide and then filtered on silica. The filtrate was evaporated under reduced pressure to give an orange-brown oil. The purification by column chromatography on silica gel (pentane/EtOAc 97:3) gave a mixture of diastereoisomers as a colourless oil 3,7-dimethyl-6-bromo-7-octen-1-acetate (**20**) (400 mg, 1.44 mmol, 62 % yield).

Formula: $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{BrO}_2$

Molar mass: 277.20

TLC: $R_f = 0.41$ (pentane/EtOAc 97:3); Rev: PMA/Ce

HRMS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{BrO}_2$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 253.14; found: 253.14

 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm):

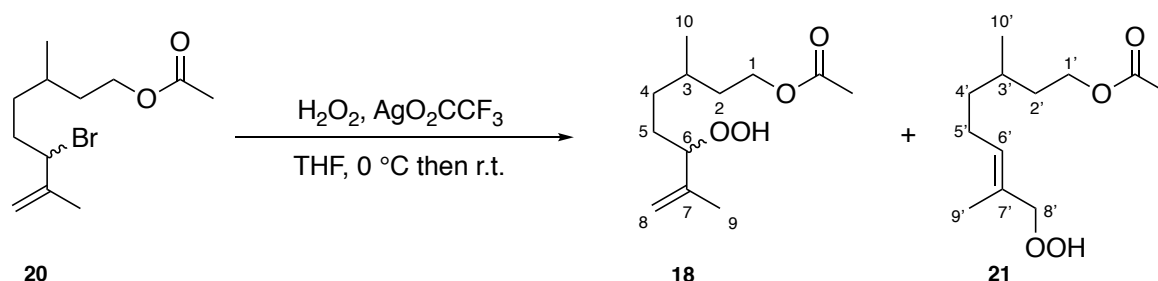
Mixture of two diastereoisomers: 0.92 (d, $^3J_{\text{H}_{10}-\text{H}_3} = 6.7$ Hz, 3 H, **H-10**), 1.01-1.12 (m, 2 H, **H-4**), 1.30-1.42 (m, 2 H, **H-5**), 1.60-1.75 (m, 3 H, **H-2** and **H-3**), 1.84 (s, 3 H, **H-9**), 2.04 (s, 3 H,

CH₃CO), 4.02-4.16 (m, 2 H, **H-1**), 4.50 (td, ³J_{H6-H5} = 7.5 Hz, ⁴J_{H6-H4} = 1.9 Hz, 1 H, **H-6**), 4.86-4.89 (m, 1 H, **H-8**), 5.05 (br s, 1 H, **H-8**)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm):

Mixture of two diastereoisomers: 17.5 (**C-9**), 17.7 (**C-9**), 19.50 (-COCH₃), 19.52 (-COCH₃), 21.18 (**C-10**), 21.2 (**C-10**), 29.6 (**C-3**), 34.7 (**C-4**), 34.8 (**C-4**), 35.1 (**C-5**), 35.2 (**C-5**), 35.4 (**C-2**), 35.5 (**C-2**), 60.3 (**C-1**), 60.4 (**C-1**), 62.8 (**C-6**), 62.9 (**C-6**), 114.2 (**C-8**), 114.3 (**C-8**), 144.9 (**C-7**), 145.0 (**C-7**), 171.35 (2 C, 2 × -C=O)

3,7-Dimethyl-6-hydroperoxy-7-octen-1- acetate (**18**) and 3,7-dimethyl- 8-hydroperoxy-6-octen-1- acetate (**21**)



In a flame dried twin neck round-bottom flask under an argon atmosphere, 3,7-dimethyl-6-bromo-7-octen-1-yl acetate (**20**) (390 mg, 1.4 mmol, 1.0 eq) was diluted in 12 mL of anhydrous tetrahydrofuran at 0 °C. An aqueous solution of hydrogen peroxide (50 % wt in water, 1.0 mL, 15.7 mmol, 11.2 eq) was added dropwise, causing discoloration of the reaction mixture, followed by the addition of silver trifluoroacetate (98 %, 371.1 mg, 1.68 mmol, 1.2 eq). The solution became beige milky. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The mixture was then filtered on celite. The filtrate was washed with a saturated solution of sodium hydrogenocarbonate (3 × 20 mL) to neutralize the excess hydrogen peroxide. The aqueous phase was extracted with diethyl ether (2 × 20 mL). The organic layers were combined, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (pentane/EtOAc 7:3) to obtain a mixture of isomers 3,7-dimethyl-6-hydroperoxy-7-octen-1-yl acetate (**18**) and 3,7-dimethyl-8-hydroperoxy-6-octen-1-yl acetate (**21**) (ratio 2/1) as a colourless oil (90.7 mg, 0.39 mmol, 30 %). (**18**) was obtained as a mixture of diastereoisomers ratio 1:1.

Formula: C₁₂H₂₂O₄

Molar mass: 230.30

CAS number: **18:** 101622-75-7

TLC: $R_f = 0.63$ (Pentane/EtOAc 7:3); Rev: PMA/Ce

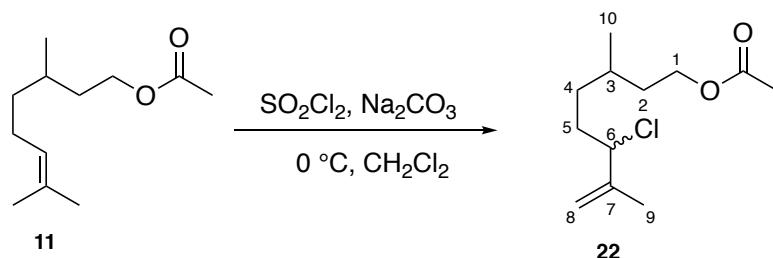
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm):

18 (mixture of two diastereoisomers) and **21**: 0.91 (d, 3 H, $^3J_{\text{H}_{10}-\text{H}_3} = 6.8$ Hz, **H-10** and **H-10'**), 1.07-1.28 (m, 2 H, **H-4** and **H-4'**), 1.30-1.45 (m, 2 H, **H-5** and **H-5'**), 1.49-1.65 (m, 3 H, **H-2**, **H-3**, **H-2'** and **H-3'**), 1.69 (s, 0.1 H, **H-9'**), 1.72 (s, 0.2 H, **H-9**), 2.03 (s, 3 H, CH_3CO), 4.08 (m, 2 H, **H-1** and **H-1'**), 4.27 (td, 0.2 H, $^3J_{\text{H}_6-\text{H}_5} = 6.65$ Hz, $^4J_{\text{H}_6-\text{H}_4} = 2.45$ Hz, **H-6**), 4.36 (s, 0.1 H, **H-8'**), 4.99 (s, 0.2 H, **H-8**), 5.01 (m, 0.2 H, **H-8**), 5.48 (t, 0.1 H, $^3J_{\text{H}_6-\text{H}_5} = 6.5$ Hz, **H-6'**), 8.00 (s, 0.1 H, -OOH), 8.03 (s, 0.1 H, -OOH), 8.14 (s, 0.1 H, -OOH)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm):

18 (mixture of two diastereoisomers) and **21**: 14.2 (**C-9'**), 17.12 (**C-9**), 17.24 (**C-9**), 19.50 (COCH_3), 19.51 (COCH_3), 19.7 (- COCH_3), 21.18 (**C-10**), 21.2 (**C-10**), 21.21 (**C-10'**), 25.3 (**C-5'**), 28.0 (**C-5**), 28.2 (**C-5**), 29.5 (**C-3'**), 29.79 (**C-3**), 29.82 (**C-3**), 32.69 (**C-4**), 32.73 (**C-4**), 35.3 (**C-2**), 35.4 (**C-2**), 35.5 (**C-4'**), 36.4 (**C-2'**), 63.0 (**C-1**), 63.1 (**C-1**), 63.2 (**C-1'**), 83.5 (**C-8'**), 89.8 (**C-6**), 90.0 (**C-6**), 114.4 (**C-8**), 114.6 (**C-8**), 130.4 (**C-6'**), 131.8 (**C-7'**), 143.6 (**C-7**), 143.7 (**C-7**), 171.5 (- $\text{C}=\text{O}$), 171.5 (- $\text{C}=\text{O}$), 171.6 (- $\text{C}=\text{O}$)

3,7-Dimethyl-6-chloro-7-octen-1-yl acetate (**22**) – Method 1



A solution of 3,7-dimethyl-6-octen-1-yl acetate (**11**) (1.0 g, 5.04 mmol, 1.0 eq) in dichloromethane (50 mL) was cooled to $0\text{ }^\circ\text{C}$ and successively treated with sodium carbonate (2.14 g, 20.2 mmol, 4.0 eq) and sulfuryl chloride (742.3 mg, 5.5 mmol, 1.1 eq) added dropwise. The reaction mixture was stirred at $0\text{ }^\circ\text{C}$ for 3 h. After this time, the reaction was quenched by the addition of a saturated solution of sodium hydrogenocarbonate. The organic layer was separated and the aqueous phase was extracted with diethyl ether (2×20 mL). The organic phases were combined and washed with water (1×20 mL) and brine (1×20 mL), then dried over magnesium sulfate and filtered. The solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (pentane/ Et_2O 97:3) to give

3,7-dimethyl-6-chloro-7-octen-1-acetate (**22**) a mixture of diastereoisomers (846.6 mg, 3.64 mmol, 72 % yield).

Formula: C₁₂H₂₁ClO₂

Molar mass: 232.75

CAS number: 74514-34-4

TLC: R_f = 0.47 (pentane/EtOAc 97:3); Rev: PMA/Ce

HRMS (ESI): *m/z* calculated for C₁₂H₂₁ClO₂ [M + Na]⁺ : 255.11; found : 255.11

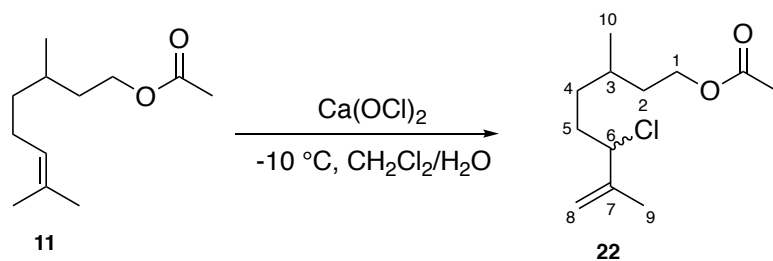
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm):

Mixture of two diastereoisomers: 0.92 (d, 3 H, ³J_{H10-H3} = 6.6 Hz, **H-10**), 1.07-1.14 (m, 2 H, **H-4**), 1.26-1.34 (m, 2 H, **H-5**), 1.41-1.49 (m, 3 H, **H-2** and **H-3**), 1.79 (s, 3 H, **H-9**), 2.04 (s, 3 H, CH₃CO), 4.04-4.14 (m, 2 H, **H-1**), 4.32-4.34 (td, 1 H, ³J_{H6-H5} = 7.5 Hz, ⁴J_{H6-H4} = 1.8 Hz, **H-6**), 4.88-4.89 (m, 1 H, **H-8**), 4.99 (br s, 1 H, **H-8**)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm):

Mixture of two diastereoisomers: 16.9 (**C-9**), 17.0 (**C-9**), 19.5 (-COCH₃), 21.2 (**C-10**), 29.6 (**C-3**), 33.9 (**C-4**), 34.0 (**C-5**), 34.1 (**C-5**), 35.4 (**C-2**), 35.5 (**C-2**), 62.8 (**C-1**), 62.9 (**C-1**), 67.21 (**C-6**), 67.22 (**C-6**), 114.3(**C-8**), 114.4 (**C-8**), 144.4 (**C-7**), 144.5 (**C-7**), 171.4 (-C=O)

3,7-Dimethyl-6-chloro-7-octen-1-acetate (**22**) – Method 2



A solution of 3,7-dimethyl-6-octen-1-yl acetate (**11**) (1.0 g, 5.04 mmol, 1.0 eq) in dichloromethane (20 mL) and distilled water (2 mL) was cooled down to -10 °C and successively treated with calcium hypochlorite (65 %, 300 mg, 2.52 mmol, 0.5 eq). Then, the reaction mixture was stirred at -10 °C for 5 h. After this time, the reaction was quenched by the addition of a saturated solution of sodium hydrogenocarbonate. The organic layer was separated and the aqueous phase was extracted with diethyl ether (2 × 20 mL). The organic phases were combined and washed with carbonate sodium (30 mL), sodium bisulfite (30 mL), brine (30 mL) and distilled water (30 mL), then dried over magnesium sulfate and filtered. The solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column

addition of a saturated solution of sodium hydrogenocarbonate. The organic layer was separated and the aqueous phase was extracted with diethyl ether (2 × 20 mL). The organic phases were combined and washed with carbonate sodium (30 mL), sodium bisulfite (30 mL), brine (30 mL) and distilled water (30 mL), then dried over magnesium sulfate and filtered. The solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (pentane/Et₂O 97:3) to give a colourless oil 3,7-dimethyl-6-chloro-7-octen-1-acetate (**22**) as a mixture of diastereoisomers (540 mg, 2.32 mmol, 46 % yield).

Formula: C₁₂H₂₁ClO₂

Molar mass: 232.75

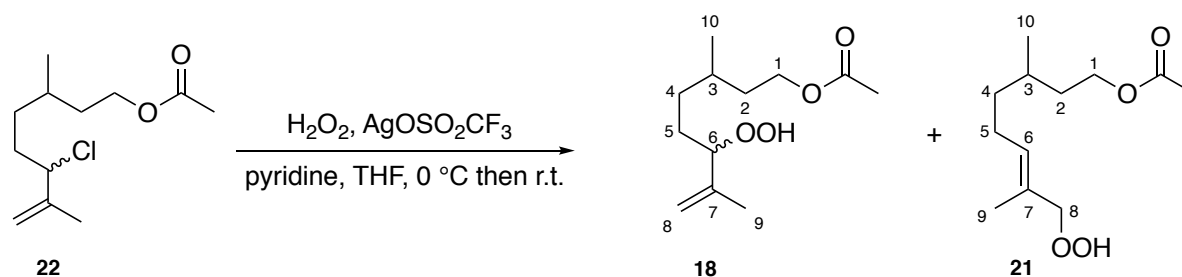
CAS number: 74514-34-4

TLC: R_f = 0.47 (pentane/EtOAc 97:3); Rev: PMA/Ce

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): See the description of **22** in page 120

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): See the description of **22** in page 120

3,7-Dimethyl-6-hydroperoxy-7-octen-1- acetate (**18**) and 3,7-dimethyl- 8-hydroperoxy-6-octen-1- acetate (**21**)



In a flame dried twin neck round bottom-flask under an argon atmosphere were introduced anhydrous tetrahydrofuran (15 mL), silver trifluoromethanesulfonate (1.10 g, 4.3 mmol, 2.0 eq) and pyridine (173 μL, 2.15 mmol, 1.0 eq). The bottom-flask was wrapped in aluminum foil to preserve it from day light. The solution was stirred and cooled down to 0 °C in an ice bath. Hydrogen peroxide (50 % wt in water, 2.0 mL, 32.6 mmol, 15.2 eq) was slowly added to the chilled solution. After 5 min, 3,7-dimethyl-6-chloro-7-octen-1-acetate (**20**) (500 mg, 2.15 mmol, 1.0 eq) dissolved in anhydrous tetrahydrofuran (15 mL) was added and the reaction mixture stirred overnight at room temperature. After this time, the starting material was always present, thus hydrogen peroxide (50 % wt in water, 1 mL, 16.3 mmol, 7.6 eq) was again added. After 24 h, the reaction mixture was filtered to remove the silver salts. The filtrate

6-hydroperoxy-7-octen-1- acetate (**18**) and 3,7-dimethyl- 8-hydroperoxy-6-octen-1- acetate (**21**) (ratio 2/1) as a colourless oil (101.3 mg, 0.44 mmol, 21 %).

Formula: C₁₂H₂₂O₄

Molar mass: 230.30

CAS number: 18: 101622-75-7

TLC: R_f = 0.22 (Pentane/Et₂O 8:2); Rev: PMA/Ce

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm):

18 (mixture of two diastereoisomers): See the description of **18** in page 119

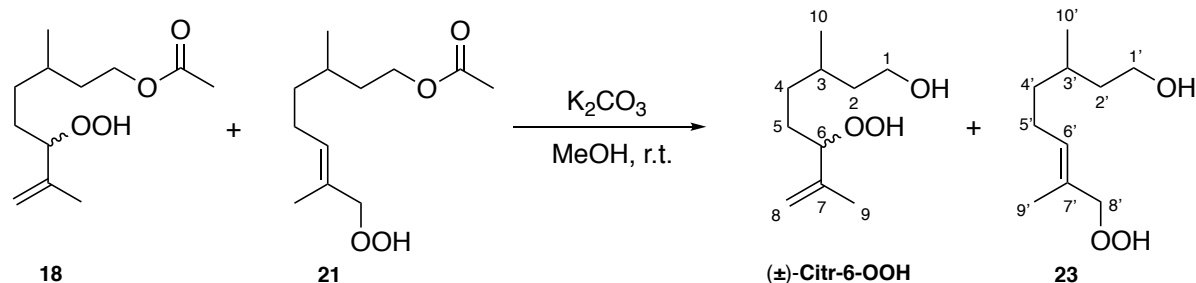
21: See the description of **21** in page 119

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm):

18 (mixture of two diastereoisomers): See the description of **18** in page 119

21: See the description of **21** in page 119

6-Hydroperoxy-3,7-dimethyloct-7-en-1-ol ((±)-Citr-6-OOH) and 3,7-dimethyl- 8-hydroperoxy-6-octen-1-ol (23)



A solution of 3,7-dimethyl-6-hydroperoxy-7-octen-1- acetate (**18**) and 3,7-dimethyl- 8-hydroperoxy-6-octen-1- acetate (**21**) (85.0 mg, 0.37 mmol, 1.0 eq) in anhydrous methanol (2.0 mL) was treated with potassium carbonate (255.0 mg, 1.85 mmol, 5.0 eq) and stirred for 2.5 hours. The mixture was diluted with water (5 mL), and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (2 × 5mL). The organic layers were combined, washed with distilled water (2 × 5mL), dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated under reduced pressure. Purification by column chromatography on silica gel (petroleum ether/EtOAc 6:4) furnished a mixture of isomers corresponding to 6-hydroperoxy-3,7-dimethyloct-7-en-1-ol ((±)-**Citr-6-OOH**) and 3,7-dimethyl-8-hydroperoxy-6-octen-1-ol (**23**) as a colourless oil (ratio 2/1) (44.3 mg, 0.23 mmol, 64 % yield).

(±)-Citr-6-OOH was obtained as a mixture of diastereoisomers ratio 1:1.

Formula: C₁₀H₂₀O₃

Molar mass: 188.27

CAS number: (±)-Citr-6-OOH: 81113-74-8

TLC: R_f = 0.4 (pentane/EtOAc 7:3); Rev: PMA/Ce

HRMS (ESI): *m/z* calculated for C₁₀H₂₀O₃[M + Na]⁺: 211.12 ; found : 211.13

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm):

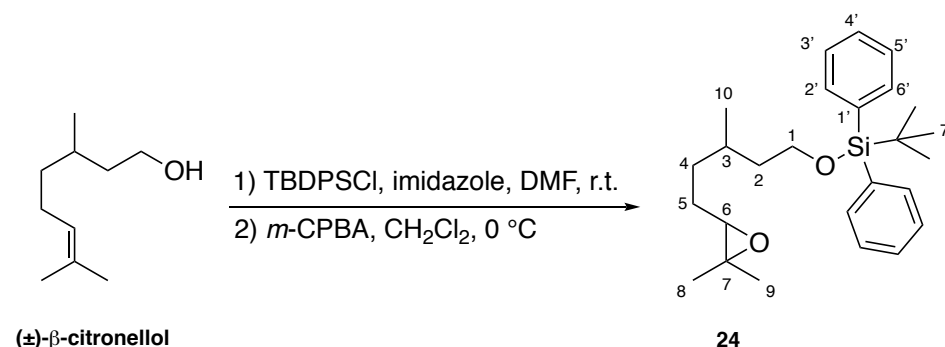
(±)-Citr-6-OOH (mixture of two diastereoisomers) and **23**: 0.90 (d, 3 H, ³J_{H10-H3} = 6.8 Hz, **H-10** and **H-10'**), 1.07-1.26 (m, 2 H, **H-4** and **H-4'**), 1.35-1.43 (m, 2 × 2 H, **H-5** and **H-5'**), 1.49-1.64 (m, 3 H, **H-2**, **H-2'**, **H-3** and **H-3'**), 1.70 (s, 0.1 H, **H-9'**), 1.72 (s, 0.2 H, **H-9**), 3.63-3.73 (m, 2 H, **H-1** and **H-1'**), 4.27 (td, 0.2 H, ³J_{H6-H5} = 6.8 Hz, ⁴J_{H6-H4} = 2.05 Hz, **H-6**), 4.35 (s, 0.1 H, **H-8'**), 4.99-5.01 (s, 0.2 H, **H-8**), 5.48 (t, 0.1 H, ³J_{H6-H5} = 6.85 Hz, **H-6'**), 8.19 (s, 0.1 H, -OOH), 8.28 (s, 0.1 H, -OOH), 8.55 (s, 0.1 H, -OOH)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm):

(±)-Citr-6-OOH (mixture of two diastereoisomers) and **23**: 14.3 (**C-9'**), 17.2 (**C-9**), 17.3 (**C-9**), 19.6 (**C-10**), 19.7 (**C-10**), 19.8 (**C-10'**), 25.4 (**C-5'**), 28.1(**C-5**), 28.2 (**C-5**), 28.7 (**C-3'**), 29.2 (**C-3**), 29.4 (**C-3**), 32.8 (**C-4**), 32.90 (**C-4**), 36.4 (**C-4'**), 39.4 (**C-2'**), 39.6 (**C-2**), 39.7 (**C-2**), 61.10 (**C-1'**), 61.12 (**C-1**), 61.14 (**C-1**), 83.6 (**C-8'**), 89.8 (**C-6**), 90.0 (**C-6**), 114.3 (**C-8**), 114.5 (**C-8**), 130.3 (**C-6'**), 132.1 (**C-7'**), 143.8 (**C-7**), 144.0 (**C-7**)

Others steps describe in Chapter 1:

1-*tert*-butyldiphenylsilane-6,7-epoxy-3,7-dimethyloct-1-yl (**24**)



A solution of β-(±)-citronellol (5.0 g, 31.9 mmol, 1.0 eq) in 15 mL of previously distilled dimethylformamide was treated with imidazole (3.3 g, 48.5 mmol, 1.5 eq) then *tert*-butyl(chloro)diphenylsilane (9.1 mL, 35.09 mmol, 1.1 eq) at room temperature. After 1 h, the reaction mixture was poured into diethyl ether (150 mL) and washed with distilled water (2 × 70 mL) and brine (2 × 70 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under

reduced pressure. The siloxyl ether was diluted in dichloromethane (50 mL) and treated with 3-chloroperbenzoic acid (5.70 g, 9.8 mmol) at 0 °C. After 1 h, diethyl ether (150 mL) was added, and the mixture was washed with a saturated sodium carbonate solution (2 × 70 mL) and brine (2 × 70 mL) dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (pentane/Et₂O 8:2) to give a mixture of diastereoisomers 1-*tert*-butyldiphenylsilane-6,7-epoxy-3,7-dimethyloct-1-yl (**24**) as a colourless oil (9.8 g, 23.8 mmol, 78 % yield).

Formula: C₂₆H₃₈O₂Si

Molar mass: 410.67

CAS number: 155997-58-3

TLC: R_f = 0.91 (pentane/Et₂O 8:2); Rev: PMA/Ce

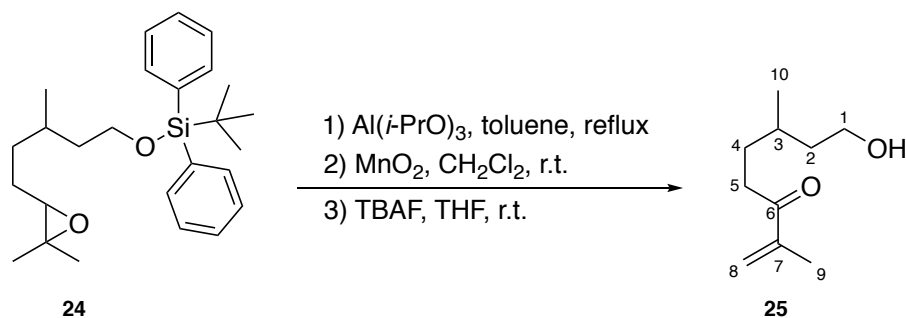
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm):

Mixture of two diastereoisomers: 0.84 (d, 3 H, ³J_{H10-H3} = 6.7 Hz, **H-10**), 1.04 (s, 9 H, **H-7'**), 1.25 (s, 3 H, **H-8** or **H-9**) 1.29 (s, 3 H, **H-8** or **H-9**), 1.33-1.44 (m, 2 H, **H-4**), 1.46-1.58 (m, 2 H, **H-5**), 1.58-1.69 (m, 3 H, **H-2** and **H-3**), 2.65-2.68 (m, 1 H, **H-6**), 3.65-3.74 (m, 2 H, **H-1**), 7.36-7.44 (m, 4 H, **H-2'**, **H-3'**, **H-5'**, **H-6'**), 7.65-7.67 (m, 1 H, **H-4'**)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm):

Mixture of two diastereoisomers: 18.7 (**C-10**), 18.8 (**C-10**), 19.31 (**C-8** or **C-9**), 19.32 (**C-8** or **C-9**), 19.6 (**C-8** or **C-9**), 19.7 (**C-8** or **C-9**), 26.5 (**C-5**), 26.6 (**C-5**), 27.0 (2C, 2 × **C-7'**), 29.48 (**C-3**), 29.54 (**C-3**), 33.7 (**C-4**), 33.8 (**C-4**), 39.6 (**C-2**), 39.7 (**C-2**), 58.3 (**C-7**), 58.4 (**C-7**), 62.1 (**C-1**), 62.2 (**C-1**), 64.7 (**C-6**), 64.8 (**C-6**), 127.74 (4C, 2 × **C-3'** and 2 × **C-5'**), 129.67 (2C, 2 × **C-4'**), 134.18 (4C, 2 × **C-2'** and 2 × **C-6'**), 135.71 (**C-11**)

3,7-Dimethyl-1-hydroxy-7-octen-6-one (**25**)



6,7-Epoxy-3,7-dimethyloct-1-yl-*tert*-butyldiphenylsilane (**24**) (9.49 g, 23.1 mmol, 1.0 eq) was treated with aluminium isopropoxide (5.0 g, 24.5 mmol, 1.06 eq) in toluene (15 mL) by refluxing for about 8 h. The cooled reaction mixture was acidified with 2 M hydrochloric acid and extracted with diethyl ether (3 × 100 mL). The combined organic layers were washed with brine (2 × 100 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated under reduced pressure. The resulting crude was diluted in anhydrous dichloromethane (40 mL) and treated with activated manganese oxide (20.0 g, 231.0 mmol, 10.0 eq) under an argon atmosphere. Stirring was continued at room temperature for 24 hours, and the reaction mixture was then filtered through celite with thorough washing with dichloromethane. The combined organic filtrates were concentrated under reduced pressure. The resulting crude was diluted in anhydrous tetrahydrofuran (10 mL) and treated with tetrabutylammonium fluoride trihydrate (7.8 g, 29.88 mmol, 1.3 eq) at room temperature for 2 hours, then diethyl ether (200 mL) was added. The mixture was washed with distilled water (100 mL) and brine (100 mL), and then dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography on silica gel (pentane/EtOAc 5:5) gave 3,7-dimethyl-1-hydroxy-7-octen-6-one (**25**) as a colourless oil (1.80 g, 10.6 mmol, 45 % yield).

Formula: C₁₀H₁₈O₂

Molar mass: 170.25

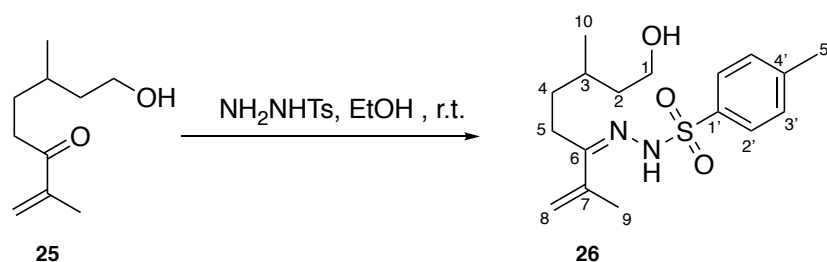
CAS number: 115433-69-7

TLC: R_f = 0.15 (pentane/EtOAc 5:5); Rev: PMA/Ce

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.92 (d, 3 H, ³J_{H10-H3} = 6.5 Hz, **H-10**), 1.37-1.47 (m, 2 H, **H-2**), 1.54-1.61 (m, 2 H, **H-4**), 1.67-1.74 (m, 1 H, **H-3**), 1.86 (s, 3 H, **H-9**), 2.69-2.73 (t, 2 H, ³J_{H5-H4} = 6.7 Hz, **H-5**), 3.65-3.76 (m, 2 H, **H-1**), 5.76 (s, 1 H, **H-8**), 5.95 (s, 1 H, **H-8**)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 17.8 (**C-9**), 19.7 (**C-10**), 29.3 (**C-3**), 31.3 (**C-5**), 35.1 (**C-4**), 39.7 (**C-2**), 61.0 (**C-1**), 124.6 (**C-8**), 144.7 (**C-7**), 202.6 (**C-6**)

3,7-Dimethyl-1-hydroxy-7-octen-6- *p*-toluenesulfonyl hydrazine (**26**)



In pure ethanol (19.0 mL), 3,7-dimethyl-1-hydroxy-7-octen-6-one (**26**) (700 mg, 4.11 mmol, 1.0 eq) and *p*-toluenesulfonyl hydrazide (700 mg, 3.75, 0.9 eq) were stirred at room temperature for 48 hours under an argon atmosphere. After two days, the reaction mixture was extracted with diethyl ether (3 × 30 mL), then washed with brine (2 × 30 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give 3,7-dimethyl-1-hydroxy-7-octen-6-*p*-toluenesulfonyl hydrazine (**26**) as colourless oil (1.28 g, 3.8 mmol, 92 % yield) without any further purification.

Formula: C₁₇H₂₆N₂O₃S.

Molar mass: 338.47

TLC: R_f = 0.81 (pentane/EtOAc 5:5); Rev: PMA/Ce

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.93 (d, 3 H, ³J_{H₁₀-H₃} = 6.6 Hz, **H-10**), 1.28-1.45 (m, 2 H, **H-4**), 1.53-1.71 (m, 2 H, **H-5**), 1.85 (s, 3 H, **H-9**), 2.04 (s, 3 H, **H-15**), 2.27-2.37 (m, 3 H, **H-2** and **H-3**) 3.8 (m, 2 H, **H-1**), 5.24 (s, 1 H, **H-8**), 5.26 (s, 1 H, **H-8**), 7.27 (d, 2 H, ³J_{H₃'-H₂'} = 8.0 Hz, **H-3'**), 7.81 (d, 2 H, ³J_{H₂'-H₃'} = 8.4 Hz, **H-2'**), 9.21 (s, 1 H, -NH)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 19.5 (**C-9**), 20.4 (**C-10**), 21.2 (**C-5'**), 21.7 (**C-3**), 22.4 (**C-5**), 31.7 (**C-4**), 35.8 (**C-2**), 61.3 (**C-1**), 116.7 (**C-8**), 128.0 (**C-2'**), 129.5 (**C-3'**), 135.8 (**C-4'**), 142.2 (**C-7**), 143.7 (**C-1'**), 156.6 (**C-6**)

Références bibliographiques

Chapitre 1

1. Lemarquand, J.; Triolet, J. Les peroxydes et leur utilisation. *Cahiers de notes documentaires - Hygiène et sécurité du travail* **2002**, 186, 5-14.
2. Casteel, D. A. Peroxy natural products. *Nat. Prod. Rep.* **1999**, 16, 55-73.
3. Turnipseed, S. B.; Allentoff, A. J.; Thompson, J. A. Analysis of triméthylsilylperoxy derivatives of thermally labile hydroperoxides by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **1993**, 213, 218-225.
4. Berkessel, A.; Vogl, N. Synthetic uses of peroxides. Dans : *The chemistry of peroxides* (Rappoport, Z., Ed.) Wiley & Sons Ltd, Chichester, Royaume-Uni **2006**, 307-596.
5. Harris, E. J.; Egerton, A. C. Decomposition of organic peroxides. *Nature* **1938**, 142, 830.
6. Luo, Y-R. BDEs of O-X bonds. Dans : *Comprehensive handbook of chemical bond energies*. Taylor & Francis group, LLC, Boca Raton, États-Unis, **2007**, 255-368.
7. Porter, N. A.; Zuraw, P. J. Stereochemistry of hydroperoxide cyclization reactions. *J. Org. Chem.* **1984**, 49, 1345-1348.
8. Porter, N. A. Alkyl hydroperoxides. Dans : *Organic Peroxides* (Ando, W., Ed.) Wiley & Sons Ltd, Chichester **1992**, 101-156.
9. Sköld, M.; Börje, A.; Harambasic, E.; Karlberg, A.-T. Contact allergens formed on air exposure of linalool. Identification and quantification of primary and secondary oxidation products and the effect on skin sensitization. *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, 17, 1697-1705.
10. Aubry, J.-M.; Bouttemy, S. Preparative oxidation of organic compounds in microemulsions with singlet oxygen generated chemically by the sodium molybdate/hydrogen peroxide system. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 5286-5294.
11. Foote, C. S.; Clennan, E. L. Properties and reactions of singlet dioxygen. Dans : *Active oxygen in chemistry*. Foote, C.; Selverstone Valentine, J.; Greenberg, A.; Liebman, J. F. Eds., Chapman & Hall.; New York, États-Unis, **1995**, 105-140.
12. You, Y. Chemical tools for the generation and detection of singlet oxygen. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, 16, 4044-4060.
13. Foote, C. S.; Wexler, S. Olefin oxidations with excited singlet molecular oxygen. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 3879-3880.
14. McDermott, W.E.; Pchelkin, N.R.; Benard, D.J.; Bousek, R. R. An electronic transition chemical laser. *Appl. Phys. Lett.* **1978**, 32, 469-470.
15. Aubry, J.-M.; Cazin, B.; Duprat, F. Chemical sources of singlet oxygen. Peroxidation of water-soluble singlet oxygen carriers with hydrogen peroxide-molybdate system. *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 726-728.
16. Saito, I.; Matsuura, T.; Inoue, K. Formation of superoxide ion via one-electron transfer from electron donors to singlet oxygen. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 3200-3206.

17. Prein, M.; Adam, W. The Schenck ene reaction: diastereoselective oxyfunctionalization with singlet oxygen in synthetic applications. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 471-494.
18. Adam, W.; Prein, M. π -Facial diastereoselectivity in the [4+2] cycloaddition of singlet oxygen as a mechanistic probe. *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 275-283.
19. Bobrowski, M.; Liwo, A.; Ołdziej, S.; Jeziorek, D.; Ossowski, T. CAS MCSCF/CAS MCQDPT2 Study of the mechanism of singlet oxygen addition to 1,3-butadiene and benzene. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8112-8119.
20. Alberti, M. N.; Orfanopoulos, M. Stereoelectronic and solvent effects on the allylic oxyfunctionalization of alkenes with singlet oxygen. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 10660-10675.
21. Singleton, D. A.; Hang, C.; Szymanski, M. J.; Meyer, M. P.; Leach, A. G.; Kuwata, K. T.; Chen, J. S.; Greer, A.; Foote, C. S.; Houk, K. N. Mechanism of ene reactions of singlet oxygen. A two-step no-intermediate mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1319-1328.
22. Stratakis, M.; Orfanopoulos, M. Regioselectivity in the ene reaction of singlet oxygen with alkenes. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 1595-1615.
23. Porter, N.A.; Zuraw, P.J. Stereochemistry of hydroperoxide cyclization reactions. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 1345-1348.
24. Frimer, A.A. A convenient synthesis of allylic hydroperoxides. *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 3194-3196.
25. Kao, D.; Chaintreau, A.; Lepoittevin, J.-P.; Giménez-Arnau, E. Synthesis of allylic hydroperoxides and EPR spin-trapping studies on the formation of radicals in iron systems as potential initiators of the sensitizing pathway. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 6188-6200.
26. Christoffers, W. A.; Blömeke, B.; Coenraads, P.-J.; Schuttelar, M.-L. The optimal patch test concentration for ascaridole as a sensitizing component of tea tree oil. *Contact Dermatitis* **2014**, *71*, 129-137.
27. Schenck, O. G.; Ziegler, K. Die synthese des ascaridols. *Naturwissenschaften* **1944**, *14*, 157.
28. Aubry, J.-M. Search for singlet oxygen in the decomposition of hydrogen peroxide by mineral compounds in aqueous solutions. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 5844-5849.
29. Aubry, J.-M.; Adam, W.; Alsters, P. L.; Borde, C.; Queste, S.; Marko, J.; Nardello, V. Dark singlet oxygenation of organic substrates in single-phase and multiphase microemulsion systems. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 10753-10761.
30. Nardello, V.; Marko, J.; Vermeersch, G.; Aubry, J.-M. ^{95}Mo NMR and kinetic studies of peroxomolybdic intermediates involved in the catalytic disproportionation of hydrogen peroxide by molybdate ions. *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 4950-4957.
31. Nardello, V.; Bouttemy, S.; Aubry, J.-M. Olefin oxidation by the system $\text{H}_2\text{O}_2/\text{MoO}_4^{2-}$: competition between epoxidation and peroxidation. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **1997**, *117*, 439-447.

32. Johansson, S.; Giménez-Arnau, E.; Grøtli, M.; Karlberg, A.-T.; Börje, A. Carbon- and oxygen-centered radicals are equally important haptens of allylic hydroperoxides in allergic contact dermatitis. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 1536-1547.
33. Bao, X.-W.; Yan, S.-S.; Chen, F.; Zhang, J. L. Preparation of TiO₂ photocatalyst by hydrothermal method from aqueous peroxotitanium acid gel. *Mater. Lett.* **2005**, *59*, 412-415.
34. Wilkinson, S. M.; Price, J.; Kassiou, M. Improved accessibility to the desoxy analogues of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *Tetrahedron Letters* **2013**, *54*, 52-54.
35. Qi, L.; Yamamoto, N.; Meijler, M. M.; Altobelli, J. L.; Koob, G. F.; Wirsching, P.; Janda, K. D. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol immunochemical studies: haptens, monoclonal antibodies, and a convenient synthesis of radiolabeled Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 7389-7399.
36. Rickards, R. W.; Watson, W. P. Conversion of (+)-(*R*)-limonene into (+)-(1*S*,4*R*)-*p*-mentha-2,8-dien-1-ol, an intermediate in the synthesis of tetrahydrocannabinoids. *Aust. J. Chem.* **1980**, *33*, 451-454.
37. Steiner, D.; Iverson, L.; Goralski, C. T.; Appell, R. B.; Gojkovic, J. R.; Singaram, B. A facile and efficient method for the kinetic separation of commercially available *cis*- and *trans*-limonene epoxide. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 2359-2363.
38. Steiner, D.; Sethofer, G. S.; Goralski, C. T.; Singaram, B. Asymmetric addition of diethylzinc to aldehydes catalyzed by β -amino alcohols derived from limonene oxide. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 1477-1483.
39. Chen, J.; Pettit, S.; Fliri, H. Abnormal cannabidiols as agent for lowering intraocular pressure. US patent 7612101 B2, **2009**, 12 pages.
40. Calandra, M.J.; Impellizzeri, J.; Wang, Y. An HPLC method for hydroperoxides derived from limonene and linalool in citrus oils, using post-column luminol-mediated chemiluminescence detection. *Flavour Fragr. J.* **2015**, *30*, 121-130.
41. Uchiyama, N.; Matsunaga, K.; Fumiyuki Kiuchi, F.; Honda, G.; Tsubouchi, A.; Nakajima-Shimada, J.; Aoki, T. Trypanocidal terpenoids from *Laurus nobilis* L. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 1514-1516.
42. Rudbäck, J.; Hagvall, L.; Börje, A.; Nilsson, U.; Karlberg, A.-T. Characterization of skin sensitizers from autoxidized citronellol-impact of the terpene structure on the autoxidation process. *Contact Dermatitis* **2014**, *70*, 329-339.
43. Mori, K.; Wu, J. Synthesis of the four stereoisomers of 6,10,13-triméthyl-1-tetradecanol, the aggregation pheromone of predatory stink bug, *Stiretrus anchorago*. *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, *8*, 783-788.
44. Sharpless, K. B.; Lauer, R. F. Mild procedure for the conversion of epoxides to allylic alcohols. First organoselenium reagent. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 2697-2699.
45. Lepoittevin, J.-P.; Karlberg, A.-T. Interactions of allergenic hydroperoxides with proteins: a radical mechanism? *Chem. Res. Toxicol.* **1994**, *7*, 130-133.

-
46. Justicia, J.; Jiménez, T.; Morcillo, S. P.; Cuerva, J. M.; Oltra, J. E. Mixed disproportionation versus radical trapping in titanocene(III)-promoted epoxide openings. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 10837-10841.
47. Bézard, M. Étude des interactions entre un hydroperoxyde allylique allergisant dérivé de terpènes et un peptide modèle : mise en évidence d'un mécanisme radicalaire. Doctorat de l'Université de Strasbourg, **1999**.
48. Zhao, Y. M.; Maimone, T. J. Short, enantioselective total synthesis of chatancin. *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 1239-1242.
49. Willis, B. J.; Ramsey, N.J.; Eilerman, R. G.; Merrick, N. Y.; Christenson, P. A.; Midland, P.; John, M.; Yurecko, Jr. Functionalization of terminal trisubstituted alkenes and derivatives thereof. US patent 4510319 **1985**, 12 pages.
50. Caglioti, L.; Gasparrini, F.; Palmieri, G.; Misiti, D. Oxidation of *N*-alkyl-*N'*-tolylsulfonylhydrazines. A new convenient synthesis of hydroperoxides. *Tetrahedron Letters*, **1976**, *44*, 3987-3988.
51. Bloodworth, A. J.; Despoina, K. Mercury(II)-mediated cyclization of hydroperoxyalkylcyclopropanes: a new route to cyclic peroxides. *Tetrahedron Letters*, **1991**, *32*, 6953-6956.
52. Tang, M.; Fan, C.-A.; Zhang, F.-M.; Tu, Y.-Q.; Zhang, W.-X.; Wang, A.-X. New metal-free one-pot synthesis of substituted allenes from enones. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 5585-5588.
53. Bloodworth, A. J.; Courtneidge, J. L.; Curtis, R. J.; Spencer, M. D. Preparation of unsaturated hydroperoxides from *N*-alkenyl-*N'*-*p*-tosylhydrazines. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1990**, *0*, 2951-2955.

Chapitre 2

Réactivité vis-à-vis d'acides aminés et d'un environnement peptidique

Introduction

Les composés au cœur de ce travail sont susceptibles de former des antigènes *via* des mécanismes de type radicalaire, en commençant par le clivage de la liaison O-O de faible énergie de dissociation ($175 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Ce clivage est un processus simple donnant naissance à des radicaux alkoxy (RO^\bullet) et peroxy (ROO^\bullet) instables. Au vu de leur instabilité et grâce à la présence de doubles liaisons, ils vont subir des réarrangements radicalaires divers tels que la cyclisation intramoléculaire, l'abstraction d'hydrogène allylique ou encore une β -scission et ainsi former des radicaux carbonés R^\bullet plus stables et de durée de vie plus longue.

Au sein du laboratoire de Dermatochimie, des études pionnières de réactivité vis-à-vis de la cystéine ont été menées dans le but de comprendre les mécanismes de sensibilisation de l'acide 15-hydroperoxyabiétique (*Figure 1*).¹

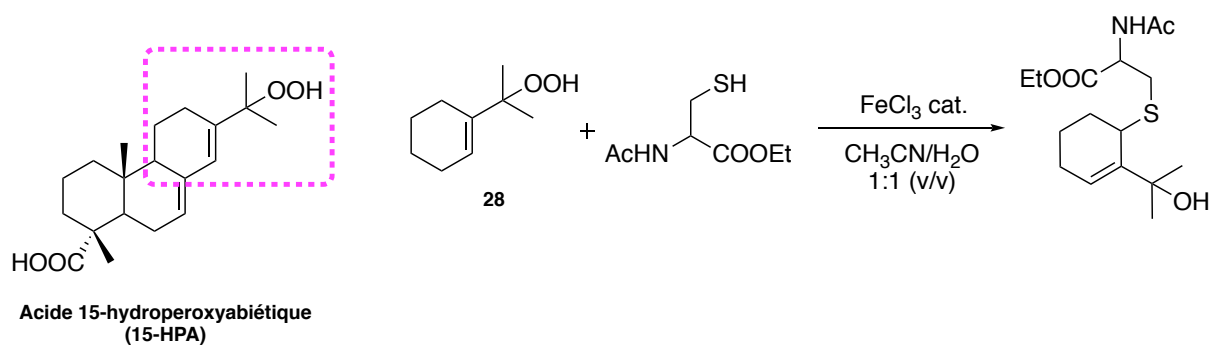


Figure 1 : Réactivité de la *N*-acétylcystéine éthyl ester vis-à-vis de **28** catalysée par du chlorure ferrique. L'élucidation structurale du produit indiqué a été réalisée par NOESY.

En présence d'une quantité catalytique de fer, un piégeage des intermédiaires radicalaires issus de l'hydroperoxyde allylique **28** avait été réalisé avec succès en utilisant un dérivé de la cystéine en excès (2,0 éq) comme agent de piégeage. La cystéine est connue pour réduire le fer (III) en fer (II) et les hydroperoxydes sont réputés pour oxyder le fer (II) en fer (III). Lors de la réduction de fer (III) en fer (II), des radicaux thiyles sont générés à partir de la *N*-acétylcystéine éthyl ester. Le fer (II) produit peut alors induire la génération des radicaux RO^\bullet à partir de l'hydroperoxyde par une réaction de type Fenton (*Figure 2*).¹ Les radicaux RO^\bullet ainsi formés pourraient alors facilement capter un hydrogène issu du thiol de la cystéine pour former un radical thiyle. Ainsi, le mécanisme concerté impliquerait que le radical thiyle de la cystéine puisse extraire un hydrogène allylique et qu'un deuxième radical thiyle formerait un adduit sur une position carbonée. Le mélange réactionnel avait été purifié par chromatographie sur gel de silice, puis la structure de l'adduit avait été déterminée par RMN du ^1H et du ^{13}C unidimensionnelle et bidimensionnelle (^{13}C -DEPT, ^{13}C -COSY, NOESY, HSQC et HMBC).

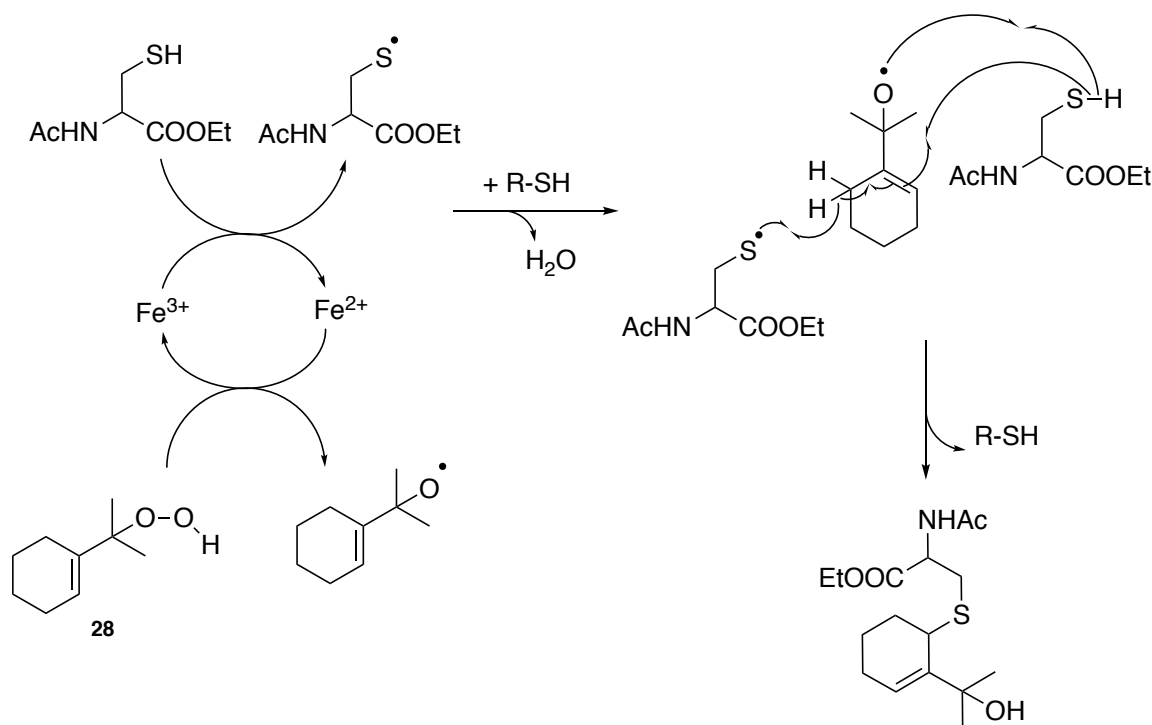


Figure 2 : Mécanisme concerté proposé pour la formation de l'adduit entre l'hydroperoxyde allylique **28** et la *N*-acétyl-cystéine éthyl ester.¹

La *N*-acétyl-cystéine éthyl ester avait été choisie afin de mimer la cystéine lorsqu'elle est située dans un environnement peptidique, mais également dans le but d'éviter la formation d'une base de Schiff entre le groupe amine libre et des composés carbonylés potentiels qui pourraient se produire lors de la décomposition de l'hydroperoxyde. Une quantité catalytique de chlorure de fer (III) avait été utilisée pour induire la formation de radicaux. Il a été rapporté en effet que certains réducteurs, tels que la cystéine, induisent une augmentation du taux de décomposition d'hydroperoxydes en présence de fer (III) *via* la réduction de fer (III) en fer (II).² La réaction d'oxydoréduction entre le réducteur et l'hydroperoxyde peut donc être catalysée par les ions fer (II) / fer (III). Les réactions avaient été effectuées dans une atmosphère d'argon afin de minimiser la compétition avec l'oxygène et d'assurer ainsi l'obtention de rendements plus élevés en produits d'addition.

Quelques années plus tard, des études de réactivité ont été réalisées avec un hydroperoxyde dérivé du linalol, le linalol-7-hydroperoxyde, vis-à-vis des acides aminés.³ Le suivi des réactions par RMN et par chromatographie en phase liquide combinée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS), avait prouvé que des adduits covalents peuvent être formés impliquant des processus radicalaires entre certains acides aminés (cystéine, tryptophane, histidine) et des radicaux carbonés dérivés de l'hydroperoxyde (Figure 3).³

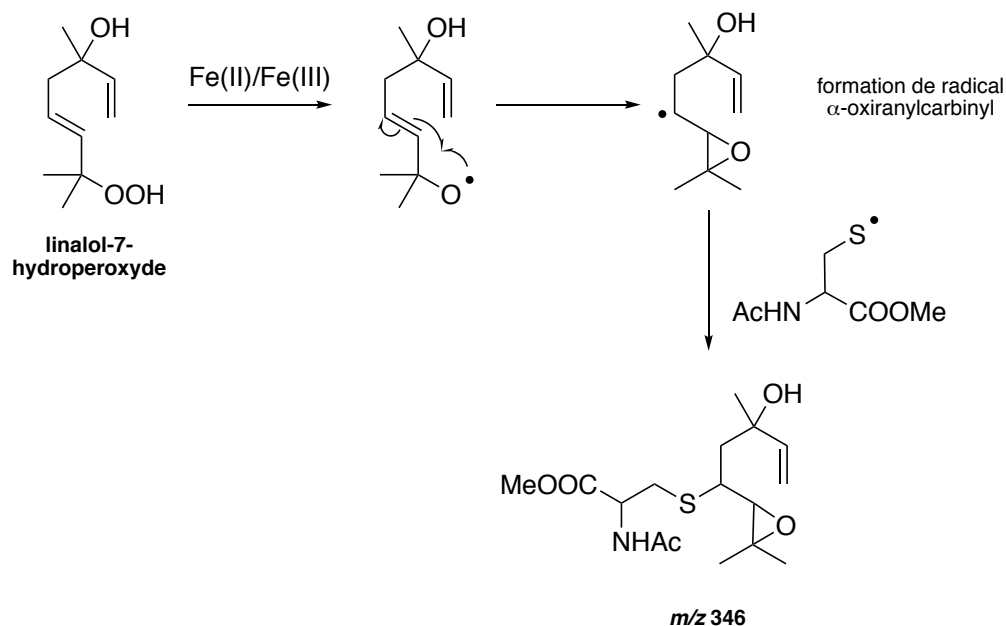


Figure 3 : Exemple de mécanisme proposé pour la formation d'un adduit entre le linalol-7-hydroperoxyde et la *N*-acétyl-cystéine méthyl ester.³

L'ensemble de ces études prouvent que plusieurs intermédiaires radicalaires réactifs peuvent être issus de ces composés en fonction de leur structure chimique. Ainsi, différentes modifications chimiques de protéines potentiellement immunogènes pourraient conduire à une sensibilisation.

Des expériences similaires avaient déjà été menées avec des acides gras contenant un groupe hydroperoxyde et avaient été suggérées comme modèles possibles d'interactions entre les hydroperoxydes allyliques et les protéines.⁴

Dans le cadre de ce travail de thèse, la réactivité des composés cibles synthétisés vis-à-vis des acides aminés, puis au sein d'un environnement peptidique, a été étudiée afin d'établir un profil de réactivité radicalaire. Au départ, les produits obtenus ont été caractérisés à l'aide de la RMN à l'issue de purification du mélange réactionnel par chromatographie sur gel de silice. Cependant, lorsque cette purification s'est avérée être difficile, les mélanges réactionnels bruts ont été analysés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem à l'aide d'une source électrospray (LC-ESI-MS/MS).

Dans un premier temps, les conditions expérimentales retenues pour mener à bien ces études seront détaillées avant de présenter et de discuter des résultats obtenus.

1. Les acides aminés et l'albumine sérique humaine

1.1. Choix des acides aminés et de la protéine modèle

1.1.1. Choix des acides aminés

Nous nous sommes focalisés sur les acides aminés connus pour être impliqués dans les réactions radicalaires. Ainsi, cinq d'entre eux ont été sélectionnés pour la poursuite des études.

La **cystéine** est l'un des acides aminés les plus labiles impliqué dans les réactions radicalaires induites par les peroxydes. Gardner et *al.* avaient proposé un mécanisme radicalaire pour la réaction, catalysée par le chlorure de fer (III), de l'hydroperoxyde d'acide linoléique avec la *N*-acétyl-cystéine. Plus précisément, plusieurs produits dérivait de cette réaction dont certains résultaient de la formation d'une liaison entre le radical thiyle dérivé de la chaîne latérale de la cystéine et un radical carboné dérivé de l'hydroperoxyde (*Figure 4 et Figure 5*).⁵

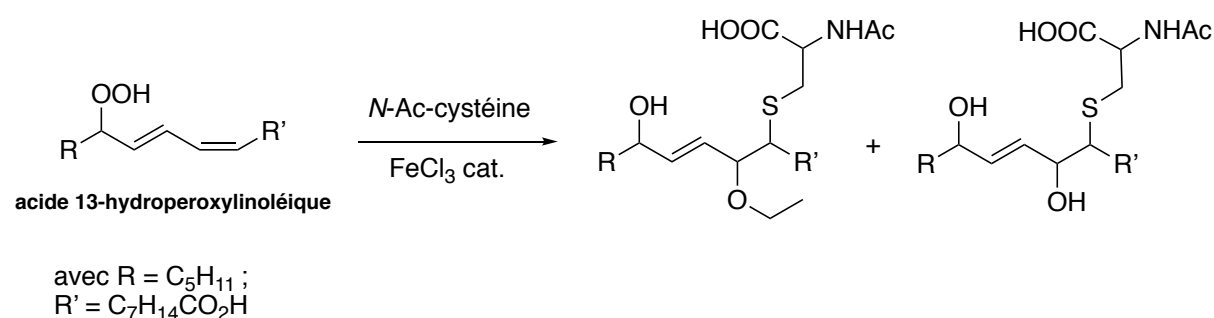


Figure 4 : Adduits formés entre l'acide 13-hydroperoxylinoléique et la *N*-acétyl-cystéine en présence de chlorure de fer (III) en quantité catalytique.

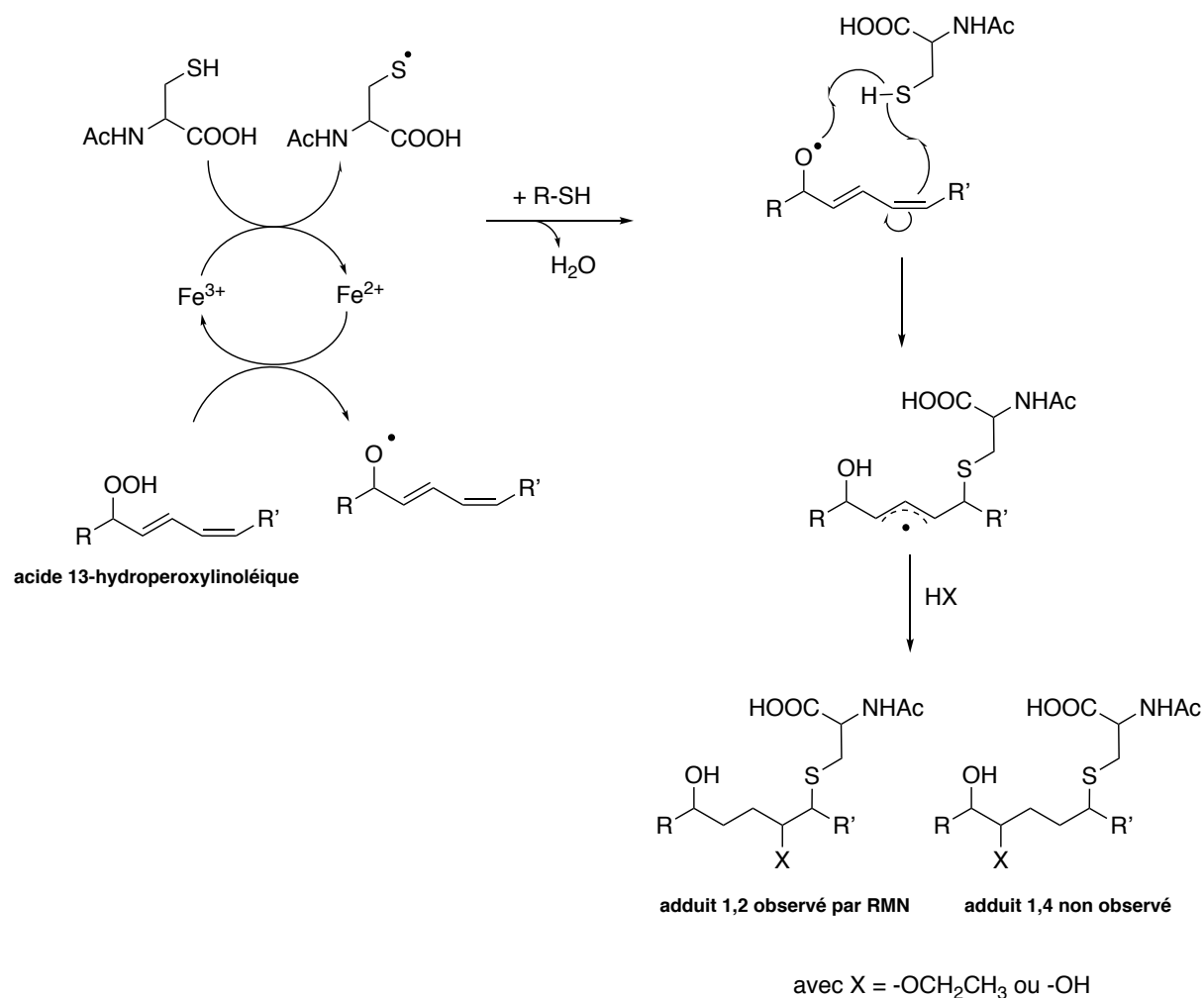


Figure 5 : Mécanisme proposé pour la formation de l'adduit 1,2 identifié à l'issue de la réaction entre la N-acétyl-cystéine et l'acide 13-hydroperoxylinoléique.

Il est aussi bien connu que la réaction des acides gras portant un groupe hydroperoxyde dans leur structure avec la cystéine en présence de chlorure de fer (III) et d'oxygène entraîne la formation de nombreux acides gras oxygénés, ainsi que de la cystéine et des oxydes de cystéine.^{1,2}

Les acides aminés contenant un noyau aromatique dans la chaîne latérale sont également sujets à des réactions radicalaires. La modification chimique de la **tyrosine** par des oxydants biologiquement pertinents repose généralement sur la formation de radicaux tyrosyles situés au niveau du cycle aromatique et centrés sur le carbone. Des études de transfert d'électrons dans l'oxydation de la tyrosine par les peroxy-nitrites ONOO⁻ menées par résonance paramagnétique électronique (RPE) ont permis la caractérisation d'un adduit formé entre un radical carboné centré sur le cycle aromatique de la tyrosine et un piègeur de spin, le 5-diéthoxyphosphoryl-5-méthyl-1-pyrroline-N-oxyde (DEPMPO) (Figure 6).⁶ De plus, pour les protéines associées à des environnements hydrophobes, il a été rapporté que les radicaux

peroxydes issus de lipides peuvent jouer un rôle médiateur dans les processus d'oxydation de la tyrosine.⁷

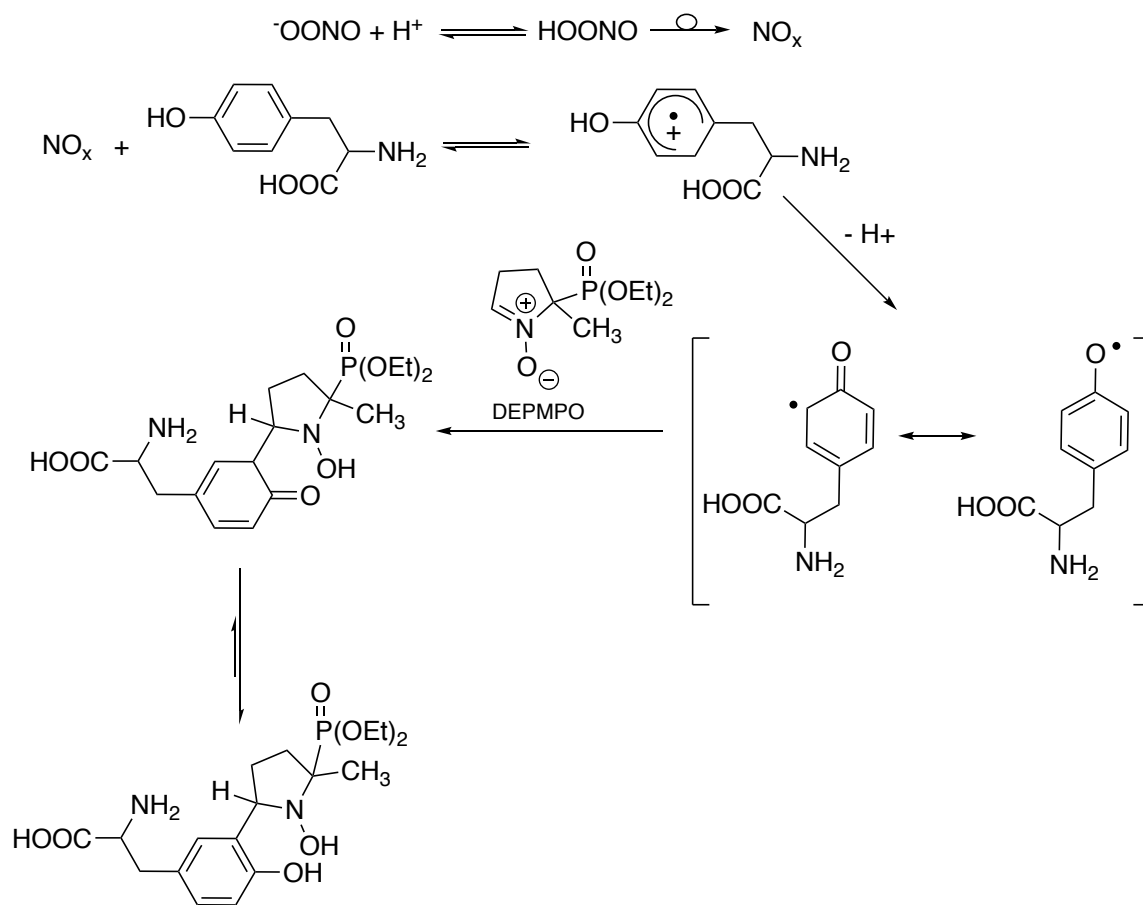


Figure 6 : Piégeage radicalaire d'un radical tyrosyle carboné par le 5-diéthoxyphosphoryl-5-méthyl-1-pyrroline-N-oxyde (DEPMPPO).⁶

Ainsi, la **tyrosine**, mais également le **tryptophane** et l'**histidine**, qui sont des acides aminés présentant une chaîne latérale aromatique, ont été employés dans le cadre de ces études de réactivité. Le **tryptophane**, joue un rôle déterminant dans les processus biologiques de transfert d'électrons, notamment dans les réactions enzymatiques. L'oxydation aboutit à la formation de radicaux indolyles pouvant subir d'autres réactions, notamment avec O_2 donnant des radicaux peroxydes. Il est, entre autres, capable de dimériser, de capter un hydrogène à partir de composés avec des liaisons hydrogènes faibles ou encore subir des réactions de β -scission produisant ainsi une fragmentation des chaînes latérales ou des chaînes principales des protéines.⁸

Le cycle imidazole de l'**histidine**, qui joue le rôle de ligand de coordination des métalloprotéines, possède deux doubles liaisons non saturées capables de réagir avec les

radicaux libres impliqués dans les processus métaboliques de transfert d'électrons et lors de stress oxydatif. L'oxydation de l'histidine en solution aqueuse par addition de radical $\cdot\text{OH}$ sur la position C-5 du noyau imidazole a été rapportée par RPE dans un système de type Fenton sur une large plage de pH, attestant ainsi de son potentiel antioxydant.⁹ La présence de radicaux $\cdot\text{OH}$ et d'autres espèces réactives de l'oxygène a été également signalée dans la réaction de complexes de nickel (II)-histidine avec des hydroperoxydes.¹⁰

Enfin, il a été rapporté dans la littérature la formation d'un adduit de type amide entre l'acide 13-hydroperoxyoctadécadiénoïque et la *N*-benzoyl-glycyl-lysine, utilisée comme modèle pour les résidus **lysine** dans les protéines (*Figure 7*).¹¹

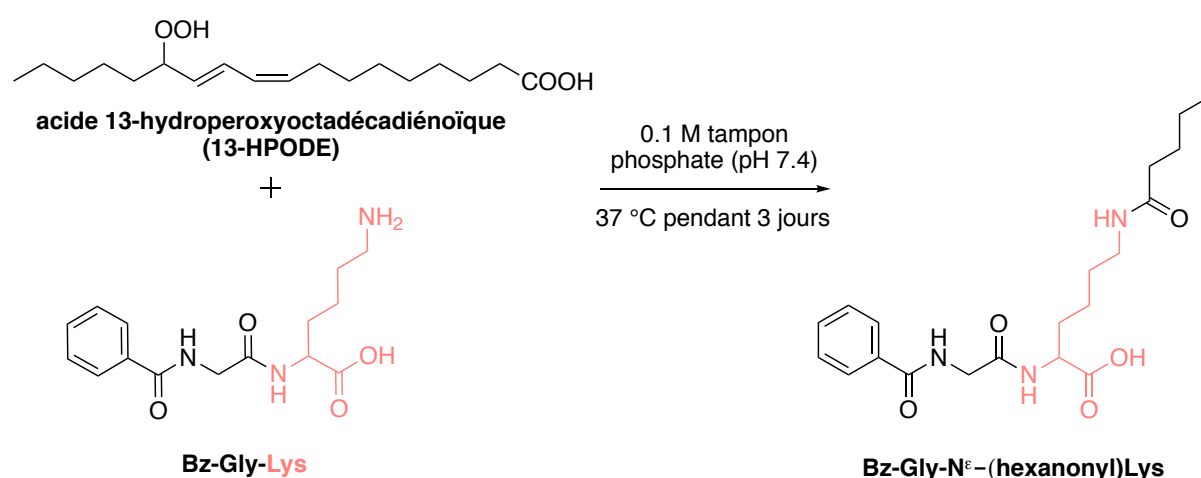


Figure 7 : Adduit caractérisé à l'issue de la réaction entre l'acide 13-hydroperoxyoctadécadiénoïque et la *N*-benzoyl-glycyl-lysine.

Bien que la littérature concernant les modifications chimiques de la lysine par voie radicalaire soit restreinte, il nous a semblé important d'étudier la réactivité de nos composés vis-à-vis de cet acide aminé.

Les informations obtenues lors des études de réactivité vis-à-vis d'acides aminés seront utilisées pour comprendre la réactivité lorsque les hydroperoxydes sont mis en présence d'un environnement peptidique.

Il est possible que certains acides aminés réagissent préférentiellement, pour des raisons de réactivité ou d'empêchement stérique, avec une position radicalaire particulière parmi les différents sites réactifs présents. Cela signifie que différents complexes antigéniques pourraient être formés à partir du même composé.

1.1.2. Choix de la protéine modèle

La nature des protéines de la peau impliquées dans la formation de complexes immunogènes est au jour d'aujourd'hui inconnue. Néanmoins, il est admis que la sensibilisation dépend de manière critique de l'association des haptènes à des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité liées aux cellules dendritiques.

Dans ce travail, l'albumine sérique humaine (HSA) a été utilisée comme protéine modèle. La HSA est caractérisée. Il s'agit d'une macromolécule synthétisée dans le foie, elle contient 585 acides aminés pour un poids moléculaire de 66438 Da. Parmi ces acides aminés, on retrouve 59 lysines, 18 tyrosines, 16 histidines, 35 résidus cystéines qui forment 17 ponts disulfures et une cystéine est libre en position 34. Ces ponts disulfures assurent en grande partie la stabilité de cette macromolécule. Le rôle principal de la HSA est d'assurer la physiologie et la détoxification du corps. Elle est la principale protéine de liaison aux substances endogènes (acides gras, métaux...) ou exogènes, comme les médicaments.^{12,13} La HSA est la protéine la plus abondante dans le plasma humain et est distribuée dans les différents organes extravasculaires dont une fraction de 41 % est présente dans la peau.¹⁴ Ainsi, elle fait l'objet de nombreuses études portant sur les interactions haptènes-protéines par des mécanismes à deux électrons.¹⁵ En outre, plusieurs études ont montré des réponses spécifiques de lymphocytes T après stimulation avec la HSA hapténisée *via* la présence d'adduits de dinitrophényle après modification avec l'acide 2,4-dinitrobenzènesulfonique, ou encore par la modification de la cystéine en position 34 par la *para*-phénylènediamine.^{16,17} Par ailleurs, d'autres études ont suggéré que la HSA pourrait jouer un rôle de protéine porteuse intervenant dans l'activation des cellules T dans l'allergie de contact lors de la liaison du Ni (II) vers les conjugués TCR / CMH.¹⁸

L'objectif principal dans notre étude a été d'identifier les peptides spécifiques dérivés de la HSA contenant des modifications chimiques induites par les composés étudiés en s'appuyant sur des analyses de spectrométrie de masse.

1.2. Conditions expérimentales

1.2.1. Généralités

Lors de ces études de réactivité, les extrémités *N*-terminales des acides aminés étaient sous forme acétylée et les groupes carboxyliques étaient sous forme d'ester dans le but d'éviter toute réaction secondaire et afin de simuler leur fonction dans une séquence peptidique et en laissant la chaîne latérale des acides aminés libre et potentiellement réactive. De plus, la protection du groupe amine permet d'éviter la formation de bases de Schiff avec des

groupements carbonyles pouvant se produire par la décomposition des hydroperoxydes ou endoperoxydes.

Des quantités catalytiques de sulfate de fer (II) ont été employées dans le but d'initier la réaction radicalaire. Toutes les réactions ont été protégées de la lumière.

Enfin, les réactions ont été réalisées sous argon afin de minimiser les réactions avec l'oxygène de l'air et ainsi obtenir de meilleurs rendements pour la formation d'adduits.

1.2.2. Mode opératoire avec les acides aminés

Pour établir les profils de réactivité chimique, les composés (1,0 équivalent) ont été incubés avec un excès d'acide aminé (2,0 équivalents) dans un mélange 1:1 (v/v) acétonitrile/eau déionisée préalablement dégazé. Les réactions ont eu lieu sous argon et à température ambiante. Une quantité catalytique de sulfate de fer (II) (0,1 équivalents) a été additionnée pour initier le processus radicalaire. Un suivi des réactions a été réalisé par CCM jusqu'à disparition totale des produits de départ. Dans le cas contraire, la réaction a été arrêtée au bout de 7 jours. L'analyse des produits de réaction et les études mécanistiques qualitatives se sont basées au départ sur la RMN du ^1H et du ^{13}C . Cependant, lorsque la purification s'est avérée être très difficile, voire impossible, par chromatographie sur gel de silice, le mélange réactionnel a été filtré sur célite (élimination des sels de fer pouvant interférer avec l'analyse spectroscopique), le solvant évaporé sous pression réduite et le brut de la réaction analysé par spectroscopie de masse en tandem par ionisation par électrospray associée à la chromatographie en phase liquide (LC-ESI-MS/MS).

1.2.3. Mode opératoire avec la HSA

La HSA (1 équivalent) dans un tampon phosphate (pH 7,4 ; 10 mM) a été incubée avec le composé à tester (100 équivalents) à 37 °C, pendant plusieurs périodes, deux jours, une semaine puis deux semaines. Les échantillons de HSA incubés et les contrôles ont été dialysés dans de l'eau, puis lyophilisés. Suite à des difficultés de solubilité des échantillons lors des analyses en spectrométrie de masse, les réactions ont été conduites dans un mélange eau déionisée/acétonitrile 9:1 (v/v) pendant une semaine uniquement. Les échantillons ont alors été dialysés dans de l'eau, puis lyophilisés. A l'issue de cette étape des analyses de Matrix-assisted laser desorption ionization-Time of flight (Maldi-Tof) ont été effectuées. Il s'agit

d'un spectromètre de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (Maldi) et un analyseur à temps de vol (Tof) permettant l'analyse de macromolécules.

Dans le but d'avoir une idée plus précise quant à l'acide aminé liant la molécule d'étude une digestion trypsique est réalisée. Avant d'effectuer la digestion trypsique à l'aide de la trypsine bovine (TPCK), un traitement préalable des échantillons est nécessaire. Tout d'abord, en présence de dithiothréitol (DTT) dans le but de rompre les ponts disulfures puis avec de l'iodoacétamide (IAA), agent alkylant, permettant de se lier de façon covalente avec les groupements thiol de la cystéine et d'éviter une nouvelle fois la formation de ponts disulfures. Par la suite, les échantillons ont été soumis à une digestion enzymatique à la trypsine afin d'identifier les peptides spécifiques dérivés de la HSA contenant des modifications chimiques induites par les composés étudiés. Pour ce faire, les mélanges digérés ont été analysés par LC-ESI-MS/MS. La spectrométrie de masse en tandem ESI-MS/MS a été ensuite utilisée afin d'identifier la séquence d'acides aminés des peptides modifiés par les composés et pour déterminer quel acide aminé a réagi dans la séquence.

2. Résultats et discussion

Les études de réactivité vis-à-vis de la chaîne latérale d'acides aminés ont été conduites avec les composés préalablement synthétisés **Asc**, **Lim-2-OOH**, **(1S, 4R)-Lim-1-OOH** et **(±)-Citr-7-OOH**. En s'appuyant sur les travaux réalisés au sein du laboratoire, du sulfate de fer (II) a été utilisé pour initier les réactions radicalaires. Pour chaque expérience, un échantillon de contrôle sans initiateur radicalaire a été effectué.

Il est important de noter que dans les analyses LC-ESI-MS/MS, les valeurs de m/z associées à la formation potentielle d'un adduit entre l'acide aminé et la molécule cible ont été considérées comme étant des espèces moléculaires sous réserve qu'elles soient formées en quantités importante. Cependant, il est primordial de prendre en compte qu'il peut s'agir en réalité de fragments d'espèces moléculaires.

2.1. Réactivité de l'ascaridol (Asc)

Un exemple bien connu de réactivité d'un endoperoxyde vis-à-vis des acides aminés est celui de l'artémisinine avec la cystéine. Le mécanisme radicalaire induit par le système Fe(II)/Fe(III) proposé pour son action antipaludique implique la formation de radicaux centrés

sur le carbone.^{19,20} Nous nous sommes en conséquence inspirés de l'artémisimine pour les études de réactivité de l'**Asc**.

2.1.1. Réactivité vis-à-vis de la *N*-acétyl-cystéine méthyl ester (*N*-Ac-Cys-COOMe)

La réaction **Asc**/*N*-Ac-Cys-COOMe catalysée par le sulfate de fer (II) a nécessité 12 h pour observer la disparition complète de l'**Asc**. Un mélange complexe de produits possédant des polarités proches a été observé. Une séparation par chromatographie sur gel de silice a tout de même été tentée et a permis d'isoler trois fractions contenant chacune un produit majoritaire. Cependant, l'analyse par RMN 2D de chaque fraction s'est avérée être compliquée étant donné qu'il s'agissait de mélanges.

Les spectres obtenus par RMN 1D ont montré que l'**Asc** et la *N*-Ac-Cys-COOMe n'ont pas formé d'adduits. En effet, les spectres de RMN du ¹³C ne présentaient que des pics caractéristiques de produits pouvant provenir du réarrangement radicalaire de l'**Asc** lui-même (Figure 8).

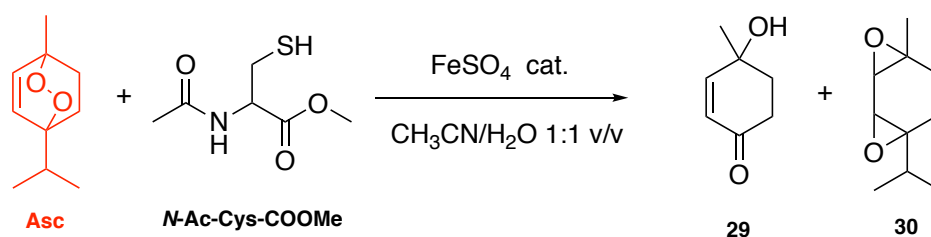


Figure 8 : Réaction **Asc**/*N*-Ac-Cys-COOMe catalysée par le sulfate de fer (II).

En accord avec les résultats obtenus en RMN du ¹³C et du ¹³C-DEPT, une des fractions contenait sept atomes de carbone, dont un quaternaire et un primaire. Cela permet de supposer qu'une partie du squelette de l'**Asc** a été éliminée, et plus précisément la partie isopropyle. Les spectres 2D provenant des expériences HSQC et HMBC ont permis de compléter ces résultats (Figure 9). En effet, un carbone quaternaire à 198,9 ppm est couplé longue distance avec deux protons à 2,40 ppm et à 2,60 ppm. Ces derniers sont, d'une part en corrélation directe avec un carbone secondaire à 34,9 ppm et, d'autre part, couplés longue distance avec un deuxième carbone secondaire à 37,4 ppm. Les déplacements chimiques (δ) ainsi que les corrélations de ces deux atomes de carbone secondaires sont similaires à ceux présents sur l'**Asc**. De plus, deux carbones tertiaires à 128,1 ppm et à 154,6 ppm sont corrélés directement à deux protons à 5,86 ppm et à 6,74 ppm respectivement. Ces δ sont caractéristiques des groupes vinyliques. Enfin, le carbone tertiaire à 154,6 ppm et le carbone quaternaire à 68,6 ppm sont couplés à longue distance au proton à 1,44 ppm du groupement

méthyle. Ces interprétations ont permis d'élucider la structure du composé présent dans cette fraction et de l'attribuer à la cétone α - β -insaturée **29** (Figure 9).

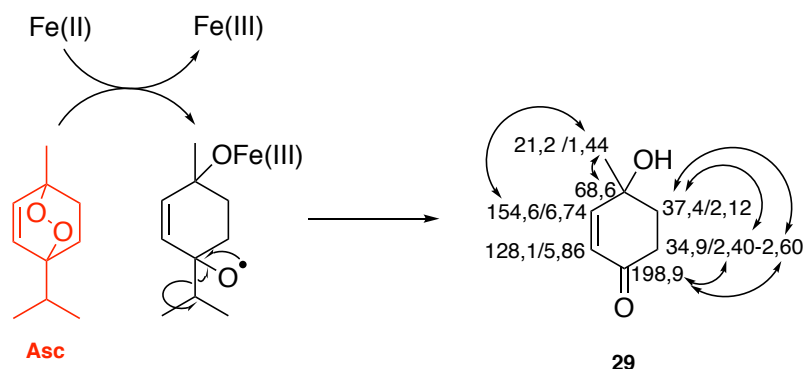


Figure 9 : Structure chimique de **29**, mécanisme de formation et corrélations obtenues en RMN 2D HSQC et HMBC.

D'un point de vue mécanistique, le radical allyloxyle obtenu facilement *via* une réaction de type Fenton peut subir une β -scission éliminant ainsi le groupement isopropyle pour former une cétone cyclique. Ensuite, le second oxygène capterait un proton d'une molécule présente dans le milieu réactionnel pour produire un groupement hydroxyle.

La comparaison entre le spectre de RMN du ^{13}C de l'**Asc** et celui de la deuxième fraction permet d'observer la disparition des deux carbones du groupe vinyle. Les spectres de RMN ^1H - ^{13}C HSQC et ^{13}C -DEPT ont montré l'existence de deux carbones tertiaires à 70,4 ppm et 73,5 ppm directement en corrélation avec les protons à 3,74 ppm et 3,54 ppm, respectivement (Figure 10). Ces δ assez déblindés sont caractéristiques de carbones portant un oxygène. De plus, l'expérience de HMBC a permis de mettre en évidence que les deux protons à 3,74 ppm et à 3,54 ppm sont couplés longue distance avec des carbones quaternaires à 84,9 ppm et à 91,5 ppm respectivement. L'ensemble de ces données peut permettre de faire l'hypothèse de l'existence de deux époxydes sur le squelette carboné du produit. Le proton à 1,28 ppm est corrélé directement à un carbone primaire à 20,2 ppm appartenant sûrement au groupement méthyle. Ce proton est couplé longue distance, d'une part au carbone quaternaire à 84,9 ppm et, d'autre part, au carbone tertiaire à 70,4 ppm. La comparaison entre le spectre de RMN du ^{13}C et celui de l'**Asc** permet de voir que le reste des carbones et des protons présentent environ les mêmes déplacements chimiques δ . L'ensemble des informations de RMN laisse à penser que l'isoascaridol **30** est présent dans la deuxième fraction (Figure 10).

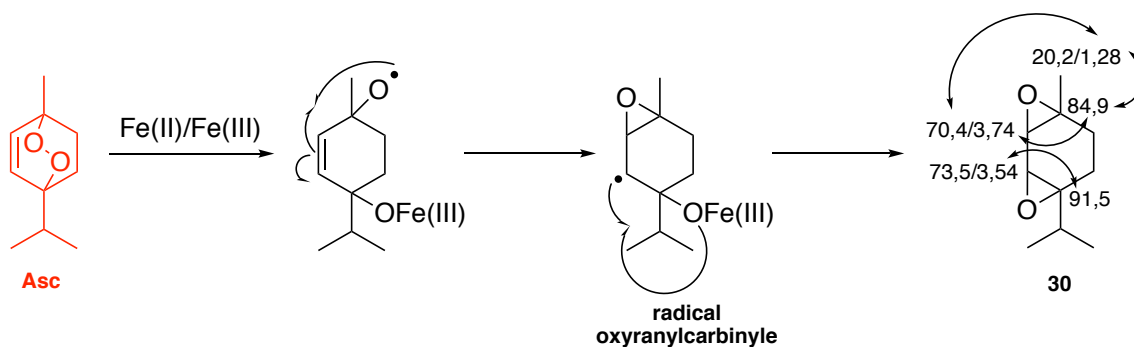


Figure 10 : Structure chimique de l'isoascaridol **30**, mécanisme simplifié de la formation et corrélations obtenues en RMN 2D HSQC et HMBC.

Un mécanisme possible expliquant l'obtention de **30** débute par la formation d'un radical allyloxyde qui pourrait se réarranger avec la liaison π formant, *via* une cyclisation, un radical oxyranilcarbinyne. Ce dernier pourrait réagir avec le deuxième oxygène pour former un second époxyde.

L'analyse de RMN 1D et 2D de la dernière fraction s'est révélée être plus compliquée que les deux autres. Malgré les efforts fournis, aucune structure chimique n'a pu être déterminée par RMN. Pour cette raison, une analyse LC-ESI-MS de l'échantillon brut a été réalisée.

L'étude par LC-ESI-MS du brut de la réaction **Asc**/*N*-Ac-Cys-COOMe, en présence d'une quantité catalytique de sulfate de fer (II), a montré un pic majeur de valeur m/z 353 correspondant respectivement au dimère disulfure de *N*-Ac-Cys-COOMe et deux autres pics avec m/z 304 et m/z 346 respectivement (Figure 11). Afin de tirer davantage de précisions sur les structures chimiques correspondant à ces valeurs de m/z , une analyse supplémentaire ESI-MS/MS a été réalisée (Figure 12). De cette façon, la fragmentation de m/z 304 présentait un ion fragment à m/z 178 en raison de la perte de *N*-Ac-Cys-COOMe. En outre, la valeur de m/z 304 indique une perte du groupe isopropyle de l'**Asc**. D'un point de vue mécanistique, l'activation de l'endopéroxyde avec le fer (II) facilite le clivage de la liaison O-O pour former des radicaux oxygénés. Ensuite, la formation de la cétone α - β -insaturée **29** est possible par fragmentation et perte d'un radical isopropyle stable. Le composé **29** peut, ensuite, subir une addition de Michael avec le groupe nucléophile thiol de la *N*-Ac-Cys-COOMe, comme décrit précédemment pour d'autres réactifs thiol.²¹ Le pic à m/z 346 pourrait correspondre aux adduits **32** et **33**. L'isoascaridol **30** est un sous-produit connu, obtenu après décomposition de l'**Asc**.²² L'ouverture des époxydes par les noyaux thiol nucléophiles devrait être à l'origine des composés **32/33**.

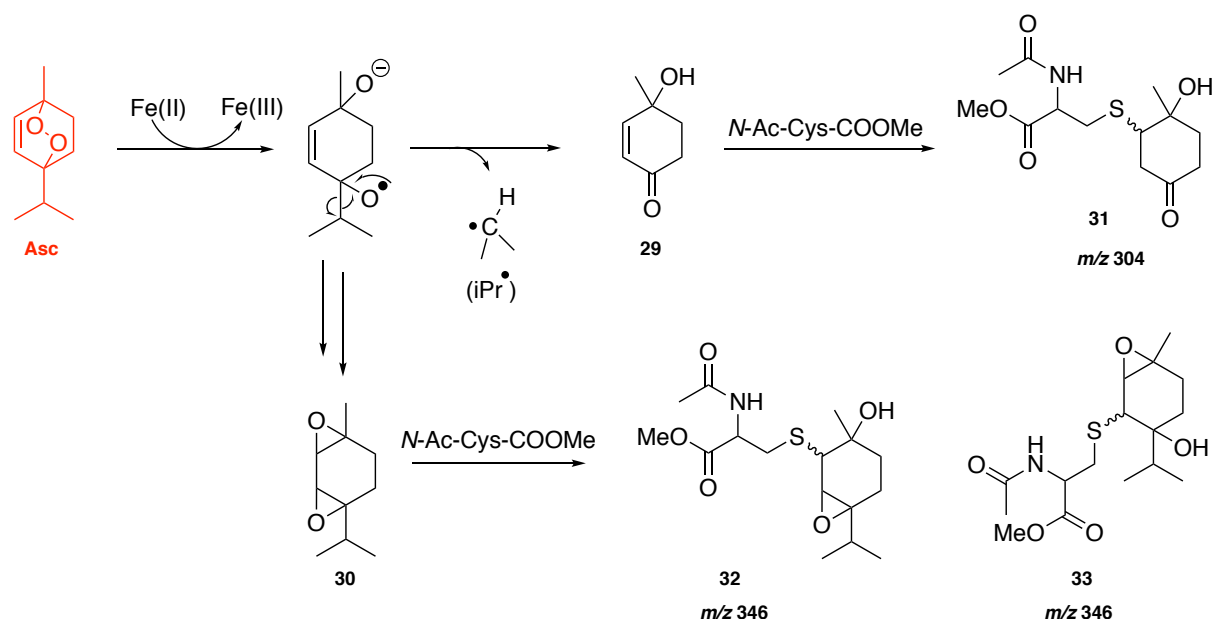


Figure 11 : Produits issus de la réactivité de l'Asc vis-à-vis de la *N*-Ac-Cys-COOMe déterminés à l'issue des études LC-ESI-MS/MS.

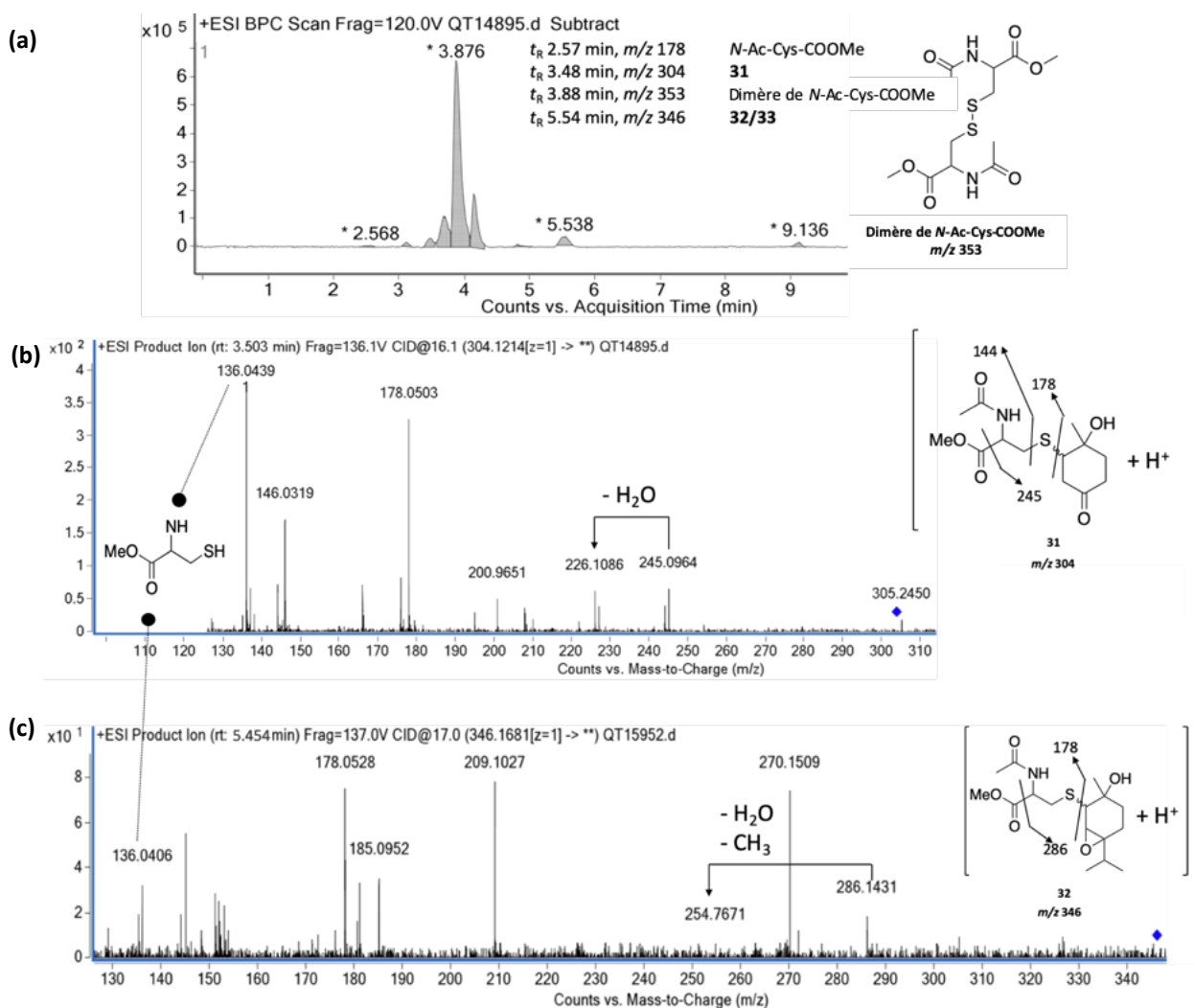


Figure 12 : (a) Chromatogramme LC indiquant les temps de rétention des produits issus de la réaction (b) Spectre expérimental ESI-MS/MS de l'ion moléculaire à m/z 304 ; (c) Spectre expérimental de ESI-MS/MS de l'ion moléculaire à m/z 346.

En effet, la dégradation radicalaire de l'**Asc** est connue pour produire des espèces réactives électrophiles telles que l'isoascaridol **30** et la cétone α - β -insaturée **29** qui seraient alors susceptibles de réagir avec les résidus nucléophiles présents sur les protéines de la peau. Nous avons montré que ces deux molécules sont capables de réagir avec le groupe thiol de *N*-Ac-Cys-COOMe par un mécanisme à deux électrons nucléophile-électrophile qui pourraient ainsi former des potentielles structures antigéniques. La formation d'espèces électrophiles *via* une dégradation radicalaire de l'**Asc** dans la peau est donc une voie qui doit être considérée dans les mécanismes éventuels de sensibilisation à l'**Asc**.

La réaction contrôle **Asc**/*N*-Ac-Cys-COOMe sans sulfate de fer (II) a montré la formation de produits à m/z 346 par LC-ESI-MS mais en très faible quantité pour réaliser une MS/MS.

2.1.2. Réactivité vis-à-vis de la *N*-acétyl-tyrosine éthyl ester (*N*-Ac-Tyr-COOEt)

La réaction **Asc**/*N*-Ac-Tyr-COOEt, catalysée par le sulfate de fer (II) n'a pas conduit à la formation d'adduit. Il a fallu 72 h pour observer la formation de nouveaux composés par CCM. Au bout d'une semaine, **Asc** n'a pas été totalement consommé. L'analyse de l'échantillon brut par LC-MS/MS a tout de même permis d'observer qu'une quantité importante de *N*-Ac-Tyr-COOEt qui n'avait pas réagi (Figure 13). Les chromatogrammes ont montré en effet un pic majeur correspondant à la *N*-Ac-Tyr-COOEt ainsi qu'un pic avec une valeur m/z de 501. Deux dérivés de dimérisation oxydante de la *N*-Ac-Tyr-COOEt peuvent correspondre à la valeur de m/z 501 : le dimère de *N*-Ac-Tyr-COOEt ou/et la cétone de type Pummerer.⁶ Ceux-ci sont des produits d'oxydation connus de la tyrosine.^{3,23}

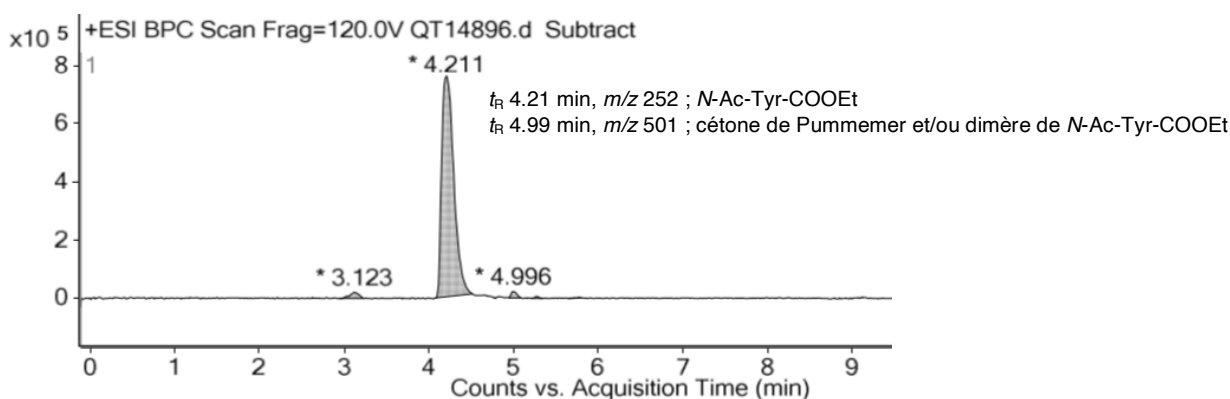


Figure 13 : Chromatogramme LC correspondant à la réaction **Asc**/*N*-Ac-Tyr-COOEt/Fe(II).

D'un point de vue mécanistique, les espèces radicalaires présentes dans le mélange réactionnel prennent l'hydrogène phénolique de la *N*-Ac-Tyr-COOEt. Le radical phénoxy obtenu est stable puisqu'il peut se délocaliser dans le cycle aromatique et donne les radicaux **A** et **B** (Figure 14).

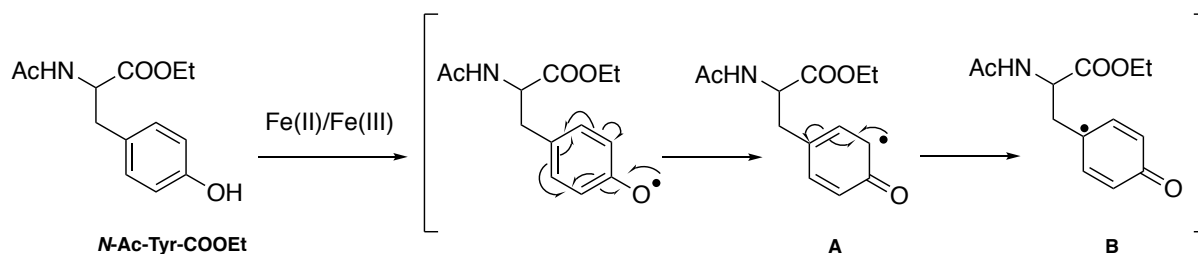


Figure 14 : Radical issu de la *N*-Ac-Tyr-COOEt et ses formes mésomères.

Divers couplages de **A** et de **B** donnent deux types de dimères différents avec m/z 501 (Figure 15).

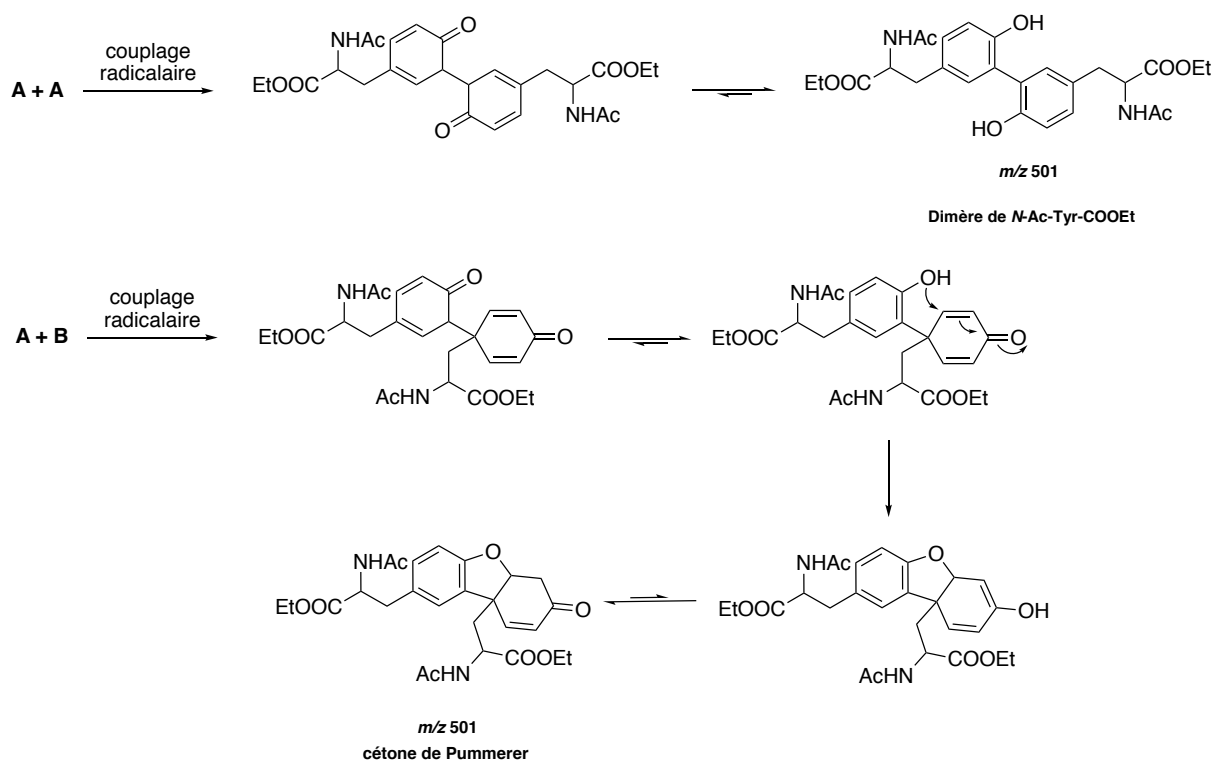


Figure 15 : Formation de l'ester diéthylique de la dityrosine et du dérivé de type cétone de Pummerer.

L'espèce moléculaire à m/z 501 a subi alors une ESI-MS/MS qui a permis d'élucider ces structures grâce aux diverses fragmentations observées (Figure 16).

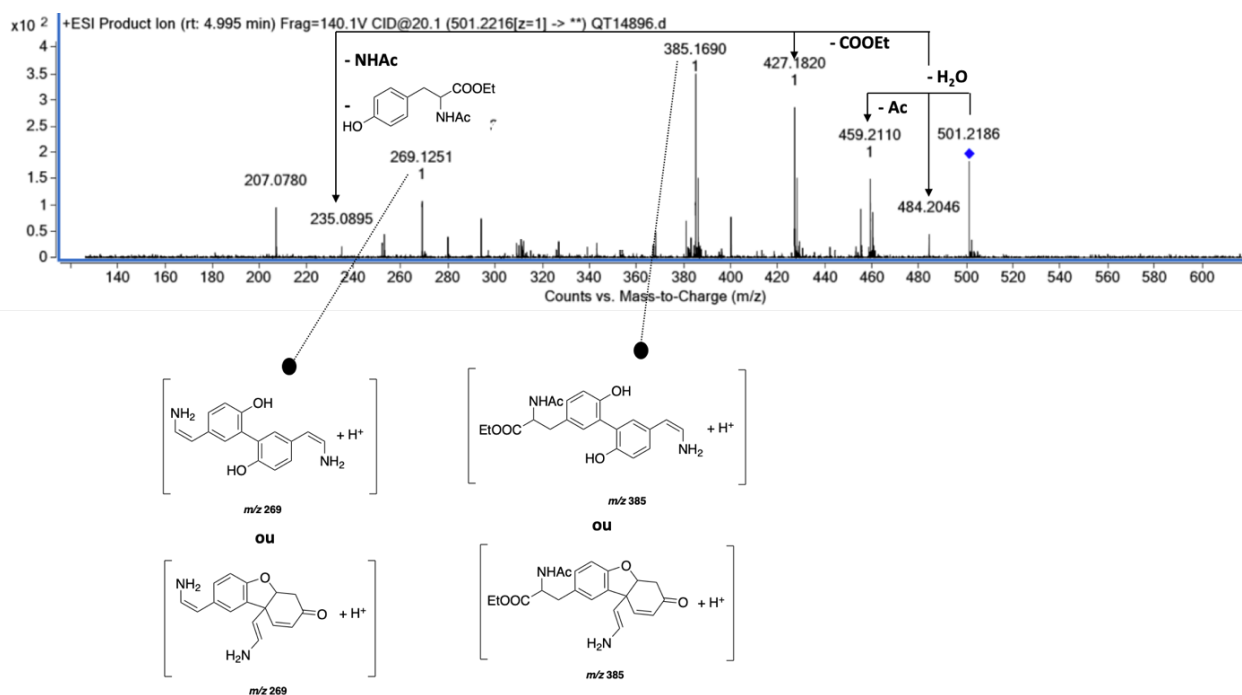


Figure 16 : Spectre expérimental ESI-MS/MS de l'ion moléculaire à m/z 501.

La modification chimique de la *N*-Ac-Tyr-COOEt en raison des propriétés oxydantes pertinentes de l'**Asc** a donc été confirmée par la formation de grandes quantités de dimères d'acide aminé.

Les expériences contrôles en absence de sulfate de fer (II), n'ont montré aucun type de réaction, l'**Asc** et la *N*-Ac-Tyr-COOEt étant récupérés comme tels.

2.1.3. Réactivité vis-à-vis du *N*-acétyl-tryptophane éthyl ester (*N*-Ac-Trp-COOEt)

Après une semaine de réaction avec le *N*-Ac-Trp-COOEt, l'**Asc** n'était pas complètement consommé. La réaction était beaucoup plus lente. Cependant, de nouveaux produits ont pu être détectés par CCM, avec une polarité proche après 7 jours de réaction. Plusieurs produits d'oxydation de *N*-Ac-Trp-COOEt ont été identifiés à l'issue des analyses LC-ESI-MS. La fonction indole était en effet susceptible de s'oxyder en donnant des dérivés monohydroxylés sur des positions différentes. Cela pourrait expliquer pourquoi plusieurs pics détectés avaient des valeurs m/z de 291 (Figure 17). La dégradation oxydative de *N*-Ac-Trp-COOEt a également permis d'obtenir la *N*-Ac-kynurénine éthyl ester avec une valeur m/z 279. La voie de la kynurénine est bien connue et explique la principale ouverture oxydative du cycle indole et la dégradation subséquente du tryptophane dans les cellules de mammifères.²⁴

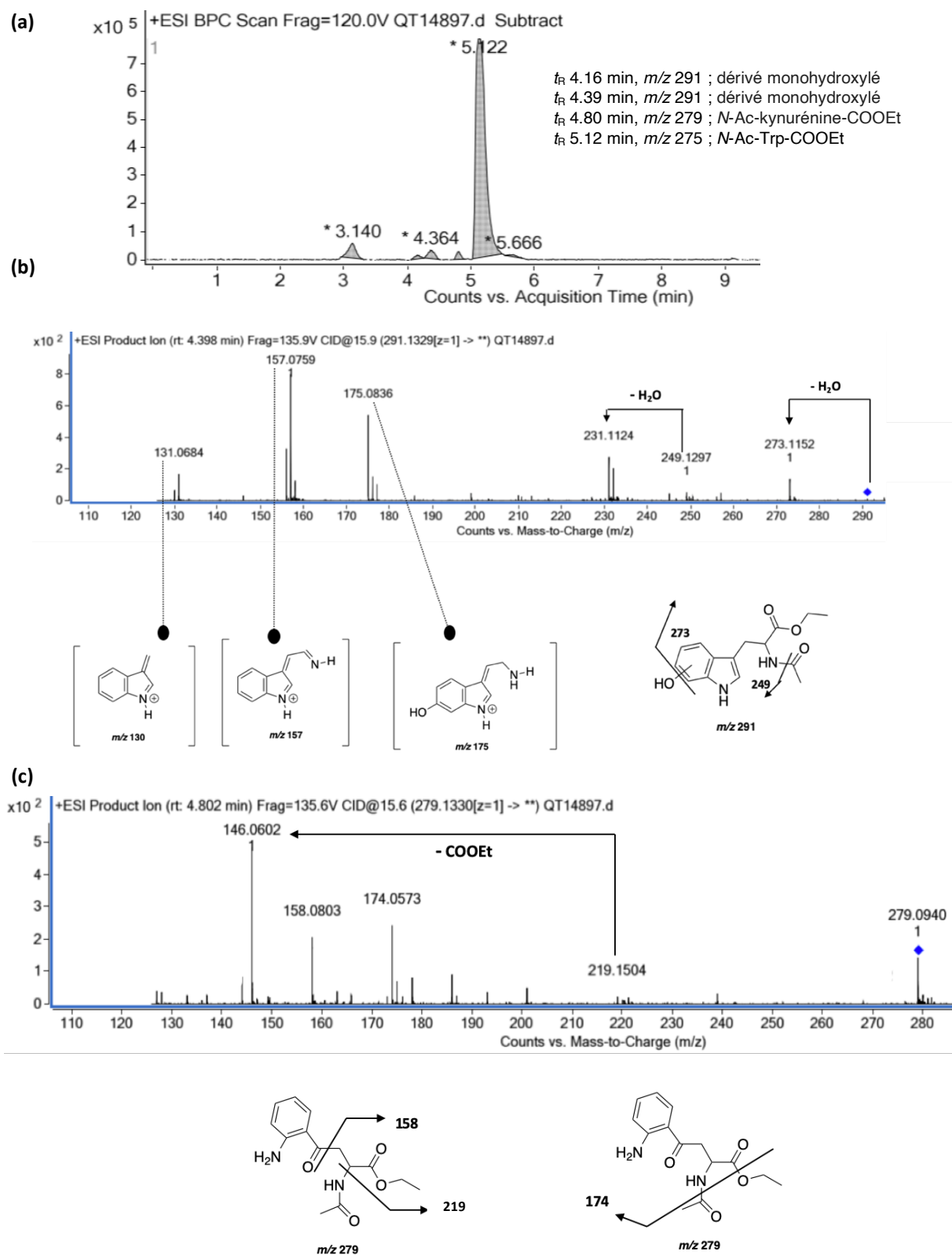


Figure 17 : (a) Chromatogramme LC du brut réactionnel avec les temps de rétention de chacun des composés formés (b) analyse MS/MS du dérivé monohydroxylé de *N*-Ac-Trp-COOEt (m/z 291) ; (c) analyse MS/MS de la kynurénine dérivée de *N*-Ac-Trp-COOEt (m/z 279).

Dans les expériences contrôle en absence de sulfate de fer (II) catalytique, aucun nouveau produit n'est apparu par CCM au bout de 7 jours d'agitation à température ambiante. L'**Asc** et le *N*-Ac-Trp-COOEt sont récupérés comme tels.

2.1.4. Réactivité vis-à-vis de la *N*-acétyl-histidine méthyl ester (*N*-Ac-His-COOME)

Lors des analyses LC-ESI-MS, aucun produit de réaction a pu être détecté, ni des d'oxydation de l'acide aminé en présence de sulfate ferreux, ni des adduits avec l'**Asc**. Les deux réactifs de départ ont été récupérés après 7 jours de réaction.

Comme attendu, les expériences contrôles en absence d'initiateur radicalaire n'ont pas non plus montré de réactivité.

2.1.5. Réactivité vis-à-vis de la *N*-acétyl-lysine méthyl ester (*N*-Ac-Lys-COOME)

De manière identique à la réaction entre l'**Asc** et la *N*-Ac-His-COOME, aucun produit n'a été identifié en présence de *N*-Ac-Lys-COOME et de sulfate de fer (II). Les deux réactifs de départ ont été récupérés après 7 jours de réaction.

En absence d'initiateur radicalaire, l'**Asc** et la *N*-Ac-Lys-COOME ont été également récupérés après 7 jours de réaction.

En raison du caractère électrophile de la cétone **29** et de l'isoacaridol **30**, observés lors de la réactivité avec la *N*-Ac-Cys-COOME, nous pensons que l'étude de la réactivité de l'**Asc** vis-à-vis de la *N*-Ac-Lys-COOME conduirait à la formation d'adduits potentiels en raison du caractère nucléophile de cet acide aminé. Or, nous avons confirmé le résultat de non-réactivité de l'**Asc** envers la *N*-Ac-Lys-COOME comme l'avaient observé Krutz *et al.* lors de leurs études de réactivité dans le DPRA de l'**Asc** vis-à-vis du peptide contenant de la lysine.²⁵

2.2. Réactivité du (5*R*)-2-méthyl-5-isopropényl-2-cyclohexène-1-hydroperoxyde (Lim-2-OOH)

2.2.1. Réactivité vis-à-vis de la *N*-acétyl-cystéine méthyl ester (*N*-Ac-Cys-COOME)

Après 2 jours de réaction, le **Lim-2-OOH** est totalement consommé en présence de sulfate de fer (II). En raison de la polarité très proche des composés formés, la purification par chromatographie sur gel de silice a été inefficace. La LC-ESI-MS du produit brut a alors montré

un pic majeur avec un m/z associé de 353 correspondant au dimère disulfure de l'acide aminé. Deux autres pics avec m/z 328 et m/z 346 ont également été détectés (Figure 18).

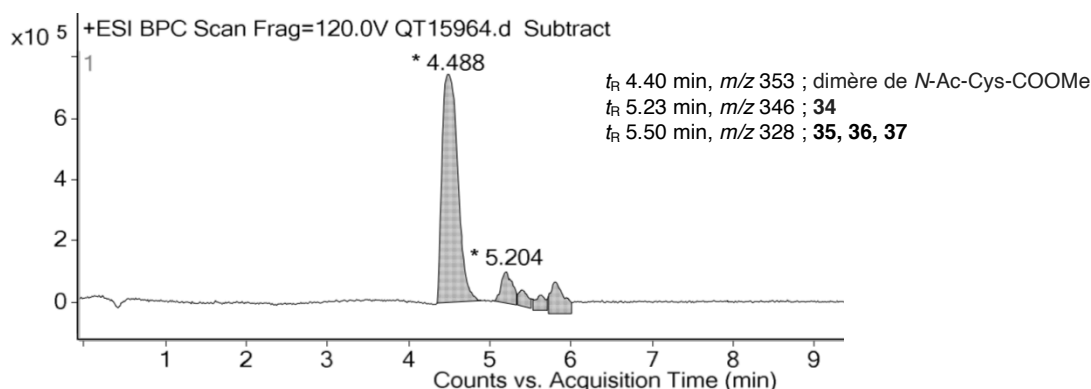


Figure 18 : Chromatogramme LC du brut réactionnel de la réaction **Lim-2-OOH**/*N*-Ac-Cys-COOMe/ Fe(II) avec les temps de rétention de chacun des composés formés détectés.

À un temps de rétention de 5,50 min, le produit détecté avec une valeur associée de m/z 328 pourrait correspondre à l'époxyde **35** (Figure 19). La ESI-MS/MS de ce signal a montré des fragments à m/z 178 et m/z 144 typiques de la perte de *N*-Ac-Cys-COOMe.²⁶ D'un point de vue mécanistique, l'hydroperoxyde a été capable d'oxyder le fer (II) en fer (III) générant des radicaux $\text{RO}\cdot$. En raison de la présence de la double liaison allylique, il a été montré que dans ces conditions expérimentales une cyclisation intramoléculaire rapide donnait des radicaux α -oxanylcarbinyloxydes pouvant être piégés par la chaîne latérale de la *N*-Ac-Cys-COOMe et former l'époxyde **35**.^{1,27} La preuve indirecte de la formation de **35** a été donnée par un pic à un temps de rétention de 5,23 min avec une valeur associée au composé **34** de m/z 346. L'augmentation de masse de 18 par rapport à m/z 328 correspondrait à l'addition d'une molécule d'eau. La fragmentation ESI-MS/MS était en accord également avec le composé **34**. La fragmentation par MS/MS de m/z 346 à un temps de rétention de 5,24 min a montré un fragment d'ion à m/z 178 en raison de la perte de *N*-Ac-Cys-COOMe. De plus, la perte de deux molécules d'eau a conduit à l'obtention d'un ion moléculaire à m/z 310. La perte d'un groupement méthyle et d'un groupement acétyle conduit à un ion moléculaire avec une valeur de m/z 253. La structure **34** proposée prend donc en compte de ces fragmentations (Figure 19a). On peut alors suggérer que l'addition nucléophile d'une molécule d'eau, présente dans le solvant de réaction sur l'époxyde électrophile **35**, produit **34**. Cependant, le spectre MS/MS correspondant à l'adduit de valeur m/z 328 ne nous donnait pas des informations concrètes quant à la structure chimique précise de l'adduit formé. Par conséquent, deux autres structures chimiques, **36** et

37, peuvent également correspondre à une valeur de m/z 328 et sont susceptibles de se former (Figure 19b).

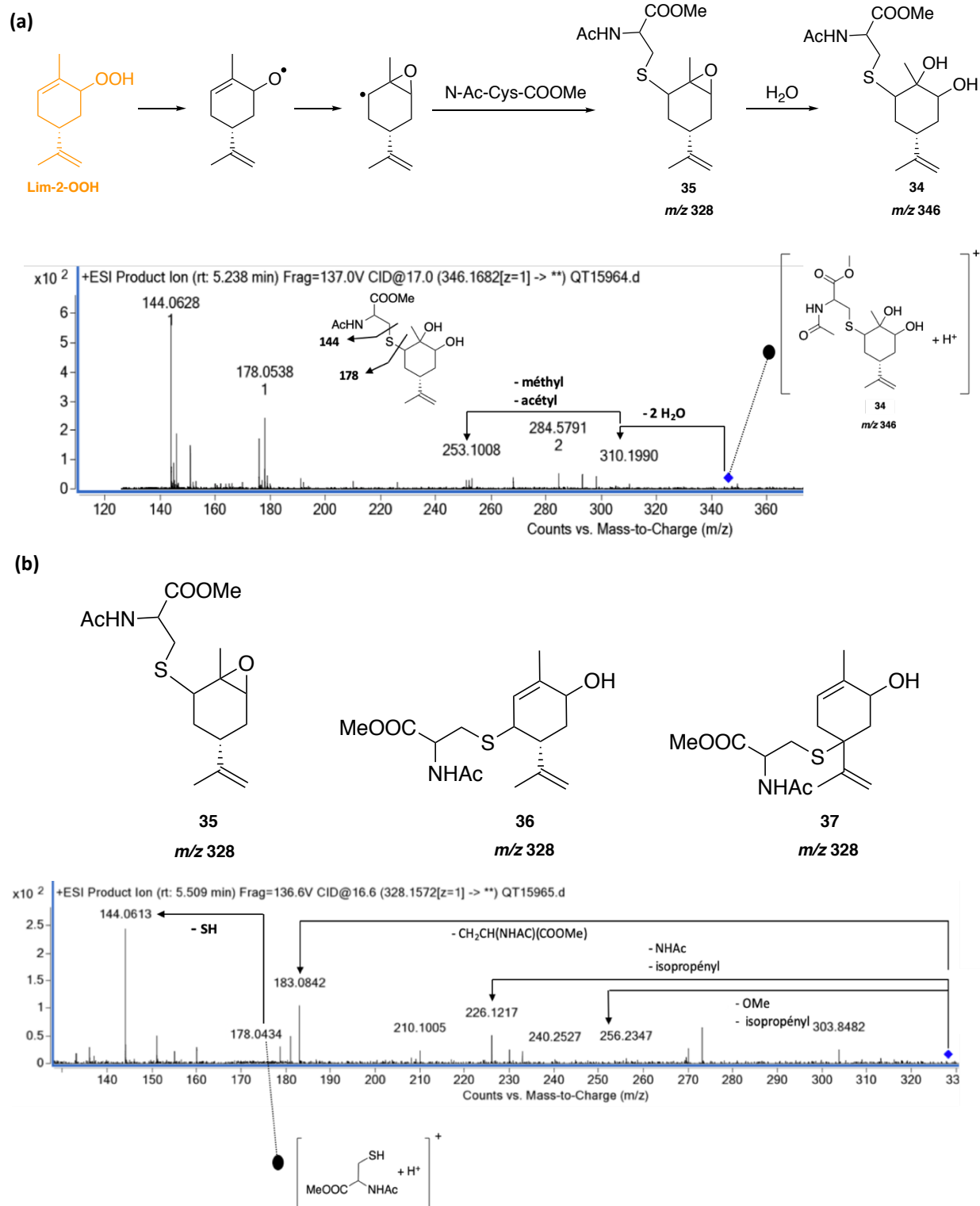


Figure 19 : (a) Structure chimique proposée pour le composé **34** et **35** et analyse MS/MS de du composé **34** à l'origine du pic m/z 346 à 5,24 min ; (b) Structures chimiques proposées pour les composés **35**, **36**, **37** et analyse MS/MS du pic m/z 328.

La formation des composé **36** et **37** peut être expliquée tout d'abord par la génération du radical alcoyle en présence de sulfate de fer (II) suivant un mécanisme concerté débutant par un processus de type Fenton (*Figure 20*).

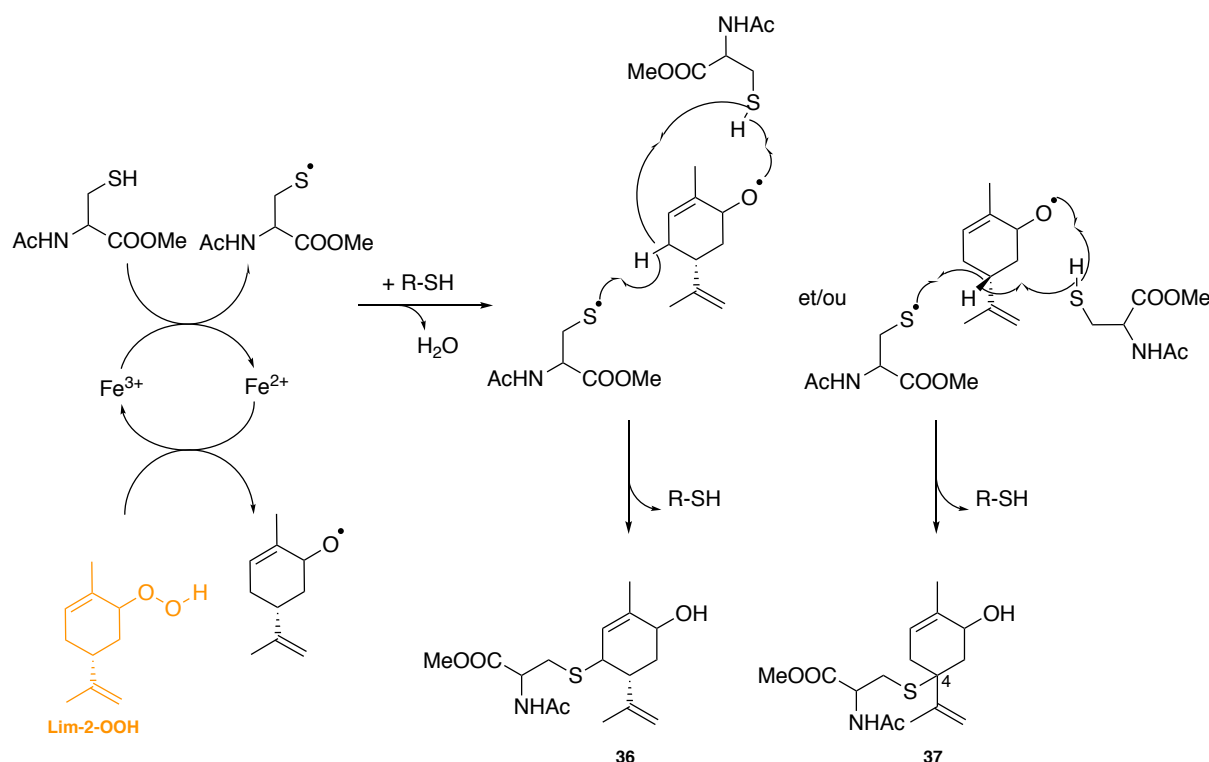


Figure 20 : Mécanisme suggéré pour la formation des adduits **36** et **37** entre le **Lim-2-OOH** et la *N*-Ac-Cys-COOMe en présence de Fe(II).

En absence de sulfate de fer, la réaction entre le **Lim-2-OOH** et la *N*-Ac-Cys-COOMe a fournit principalement le dimère de l'acide aminé à m/z 353.

2.2.2. Réactivité vis-à-vis de la *N*-acétyl-tyrosine éthyl ester (*N*-Ac-Tyr-COOEt)

Au bout d'une semaine, le **Lim-2-OOH** n'a pas été totalement consommé. L'analyse de l'échantillon brut par LC-MS/MS a tout de même permis d'observer une large quantité de *N*-Ac-Tyr-COOEt avec une valeur de m/z de 252. Deux produits issus de l'oxydation sont identifiés à une valeur de m/z de 501 correspondant à la dityrosine et/ou à la cétone de type Pummerer.

En absence d'initiateur radicalaire, une large quantité de tyrosine est détectée. En plus, du **Lim-2-OOH** et de la carvone caractérisée par RMN du ^1H et du ^{13}C sont récupérés à l'issu d'une purification par colonne sur gel de silice. Ce composé est issu de la réduction du **Lim-2-OOH** (*Figure 21*).

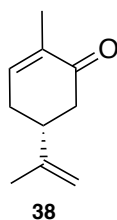


Figure 21 : Structure chimique de la carvone **38**.

2.2.3. Réactivité vis-à-vis du *N*-acétyl-tryptophane éthyl ester (*N*-Ac-Trp-COOEt)

En présence de sulfate de fer aucun adduit entre le **Lim-2-OOH** et le *N*-Ac-Trp-COOEt n'est détecté par LC-ESI-MS/MS après une semaine de réaction. Uniquement les produits d'oxydation du tryptophane, notamment le dérivé monohydroxylé pouvant expliquer la valeur *m/z* de 291 et la *N*-acétyl-kynurénine éthyl ester avec une valeur *m/z* de 279 sont détectés ainsi qu'une quantité importante de *N*-Ac-Trp-COOEt. De plus, une purification par chromatographie sur gel de silice nous a permis d'identifier des fractions contenant de la carvone **38** et du carvéol **39**, issus de la réduction du **Lim-2-OOH** (Figure 22). Une fraction contenant du *N*-Ac-Trp-COOEt est également récupérée.

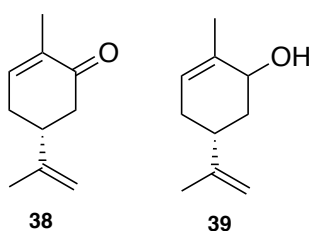


Figure 22 : Structure chimique de la carvone **38** et du carvéol **39**.

En absence d'initiateur radicalaire, une large quantité de *N*-Ac-Trp-COOEt est détectée après une semaine de réaction à température ambiante. De plus, de la carvone est détectée par LC-ESI-MS/MS.

2.2.4. Réactivité vis-à-vis de la *N*-acétyl-histidine méthyl ester (*N*-Ac-His-COOMe)

En présence d'initiateur radicalaire, au bout d'une semaine de réaction entre le **Lim-2-OOH** et la *N*-Ac-His-COOMe, la CCM a indiqué que l'hydroperoxyde allylique n'avait pas été complètement consommé. Très peu de composés ont été formés au cours de cette réaction (Figure 23).

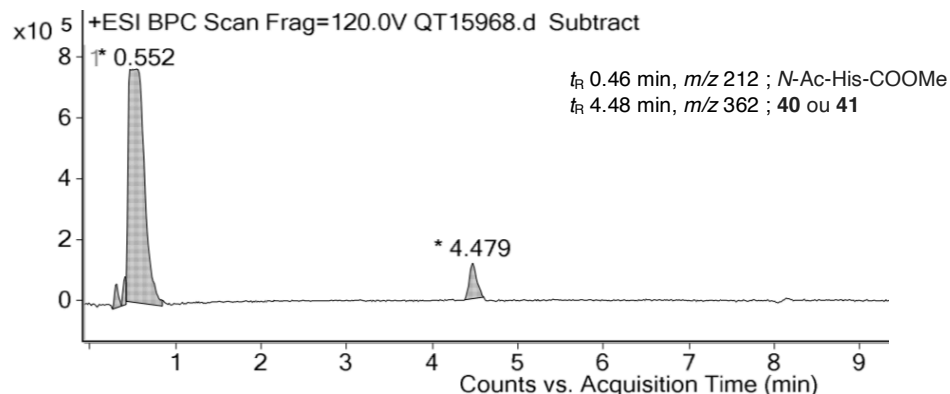


Figure 23 : Chromatogramme LC du brut réactionnel de la réaction du **Lim-2-OOH**/*N*-Ac-His-COOMe/Fe(II) avec les temps de rétention de chacun des composés formés.

Ainsi, aucun produit d'oxydation de la *N*-Ac-His-COOMe n'a été détecté. Un pic majeur à un temps de rétention de 0,46 min correspondant à la *N*-Ac-His-COOMe a été détecté. Dans les conditions expérimentales employées, la LC-ESI-MS nous a montré la présence d'un composé avec une masse d'une valeur m/z de 362 à un temps de rétention de 4,48 min pouvant correspondre à un adduit potentiel. Des analyses complémentaires d'ESI-MS/MS nous ont permis de proposer deux structures chimiques associées à la valeur de cet ion moléculaire (Figure 24).

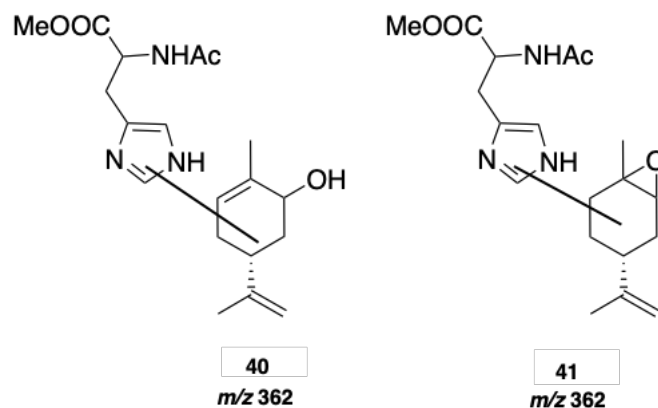


Figure 24 : Structures chimiques proposées pour les composés **40** et **41** à l'origine des pics avec une valeur m/z de 362.

La fragmentation de cet ion moléculaire m/z 362 conduit à un ion fragment de m/z 212, caractérisant la perte de la *N*-Ac-His-COOMe. Le clivage de la liaison O-O de l'hydroperoxyde par le sulfate de fer (II) forme les radicaux allyloxy $RO\cdot$. Ces derniers peuvent évoluer en radicaux carbonés soit par abstraction d'hydrogène allylique soit par cyclisation 3-exo-trig conduisant à la formation de radicaux oxiranylcarbinyloxy. Dans les deux cas, une réaction radicalaire avec la chaîne latérale de la *N*-Ac-His-COOMe donnerait des adduits avec une

valeur associée de m/z 362. Par conséquent, les composés **40** et **41** pourraient être principalement suggérés pour m/z 362. Cependant, la structure chimique exacte du produit d'addition, et la position précise de l'addition sur la chaîne latérale de *N*-Ac-His-COOMe n'ont pu être élucidées (Figure 25).

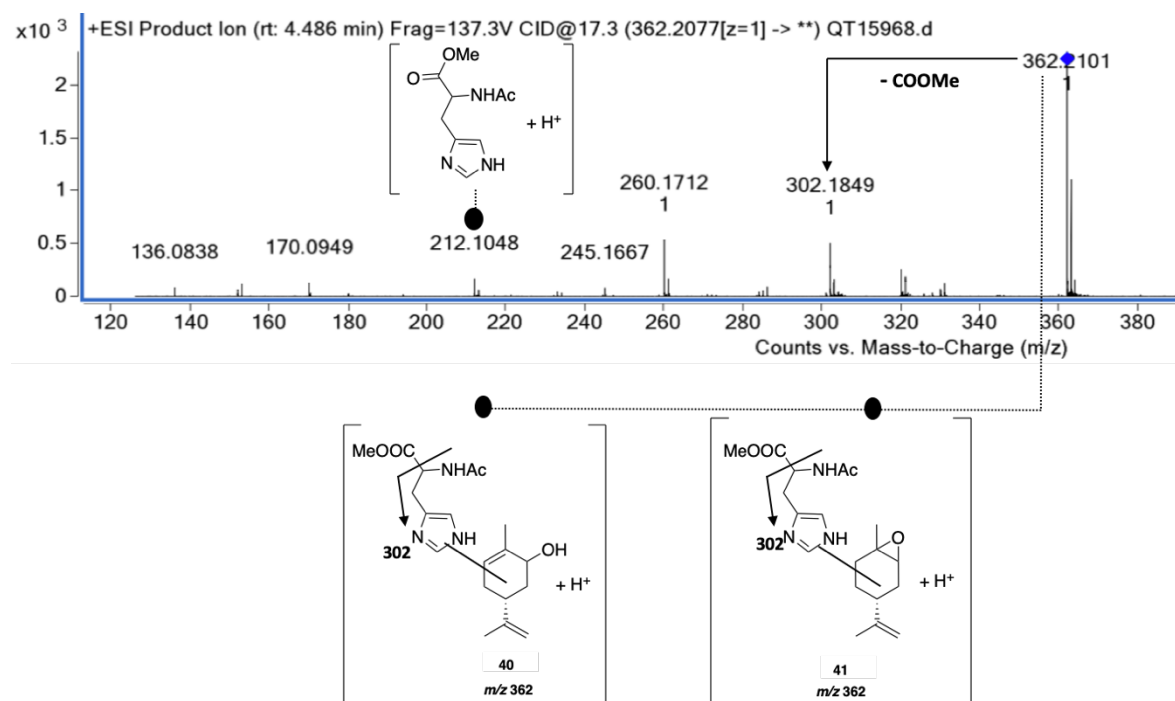


Figure 25 : Spectre expérimental d'ESI-MS/MS de l'ion moléculaire à m/z 362.

L'expérience contrôle en absence d'initiateur radicalaire ne montre aucune réactivité.

2.2.5. Réactivité vis-à-vis de la *N*-acétyl-lysine méthyl ester (*N*-Ac-Lys-COOMe)

En présence de sulfate de fer (II), la CCM ne montre pas l'apparition de nouveaux produits lors de la réaction du **Lim-2-OOH** avec la *N*-Ac-Lys-COOMe. Ces deux produits sont ainsi détectés lors de la LC-ESI-MS.

De même, en absence de sulfate de fer (II), l'apparition de nouveaux produits n'est pas observée par CCM et les deux réactifs de départ sont identifiés lors de l'analyse du brut réactionnel par LC-ESI-MS.

2.3. Réactivité du (1S, 4R)-1-méthyl-4-isopropényl-2-cyclohexène-1-hydroperoxyde ((1S, 4R)-Lim-1-OOH)

2.3.1. Réactivité vis-à-vis de la N-acétyl-cystéine méthyl ester (N-Ac-Cys-COOMe)

Au bout de trois jours de réaction en présence de sulfate de fer (II), le (1S, 4R)-Lim-1-OOH est totalement consommé. La purification des produits de réaction par chromatographie sur gel de silice s'est avérée difficile en raison de la polarité voisine des composés formés. Grâce à l'analyse du brut réactionnel par LC-ESI-MS, plusieurs composés ont pu être détectés. Tout d'abord, un pic majoritaire avec un temps de rétention de 4,29 min correspondant au dimère de l'acide aminé à m/z 353, plus, un signal à m/z 352 mesuré à un temps de rétention de 5,32 min et à 5,24 min un signal correspondant à une valeur de m/z 312 (Figure 26).

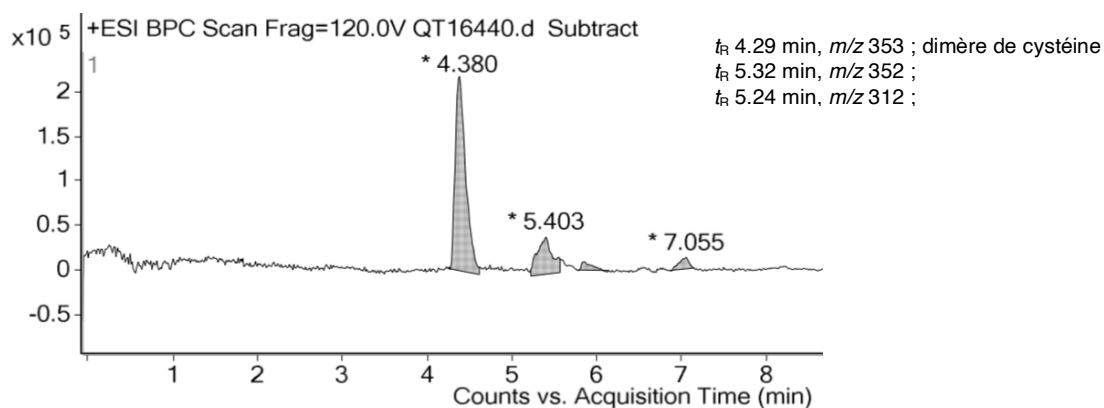


Figure 26 : Chromatogramme LC du brut réactionnel de (1S, 4R)-Lim-1-OOH/N-Ac-Cys-COOMe/Fe(II) avec les temps de rétention de chacun des composés formés.

Dans le but d'avoir des informations complémentaires concernant les pics avec m/z 312 et m/z 352, une analyse ESI-MS/MS a été réalisée. Cependant, nous n'avons pas été en mesure d'assigner de structure. De même, une valeur de m/z 279 à 7,06 min n'a pas pu se voir attribuer de structure chimique. Ces signaux correspondent probablement à des fragments d'espèces moléculaires dont les structures peuvent difficilement se voir octroyer.

En absence de sulfate de fer (II), la CCM de l'expérience contrôle ne montre pas de réactivité.

2.3.2. Réactivité vis-à-vis de la N-acétyl-tyrosine éthyl ester (N-Ac-Tyr-COOEt)

En présence de sulfate ferreux, la réaction du (1S, 4R)-Lim-1-OOH avec la N-Ac-Tyr-COOEt était plutôt lente. Au bout d'une semaine de réaction, l'hydroperoxyde allylique n'avait

pas été totalement consommé. Le profil de l'analyse LC-MS a révélé la formation de quelques composés (Figure 27).

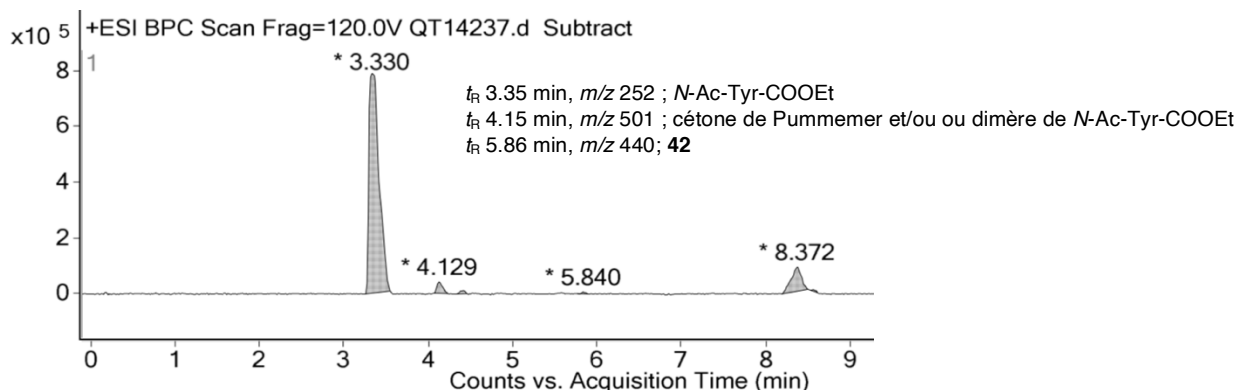


Figure 27 : Chromatogramme LC du brut réactionnel de **(1S, 4R)-Lim-1-OOH**/*N*-Ac-Tyr-COOEt/Fe(II) avec les temps de rétention de chacun des composés formés.

D'après le chromatogramme, une large quantité de *N*-Ac-Tyr-COOEt n'avait pas réagi mais une partie a été engagée dans des processus d'oxydoréduction, comme il peut être constaté avec une masse de m/z 501 qui correspond à la cétone de Pummener et/ou dimère de *N*-Ac-Tyr-COOEt. De plus, nous constatons sur le chromatogramme qu'à un temps de rétention de 5,86 min un composé de masse m/z 440 est formé. Une analyse complémentaire de ESI-MS/MS a été réalisée. Ainsi, un fragment correspondant à la perte du squelette du **(1S, 4R)-Lim-1-OOH** est observé avec une masse de 167 (Figure 28).

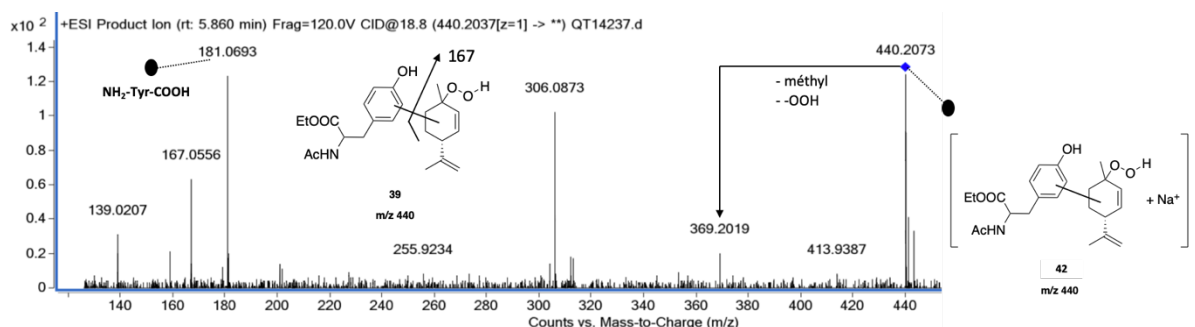


Figure 28 : Analyse ESI-MS/MS de l'ion moléculaire à m/z 440 et structure chimique **42** proposée pour cet adduit.

En absence de sulfate de fer (II), le **(1S, 4R)-Lim-1-OOH** n'est pas consommé au bout d'une semaine de réaction. La CCM ne montre pas l'apparition de nouveaux produits. Aucun produit d'oxydation issu de l'acide aminé n'est détecté par ESI-MS/MS.

2.3.3. Réactivité vis-à-vis du *N*-acétyl-tryptophane éthyl ester (*N*-Ac-Trp-COOEt)

En présence de sulfate de fer (II), la CCM ne montre pas l'apparition de nouveaux produits lors de la réaction entre le **(1S, 4R)-Lim-1-OOH** et le *N*-Ac-Trp-COOEt.

De même, en absence de sulfate de fer (II), l'apparition de nouveaux produits n'est pas observée par CCM et les deux réactifs de départ sont identifiés lors de l'analyse LC-ESI-MS.

2.3.4. Réactivité vis-à-vis de la *N*-acétyl-histidine méthyl ester (*N*-Ac-His-COOME)

En présence de sulfate de fer (II), la CCM ne montre pas l'apparition de nouveaux produits lors de la réaction entre le **(1S, 4R)-Lim-1-OOH** et la *N*-Ac-His-COOME.

De même, en absence de sulfate de fer (II), l'apparition de nouveaux produits n'est pas observée par CCM et les deux réactifs de départ sont identifiés lors de l'analyse LC-ESI-MS.

2.3.5. Réactivité vis-à-vis de la *N*-acétyl-lysine méthyl ester (*N*-Ac-Lys-COOME)

En présence de sulfate de fer (II), la CCM ne montre pas l'apparition de nouveaux produits lors de la réaction entre le **(1S,4R)-Lim-1-OOH** et la *N*-Ac-Lys-COOME.

De même, en absence de sulfate de fer (II), l'apparition de nouveaux produits n'est pas observée par CCM et les deux réactifs de départ sont identifiés lors de l'analyse LC-ESI-MS.

2.4. Réactivité du (*E*)-7-hydroperoxy-3,7-diméthyl-oct-5-en-1-ol ((±)-Citr-7-OOH)

2.4.1. Réactivité vis-à-vis de la *N*-acétyl-cystéine méthyl ester (*N*-Ac-Cys-COOME)

La réaction de l'hydroperoxyde allylique (±)-**Citr-7-OOH** avec la *N*-Ac-Cys-COOME en présence de sulfate de fer (II) a conduit à la formation de divers produits en quelques heures. L'analyse ESI-LC-MS du brut réactionnel a montré l'existence d'un signal majoritaire à *m/z* 353 représentant l'oxydation de l'acide aminé et formation de son dimère disulfure (*Figure 29*).

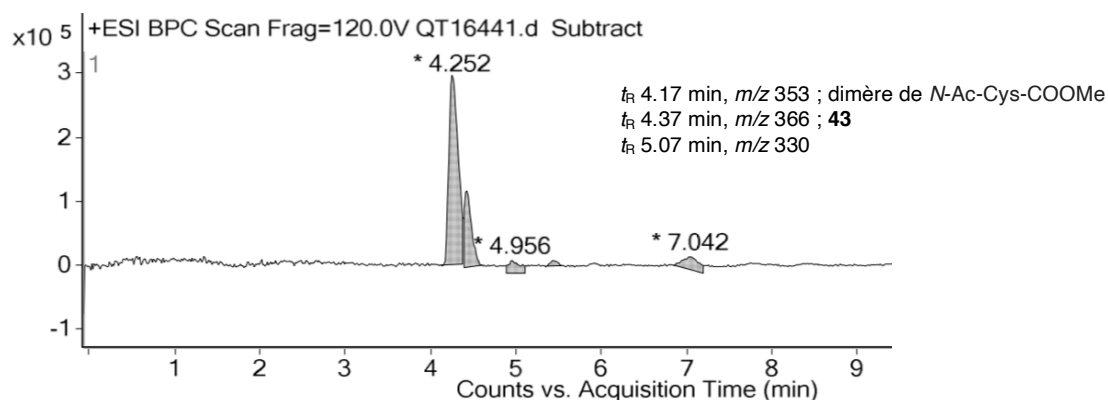


Figure 29 : Chromatogramme LC du brut réactionnel de la réaction (±)-Citri-7-OOH/N-Ac-Cys-COOMe/Fe(II) avec les temps de rétention de chacun des composés formés.

De même, cette analyse nous montre un pic avec une valeur associée m/z de 366. L'analyse ESI-MS-MS montre la libération des ions fragments avec m/z 144 et m/z 178 caractéristiques du clivage de l'acide aminé suggérant la formation d'un adduit (Figure 30). De plus, ceci peut être expliqué par le fait que les conditions expérimentales utilisent un mélange d'eau et d'acétonitrile favorisant la cyclisation intramoléculaire rapide des radicaux alcoyles pour donner des radicaux α -oxanylcarbinyloxy pouvant être piégés par la chaîne latérale de la N-Ac-Cys-COOMe et former l'époxyde. Cet époxyde subit alors une addition de molécule d'eau pour former l'adduit **43**. Bien que la ESI-MS/MS ne donne pas d'information directe sur la formation de cet époxyde la structure **43** peut être proposée (Figure 30).

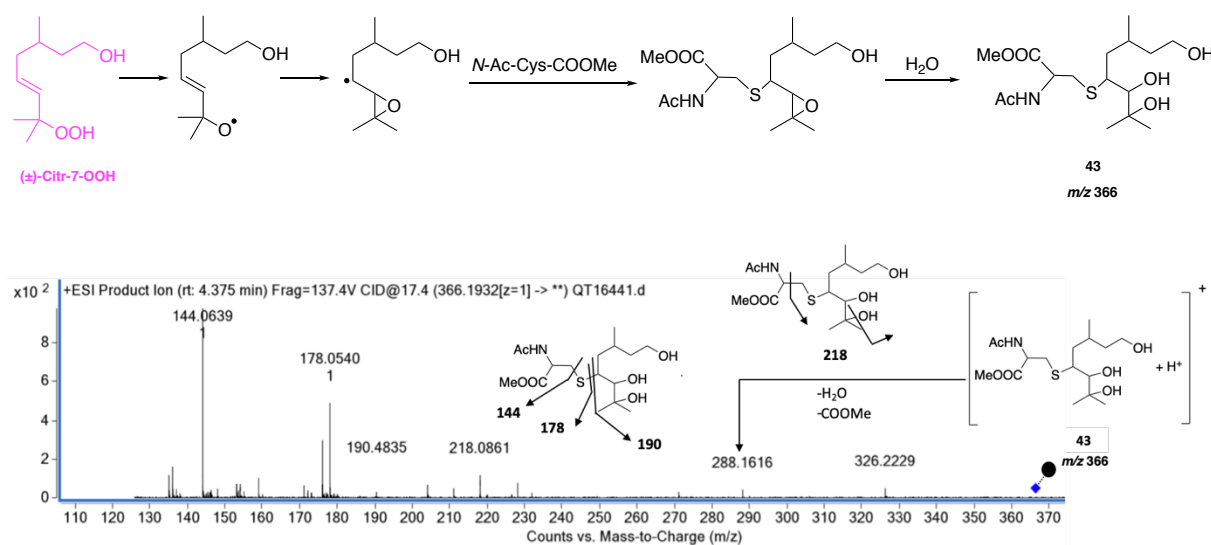


Figure 30 : Structure chimique proposée pour le composé **43** et spectre expérimental ESI-MS/MS de l'ion moléculaire m/z 366.

Dans le but d'avoir des informations complémentaires sur le signal avec m/z associé de 330 présentant un temps de rétention de 5,07 min, une analyse ESI-MS-MS a été réalisée. Bien que présentant un ion fragment à m/z 176 caractéristique de la cystéine, nous n'avons pas été en mesure de lui assigner de structure.

Au bout d'une semaine de réaction en absence de sulfate de fer (II), l'analyse LC-ESI-MS a montré un pic majeur avec une valeur m/z de 353 correspondant au dimère de la *N*-Ac-Cys-COOMe. En outre, un signal avec m/z 330 a été détecté. Cependant, le signal étant trop faible pour une analyse ESI-MS/MS nous n'avons pas été en mesure de lui attribuer de structure.

2.4.2. Réactivité vis-à-vis de la *N*-acétyl-tyrosine éthyl ester (*N*-Ac-Tyr-COOEt)

Au bout d'une semaine de réaction, l'hydroperoxyde allylique dérivée du (\pm)- β -citronellol n'a pas été totalement consommé. L'analyse LC-ESI-MS a montré un pic majeur correspondant à la *N*-Ac-Tyr-COOEt avec une valeur de m/z 252. En outre, un pic d'une valeur de m/z 501 issu de l'oxydation de l'acide aminé employé a été détecté. Par ailleurs, aucun adduit potentiel n'a été observé.

Au bout d'une semaine de réaction en absence de sulfate de fer (II), l'analyse LC-ESI-MS a montré un pic majeur avec une valeur de m/z 252 correspondant à la *N*-Ac-Tyr-COOEt. En outre, aucun produit issu de l'oxydation de l'acide aminé employé n'a été détecté. De même, aucun adduit potentiel n'a été obtenu.

2.4.3. Réactivité vis-à-vis du *N*-acétyl-tryptophane éthyl ester (*N*-Ac-Trp-COOEt)

Au bout d'une semaine de réaction, l'hydroperoxyde allylique dérivée du (\pm)- β -citronellol n'a pas été totalement consommé. L'analyse LC-ESI-MS a montré un pic majeur correspondant au *N*-Ac-Trp-COOEt avec une valeur de m/z 275. En outre, un pic d'une valeur de m/z 291 issu de l'oxydation de l'acide aminé employé a été détecté. Aucun adduit potentiel n'a été observé.

Au bout d'une semaine de réaction en absence de sulfate de fer (II), l'analyse LC-ESI-MS a montré un pic majeur avec une valeur de m/z 275 correspondant au *N*-Ac-Trp-COOEt. En outre, aucun produit issu de l'oxydation de l'acide aminé employé n'a été détecté. De même, aucun adduit potentiel n'a été obtenu.

2.4.4. Réactivité vis-à-vis de la *N*-acétyl-histidine méthyl ester (*N*-Ac-His-COOMe)

Au bout d'une semaine de réaction en présence de sulfate de fer (II), l'hydroperoxyde allylique dérivée du β -citronellol n'a pas été totalement consommé. L'analyse LC-ESI-MS a montré un pic majeur correspondant à la *N*-Ac-His-COOMe avec une valeur de m/z 212. En outre, un produit d'une masse de valeur m/z 382 est détecté (Figure 31).

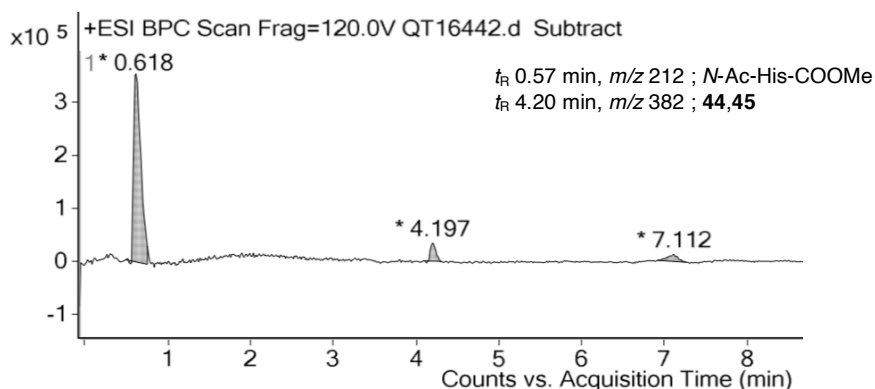


Figure 31 : Chromatogramme LC du brut réactionnel de la réaction entre *N*-Ac-His-COOMe/(\pm)-Citr-7-OOH/Fe(II) avec les temps de rétention de chacun des composés formés.

Pour déduire une structure chimique compatible avec la masse de m/z 382, une analyse complémentaire de ESI-MS/MS a été effectuée. Ainsi, les structures chimiques des composés **44** et **45** ont été proposées (Figure 32).

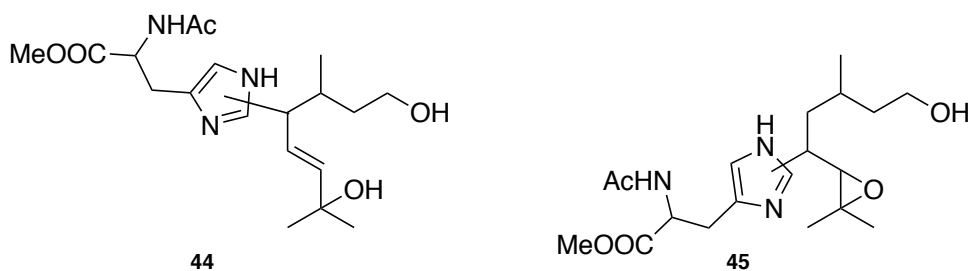


Figure 32 : Structures chimiques proposées pour les composés **44** et **45**.

La formation des adduits **44** et **45** débiterait par la rupture de la liaison O-O du (\pm)-Citr-7-OOH conduisant à la formation des radicaux alcoxydes. Ces radicaux sont susceptibles d'effectuer une abstraction d'un hydrogène en position allylique. Le radical carboné issu de cette abstraction d'hydrogène serait alors capable de se conjuguer avec l'histidine pour donner **44**. D'autre part, un radical de type oxyranylecarbinyloxy issu de la cyclisation 3-exo-trig s'additionnerait à la *N*-Ac-His-COOMe pour former le composé **45**.

L'espèce moléculaire avec m/z 382 a libéré des ions avec une valeur m/z de 212 caractéristiques du clivage de l'histidine mais également d'autres associés à la perte de

molécules d'eau ou encore des groupements caractéristiques de la *N*-Ac-His-COOMe (Figure 33).

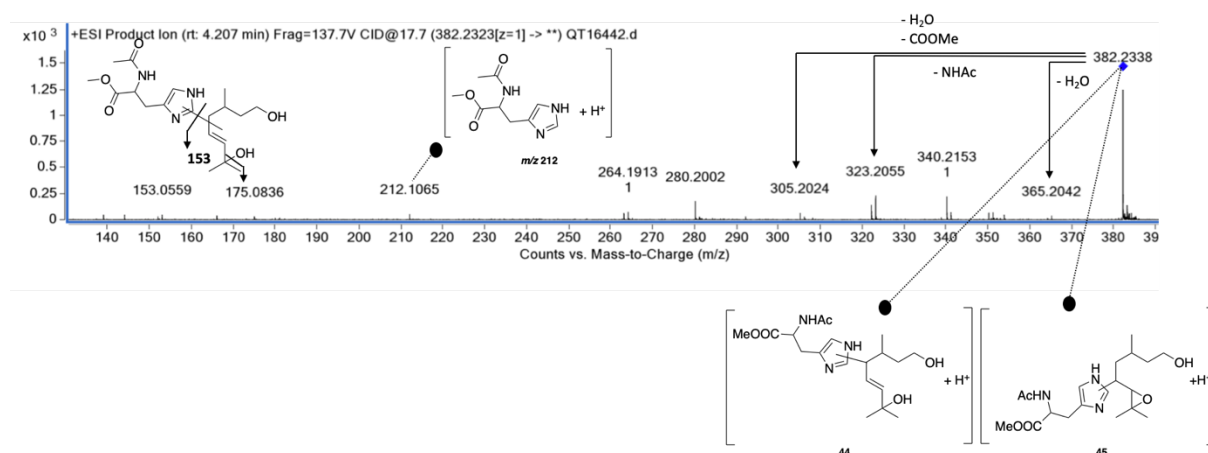


Figure 33 : Spectre expérimental de ESI-MS/MS de l'ion moléculaire m/z 382.

Dans le cas de la réactivité du (\pm)-Citr-7-OOH vis-à-vis de la *N*-Ac-His-COOMe en absence de sulfate de fer (II), la formation de produits d'addition avec m/z 382 a été détectée par LC-ESI-MS. Cependant, le signal était trop faible pour réaliser une ESI-MS/MS.

2.4.5. Réactivité vis-à-vis de la *N*-acétyl-lysine méthyl ester (*N*-Ac-Lys-COOMe)

Au bout d'une semaine de réaction, l'hydroperoxyde allylique dérivée du (\pm)- β -citronellol n'a pas été totalement consommé. L'analyse LC-ESI-MS a montré un pic majeur correspondant à la *N*-Ac-Lys-COOMe avec une valeur de m/z 212. En outre, aucun adduit potentiel n'a pu être détecté.

Au bout d'une semaine de réaction en absence de sulfate de fer (II), l'analyse LC-ESI-MS a montré un pic majeur une valeur de m/z 203 correspondant à la *N*-Ac-Lys-COOMe. En outre, aucun produit issu de l'oxydation de l'acide aminé employé n'a été détecté. De même, aucun adduit potentiel n'a été obtenu.

2.5. Réactivité des hydroperoxydes vis-à-vis de la HSA

2.5.1. Analyse par spectrométrie Maldi-Tof

Après divers essais avec des temps d'incubation de deux jours, une semaine et deux semaines à 37 °C dans une solution de tampon phosphate à pH 7,4 des problèmes de solubilité ont été rencontrés pour ces échantillons lors des analyses de Maldi-Tof. Il a donc été

décidé de conduire ces réactions avec un temps d'incubation d'une semaine de manière identique aux études de réactivité vis-à-vis des acides aminés dans un mélange d'eau déionisée/acétonitrile 9:1. Les analyses de Maldi-Tof ont montré des produits d'addition de la HSA avec l'**Asc**, le **Lim-2-OOH**, le **(1S,4R)-Lim-1-OOH** et le **(±)-Citr-7-OOH** que ce soit en présence ou en absence de sulfate de fer (II).

Le spectre de masse de Maldi-Tof obtenu par analyse de la HSA commerciale incubée à 37 °C présente une masse moléculaire de 66 747 Da. La HSA incubée à 37 °C avec l'**Asc** pendant une semaine en absence de fer (II) présente une masse moléculaire de 67 027 Da alors que la HSA incubée en présence d'**Asc** et de sulfate de fer (II) en quantité catalytique présente une masse moléculaire de 67 406 Da. L'écart est de 280 Da en absence de fer (II) alors qu'en présence de fer (II) l'écart est de 659 Da. Étant donné la masse moléculaire de l'**Asc** de 168 Da, on pourrait estimer qu'une moyenne de 4 molécules d'**Asc** se seraient fixées sur la molécule de HSA en présence de fer (II) tandis qu'en absence de sulfate de fer (II) seulement la moitié se seraient fixées (*Figure 34*).

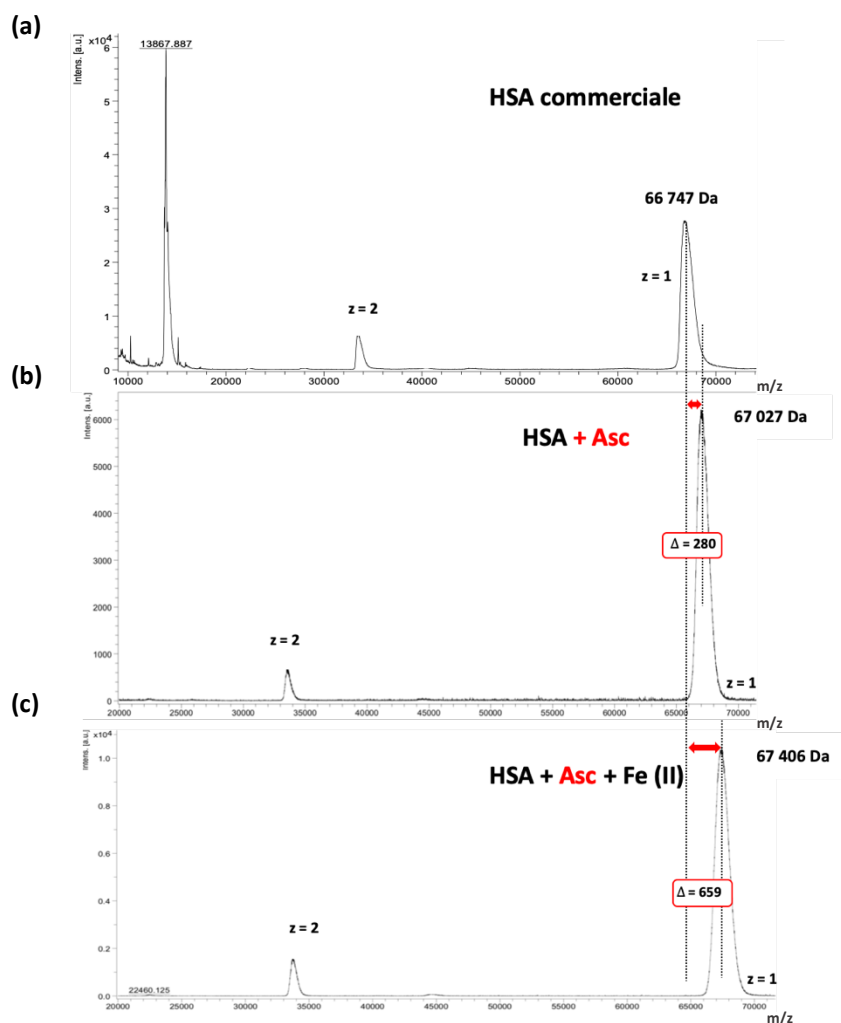


Figure 34 : (a) Spectre de la HSA commerciale ; (b) spectre de la HSA incubée avec l'**Asc** en absence de sulfate de fer (II) ; (c) Spectre de masse du bioconjugué HSA/**Asc**/Fe(II) obtenu après incubation d'une semaine à 37 °C dans un mélange eau déionisée/CH₃CN 9:1.

Il est important de noter que les pics de masse détectés sont larges et ont l'allure de gaussienne. Il s'agit en réalité d'un ensemble de pics non résolus et seul la masse moyenne peut être considérée comme étant le centre de cet ensemble de pics.²⁸ En considérant le pic dans son ensemble, on en déduit que le nombre de molécule d'**Asc** fixées à la HSA varierait de 1 à 8 molécules avec le maximum de la distribution centré sur 4 molécules d'**Asc** par HSA (Figure 35).

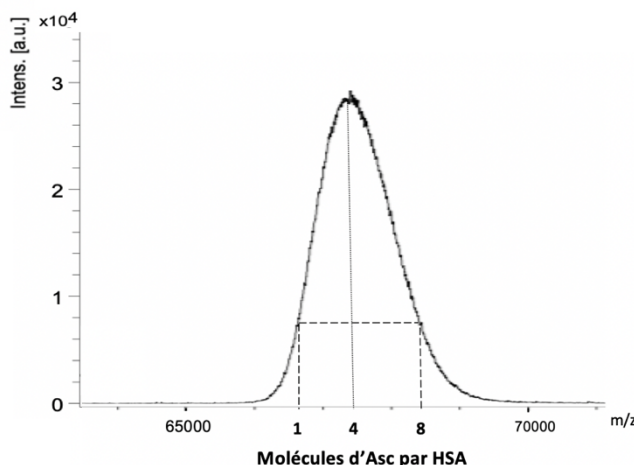


Figure 35 : Distribution du nombre de molécules d'**Asc** fixées à la HSA.

La réactivité vis-à-vis de la HSA des hydroperoxydes allyliques **Lim-2-OOH**, **(1S,4R)-Lim-1-OOH** et **(±)-Citr-7-OOH** a été étudiée en suivant la même procédure décrite précédemment pour l'**Asc**. Les résultats des spectres de masse Maldi-Tof sont résumés dans le *Tableau 1*.

Tableau 1 : Résumé du nombre de molécules d'hydroperoxyde à l'étude fixées à la HSA dans un milieu eau déionisée/CH₃CN 9:1 après une semaine d'incubation à 37 °C.

	Masse (en Da)	Δm (en Da)	Nombre moyen de molécules fixées à la HSA	Distribution du nombre de molécules fixées à la HSA
HSA commerciale	66 747	/	/	/
HSA + Lim-2-OOH	67 242	495	≈ 5	≈ 10
HSA + Lim-2-OOH + Fe(II)	67 272	525	≈ 5	≈ 10
HSA + (1S, 4R)-Lim-1-OOH	67 650	903	≈ 3	≈ 6
HSA + (1S, 4R)-Lim-1-OOH + Fe(II)	67 625	878	≈ 3	≈ 6
HSA + (±)-Citr-7-OOH	67 148	401	≈ 2	≈ 4
HSA + (±)-Citr-7-OOH + Fe(II)	67 221	474	≈ 2	≈ 4

Pour tous les hydroperoxydes étudiés, nous observons que les spectres de Maldi-Tof présentent bien une différence avec la HSA commerciale n'ayant subi aucune modification. Cependant, que ce soit en présence ou en absence de sulfate de fer catalytique, le nombre moyen de molécules d'hydroperoxyde qui se seraient fixées à la HSA reste le même.

Pour tous les composés étudiés, l'analyse de Maldi-Tof n'est pas suffisante pour déterminer le nombre précis de molécules fixées à la HSA. Ainsi, une expertise supplémentaire a été réalisée.

2.5.2. Analyse par spectrométrie ESI-MS/MS

Les échantillons de HSA incubés et les contrôles ont été soumis à une digestion enzymatique à la trypsine dans les conditions décrites par Aleksic et *al.*²⁹ L'objectif était d'identifier les peptides spécifiques dérivés de la HSA contenant des modifications chimiques induites par les composés étudiés. Les mélanges digérés ont été lyophilisés donnant ainsi un nombre important de peptides capable d'être analysé par LC-ESI-MS/MS. La trypsine va permettre le clivage des liaisons peptidiques d'une protéine au niveau des lysines et des arginines. La spectrométrie de masse en tandem ESI-MS/MS a été utilisée pour identifier la séquence d'acides aminés des peptides modifiés par les composés et pour déterminer quel acide aminé a réagi dans la séquence.

A l'issue de ces analyses, les spectres LC-ESI-MS ne nous ont pas apporté les informations souhaitées. Les spectres issus de la digestion trypsique de la HSA commerciale ne nous permettent pas de tirer des conclusions définitives quant au nombre de peptides obtenus. De plus, pour les quatre échantillons HSA-**Asc**, HSA-**Asc-Fe(II)**, HSA-**Lim-2-OOH** et HSA-**Lim-2-OOH-Fe(II)**, seule une masse de m/z 122 a pu être détectée. Après de nombreuses simulations de structures, cette masse n'a pas pu être associée à une structure résultant d'un réarrangement radicalaire des molécules d'études. La non détection de masse importante a pu être expliquée par le fait que la digestion trypsique n'a malheureusement pas eu lieu et de ce fait aucun peptide n'a pu être détecté. Par manque de temps, des études complémentaires n'ont pas pu être menées.

Conclusion

Pour compléter les études concernant l'identification d'intermédiaires radicalaires réactifs issus des composés étudiés, leur réactivité vis-à-vis des acides aminés prédisposant à des réactions radicalaires a été évaluée afin de mieux comprendre leur capacité supposée à former des structures immunogènes en réagissant avec les protéines de la peau par le biais de mécanismes radicalaires.

Les études présentées ici fournissent des informations supplémentaires quant aux mécanismes radicalaires qui pourraient expliquer la réactivité des hydroperoxydes allyliques vis-à-vis des protéines et donc leur potentiel sensibilisant. L'initiation radicalaire à l'aide du sulfate de fer (II) a confirmé que les intermédiaires radicalaires carbonés dérivés des composés d'études sont capables de modifier chimiquement certains acides aminés en formant des liaisons covalentes stables. De même, on sait que la rupture des liaisons O-O des peroxydes et des hydroperoxydes se produit en présence de métaux réduits tels que le Fe(II).

Ainsi, un certain nombre d'intermédiaires radicalaires peuvent être issus de ces composés et être à l'origine de différentes modifications chimiques de protéines potentiellement immunogènes. D'autre part, comme dans le cas de l'ascaridole, ces composés peuvent dans un premier temps subir un réarrangement radicalaire pour former une espèce électrophile qui sera alors capable de réagir *via* un mécanisme à deux électrons (nucléophile-électrophile) pour former un adduit. Ces études qualitatives, même si l'élucidation de la structure chimique exacte des adduits est difficile, ouvrent un nouvel horizon sur la compréhension des mécanismes induisant la modification chimique des biomolécules par des espèces radicalaires carbonées issues de xénobiotiques.

En parallèle, les études vis-à-vis de la protéine modèle nous ont permis de voir par Maldi-Tof une modification de cette protéine lors de l'incubation des molécules cibles. Cependant, les études complémentaires de digestion trypsique et l'analyse par ESI-MS/MS ne nous ont pas permis de déterminer les peptides potentiels portant la modification chimique. Des essais supplémentaires peuvent être reconduits en modifiant les conditions expérimentales de la digestion trypsique. Pour compléter ces essais, il serait intéressant de modifier un paramètre réactionnel quant à la digestion trypsique. D'autre part, un marquage au carbone ^{13}C des positions réactives sur les molécules cibles permettrait l'étude de la bioconjugaison *via* la RMN du ^1H et ^{13}C qui se montreraient plus pratiques pour l'interprétation des spectres. Cette méthode faciliterait également les études menées avec les acides aminés.

Partie expérimentale

Chapitre 2

1. Materials and methods

1.1. Reagents and solvents

All solvents and reagents were used as received and without any further purification. Deionized water and acetonitrile (analytical grade) were deaerated before used by bubbling argon for about 30 minutes.

HSA (lyophilized powder, $\geq 96\%$), trypsin from bovine pancreas (TPCK-Treated, essentially salt-free, lyophilized powder, $\geq 10,000$ BAEE units/mg protein), ammonium bicarbonate, DL-dithiothreitol, iodoacetamide and tris-base were acquired from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and were used as received. Aqueous solutions were prepared with deionized water.

1.2. Follow-up of the reactions

Experiments requiring inert and anhydrous conditions were conducted under argon in glassware previously flamed under vacuum.

The reactions were followed by thin layer chromatography (TLC) using silica gel plates 60 F₂₅₄ (Merck 60 F₂₅₄; thickness 0.25 mm). After elution, the plates were revealed under short-wave UV radiation (254 nm), then immersed in phosphomolybdic acid, anisaldehyde or potassium permanganate solutions followed by heating.

- Phosphomolybdic acid solution (PMA/Ce): phosphomolybdic acid (5 g) and cerium sulfate tetrahydrate (2 g) in a mixture of sulfuric acid (12 mL) and distilled water (188 mL)
- Anisaldehyde solution: *para*-anisaldehyde (0.5 mL) and *ortho*-anisaldehyde (0.5 mL) in a mixture of sulfuric acid (5 mL), acetic acid (100 mL) and ethanol (8 mL)
- Potassium permanganate solution: 1.5 g KMnO₄, 1.25 mL NaOH 10% and 10 g K₂CO₃ in 200 mL water

1.3. Purification of products

Column chromatography purifications were carried out when it was possible by using silica gel 60 (Merck, Gerduran, 40-63 μm).

1.4. Characterization of products

^1H and ^{13}C NMR nuclear magnetic resonance spectra were recorded on Bruker Avance spectrometers at 300 MHz for ^1H and 75 MHz for ^{13}C or 500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C . Chemical shifts (δ) are reported in parts per million (ppm). The chemical shifts (δ) are indirectly referenced to TMS via the residual solvent signal of DMSO (DMSO δ ^1H = 2.50 ppm; δ ^{13}C = 39.5 ppm).

Multiplicities are indicated as s (singlet), br s (broad singlet), d (doublet), dd (doublet of doublets), ddd (doublet of doublet of doublet), t (triplet), q (quadruplet), q (quintuplet), hept (heptuplet), td (triplet of doublets), dt (doublet of triplets), dq (doublet of quadruplets) and m (multiplet). Constant couplings (J) are given in Hertz (Hz). Signal attributions were determined either on the basis of unambiguous chemical shifts or coupling patterns. Heteronuclear single quantum correlation (HSQC) and heteronuclear multiple bond correlation (HMBC) experiments were performed when necessary to complete spectral assignment.

Maldi-Tof mass spectra were acquired on a time-of-flight mass spectrometer (Maldi-Tof Autoflex Speed LRF, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with a nitrogen laser (λ = 337 nm). An external multi-point calibration was carried out before each measurement. Scan accumulation and data processing were performed with FlexAnalysis 3.0 software. α -Cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (CHCA) and sinapinic acid (SA) were obtained from Sigma (St Louis, MO, USA). Matrix solutions were freshly prepared. CHCA and SA were dissolved to saturation in a mixture $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{HCOOH}$ (50/50,1%). Typically, 0.5 μL of a mixture containing the sample solution and the matrix (1/1) was deposited on the stainless-steel plate.

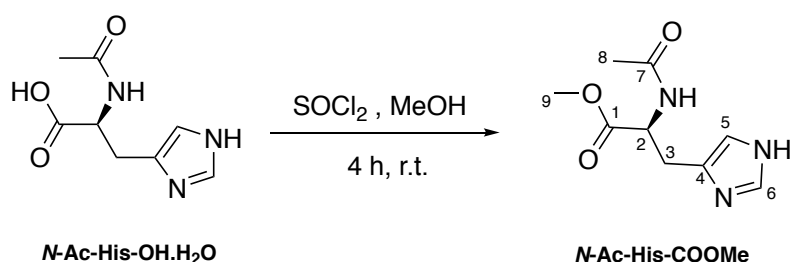
LC-ESI-MS/MS analyses were performed using an ion trap mass Agilent QToF spectrometer connected to an Agilent 1200 HPLC system. The samples were subjected to reverse phase chromatography on a Zorbax SB-C18 column (50 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm particle size) at a flow rate of 0.5 mL/min. They were eluted from the column using a mobile phase A (0.05% formic acid in acetonitrile) and a mobile phase B (0.05% formic acid in H_2O) with the following gradient: started at 98% B and decreased to 0% B after 8 min, kept at 0% B during 12.5 min, and increased again to 98% B after 12.5 min, kept at 98% B during 13 min at the end. After passing through the diode array absorbance detector, the eluent was directed to the connected ion trap mass spectrometer with a standard electrospray source. The ionization method used was ESI in the positive ion mode (heated capillary temperature 340°C, gas flow 8 L/min, nebulizer gas 30 psi). Full scan mass spectra were acquired in the profile mode scanning m/z 50 to 1000. For the ESI-MS/MS studies, the mass spectrometer was equipped with the ESI source used for ESI-MS studies described above and with the same source parameter settings. The ionization mode was ESI in the positive ion mode. The isolation width

was 4 m/z . Data were processed using the Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis software. Only molecular ions detected by LC-ESI-MS having an m/z value in accordance with potential adducts were considered as molecular species provided that they were relatively abundant. Even if unlikely, the eventuality of these ions being fragments of other molecular species cannot be excluded.

1.5. Reactivity with amino acids: general procedure presented here for **Asc**

Asc (100 mg, 0.59 mmol) was dissolved in deaerated 1:1 (v/v) H_2O/CH_3CN (15 mL). The amino acids (2.0 eq) were added together with a catalytic amount (0.1 eq) of $FeSO_4 \cdot 7H_2O$. The reaction mixtures were continuously stirred at room temperature, hidden from light and kept under an argon atmosphere to minimize competing reactions with oxygen. Reactions were monitored by TLC (0.25 mm silica gel plates; $60F_{254}$). After migration, TLC plates were inspected under UV light (254 nm) then sprayed with the previously described phosphomolybdic acid solution, anisaldehyde solution or potassium permanganate solution followed by heating. Reactions were stopped after 7 days if **Asc** was still present in the reaction mixtures and the reactions did not evolve after that time. The mixtures were filtered on celite (Celite 545) in order to remove iron salts and the filtrate solvent was removed under reduced pressure. Crude products were separated by chromatography on silica gel when possible or were analyzed by LC-ESI-MS combined to ESI-MS/MS.

2. Synthesis of *N*-acetyl-histidine methyl ester (*N*-Ac-His-COOMe)



N-Acetyl-histidine monohydrate (5.5 g, 25.4 mmol, 1.0 eq) was added to a mixture of anhydrous methanol (51 mL) and thionyl chloride (3.5 mL, 48.2 mmol, 1.9 eq). The reaction mixture was stirred at room temperature under an argon atmosphere for 4 h. The solvent was then removed under reduced pressure, distilled water (40 mL) was added followed by the addition of sodium hydrogenocarbonate until pH 4-5. The solvent was removed affording a

residue, which was purified by column chromatography on neutralized silica (AcOEt/MeOH 8:2) to give *N*-acetyl-histidine methyl ester as a white solid (4.2 g, 79 %).

Formula: C₉H₁₃N₃O₃

Molar mass: 211.22

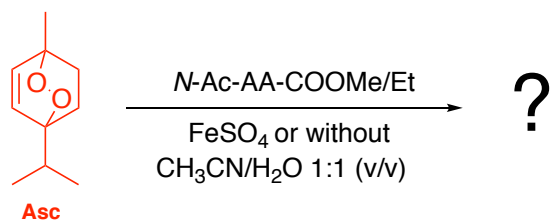
CAS number: 51276-32-5

TLC: R_f = 0.37 (CHCl₃/MeOH/AcOH 5:3:1) Rev: PMA/Ce

¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ (ppm): 1.82 (s, 3 H, **H-8**), 3.03 (dd, 1 H, ²J_{H3-H3} = 14.9, ³J_{H3-H2} = 5.2 Hz, **H-3**), 3.13 (dd, 1 H, ²J_{H3-H3} = 14.95 Hz, ³J_{H3-H4} = 8.0 Hz, **H-3**), 3.62 (s, 3 H, **H-9**), 4.52-4.56 (ddd, 1 H, ³J_{H2-H3} = 8.0 Hz, ³J_{H2-NH} = 7.3 Hz, ³J_{H2-H3} = 5.15 Hz, **H-2**), 7.41 (s, 1 H, **H-6**), 8.62 (d, 1 H, ³J_{H5-NH} = 7.1 Hz, **H-5**), 9.0 (d, 1 H, ³J_{NH-H5} = 7.3 Hz, -NH)

¹³C NMR (125 MHz, DMSO) δ (ppm): 22.3 (**C-8**), 25.9 (**C-3**), 51.5 (**C-2**), 52.2 (**C-9**), 116.9 (**C-5**), 129.1 (**C-4**), 133.6 (**C-6**), 169.6 (**C-7**), 171.2 (**C-1**)

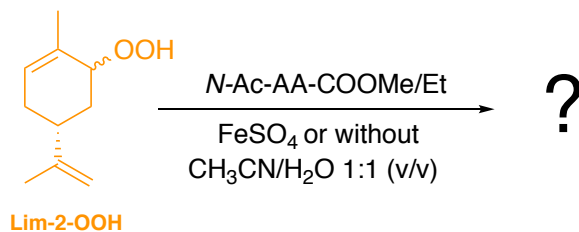
3. Experiments with ascaridole (Asc)



The following table presents the structures proposed for the products observed during the experiments with acaridole as a function of the reaction conditions.

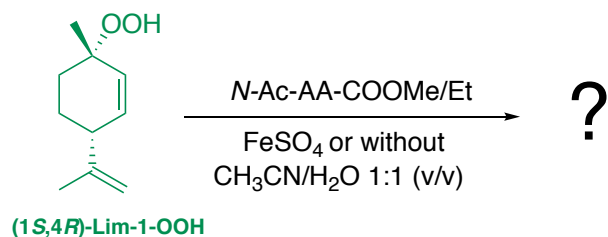
	Fe(II)	Asc (mg)	Solvent (mL)	Time of reaction (days)	Proposed structures oxidized products	Proposed structures addition products
<i>N</i> -Ac-Cys-COOMe	√	100	15	12 hours	29, 30	31, 32, 33
	/	100	15	7	/	/
<i>N</i> -Ac-Tyr-COOEt	√	100	15	7	Pummerer-like ketone <i>N</i>-Ac-Tyr-COOEt dimer	/
	/	100	15	7	/	/
<i>N</i> -Ac-Trp-COOEt	√	100	15	7	Mohydroxylated derivative <i>N</i>-Ac- kynurénine- COOEt	/
	/	100	15	7	/	/
<i>N</i> -Ac-His-COOEt	√	100	15	7	/	/
	/	100	15	7	/	/
<i>N</i> -Ac-Lys -COOEt	√	100	15	7	/	/
	/	100	15	7	/	/

4. Experiments with Lim-2-OOH



The following table presents the structures proposed for the products observed during the experiments with Lim-2-OOH as a function of the reaction conditions.

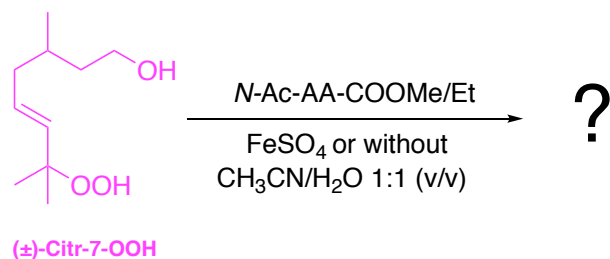
	Fe(II)	Lim-2-OOH (mg)	Solvent (mL)	Time of reaction (days)	Proposed structures oxidized products	Proposed structures addition products
N-Ac-Cys-COOMe	√	100	15	2	/	34,35,36,37
	/	100	15	7	/	
N-Ac-Tyr-COOEt	√	100	15	7	Pummerer-like ketone N-Ac-Tyr-COOEt dimer	/
	/	100	15	7	38	/
N-Ac-Trp-COOEt	√	100	15	7	Mohydroxylated derivative N-Ac- kynurénine-COOEt	/
	/	100	15	7	/	/
N-Ac-His-COOEt	√	100	15	7	/	40, 41
	/	100	15	7	/	/
N-Ac-Lys -COOEt	√	100	15	7	/	/
	/	100	15	7	/	/

5. Experiments with (1*S*, 4*R*)-Lim-1-OOH


The following table presents the structures proposed for the products observed during the experiments with (1*S*,4*R*)-Lim-1-OOH as a function of the reaction conditions

	Fe(II)	(1 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)- Lim-1- OOH (mg)	Solvent (mL)	Time of reaction (days)	Proposed structures oxidized products	Proposed structures addition products
<i>N</i> -Ac-Cys-COOMe	√	100	15	3	/	/
	/	100	15	7	/	/
<i>N</i> -Ac-Tyr-COOEt	√	100	15	7	Pummerer-like ketone <i>N</i>-Ac-Tyr-COOEt dimer	42
	/	100	15	7	/	/
<i>N</i> -Ac-Trp-COOEt	√	100	15	7	/	/
	/	100	15	7	/	/
<i>N</i> -Ac-His-COOEt	√	100	15	7	/	/
	/	100	15	7	/	/
<i>N</i> -Ac-Lys -COOEt	√	100	15	7	/	/
	/	100	15	7	/	/

6. Experiments with (±)-Citr-7-OOH



The following table presents the structures proposed for the products observed during the experiments with (±)-Citr-7-OOH as a function of the reaction conditions.

	Fe(II)	(±)- Citr-7-OOH (mg)	Solvent (mL)	Time of reaction (days)	Proposed structures oxidized products	Proposed structures addition products
<i>N</i> -Ac-Cys-COOMe	√	100	15	12 hours	/	43
	/	100	15	7	/	/
<i>N</i> -Ac-Tyr-COOEt	√	100	15	7	Pummerer-like ketone <i>N</i>-Ac-Tyr-COOEt dimer	/
	/	100	15	7	/	/
<i>N</i> -Ac-Trp-COOEt	√	100	15	7	Mohydroxylated derivative	/
	/	100	15	7	/	/
<i>N</i> -Ac-His-COOEt	√	100	15	7	/	44, 45
	/	100	15	7	/	/
<i>N</i> -Ac-Lys -COOEt	√	100	15	7	/	/
	/	100	15	7	/	/

7. Experiments with HSA

7.1. Preparation of solutions

Tris buffer solution (0.6 M, pH 8.5) was prepared with Tris-base (36.3 g), completed with deionized water up to 500mL and pH adjusted to 8.5 with acetic acid if necessary.

Ammonium bicarbonate buffer solution (50 mM) was prepared with ammonium bicarbonate (3.95 g) then completed with deionized water up to 1 L.

Dithiothreitol solution (200 mM) was prepared with dithiothreitol (7.71 mg) then completed with Tris buffer up to 250 mL.

Iodoacetamide solution (200 mM) was prepared with iodoacetamide (7.4 g) then completed with Tris buffer up to 200 mL.

Hypochloride solution was prepared with hypochloride (37 %, 817 μ L) then completed with deionized water up to 100 mL.

7.2. Experimental conditions

HSA (100 mg, 1.5 μ mol, 1.0 eq) was incubated with a large excess of chemical (25 μ L, 150 μ mol, 100.0 eq) at 37 °C in deaerated 9:1 (v/v) deionized water /acetonitrile (10 mL) under an argon atmosphere. Iron sulfate heptahydrate (0.2 mg, 0.75 μ mol, 0.5 eq) was then added. A control was realized without iron. After 7 days, the mixture was dialyzed using a suitable molecular weight cut-off membrane (Spectra/Por® Dialysis Membrane MWCO: 12-14,000), placing samples inside the membrane, closing them with clip supports and submerging them into a large volume of deionized water (3 L beaker). Deionized water was changed a couple of times and after 1 week, samples were lyophilized. After a night of freeze-drying, the samples were sent for Maldi-ToF studies.

In these experiments, 6 mg of HSA (or samples containing HSA incubated with target molecules) were dissolved in 600 μ L of a Tris buffer solution. Then, 30 μ L dithiothreitol were added at room temperature for 1 h at 37 °C to reduce the protein mixture, followed by cooling down to room temperature. Then, 120 μ L iodoacetamide were added with incubation at room temperature in the dark for 1 h. The reaction was terminated by dialysis against ammonium bicarbonate buffer (50 mM) at room temperature for 24 h with at least one change of buffer (as described above). The samples were lyophilised overnight.

For tryptic digestion, the lyophilized sample (6 mg) was dissolved in 600 μ L of 50 mM ammonium bicarbonate solution. A solution of TPCK treated bovine trypsin in hypochloride

solution 0.01 M was added (1 mL containing 0.2 mg of trypsin).³⁰ The reaction was incubated at 37 °C for 24 h and then lyophilized. After a night of freeze-drying, the samples were sent for LC-ESI-MS/MS analysis.

Références bibliographiques

Chapitre 2

1. Giménez-Arnau, E.; Haberkorn, L.; Grossi, L.; Lepoittevin, J. -P. Identification of radical species derived from allergenic 15-hydroperoxyabiatic acid and insights into the behaviour of cyclic tertiary allylic hydroperoxides in Fe(II)/Fe(III) systems. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 5680-5691.
2. Gardner, H. W.; Kleiman, R. Degradation of linoleic acid hydroperoxides by a cysteine. FeCl₃ catalyst as a model for similar biochemical reactions. *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, *665*, 113-125.
3. Kao, D.; Chaintreau, A.; Lepoittevin, J. -P.; Giménez-Arnau, E. Mechanistic studies on the reactivity of sensitizing allylic hydroperoxides: investigation of the covalent modification of amino acids by carbon-radical intermediates. *Toxicol. Res.* **2014**, *3*, 278-289.
4. Gardner, H. W.; Plattner, R. D.; Weisleder, D. The epoxy- allylic radical from homolysis and rearrangement of methyl linoleate hydroperoxide combines with the thiyl radical of N-acetylcysteine. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *834*, 65-74.
5. Gardner, H. W.; Weisleder, D.; Kleiman, R. Addition of N-acetylcysteine to linoleic acid hydroperoxide. *Lipids* **1976**, *11*, 127-134.
6. Grossi, L. Evidence of an electron-transfer mechanism in the peroxyxynitrite-mediated oxidation of 4-alkylphenols and tyrosine. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 6349-6353.
7. Bartesaghi, S.; Wenzel, J.; Trujillo, M.; Lopez, M.; Joseph, J.; Kalyanaraman, B.; Radi, R. Lipid peroxy radicals mediate tyrosine dimerization and nitration in membranes, *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23*, 821-835.
8. Carroll, L.; Pattison, D. I.; Davies, J. B.; Anderson, R. F.; Lopez-Alarcon, C.; Davies, M. J. Superoxide radicals react with peptide-derived tryptophan radicals with very high rate constants to give hydroperoxydes as major products. *Free Radic. Biol. Med.* **2018**, *118*, 126-136.
9. Lassmann, G.; Eriksson, L. A.; Lenzian, F.; Lubitz, W. Structure of a transient neutral histidine radical in solution: EPR continuous-flow. Studies in a Ti³⁺/EDTA - Fenton system and density functional calculations. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 9144-9152.
10. Joshi, S.; Husain, M. M.; Chandra, R.; Hasan, S. K.; Srivastava, R. C. Hydroxyl radical formation resulting from the interaction of nickel complexes of L-histidine, glutathione or L-cysteine and hydrogen peroxide. *Hum. Exp. Toxicol.* **2005**, *24*, 13-17.
11. Kato, Y.; Mori, Y.; Makino, Y.; Morimitsu, Y.; Hiroi, S.; Ishikawa, T.; Osawa, T. Formation of Nε-(hexanonyl)-lysine in protein exposed to lipid hydroperoxide. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 20406-20414.
12. Boisramé-Helms, J; Boivin, A.; Delabranche, X.; Meziani, F. Albumine humaine comme traitement adjuvant du sepsis et du choc septique : mythe et réalité. *Réanimation* **2014**, *23*, 148-158.
13. Meloun, B.; Moraveck, L.; Kostka, V. Complete amino acid sequence of human serum albumin. *FEBS Lett.* **1975**, *58*, 134-137.

14. Nicholson, J.-P.; Wolmarans, M. R.; Park, G. R. The role of albumin in critical illness. *Br. J. Anaesth.* **2000**, *85*, 599-610.
15. Alvarez-Sánchez, R.; Divkovic, M.; Basketter, B.; Pease, C.; Panico, M.; Dell, A.; Morris, H.; Lepoittevin, J. -P. Effect of glutathione on the covalent binding of the ¹³C-labeled skin sensitizer 5-chloro-2-methylisothiazol-3-one (MCI) to human serum albumin: identification of adducts by NMR, MALDI-MS, and nano-ES MS/MS. *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, *17*, 1280-1288.
16. Dietz, L.; Esser, P. R.; Schumcker, S. S.; Goette, I.; Richter, A.; Schnölzer, M.; Martin, S. F.; Thierse, H. -J. Tracking human contact allergens: from mass spectrometric identification of peptide-bound reactive small chemicals to chemical-specific naïve human T-cell priming. *Toxicol. Sci.* **2010**, *117*, 336-347.
17. Jenkinson, C.; Jenkins, R. E.; Aleksic, M.; Pirmohamed, M.; Naisbitt, D. J.; Park, B. K. Characterization of p-phenylenediamine-albumin binding sites and T-cell responses to haptent-modified protein. *J. Invest. Dermatol.* **2010**, *130*, 732-742.
18. Thierse, H. -J.; Moulon, C.; Allespach, Y.; Zimmermann, B.; Doetze, A.; Kuppig, S.; Wild, D.; Herberg, F.; Weltzien H. U. Metal-protein complex-mediated transport and delivery of Ni²⁺ to TCR/MHC contact sites in Nickel-specific human T cell activation. *J. Immunol.* **2004**, *172*, 1926-1934.
19. O'Neill, P. M.; Barton, V. E.; Ward, S. A. The molecular mechanism of action of artemisinin-the debate continues. *Molecules* **2010**, *15*, 1705-1721.
20. Wang, D. -Y.; Wu, Y. -L.; Wu, Y.; Liang, J.; Li, Y. Further evidence for the participation of primary carbon-centered free radicals in the antimalarial action of the *qinghaosu* (artemisinin) series of compounds. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2001**, 605-609.
21. Chittiboyina, A. G.; Avonto, C.; Khan, I. A. What happens after activation of ascaridole? Reactive compounds and their implications for skin sensitization. *Chem. Res. Toxicol.* **2016**, *29*, 1488-1492.
22. Satyal, P.; Paudel, P.; Kafme, A.; Pokharel, S. K.; Lamichhane, B.; Dosoky, N. S. Bioactivities of volatile components from Nepalese *Artemisia* species. *Nat. Prod. Commun.* **2012**, *12*, 1651-1658.
23. Giulivi, C.; Traaseth, N. J.; Davies, K. J. A. Tyrosine oxidation products: analysis and biological relevance. *Amino Acids* **2003**, *25*, 227-232.
24. Schwarcz, R. The kynurenine pathway of tryptophan degradation as a drug target. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2004**, *4*, 12-17.
25. Krutz, N. L.; Hennen, J.; Korb, C.; Schellenberger, M. T.; Gerberick, G. F.; Blömeke, B. Activation of the endoperoxide ascaridole modulates its sensitizing capacity. *Toxicol. Sci.* **2015**, *147*, 515-523.
26. Perfetti, X.; O'Mathuna, B.; Pizarro, N.; Cuyas, E.; Khymenets, O.; Almeida, B.; Pellegrini, M.; Pichini, S.; Lau, S. S.; Monks, T. J.; Farré, M.; Pascual, J. -A.; Joglar, J.; De la Torre, R. Neurotoxic thioether adducts of 3,4-methyl-enedioxymethamphetamine identified in human urine after ecstasy ingestion. *Drug Metab. Dispos.* **2009**, *37*, 1448-1455.

27. Grossi, L.; Strazzari, S.; Gilbert, B. C.; Whitwood, A. C. Oxiranylcarbonyl radicals from allyloxyl radical cyclization: characterization and kinetic information via ESR spectroscopy. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 8366-8372.
28. Scornet, N. Étude de l'allergie aux antibiotiques : synthèse de peptides antigéniques. Doctorat de l'Université de Paris Sud, **2015**.
29. Aleksic, M.; Pease, C. K.; Basketter, D. A.; Panico, M.; Morris, H. R.; Dell, A. Investigating protein haptentation mechanisms of skin sensitizers using human serum albumin as a model protein. *Toxicol. in Vitro* **2007**, *21*, 723-733.
30. Walmsley, S. J.; Rudnick, P.A.; Liang, Y.; Dong, Q.; Stein, S. E.; Nesvizhskii, A. I. Comprehensive analysis of protein digestion using six trypsins reveals the origin of trypsin as a significant source of variability in proteomics. *J. Proteome Res.* **2013**, *12*, 5666-5680.

Chapitre 3

Mise en évidence des intermédiaires radicalaires en solution et dans des épidermes humains reconstitués

Introduction

Lors du processus de sensibilisation cutanée à un produit chimique, la première étape clé est la réaction de l'allergène avec les protéines de la peau après avoir pénétré dans l'épiderme. Les hydroperoxydes sensibilisants dérivés de l'autoxydation de terpènes sont susceptibles d'interagir avec les protéines *via* des mécanismes de type radicalaire pour ainsi former les complexes antigéniques. Jusqu'à présent, les études sur les intermédiaires radicalaires réactifs dérivés de ces sensibilisants cutanés ont été menées en solution, bien que les conditions expérimentales soient toutefois très éloignées de la sensibilisation dans la vie réelle.^{1,2,3}

Depuis plusieurs années, l'équipe de Dermatochimie de l'Université de Strasbourg s'intéresse à l'identification et à la caractérisation de ces espèces radicalaires.⁴ Pour ce faire, la technique de piégeage de spin associée à la Résonance Paramagnétique Électronique (RPE), utilisée pour l'identification des radicaux transitoires RO[•]/ROO[•]/R[•] dans les systèmes chimiques et biologiques, permet une identification des radicaux réactifs potentiels issus des molécules cibles. En effet, en raison de leur courte durée de vie, la grande majorité des radicaux libres (ROS, RNS ...) ne sont pas détectables directement par RPE.

Dans ce chapitre, il s'agira dans un premier temps de décrire la technique de piégeage radicalaire associée à la RPE. Dans un second temps, nous détaillerons l'approche expérimentale en deux étapes : (1) l'étude de la génération de radicaux libres en solution et (2) la génération *ex vivo* de radicaux libres dans un modèle 3D d'épiderme humain reconstitué (RHE). Enfin, dans le but d'identifier de manière précise les radicaux formés, des études de substitution au carbone 13 seront présentées.

1. Résonance paramagnétique électronique

Le phénomène de résonance magnétique est associé à l'absorption de l'énergie provenant d'un champ électromagnétique qui accompagne le changement d'orientation du spin des électrons ou des noyaux dans le champ magnétique externe. En comparaison avec la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) qui se focalise sur le comportement du noyau dans un champ magnétique externe, la RPE se concentre sur celui de centres paramagnétiques tel que l'électron non apparié.

1.1. Un peu d'histoire

Bien que le principe fondamental de la RPE repose sur l'effet Zeeman, découvert en 1902 (voir section 1.2.2 de ce chapitre), les origines de la RPE sont associées à l'expérience fondatrice de Stern-Gerlach. Ces derniers ont observé qu'un faisceau d'atomes d'argent se divise en deux lignes lorsqu'il traverse un champ magnétique non uniforme. Par cette expérience, il a été montré que le moment magnétique des électrons ne peut adopter que deux orientations possibles dans un champ magnétique, et ce malgré la sphéricité de l'atome.⁵

Après diverses études sur l'influence du champ magnétique statique sur les niveaux d'énergie obtenus ou encore sur la transition entre les niveaux induits par les champs oscillants, Rabi *et al.* ont été les premiers à observer le phénomène de résonance magnétique.^{6,7} Cette découverte value à Rabi le prix Nobel de physique en 1944.⁸

Par la suite, le physicien russe E. Zavoïsky en étudiant des sels paramagnétiques, a accompli une avancée importante dans l'histoire de la RPE. En 1945, Il a été le premier à observer un signal de RPE correspondant à la raie d'absorption de radiofréquence d'un échantillon de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.⁹

Depuis cette période pionnière, la RPE a sans cesse été perfectionnée et a vu ses champs d'applications possible s'étendre au point de devenir aujourd'hui un instrument incontournable dans bon nombre de domaines en allant de la chimie et la recherche biomédicale à la physique de l'état solide et des matériaux.^{10,11} En particulier, la RPE est appliquée avec succès à la compréhension de nombreux processus physiologiques allant de la détection et caractérisation *in vivo* d'espèces de l'azote réactif (RNS) et des espèces oxygénées (ROS) et à l'oxymétrie des tumeurs, à l'évaluation de l'état redox des tissus biologiques.¹² De plus, le développement plus récent de l'imagerie RPE permet d'approfondir les études biologiques dans la détection des mécanismes radicalaires *in vivo*.¹³

1.2. Principe de base de la RPE

1.2.1. Notion de spin et de moment magnétique de l'électron

Les électrons non appariés possèdent un moment angulaire intrinsèque appelé spin qui est présent sans forces externes. Par conséquent, chaque électron libre induit un champ magnétique en raison de sa charge en mouvement et agit alors comme un petit dipôle magnétique possédant un moment magnétique (*Figure 1*).

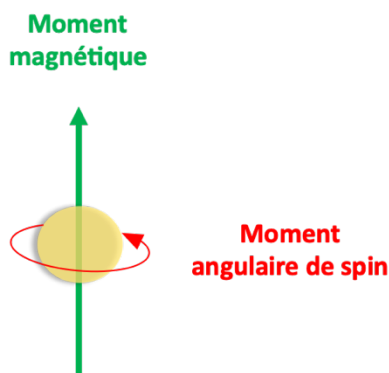


Figure 1 : Électron libre non apparié possédant un moment angulaire de spin (flèche incurvée rouge) associé un moment magnétique (flèche verticale verte).

Le spin de l'électron est caractérisé par le nombre quantique $S = \frac{1}{2}$, avec des composantes magnétiques $m_S = +\frac{1}{2}$ (spin α) et $m_S = -\frac{1}{2}$ (spin β). Le moment magnétique $\vec{\mu}_S$ associé à l'électron est exprimé par l'équation suivante :

$$\vec{\mu}_S = -\gamma_S \frac{h}{2\pi} \vec{S} = -g\beta_e \vec{S} \quad (I)$$

avec γ_S rapport gyromagnétique de l'électron,

h la constante de Planck ($6,62607 \cdot 10^{-34} \text{ m}^2 \cdot \text{kg} \cdot \text{s}^{-1}$),

g facteur sans dimension, appelé facteur de Landé ou « facteur g » caractéristique de l'échantillon étudié car il dépend exclusivement de la structure électronique du composé d'étude. A titre d'illustration, le paramètre g de l'électron libre correspond à $g = g_e = 2,0023193043617$ (52)

β_e le magnéton de Bohr ($\beta_e = 9,27401 \cdot 10^{-24} \text{ A} \cdot \text{m}^2$).

Ainsi, la RPE présente les mêmes concepts que la RMN. Cependant, la différence repose sur le moment magnétique qui s'avère être plus important pour les spins électroniques que pour les spins nucléaires. La RPE est donc une méthode plus sensible et est adaptée à la détection d'espèces paramagnétiques possédant un électron non apparié tels que les radicaux libres et les sels métalliques.

1.2.2. L'effet Zeeman

La RPE consiste à induire des transitions entre deux états de spin électroniques dont la dégénérescence est levée lorsqu'un champ magnétique est appliqué. On parle alors d'effet Zeeman. En l'absence de champ magnétique les niveaux électroniques, pour lesquels $m_S = \pm \frac{1}{2}$, sont dégénérés, mais lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique externe (B_0) parallèle à l'axe des z , l'énergie de l'électron est définie selon l'équation :

$$E = - \vec{\mu} \cdot \vec{B}_0 \quad (II)$$

Lorsqu'on se trouve en présence d'un champ magnétique B_0 , les électrons s'alignent suivant deux orientations dans l'espace, parallèle ou antiparallèle au champ B_0 . Ces deux orientations permises déterminent deux états énergétiques différents et la levée de dégénérescence (*Figure 2*) est exprimée par l'Hamiltonien Zeeman :

$$\vec{H}_{\text{Zeeman}} = - \vec{\mu} \cdot \vec{B}_0 = g\beta_e \vec{S} \cdot \vec{B}_0 = g\beta_e S_z \quad (III)$$

avec : S_z est la projection de l'opérateur de spin électronique sur l'axe z associé à la direction du champ magnétique \vec{B}_0

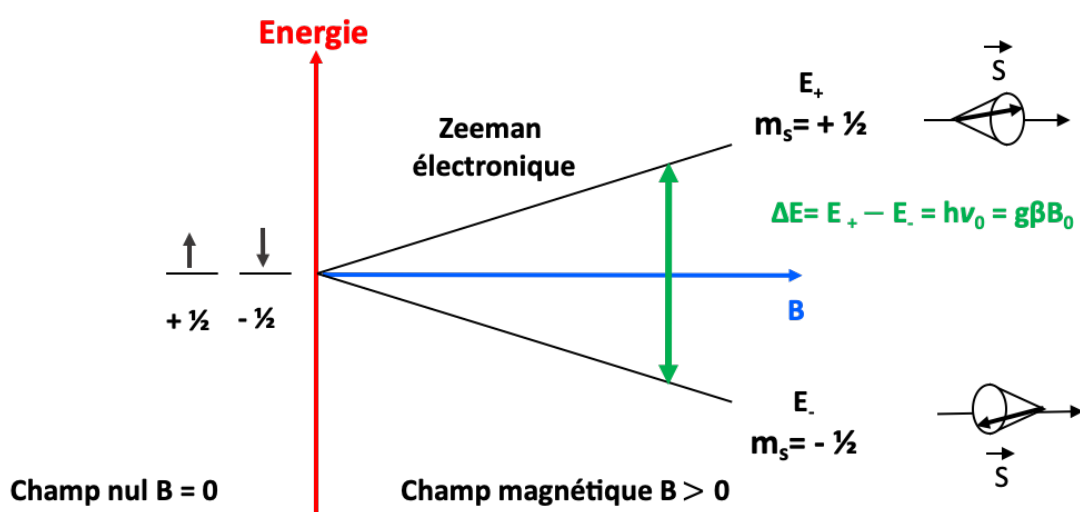


Figure 2 : Levée de dégénérescence des niveaux d'énergie de spin électronique $S = 1/2$ sous l'action d'un champ magnétique B .

Ce phénomène a été découvert par le physicien néerlandais Pieter Zeeman qui lui valut le second prix Nobel de physique de l'Histoire en 1902.¹⁴

Une transition de spin d'un niveau énergétique $m_s = - 1/2$ vers un niveau $m_s = + 1/2$ peut être induite par l'absorption d'une radiation électromagnétique d'énergie ΔE et de fréquence ν perpendiculaire au champ magnétique B . Lorsque la différence entre les deux niveaux énergétiques devient égale à l'énergie fournie, les photons $h\nu$ sont absorbés et cela se traduit par l'équation (IV) qui constitue la condition de résonance :

$$\Delta E = h\nu = E_+ - E_- = + 1/2 g\beta_e B_0 - (- 1/2 g\beta_e B_0) = g\beta_e B_0 \quad (IV)$$

Il en découle :

$$g = \frac{h \nu}{\beta_e B_0} \sim 0,714484 \frac{\nu(\text{MHz})}{B_0(\text{G})} \quad (\text{V})$$

Ainsi, la détection de cette énergie absorbée lorsque de la condition de résonance est satisfaite fait de la RPE une spectroscopie d'absorption où la fréquence ν de l'onde électromagnétique utilisée se situe généralement dans le domaine des micro-ondes ou hyperfréquences (ca. 1-300 GHz). Dans ce travail, l'appareil utilisé est un spectromètre RPE continue dit de bande X ce qui correspond à une fréquence d'excitation de ca. 10 GHz.

Il est également à noter que pour des raisons de sensibilité de détection, le champ magnétique B est modulé (généralement à 100 kHz, suivant un système de détection synchrone)¹⁵ : le signal de RPE observé correspond alors à la dérivée première du signal d'absorption (Figure 3).

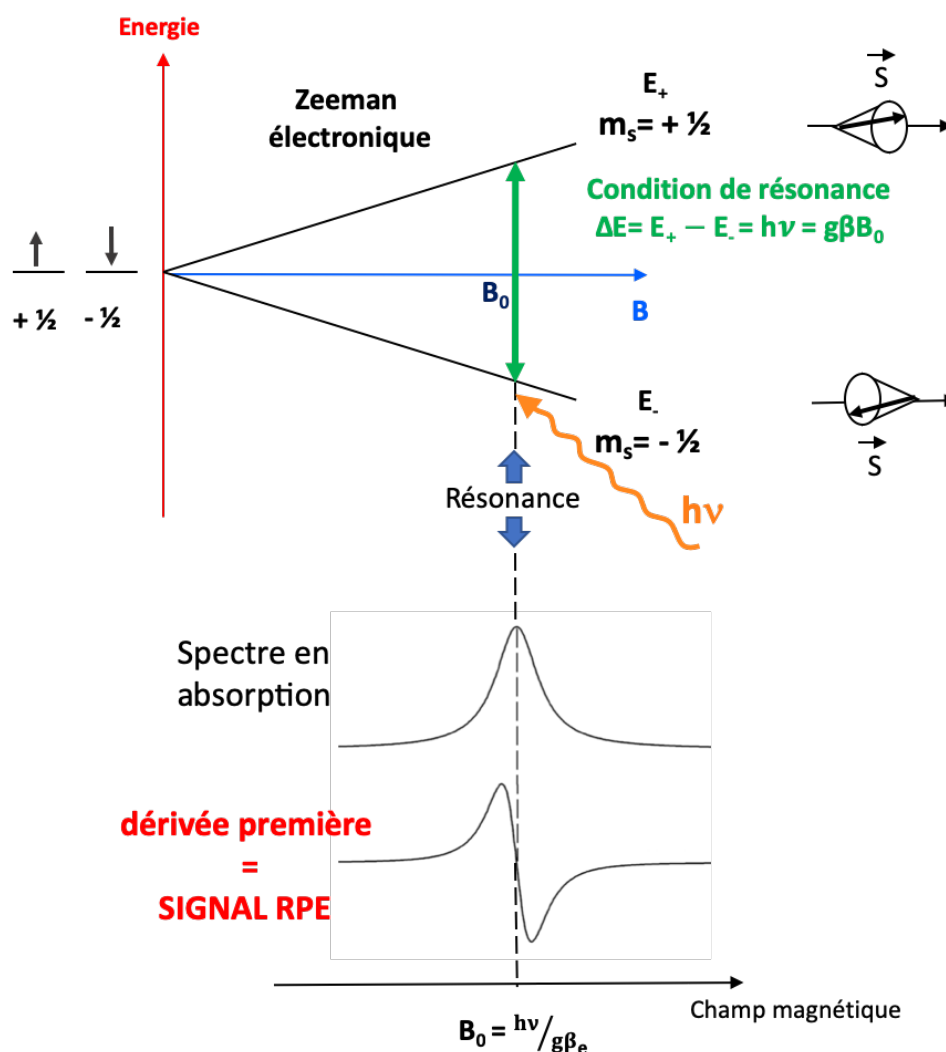


Figure 3 : Niveau d'énergie pour un système isotrope de spin $S = 1/2$ en fonction du champ magnétique B et spectre de RPE obtenu lors que la condition de résonance est vérifiée.

1.2.3. Les interactions hyperfines

Outre la détection d'un centre paramagnétique *per se*, la spectroscopie RPE peut également permettre d'identifier l'environnement de l'électron non apparié sondé. Lorsque, ce dernier se trouve à proximité de noyaux possédant un spin nucléaire I non nul, le champ magnétique perçu par le spin électronique est perturbé en raison de l'interaction dipolaire entre l'électron non apparié et ces noyaux voisins. L'interaction résultante entre les moments magnétiques des spins électronique S et nucléaire I est appelée interaction hyperfine. Une telle interaction est isotrope dans nos conditions expérimentales et est décrite par l'hamiltonien suivant qui se superpose à celui de Zeeman précédemment cité (voir équation (III)) :

$$\vec{H}_{\text{Hyperfine}} = a_{\text{iso}} \vec{S} \cdot \vec{I} \quad (\text{VI})$$

avec : a_{iso} la constante de couplage hyperfine isotrope (hfcc, pour *hyperfine coupling constant* en anglais) représentant l'énergie d'interaction entre l'électronique et le spin nucléaire

\vec{I} l'opérateur de spin nucléaire

Cette interaction dépend du rapport gyromagnétique du noyau mais également de la densité de spin présente sur le noyau. Ces deux paramètres sont d'autant plus importants que la constante de couplage hyperfine est grande. L'abondance naturelle, le spin nucléaire et le rapport gyromagnétique de quelques noyaux sont présentés dans le *Tableau 1*.

Tableau 1 : Abondance naturelle, spins nucléaires et rapports gyromagnétiques de quelques noyaux.

Noyau	Abondance naturelle (%)	Spin nucléaire	Rapport gyromagnétique (rad.s ⁻¹ .T ⁻¹)
¹ H	99,987	1/2	267,513
² H	0,015	1	41,066
¹³ C	1,07	1/2	67,262
¹⁴ N	99,634	1	19,338
¹⁵ N	0,336	1/2	-27,116
¹⁷ O	0,038	5/2	-36,279
¹⁹ F	100	1/2	25,181
³¹ P	100	1/2	108,291

L'hamiltonien décrivant le système de spin électronique (S) et nucléaire (I) est donc le suivant :

$$\vec{H}_{SI} = \vec{H}_{Zeeman} + \vec{H}_{Hyperfine} = g\beta_e \vec{S} \cdot \vec{B}_0 + a_{iso} \vec{S} \cdot \vec{I} \quad (VII)$$

In fine, cette interaction hyperfine va conduire à la subdivision de chaque niveau électronique m_s en $2I+1$ sous niveaux de valeur m_I , où I caractérise le nombre quantique de spin nucléaire. L'énergie $E(m_s, m_I)$ d'un tel système à la résonance s'écrit :

$$E(m_s, m_I) = g\beta_e B_0 m_s + m_s a_{iso} m_I \quad (VIII)$$

En RPE, les transitions électroniques autorisées sont celles pour lesquelles $\Delta m_s = \pm 1$ et $\Delta m_I = 0$. Un exemple simple est lorsqu'un système de spin électronique ($m_s = \pm 1/2$) est en interaction avec un noyau proton 1H voisin ($I = 1/2$) on peut donc observer $2I + 1 = 2$ transitions dont l'espacement entre les raies observées correspond à la constante de couplage hyperfine isotrope a_H (Figure 4).

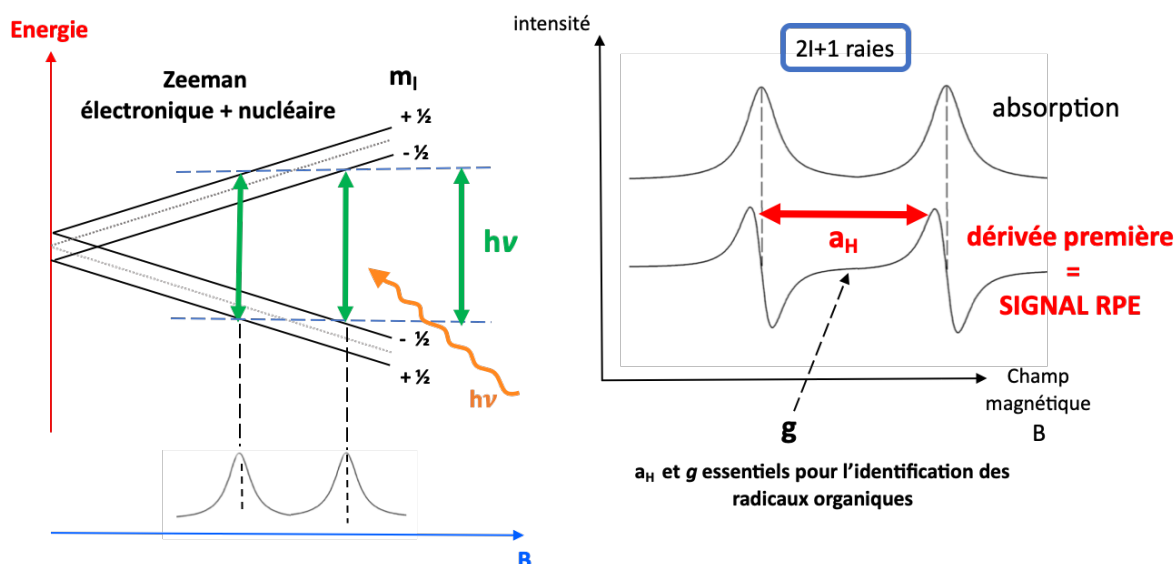


Figure 4 : Diagramme de niveaux d'énergie et des transitions autorisées pour un électron non apparié en interaction avec un noyau 1H ($I = 1/2$), conduisant à un spectre de RPE à 2 raies.

Ainsi, pour une espèce paramagnétique dont l'électron interagit avec un noyau ^{14}N ($I = 1$), on obtient un spectre de $2I+1 = 3$ raies (Figure 5).

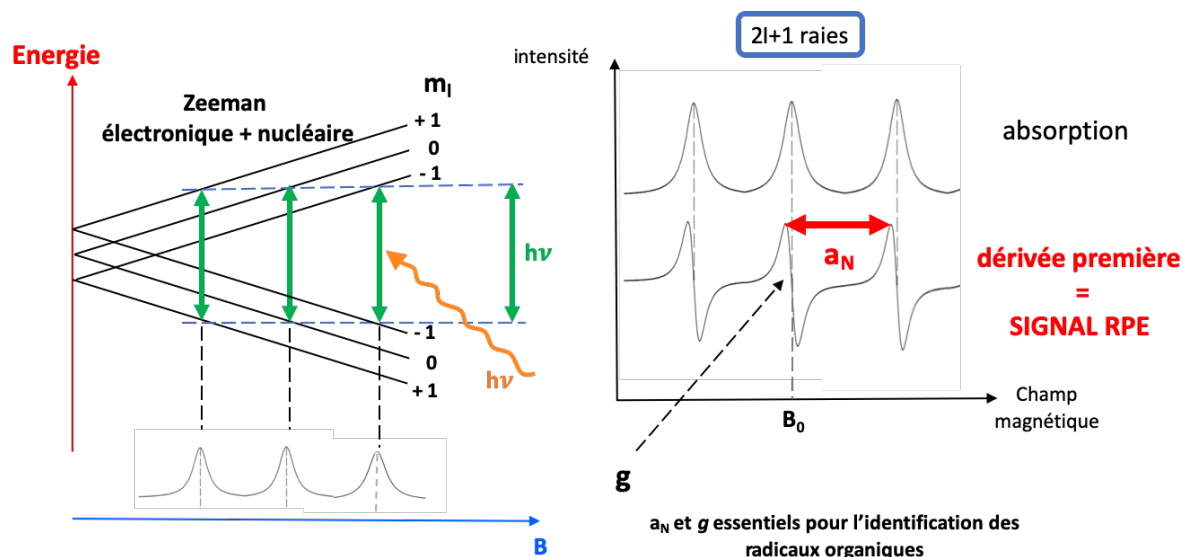


Figure 5 : Diagramme de niveaux d'énergie et des transitions autorisées pour un électron non apparié en interaction avec un noyau ^{14}N ($I = 1$), conduisant au spectre de RPE à 3 raies.

Par ailleurs, les spectres RPE peuvent facilement se complexifier lorsque l'espèce paramagnétique interagit avec des noyaux non équivalents possédant des spins nucléaires non nuls. Par exemple, l'électron non apparié d'une espèce radicalaire est capable d'interagir avec un noyau ^1H mais également avec un noyau ^{14}N présent dans son environnement voisin. Ainsi, le spectre correspondrait à un triplet hyperfin dédoublé (Figure 6).

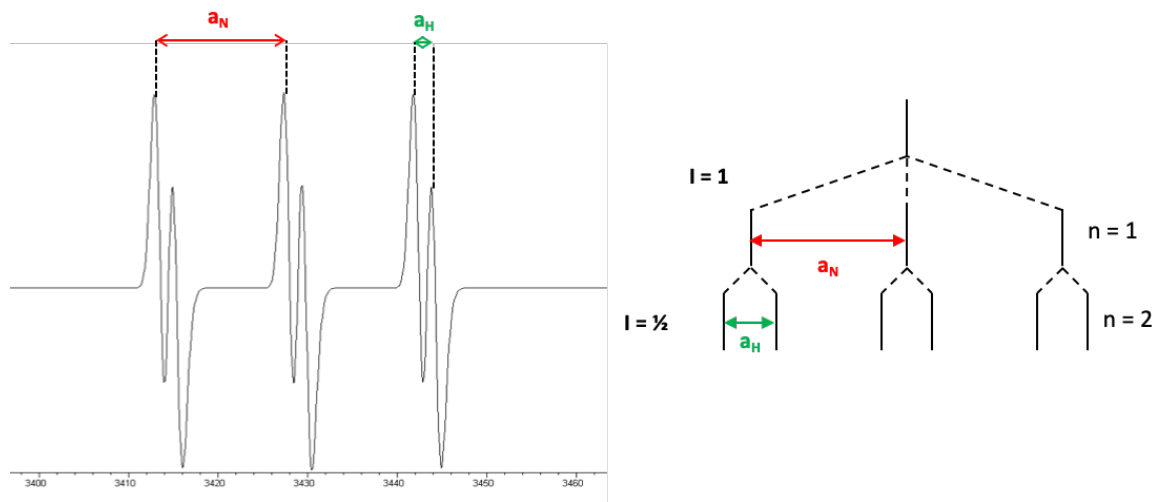


Figure 6 : Exemple de spectre simulé de RPE d'un radical lorsque l'électron célibataire interagit avec un noyau ^{14}N et un noyau ^1H et diagramme en bâton justifiant du dédoublé hyperfin observé sur le spectre.

De manière générale, lorsque l'on considère un système avec un ensemble n de noyaux équivalents de spin nucléaire I_n interagissant avec l'électron non apparié, le spectre de RPE sera composé de $(2I_n \times n + 1)$ raies, également espacées en raison des couplages hyperfins impliqués identiques. Les intensités relatives des raies sont alors données par le triangle de Pascal (Figure 7).



Figure 7 : Exemple de spectre RPE obtenu lorsque l'on se trouve en présence de 4 protons équivalents.

Dans le cas où un système présente des ensembles non équivalents tels que n noyaux équivalents de spin I_n et n' noyaux équivalents de spin $I_{n'}$, le nombre de raies se détermine par $(2I_n \times n + 1) \times (2I_{n'} \times n' + 1)$ avec un rapport d'intensité 1:1.

Il est important de noter que la spectroscopie de RPE peut être divisée en deux catégories différentes : la spectroscopie impulsionnelle (p-RPE) et la spectroscopie en onde continue (cw-RPE) c'est à dire que le système étudié est soit irradié par des impulsions soit continuellement par un rayonnement électromagnétique à une fréquence ν_0 donnée.¹⁶ Dans le cadre de nos études, seule la dernière citée sera évoquée et sera dès à présent appelée RPE.

1.3. Instrumentation

Lors d'une mesure RPE, l'électroaimant génère un champ magnétique B de direction fixe à l'intérieur d'une cavité résonante et donc sur l'échantillon placé dans la cavité conduisant ainsi à l'effet Zeeman (Figure 8). Une variation de l'intensité de courant circulant dans les bobines permet d'effectuer un balayage en champ.

Un rayonnement micro-onde, en régime stationnaire, est fourni par un générateur dont la fréquence constante ν est indiquée par un fréquencemètre. Ce rayonnement se propage à l'intérieur d'un guide d'onde et possède une puissance P réglable entre 1 μ W et 200 mW. Le rayonnement est orienté de la source vers la cavité et de la cavité vers le détecteur grâce à un circulateur.

Un spectre RPE est enregistré en gardant la fréquence ν constante à environ 9,5 GHz (bande X) et en faisant varier le champ B jusqu'à atteindre les conditions de résonance.

Le couplage entre les micro-ondes arrivant depuis le guide d'onde et la cavité résonante est réalisé par l'intermédiaire d'une iris dont l'ouverture est ajustée pour accorder les micro-ondes de tel sorte que la cavité de ne réfléchisse aucun rayonnement hors conditions de résonance.¹⁶

Le rayonnement provenant de la source est divisé en deux, un « bras » servant de référence pour le détecteur et un autre dirigé vers la cavité. La détection se fait en comparant le rayonnement incident, provenant du bras de référence, au rayonnement transmis par la cavité. La phase du bras de référence est réglée par rapport à la phase du signal provenant de la cavité. L'intensité (bias) du bras de référence est réglée de façon à ce que le détecteur (une diode) soit dans son régime de fonctionnement linéaire.¹⁷

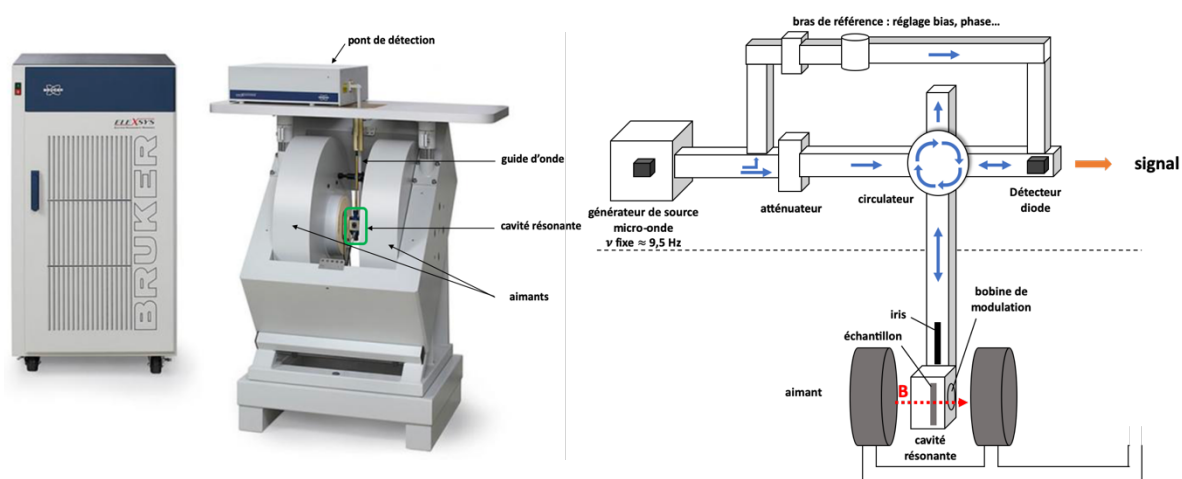


Figure 8 : Spectromètre Bruker E500 CW EPR X-band (Bruker) et schéma du principe d'un spectromètre RPE.¹⁶ (Source : Bruker).

La cavité est conçue de sorte que l'échantillon soit placé là où la partie magnétique de l'onde électromagnétique y soit maximale et la partie électrique y soit la plus faible possible voire nulle (Figure 9b). Ainsi, un signal optimal peut être mesuré. En présence d'un système dont la constante diélectrique est élevée (c'est le cas d'une solution aqueuse où $\epsilon \approx 80$ à température ambiante), la majeure partie de la composante électrique du champ électromagnétique est absorbée par le système. Au mieux, cela diminue considérablement la sensibilité de l'expérience, au pire cela l'empêche complètement. Par conséquent, une géométrie spécifique des échantillons étudiés est importante : il faut réduire au maximum la quantité d'échantillon « vue » par la composante électrique du champ électromagnétique (Figure 9). Pour ce faire, des cellules dites plates ou des capillaires submillimétriques en quartz

ou en verre peuvent être utilisés, placés verticalement dans la cavité. Dans le cas d'études sur des tissus biologiques, une cellule plate adaptée a été privilégiée (Figure 9a).

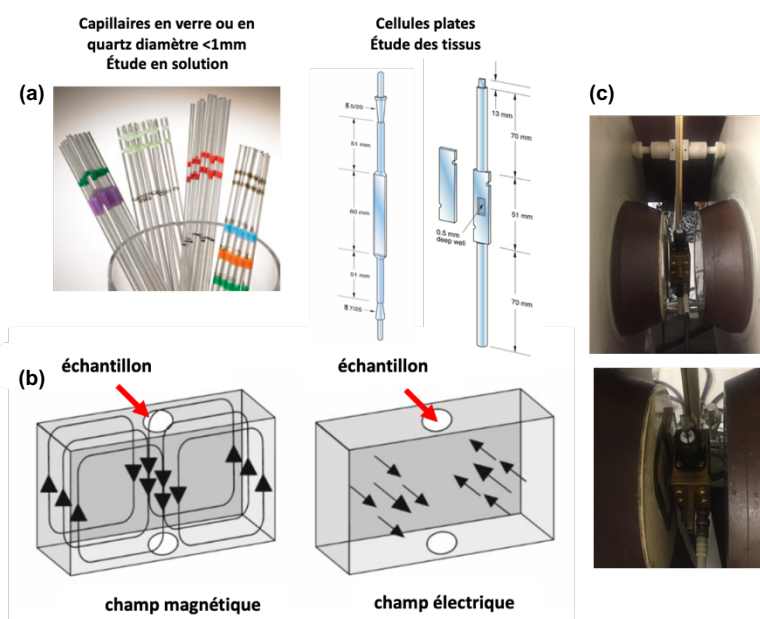


Figure 9 : (a) Capillaires (Hirschmann®) (Source : Hirschmann) et cellules plates (Wilmad-LabGlass®) permettant l'analyse par RPE en solution aqueuse et sur des tissus (Source : Wilmad) ; (b) illustration schématique du champ magnétique et du champ électrique dans une cavité RPE rectangulaire standard¹⁵ ; (c) photographie d'une cavité d'un appareil de RPE.

1.4. Le piégeage radicalaire

Le RPE est une spectroscopie dédiée à l'étude des espèces réactives tel que les radicaux libres. Cependant, la plupart des espèces réactives ne sont pas détectables directement par RPE conventionnelle en raison notamment de leur durée de vie extrêmement courte (de l'ordre de la milliseconde à la nanoseconde) justifiant ainsi leur grande réactivité.¹⁸ Afin de remédier à cela, une méthode dite « indirecte » de détection a été développée. Ainsi, l'utilisation d'une molécule diamagnétique P jouant le rôle de piègeur de spin réagit avec un radical fugace R' conduisant à la formation d'un adduit de spin paramagnétique (PR') ayant une durée de vie plus longue (quelques minutes à quelques heures), et dont la signature RPE est liée à la nature de l'espèce piégée R', oxygénée ou carbonée (Figure 10).¹⁹

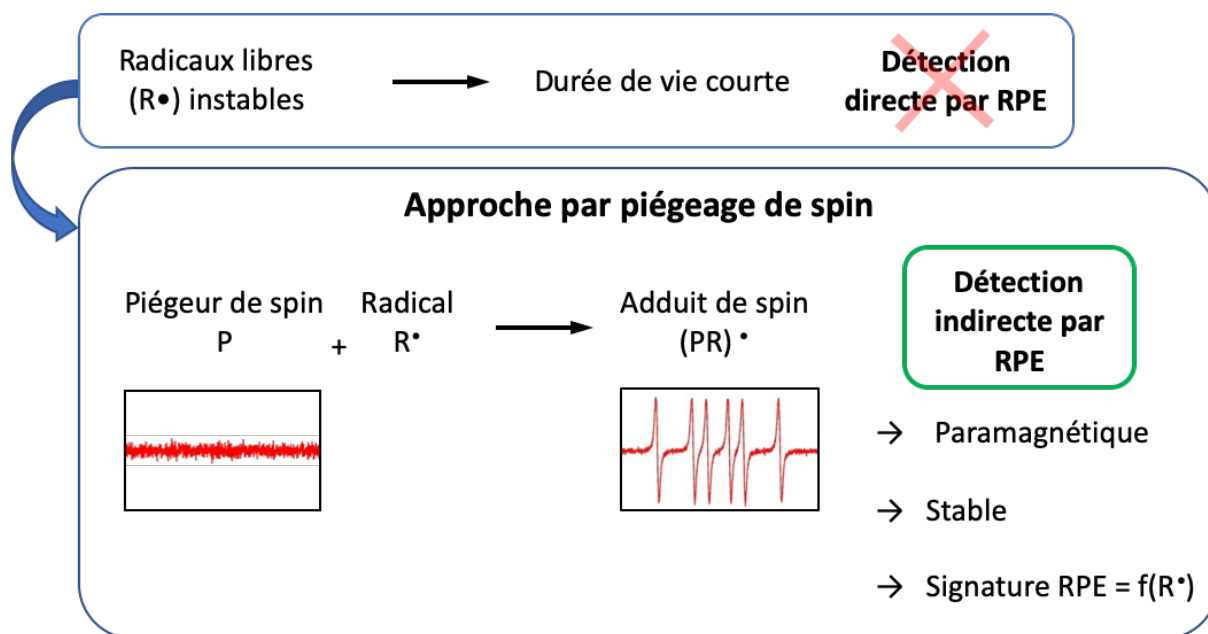


Figure 10 : Schéma général d'une expérience de piégeage de radicaux.

Dès la fin des années 60, la technique de piégeage de spin (ou *spin trapping* en anglais) devint rapidement incontournable quant à la détection et à l'identification de radicaux libres de très courte durée de vie.²⁰

1.4.1. Généralités

Les piègeurs de spin les plus couramment utilisés sont de type nitroso, tel que le 2-méthyl-2-nitrosopropane (**MNP**) et le nitrosodurène (**ND**), ou encore les composés de type nitronne tels que la phényl-*N*-*tert*io-butyl-nitronne (**PBN**), le 5,5-diméthyl-1-pyrroline-*N*-oxyde (**DMPO**), le 5-diéthoxyphosphoryl-5-méthyl-1-pyrroline-*N*-oxyde (**DEPMPO**) ou encore le 5-(diisopropoxyphosphoryl)-5-méthyl-1-pyrroline-*N*-oxyde (**DIPPMPO**) (Figure 11).¹⁹

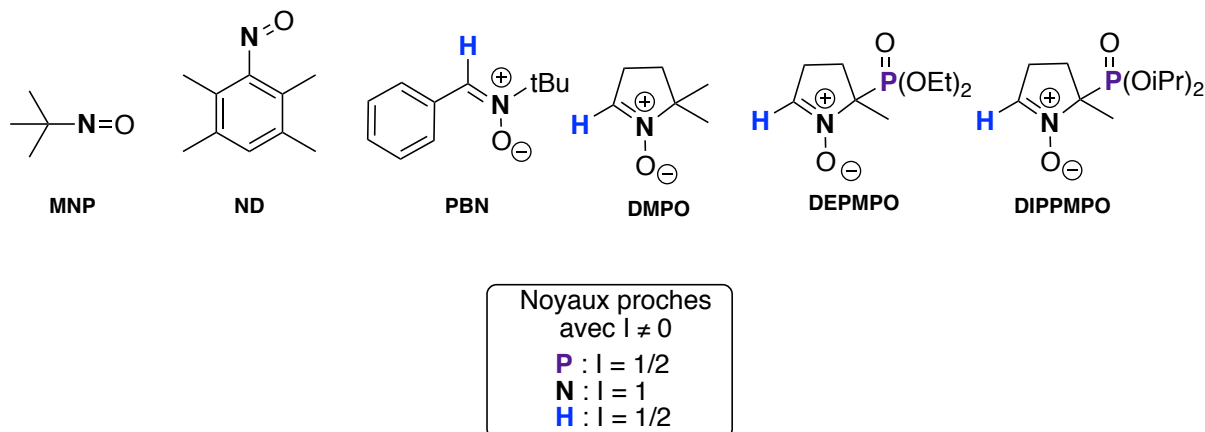


Figure 11 : Structure chimique de piègeurs de radicaux libres.

Il s'agit de composés diamagnétiques qui conduisent à la formation d'adduits de spin nitroxydes stables lors de l'addition de R' sur le carbone en α du groupement nitroso ou de la nitrone. Ces adduits de spin présentent une signature de RPE caractéristique du radical piégé (Figure 12).

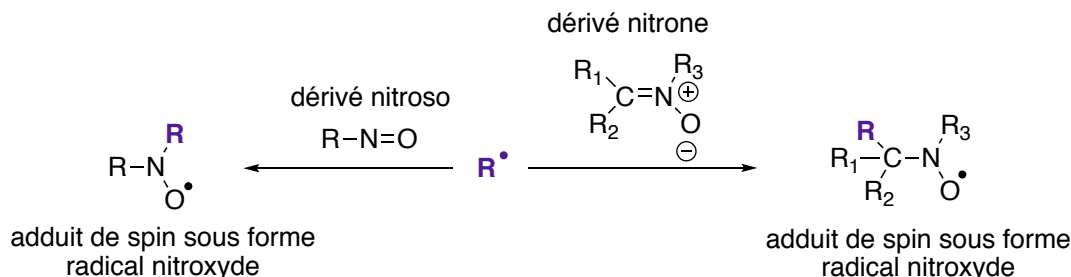


Figure 12 : Formation d'adduits de spin sous forme de radicaux nitroxydes par piégeage de radicaux libres R' avec des dérivés de type nitroso et de type nitrone.

Considérés stables et persistants, les radicaux nitroxydes sont régulièrement représentés avec l'électron célibataire sur l'oxygène. En réalité, l'électron est délocalisé entre l'azote et l'oxygène (Figure 13). Cette délocalisation combinée à un encombrement stérique autour du groupe nitroxyde empêche les radicaux de se dimériser. La densité de spin peut, en fonction de la nature des substituants R1 et R2, qu'ils soient électro-attracteurs ou -donneurs, être davantage délocalisée sur l'atome d'azote ou sur l'atome d'oxygène.²¹ Il a été montré que la constante de couplage hyperfine a_N est proportionnelle à la densité de spin sur l'azote. De ce fait, plus a_N est élevée plus la forme B est favorisée.

Les radicaux nitroxydes ont un moment dipolaire assez important qui dépend de la polarité du solvant. Ainsi, a_N est sensible à la polarité du solvant de l'expérience et bien que la densité de spin soit distribuée entre ces deux atomes, elle reste tout de même supérieure sur l'atome d'oxygène en milieu apolaire avec la forme A prédominante.^{19, 22}

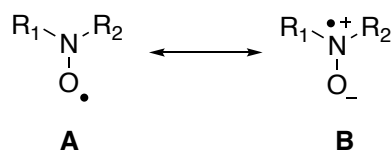


Figure 13 : Structures des formes mésomères limites des radicaux nitroxydes.

Les radicaux nitroxydes présentant des cycles pipéridine, pyrroline et pyrrolidine contenant des groupements encombrants sont particulièrement stables.

Par ailleurs, plusieurs paramètres doivent être pris en compte lors de l'attribution des valeurs des constantes de couplage hyperfines des adduits de spin formés. En effet, la constante de l'hydrogène a_H est dépendante de l'angle dièdre formé entre la liaison C-H avec

l'atome d'hydrogène en β et l'orbitale p de l'atome d'azote, qui contient l'électron célibataire.¹⁹ De ce fait, la valeur de a_H dépend de l'encombrement du radical piégé. Comme indiqué précédemment, a_N varie suivant la polarisation de la liaison N-O mais également suivant l'électronégativité du radical piégé. Enfin, la polarité des solvants est le dernier paramètre jouant sur les valeurs de ces constantes.

Au cours d'une expérience de piégeage de spin un adduit de spin est donc formé. Des informations spécifiques du radical piégé vont pouvoir être extraites des spectres obtenus. Ainsi, les constantes de couplage hyperfines a_N , a_H ou a_P (^{31}P , $I = 1/2$), dans le cas du **DEPMPO** ou **DIPPMPO** (Figure 11), vont nous permettre d'obtenir des informations quant à la nature de l'espèce capturée.

Par exemple, le **DEPMPO** est capable de piéger à la fois les radicaux centrés sur l'oxygène et sur le carbone en milieu aqueux à température ambiante formant ainsi une multitude d'adduits de spin (Figure 14).²³ Si un radical hydroxyle HO^\bullet est piégé, l'adduit de spin DEPMPO-OH possède une signature spécifique de ce radical. Dans ce cas $a_N \sim a_H \sim 14$ G et la constante hyperfine lié au phosphore $a_P \sim 47$ G.²³ En conséquence directe, seulement huit lignes sont visibles avec un rapport d'intensité typique de 1:2:2:1:1:2:2:1. Le **DEPMPO** est toutefois capable de piéger un radical superoxyde formant l'adduit de spin DEPMPO-OOH et présentant un spectre plus complexe.²³ A l'issue de ce piégeage, deux diastéréoisomères sont formés, le *cis* minoritaire et le *trans* majoritaire, présentant tous deux des allures de spectres différents.^{19,24} C'est le mélange des deux isomères qui est observé. Enfin, un radical carboné, par exemple le méthyle $^\bullet\text{CH}_3$ peut-être piégé. L'électron célibataire résultant de la réaction interagit à la fois avec ^{14}N ($I_N = 1$) et ^1H ($I_H = 1/2$) voisins en position β mais également avec l'atome de phosphore ^{31}P ($I_P = 1/2$). Cette combinaison est supposée donner $(2I_N + 1)(2I_H + 1)(2I_P + 1) = 12$ raies. Les constantes de couplage hyperfines sont connues ici comme étant de ca. 15 G, 23 G et 47 G respectivement pour a_N , $a_{H\beta}$ et a_P .

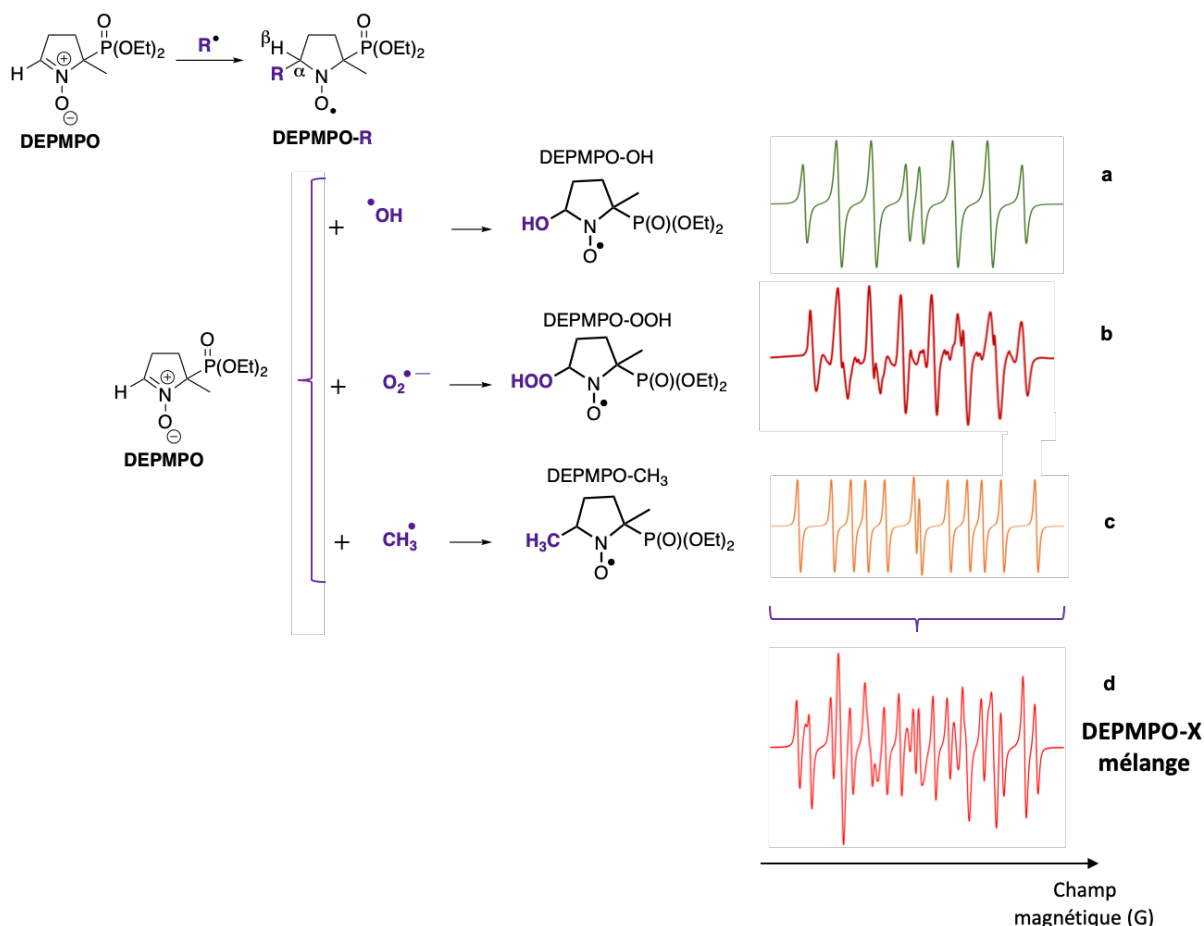


Figure 14 : Exemple de spectre RPE simulé d'un mélange d'adduits de spin formés en présence de DEPMPPO (a) déconvolution correspondant au radical hydroxyle HO \bullet piégé ; (b) déconvolution du radical superoxyde piégé HOO \bullet ; (c) déconvolution attribuée au radical méthyle CH_3^\bullet et ; (d) spectre du mélange DEPMPPO-X (avec X = HO \bullet , HOO \bullet et CH_3^\bullet).

Ainsi, dans les essais expérimentaux on observe très régulièrement un mélange de différents adduits de spin et les spectres RPE résultants sont plus complexes et chronophages à analyser. Leurs déconvolutions peuvent alors nécessiter l'utilisation programmes/logiciels permettant de quantifier les quantités relatives des spins adduits en présence. Cette quantité sera donnée en pourcentage.

Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés à deux types de piègeurs de spin : les piègeurs « classiques » comme la **PBN** et le **DMPO** et les piègeurs β -phosphorylés comme le **DEPMPPO** et le **DIPPMPO**.

1.4.2. Analyses des données : développement de boîte à outils

Une analyse complète du spectre RPE repose sur la caractérisation des constantes de couplages hyperfines (*hfccs*) et du facteur *g*. Ces paramètres permettent l'identification et la

caractérisation du radical piégé tout en les comparant aux données de la littérature et aux bases de données existantes.^{21,25}

La première étape lorsqu'on se retrouve face à un spectre expérimental RPE, consiste à déterminer à l'aide « d'une règle et d'un crayon » les valeurs des constantes de couplages (a_P , a_N et $a_{H\beta}$) ainsi que le facteur g (Figure 15).

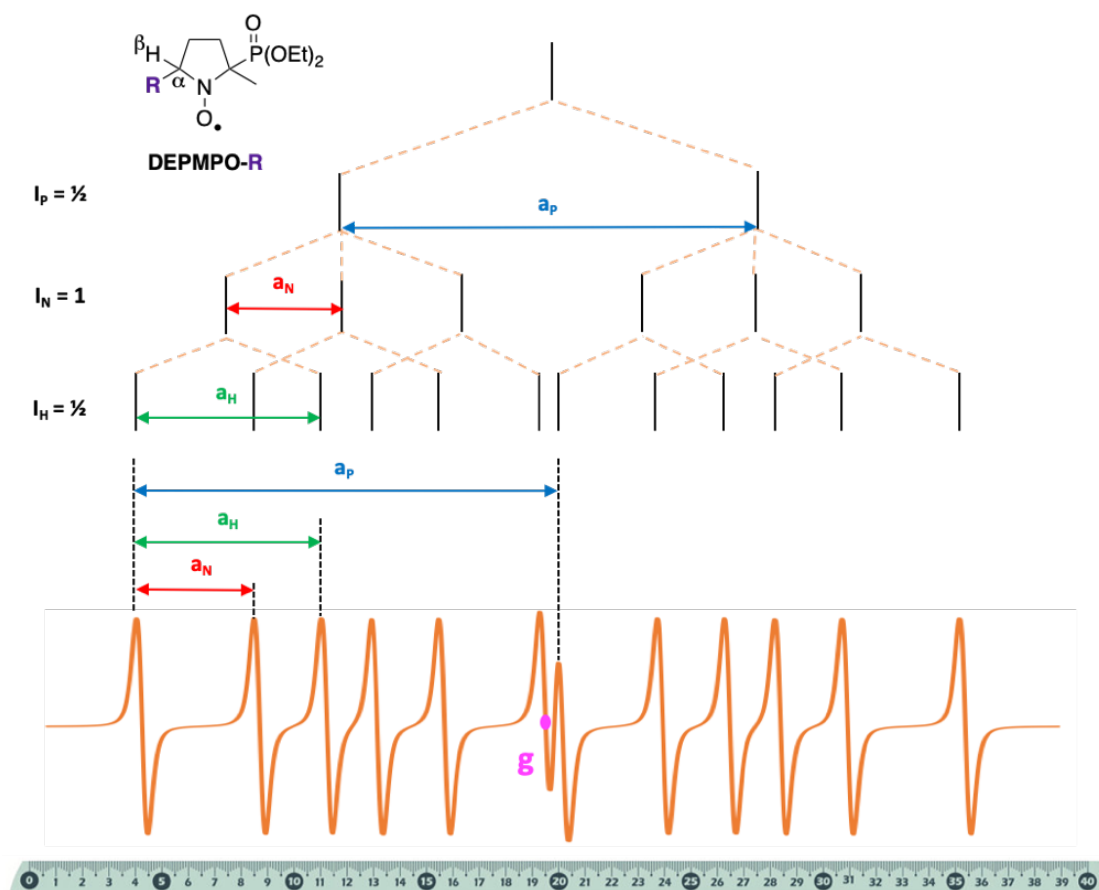


Figure 15 : Couplage hyperfin sur un spectre RPE d'un adduit de spin DEPMPO-R et diagramme en bâton correspondant, R' étant un radical carboné.

Une fois les valeurs des constantes déterminées « manuellement », elles vont nous permettre d'effectuer une simulation numérique *via* des logiciels adaptés. Au sein du laboratoire de Dermatochimie, l'exploitation des spectres RPE est réalisée grâce à la boîte à outil *Easyspin* utilisée sous environnement Matlab (MathWorks®). Cette méthode a été développée par Stoll et *al.* en 2006,²⁶ et permet une simulation complète des données expérimentales (Figure 16).

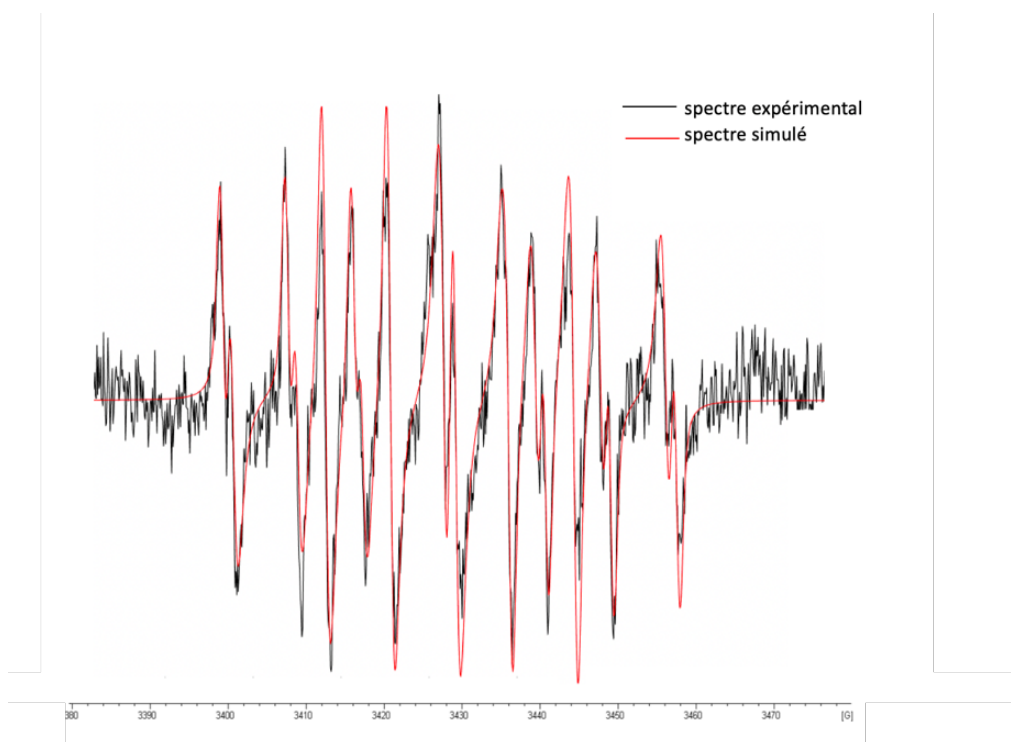


Figure 16 : Simulation d'un spectre présentant un rapport S/N faible justifiant les conditions limites d'utilisation de la boîte à outil Easyspin sous environnement Matlab.²⁶

Dans de nombreux cas, les spectres RPE correspondent à un mélange complexe de plusieurs adduits de spin rendant l'analyse spectrale plus laborieuse en raison de la difficulté à dissocier les raies appartenant à un adduit de spin spécifique. Dans les cas recensés, l'analyse « manuelle » décrite ci-dessus devient alors beaucoup plus compliquée et confuse à réaliser. Cette approche est d'autant plus importante lorsque le rapport signal sur bruit (S/N, pour *Signal/Noise* ratio en anglais) du signal est relativement faible, ce qui est fréquemment observé dans les études *in situ* sur les systèmes biologiques. Dans tous ces cas de figure, la simulation des spectres devient d'avantage indispensable.

Dans un second temps, le programme est capable d'effectuer la déconvolution du signal simulé présentant la signature de RPE « mixte » et ainsi déterminer une estimation de la proportion des différents adduits de spin constituant le mélange réactionnel (Figure 17).

Les adduits de spin obtenus nous donnent les indications nécessaires quant aux espèces piégées car leurs signatures RPE dépendent de la nature des radicaux piégés. Par ailleurs, l'intensité du signal observé (soit la double intégrale du signal RPE) est directement liée à la quantité d'espèces en présence.

Il est important de noter que la technique de piégeage de spin reste une méthode indirecte : nous observons des adduits de spin formés et non directement les espèces

réactives. De ce fait, l'analyse quantitative est modérée par l'affinité du radical avec le piègeur mais aussi par les durées de vie respectives des adduits de spin.

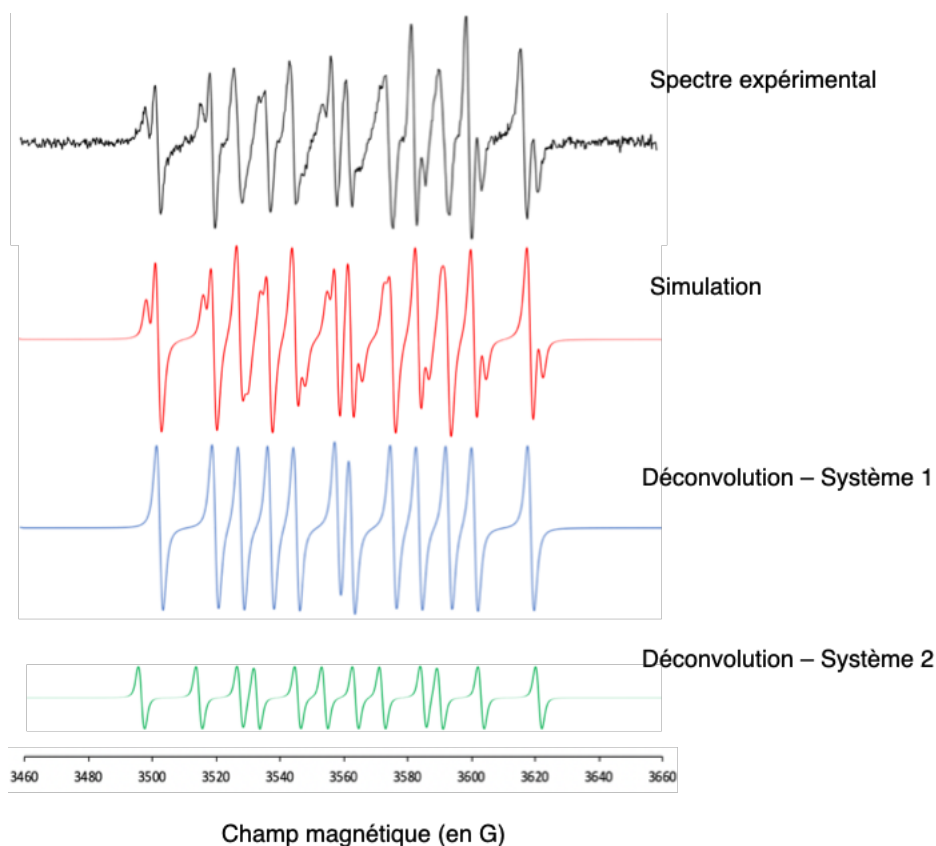


Figure 17 : Résultat d'une déconvolution réalisée avec Easyspin.²⁶

1.5. Limitations de la méthode

Bien que cette méthode permette la détection et l'identification d'espèces radicalaires, elle fournit uniquement des informations quant au type de radical piégé (alkyle, peroxyde, alkoxyde...).

Il est aussi important de souligner que des réactions secondaires non associées au piégeage de spin sont capables de former des radicaux nitroxydes détectés en RPE et conduisant à des interprétations erronées dû à la présence d'artéfacts.¹⁹ Il s'agit par exemple de la ène-réaction, de la réaction de Forrester-Hepburn ou du piégeage à spin inverse (IST) (Figure 18).

Lors d'une ène-réaction, le composé nitroso réagit avec une oléfine. Une hydroxylamine issue de la réaction péricyclique subit en présence de dioxygène une oxydation conduisant à la formation de la fonction nitroxyde. Ce composé possède une signature RPE semblable à l'adduit de spin d'un radical centré sur le carbone (Figure 18a).²⁷

Au cours de la réaction Forrester-Hepburn une hydroxylamine est formée par addition d'un nucléophile sur le piègeur de spin. Cette hydroxylamine est ensuite oxydée en présence de dioxygène pour former, par exemple, un radical nitroxyde. A l'issue de cette réaction, un spectre identique à celui de l'adduit de spin du radical hydroxyle HO[•] est détecté lorsque l'on se trouve dans un milieu aqueux (*Figure 18b*).²⁸

Le piégeage à spin inverse consiste en une oxydation du piègeur de spin à l'aide d'un oxydant puissant comme H₂O₂ produisant un radical cationique stabilisé par l'addition d'un nucléophile. En cas d'addition d'eau, le spectre obtenu sera identique à celui d'un piégeage de radical HO[•] (*Figure 18c*).²⁹

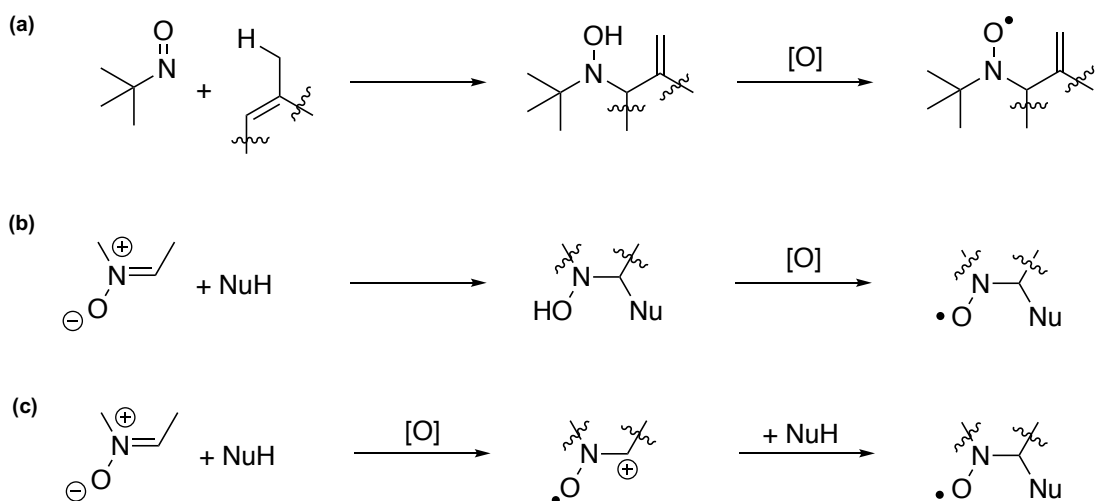


Figure 18 : Formation secondaire de radicaux nitroxyde sans piégeage de spin lors d'un piégeage d'espèce radicalaire **(a)** ène-réaction à partir d'un nitroso, exemple du MNP avec une oléfine ; **(b)** réaction Forrester-Hepburn : addition d'un nucléophile sur une nitronne suivie d'une oxydation ; **(c)** IST nécessitant une oxydation de la nitronne puis d'une addition nucléophile.

Ainsi, tous les blancs et expériences de contrôle sont primordiales pour s'assurer au maximum de l'origine du radical piégé et permettant ainsi d'éliminer les doutes quant à la présence d'impuretés paramagnétiques dans nos échantillons. En effet, certains piègeurs de spin peuvent présenter des signaux parasites et une purification au préalable peut être nécessaire. Une distillation, une recristallisation et/ou un traitement au charbon actif suivie d'une filtration peuvent être préconisés.³⁰

2. Identification des espèces radicalaires issues des composés cibles : études en solution

Dans un premier temps, des études en solution ont été réalisées dans le but de déterminer la nature des radicaux formés dans les conditions expérimentales optimales nous permettant de nous rapprocher des systèmes biologiques. Ainsi, nous avons dû mettre en place des conditions nous permettant à la fois d'obtenir un bon rapport signal sur bruit (S/N) tout en maintenant les concentrations des molécules cibles et des piègeurs de spin faibles, adaptées aux conditions physiologiques. L'initiation radicalaire a été déclenchée par une réaction de type Fenton induite par le sulfate de fer (II).³¹ L'objectif principal était de transférer ces conditions expérimentales à un modèle 3D d'épiderme humain reconstitué (RHE).

2.1. Les acteurs principaux de l'étude

2.1.1. Choix des piègeurs de radicaux

En raison de leur stabilité et de leur faible toxicité, les nitrones **PBN**, **DMPO**, le **DEPMPO** et le **DIPPMPO** ont été utilisées au cours de nos études.

La signature RPE des adduits de spin formés en présence de la **PBN** résultent de l'interaction de l'électron non apparié avec le ^{14}N ($I_{\text{N}} = 1$) et le ^1H voisins ($I_{\text{H}} = \frac{1}{2}$) (*Figure 11*).¹⁹ Durant nos études, il s'est avéré être un excellent piègeur de radicaux carbonés. Toutefois, il permet difficilement de distinguer les adduits formés lors de piégeage des radicaux oxygénés (*hfccs* similaires). La décomposition de l'adduit PBN-OH avec le temps conduit à la formation de nitroxydes pouvant être détectés et confondus avec des adduits potentiellement formés, s'agissant en réalité d'artéfacts. De plus, la **PBN** est un composé moyennement lipophile.¹⁹

L'utilisation de nitrones cycliques fournit des spectres RPE plus caractéristiques du radical piégé. Cependant, leur purification s'avère difficile en raison de la présence d'impuretés paramagnétiques contenues dans l'échantillon d'huile.¹⁹ Ainsi, le **DMPO** également disponible commercialement a été longtemps utilisé en raison de la simplicité dans le traitement des spectres obtenus. Ses constantes de couplages hyperfines sont dues à l'interaction de l'électron non apparié avec le ^{14}N ($I_{\text{N}} = 1$) et le ^1H ($I_{\text{H}} = \frac{1}{2}$) (*Figure 11*) et dépendent fortement de la nature du radical piégé.

La **PBN** et le **DMPO** sont couramment utilisées dans les milieux biologiques, mais leur faible résistance aux bio-réductions de leurs adduits de spin limite le potentiel d'applications *in vivo*.³²

Une autre nitroène cyclique couramment utilisée est le **DEPMPO**. Il s'agit d'un composé hydrophile permettant l'obtention de spectres caractéristiques des radicaux piégés. Il est capable de piéger aussi bien les radicaux carbonés qu'oxygénés avec un temps de demi-vie des adduits formés supérieurs à ceux formés par le **DMPO**, particulièrement pour l'adduit formés avec le superoxyde.^{24,33}

Les *hfccs* résultent de l'interaction de l'électron non apparié avec le ^{14}N ($I_{\text{N}} = 1$), ^1H ($I_{\text{H}} = \frac{1}{2}$) et ^{31}P ($I_{\text{P}} = \frac{1}{2}$) (*Figure 11*). La présence du groupement électro-attracteur (groupement phosphonate) permet l'augmentation du temps de vie de l'adduit du superoxyde au pH physiologique ($t_{\frac{1}{2}} = 900$ s).²³ Il a également été montré que le **DEPMPO** est un bon candidat lors d'études de piégeage radicalaire *in vivo*. Malgré son effet toxique à des concentrations plus élevées, il présente une amélioration par rapport au **DMPO** largement utilisé en termes de stabilité des adduits de spin formés.³³ De ce fait, il représente une alternative pertinente pour les expériences dans les épidermes humains reconstitués.

Enfin, le **DIPPMPO** présente les mêmes caractéristiques que le **DEPMPO**. Seulement son coefficient de partage diffère (K_p 2,1 vs 0,16 pour de **DEPMPO**).³⁴ Il se trouve qu'il est plus lipophile que le **DEPMPO**, ce qui nous est avantageux pour l'étude d'un piégeage de radicaux dans le modèle d'épiderme humain reconstitué.

La durée de vie de l'adduit de spin en présence de **DEPMPO** ou de **DIPPMPO** peut varier de quelques minutes à plusieurs heures et dépend de la nature du radical piégé ainsi que de son environnement.

2.1.2. Synthèses des piègeurs de radicaux

Les piègeurs de spin utilisés au cours de cette thèse sont commerciaux. Cependant, deux d'entre eux ont été synthétisés au sein du laboratoire en raison de leur coûts prohibitifs (**DEPMPO** - 1196 euros pour 500 mg et **DIPPMPO** - 207 euros pour 50 mg). Ces deux piègeurs de spin ont été obtenus en employant les méthodes décrites par Barbati et al.³⁵ et Tordo et al.³⁴

Les deux synthèses sont similaires et comportent deux étapes. Dans un premier temps, une addition de diéthylphosphite ou de diisopropylphosphite à température ambiante et sous atmosphère inerte sur la 2-méthylpyrroline conduit à la formation des composés **46** et **47** avec

des rendements respectifs de 81 % et 74 %. Ensuite, les oxydations de ces deux intermédiaires avec de l'acide *m*-chloroperbenzoïque à -5 °C dans le chloroforme permet la formation des nitrones **DEPMPO** et **DIPPMPO** avec des rendements de 18 % et 46 % (Figure 19).

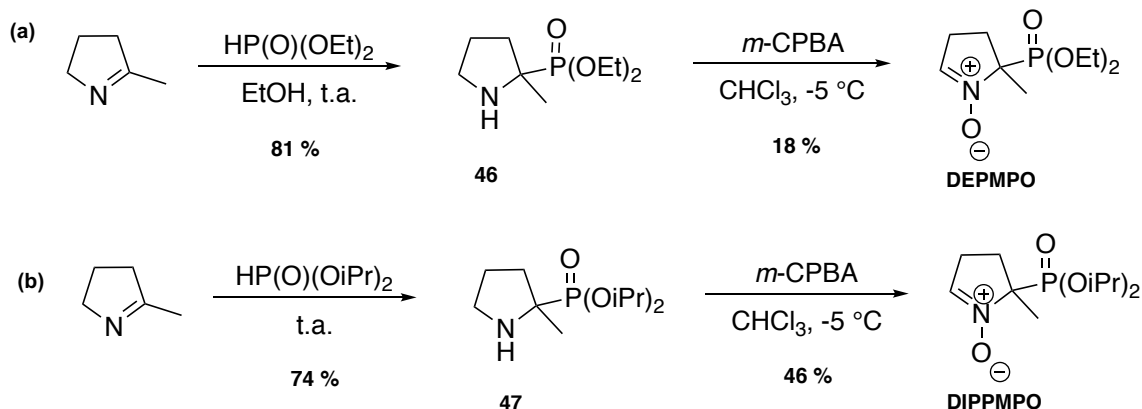
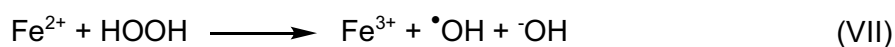


Figure 19 : Schéma de synthèse du (a) **DEPMPO** et du (b) **DIPPMPO**.

2.1.3. Initiateur radicalaire : système Fe(II)/Fe(III)

Souvent incriminé dans la dégradation des peroxydes *in vivo*, le fer est le métal le plus abondant chez l'homme.³⁶ La réaction homogène de Fenton a été signalée pour la première fois en 1894 par H.J.H. Fenton.³¹ Il a prouvé que les ions ferreux favorisaient fortement l'oxydation de l'acide malique par H₂O₂. Il a par la suite suggéré que le mélange de H₂O₂ et d'un sel ferreux, depuis appelé le " réactif de Fenton ", était un oxydant efficace pour une variété de composés organiques. L'interaction de H₂O₂ avec les sels ferreux produit les radicaux hydroxyles suivants :



Il a été également prouvé que le Fe(II) entraînait la décomposition des hydroperoxydes en radicaux alcoxyles et en ions hydroxyles, suivant un mécanisme identique à celui de la réaction de Fenton.^{37,38} Ceux-ci peuvent interagir ensemble, ce qui donne des composés tétroxydes (ROOOOR) capables de régénérer les radicaux alcoxyles en même temps que la libération d'oxygène moléculaire. Les radicaux peroxydes peuvent aussi extraire un hydrogène pour produire des radicaux centrés sur le carbone (Figure 20).

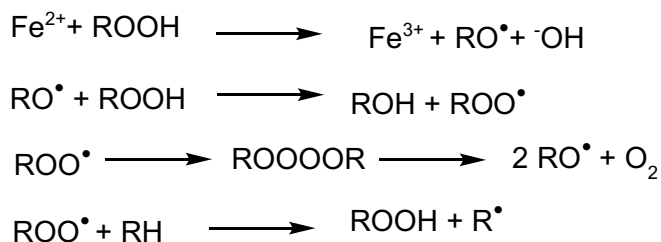


Figure 20 : Génération de radicaux en présence de Fe(II) dans le cas des hydroperoxydes.

Ainsi, l'initiation radicalaire en solution a été réalisée à l'aide d'une quantité catalytique de sulfate de fer (II) et d'une réaction de type Fenton.

2.1.4. Choix du solvant

Les premiers essais ont été effectués dans un tampon phosphate (pH 7,4), mais nous avons observé que la concentration en Fe(II) était un facteur limitant. Il a été montré que dans un tampon phosphate, lors de l'oxydation du Fe(II) en Fe(III), le fer est chélaté par les phosphates conduisant à sa précipitation. De ce fait, le choix du solvant s'est tourné vers le tampon HEPES (pH 6,8 ; 10 mM) pour lequel cette chélation n'a pas lieu et avec lequel la réaction radicalaire peut être initiée grâce à une quantité de fer dix fois inférieure à celle nécessaire dans le tampon phosphate soit avec 0,1 mM.

2.1.5. La méthode

Les études en solution ont nécessité la préparation de solutions mères de piègeur de spin à 100 mM dans de l'HEPES et de sulfate de fer (II) ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) à 10 mM dans de l'HEPES. Les molécules organiques étudiées ont été solubilisées dans un mélange HEPES/acétonitrile (9/1) à 10 mM.

Pour une concentration 50 mM de piègeur de spin dans le mélange réactionnel, un ajout de sulfate ferreux aqueux de 0,1 mM à 1 mM a été effectué. Enfin, le composé d'étude a été ajouté au mélange avec une concentration de 1 ou 4 mM. La solution résultante est introduite dans un capillaire en verre de 20 μL (*Hirschmann*®), scellé aux deux extrémités, puis analysée par RPE (*Figure 21*).

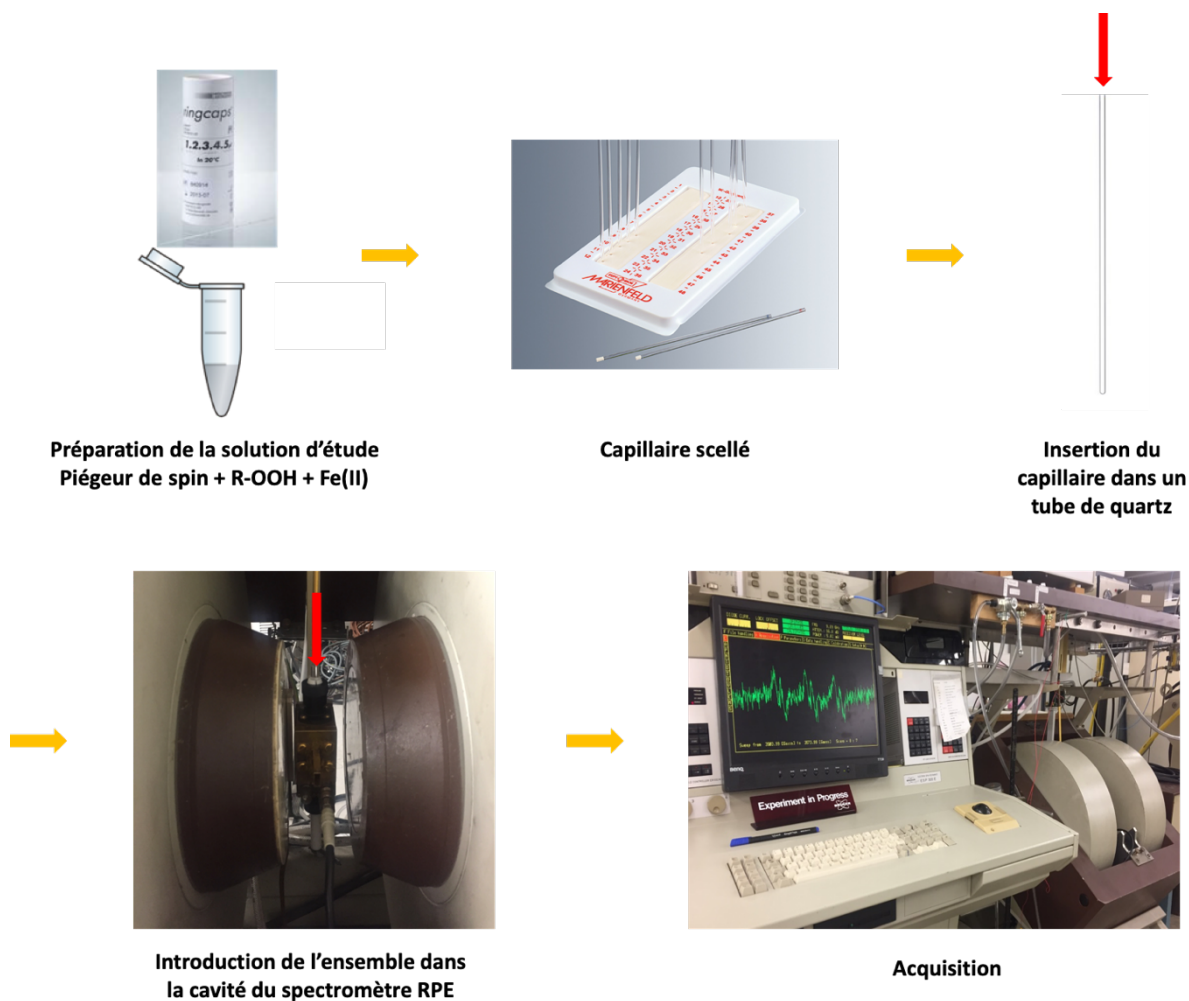


Figure 21 : Procédure adoptée lors des études en solution.

Dans le but d'être concis, la méthode générale suivie pour l'identification des différents radicaux oxygénés et carbonés dérivés des composés d'études ne sera détaillée qu'en présence du **DEPMPO**. Ce dernier a été choisi comme modèle en raison de son avantage à distinguer à la fois les radicaux centrés sur l'oxygène et ceux centrés sur le carbone, mais également en raison de la durée de vie de l'adduit de spin pouvant varier de quelques minutes à plusieurs heures.³⁹ Il est aussi efficace pour la détection *in vivo* des radicaux centrés sur l'oxygène en raison de la persistance élevée des adduits formés avec les radicaux superoxydes et alkylperoxydes.²⁴

Les études complémentaires avec d'autres piègeurs de spin tels que le **DMPO** et le **DIPPMPO** ont été réalisées et les spectres de RPE respectifs, les valeurs des *hfccs* et des facteurs *g* seront présentés dans la section annexe à la fin de ce chapitre. N'apportant aucune information précise quant à la nature des radicaux piégés, l'utilisation de la **PBN** dans ce projet a vite été écartée au profit des pièges **DEPMPO** et **DIPPMPO**.

2.2. Résultats

Pour chacun des spectres présentés, l'approche "règle et crayon" (voir section 1.3.2) a tout d'abord été préférée pour identifier les adduits de spin potentiellement formés ainsi que leurs valeurs approximatives des $hfccs$ et de g . Ensuite, des scripts Matlab®/Easyspin développé au laboratoire ont été utilisés pour simuler le spectre expérimental afin d'affiner, corriger les $hfccs$ et le facteur g pour tous les adduits de spin présents et d'avoir une estimation de la proportion des adduits formés. La quantification relative des radicaux générés n'est possible que si et seulement si les durées de vie des adduits comme l'affinité des différents pièges pour les radicaux sont supposées très similaires. Mais là n'était pas la question.

2.2.1. Étude de l'ascaridol en solution

Les spectres de RPE enregistrés après activation de l'**Asc** avec du Fe(II) en solution sont illustrés dans la *Figure 22*. Ainsi, deux adduits ont été identifiés comme résultant du piégeage de radicaux carbonés dont la caractérisation est résumée dans le *Tableau 2*. C'est en comparant les données obtenues et celles existantes dans la littérature, que ces deux adduits ont été attribués aux radicaux carbonés (DEPMPO-R1) et (DEPMPO-R2).

Tableau 2 : $hfccs$, g et quantification relative des adduits de spin identifiés pour le système **DEPMPO** 50 mM / **Asc** 1 mM / Fe(II) 0,1 mM.

DEPMPO-R1 (ca. 83 %)	DEPMPO-R2 (ca. 17 %)
$g = 2,0056$	$g = 2,0057$
$a_N = 14,7 \text{ G}$	$a_N = 15,0 \text{ G}$
$a_H = 21,5 \text{ G}$	$a_H = 25,8 \text{ G}$
$a_P = 47,2 \text{ G}$	$a_P = 47,7 \text{ G}$

Lors de l'augmentation de la concentration en Fe(II) à 1 mM, les mêmes radicaux semblent être piégés. Cependant, les proportions relatives de DEPMPO-R1 et DEPMPO-R2 varient. Cette fois-ci, la proportion en DEPMPO-R2 est plus importante (ca. 44 % vs ca. 17 %). De plus, en travaillant avec des concentrations plus importantes, le rapport signal sur bruit du spectre est meilleure (*Annexe 1*).

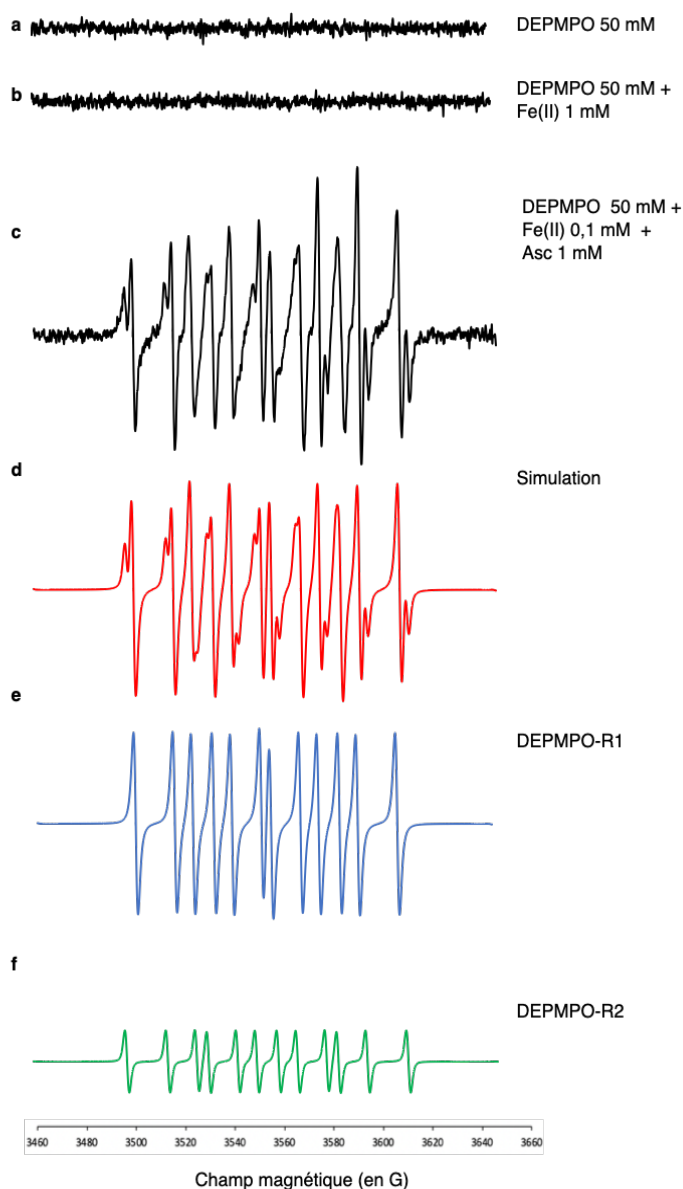


Figure 22 : (a) Spectre contrôle **DEPMPPO** 100 mM ; (b) Spectre contrôle **DEPMPPO** 100 mM / Fe(II) 1 mM ; (c) Spectre de RPE des adduits de spins formés avec **DEPMPPO** 50 mM / **Asc** 1 mM / Fe(II) 0,1 mM dans l'HEPES 10 mM pH = 6.8 ; (d) simulation du spectre expérimental et ; (e et f) sa déconvolution en DEPMPPO-R1 (ca. 83 %) et DEPMPPO-R2 (ca. 17 %).

La dégradation radicalaire de l'**Asc** est connue pour donner des espèces électrophiles réactives comme la cétone α,β -insaturée **29** et l'isoascaridol **30** qui pourraient réagir avec les résidus nucléophiles présents sur les protéines cutanées (Chapitre 2, Section 2.1). En effet, nous avons montré dans le Chapitre 2 que ces deux composés étaient capables de réagir avec le groupe thiol de la *N*-Ac-Cys-COOMe par un mécanisme de type nucléophile-électrophile.⁴⁰ Par ailleurs, cette dégradation entraîne la perte du radical isopropyle stable. En parallèle, par un mécanisme totalement similaire au précédent, la dégradation radicalaire de l'**Asc** peut également conduire à la perte du radical méthyle (Figure 23).^{41, 42}

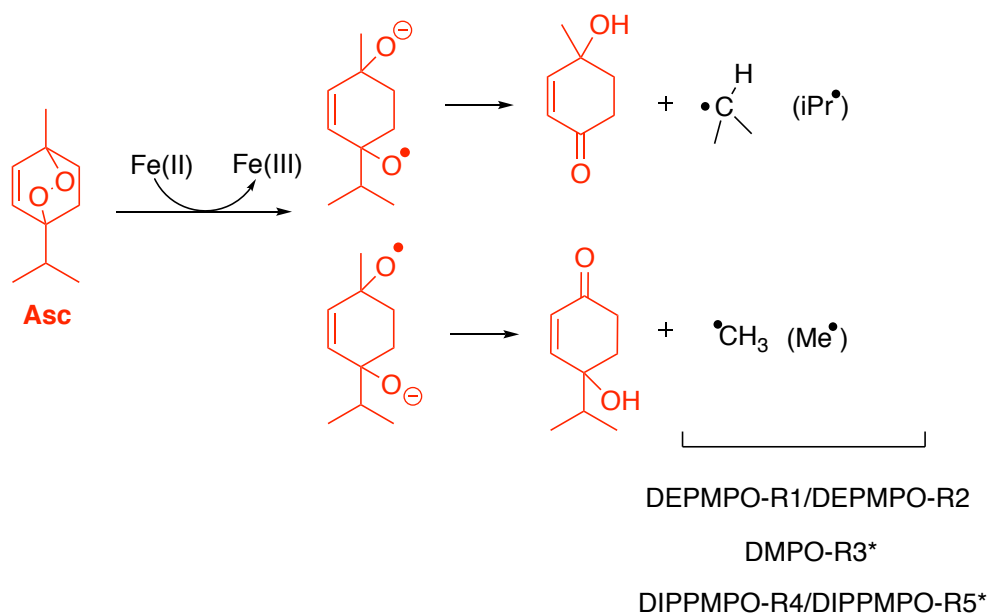


Figure 23 : Décomposition radicalaire de l'Asc en présence de Fe(II) : proposition de mécanismes en accord avec les spin adduits observés (* voir annexes).

En outre, le **DEPMPO** est capable de produire des isomères stéréospécifiques lorsqu'il piège les radicaux superoxydes ou alkylperoxydes sur les deux faces planes de ce piègeur de spin. Ceci conduit à deux signatures de RPE légèrement différentes et superposées. Cependant, cela n'a pas été défini dans le cas des radicaux carbonés piégés. De ce fait, on peut supposer que les deux radicaux carbonés piégés sont de nature différente. Mais on pourrait également soumettre comme hypothèse que le piégeage d'une seule espèce de radicaux carbonés puisse avoir lieu des deux côtés de la molécule du **DEPMPO** donnant cette signature de RPE mixte (Figure 22).²³

Il a été intéressant d'étudier la cinétique de dégradation de ces adduits en solution. Une étude cinétique a été réalisée pour l'échantillon **DEPMPO** 50 mM / **Asc** 1 mM / Fe(II) 0,1 mM, dans le but de déterminer le temps de vie des adduits de spin formés. Nous avons pu observer que les adduits formés sont pour le moins stables dans le temps : après 4 jours de réaction, les mêmes adduits de spin sont toujours observable mais avec des proportions différentes par rapport à celles de départ. En effet, seul un des adduits en l'occurrence le DEPMPO-R1 semble persister sur cette période (Figure 24).

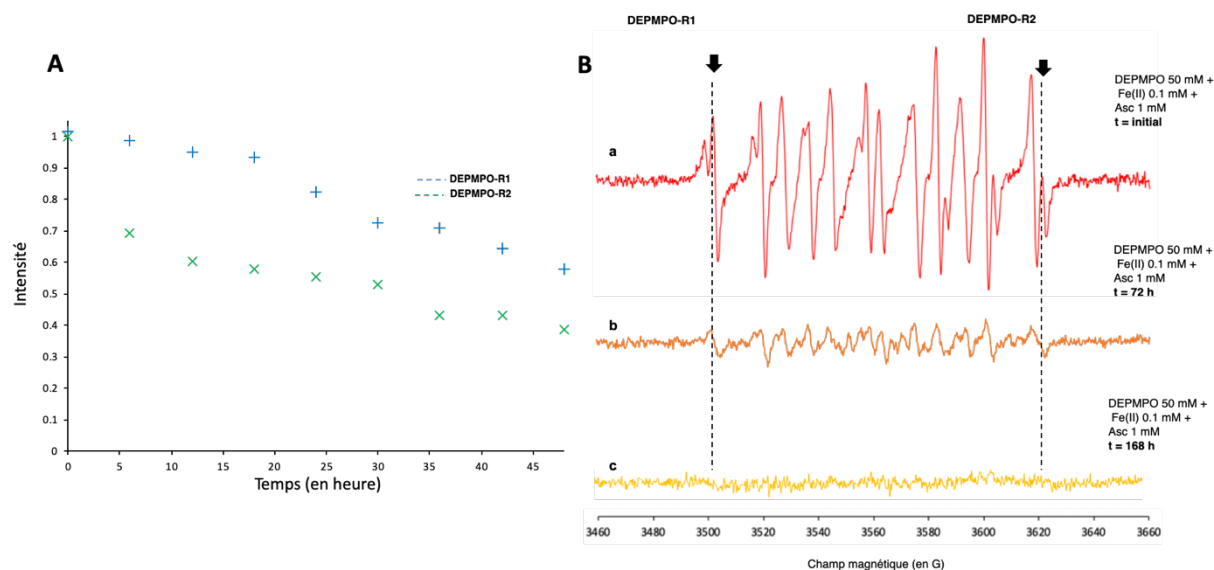


Figure 24 : **(A)** Cinétique de dégradation des adduits de spin **DEPMPO** 50 mM/**Asc** 1 mM/**Fe** 0,1 mM sur 72 h ; **(B)** Spectre de la réaction **(a)** **DEPMPO** 50 mM/**Asc** 1 mM/**Fe(II)** 0,1 mM à l'instant t initial ; **(b)** à un temps t = 72 h ; **(c)** après un temps t = 168 h.

Après 72 h, le rapport signal sur bruit est bien plus faible qu'à t_0 : si l'adduit de spin **DEPMPO-R2** est difficilement observable, l'adduit de spin **DEPMPO-R1** est toujours largement détectable. Néanmoins, au bout d'une semaine (t = 168 h) aucun adduit n'est plus détecté.

2.2.2. Étude du **Lim-2-OOH** en solution

Pour le système **DEPMPO** 50 mM/**Lim-2-OOH** 1 mM/**Fe(II)**, quatre adduits de spin ont été détectés. Selon la littérature existante, ces adduits ont été attribués au piégeage des radicaux hydroxyles (**DEPMPO-OH**), de radicaux centrés sur le carbone (**DEPMPO-R6** et **DEPMPO-R6'**) et de radicaux oxygénés **DEPMPO-OOLim2** (Figure 25, Tableau 3).²³

Tableau 3 : *hfccs*, *g* et quantification relative des adduits de spin identifiés pour le système **DEPMPO** 50 mM / **Lim-2-OOH** 1 mM / **Fe(II)** 0,1 mM.

DEPMPO-R6 (ca. 73 %)	DEPMPO-OH (ca. 9 %)	DEPMPO-OOLim2 (ca. 9 %)	DEPMPO-R6' (ca. 9 %)
$g = 2,0058$	$g = 2,0059$	$g = 2,0057$	$g = 2,0058$
$a_N = 14,5 \text{ G}$	$a_N = 14,1 \text{ G}$	$a_N = 14,5 \text{ G}$	$a_N = 14,6 \text{ G}$
$a_H = 21,6 \text{ G}$	$a_H = 13,5 \text{ G}$	$a_H = 14,6 \text{ G}$	$a_H = 21,2 \text{ G}$
$a_P = 47,0 \text{ G}$	$a_P = 47,6 \text{ G}$	$a_P = 53,5 \text{ G}$	$a_P = 52,8 \text{ G}$

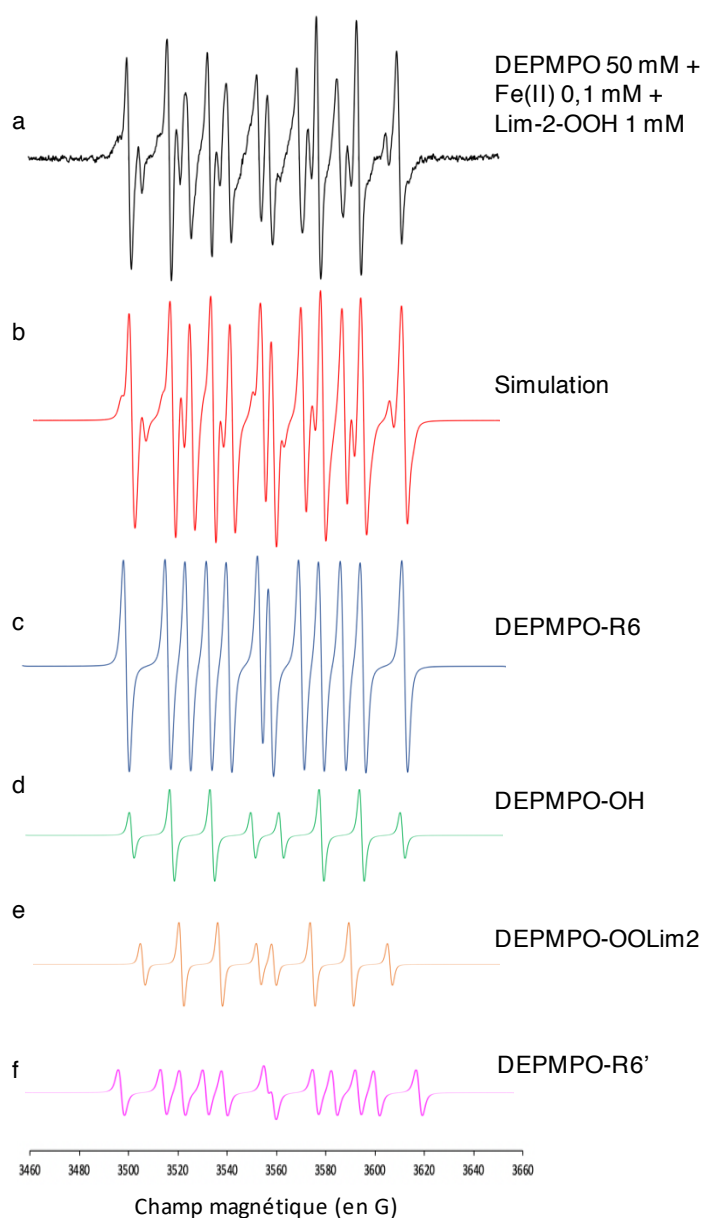


Figure 25 : (a) Spectre de RPE des adduits de spin formé avec le **DEPMPPO** 50 mM/**Lim-2-OOH** 1 mM/**Fe(II)** 0,1 mM ; (b) simulation du spectre expérimental ; et (c et d) sa déconvolution en DEPMPPO-R6 (ca. 73 %), DEPMPPO-OH (ca. 9 %), DEPMPPO-OOLim2 (ca. 9 %) et DEPMPPO-R6' (ca. 9 %).

Dans un premier temps, le clivage de la liaison O-O génère des radicaux alkoxyles. Puis, par réarrangement radicalaire dû à la présence de double liaisons (cyclisation intramoléculaire, abstraction d'hydrogène allylique...) conduirait à la formation de radicaux carbonés à l'origine de l'adduit de spin DEPMPPO-R6 et DEPMPPO-R6' (Figure 26).

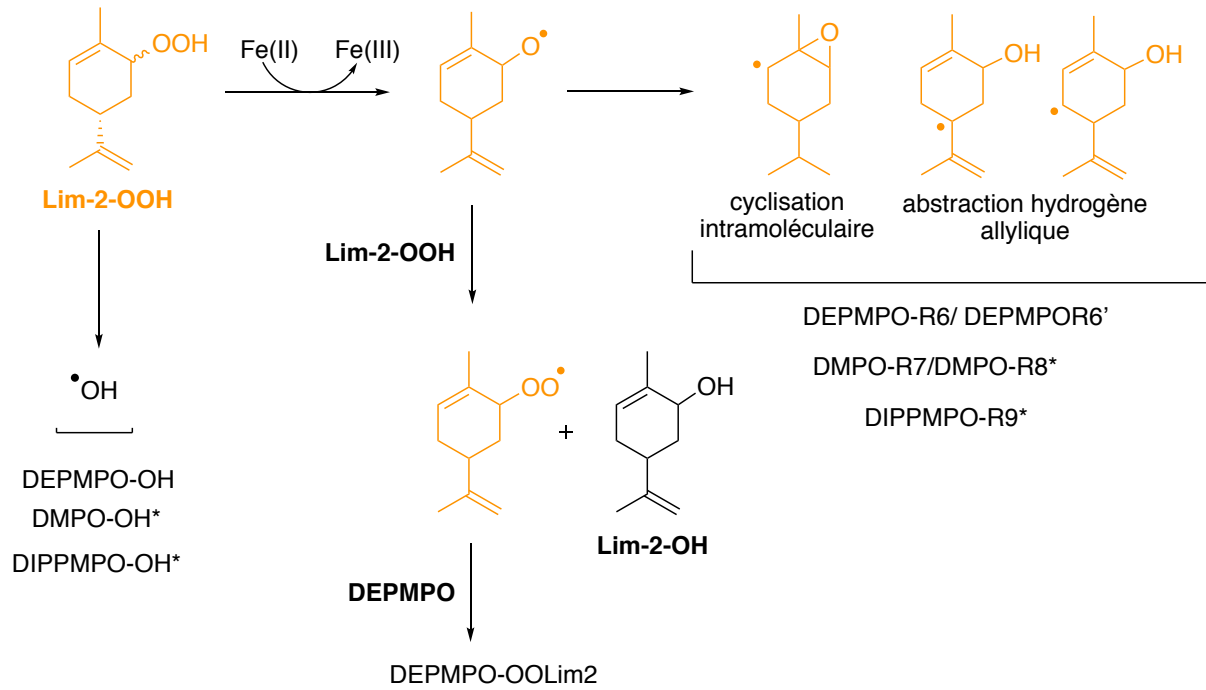


Figure 26 : Décomposition radicalaire du **Lim-2-OOH** en présence de Fe(II) : proposition de mécanismes en accord avec les spin aduits observés (* voir annexes).

En augmentant la concentration en Fe(II) à 1 mM, des aduits de spin identiques à ceux obtenus précédemment ont été détectés. Les proportions relatives sont elles restées stables (ca. 73 % pour DEPMPPO-R6, ca. 9 % pour DEPMPPO-OH, ca. 9 % pour DEPMPPO-OOLim2 et ca. 9 % pour DEPMPPO-R6') (Annexe 4).

La cinétique de dégradation des aduits a été étudiée. Ainsi, à $t = 10$ h, seul l'adduit DEPMPPO-R6 est observé (Figure 27).

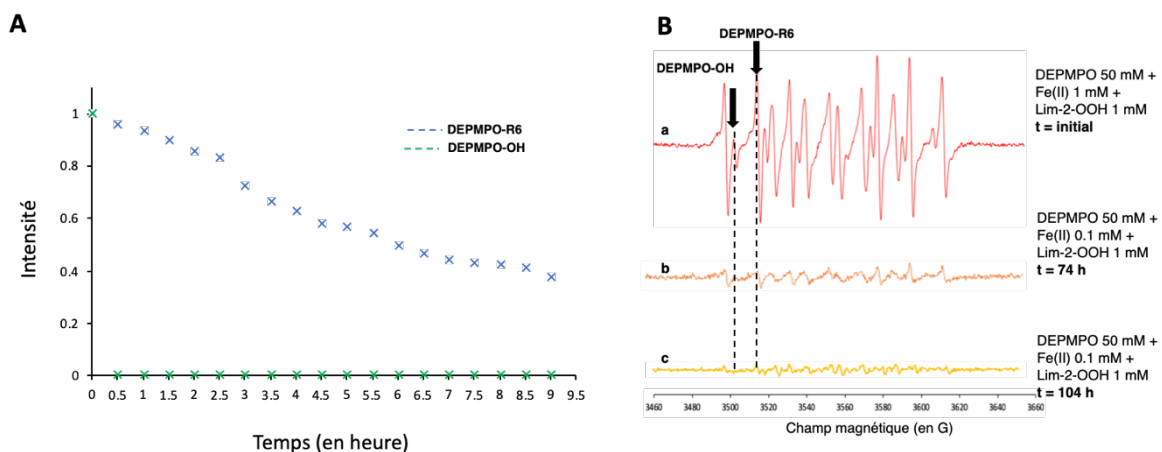


Figure 27 : (A) Cinétique de dégradation des aduits de spin **DEPMPPO** 50mM/ **Lim-2-OOH** 1 mM/Fe(II) 0,1 mM ; (B) Spectre de RPE (a) à un temps t initial ; (b) au bout de 74 h ; puis (c) après 104 h.

Au cours de cette cinétique, nous observons que l'intensité de l'adduit DEPMPPO-OH disparaît au cours des 30 premières minutes. A partir de ce temps, il devient difficilement

observable (*Figure 27A*). L'adduit DEPMPPO-R6 quant à lui présente une décroissance bien plus lente, et reste observable après plus d'une centaine d'heure (*Figure 27B*). De ce fait, la quantification relative des radicaux générés au travers de celle des spins adduits est simplement hors de propos. Les intensités relatives des spins adduits avancés dans ce travail sont donc simplement indicatives des ratios utilisés pour la simulation des spectres.

2.2.3. Étude du (1S, 4R)-Lim-1-OOH en solution

La dégradation radicalaire du (1S, 4R)-Lim-1-OOH conduit à la formation de radicaux carbonés et oxygénés de la même manière que pour le Lim-2-OOH. Cette fois-ci, de plus, une β -scission peut-être est favorisé par l'obtention d'une cétone α,β -insaturée et d'un radical méthyle (*Figure 28*).

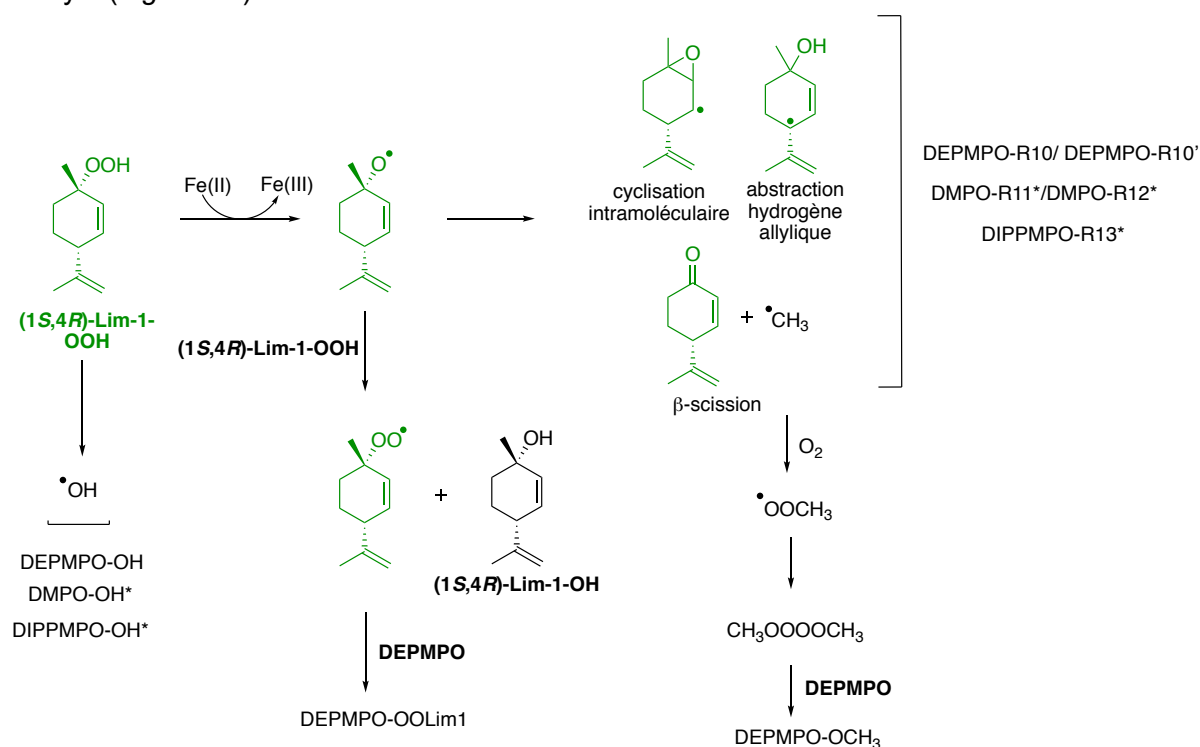


Figure 28 : Décomposition radicalaire du (1S,4R)-Lim-1-OOH en présence de Fe(II) : proposition de mécanismes en accord avec les spin adduits observés (* voir annexes).

En présence du **DEPMPPO**, on retrouve les signatures de RPE typiques d'un piégeage d'un radical carboné DEPMPPO-R10 et du radical hydroxyle DEPMPPO-OH (*Figure 29*). De plus, nous observons la présence d'un adduit de spin correspondant au piégeage d'un radical carboné DEPMPPO-R10' caractérisé par une constante de couplage a_P bien plus grande et le piégeage d'un radical oxygéné pouvant correspondre aux adduits DEPMPPO-OOLim1 ou DEPMPPO-OCH₃ dont la formation est expliquée par le fait que le radical méthyle généré est capable de réagir avec l'oxygène moléculaire dissout dans la solution formant ainsi le radical

$\text{CH}_3\text{COO}^\bullet$ réagissant sur lui-même et formant le radical $\text{CH}_3\text{O}^\bullet$ qui pourrait être à l'origine de l'adduit DEPMPO-OCH_3 . Le radical oxygéné initialement formé est capable de réagir avec le **(1S, 4R)-Lim-1-OOH** en lui permettant d'arracher un hydrogène pour former le **(1S, 4R)-Lim-1-OH** ainsi que le radical **(1S, 4R)-Lim-1-OO \bullet** qui serait alors à l'origine de l'adduit observé avec le DEPMPO, le DEPMPO-OOLim1 (*Figure 28*).

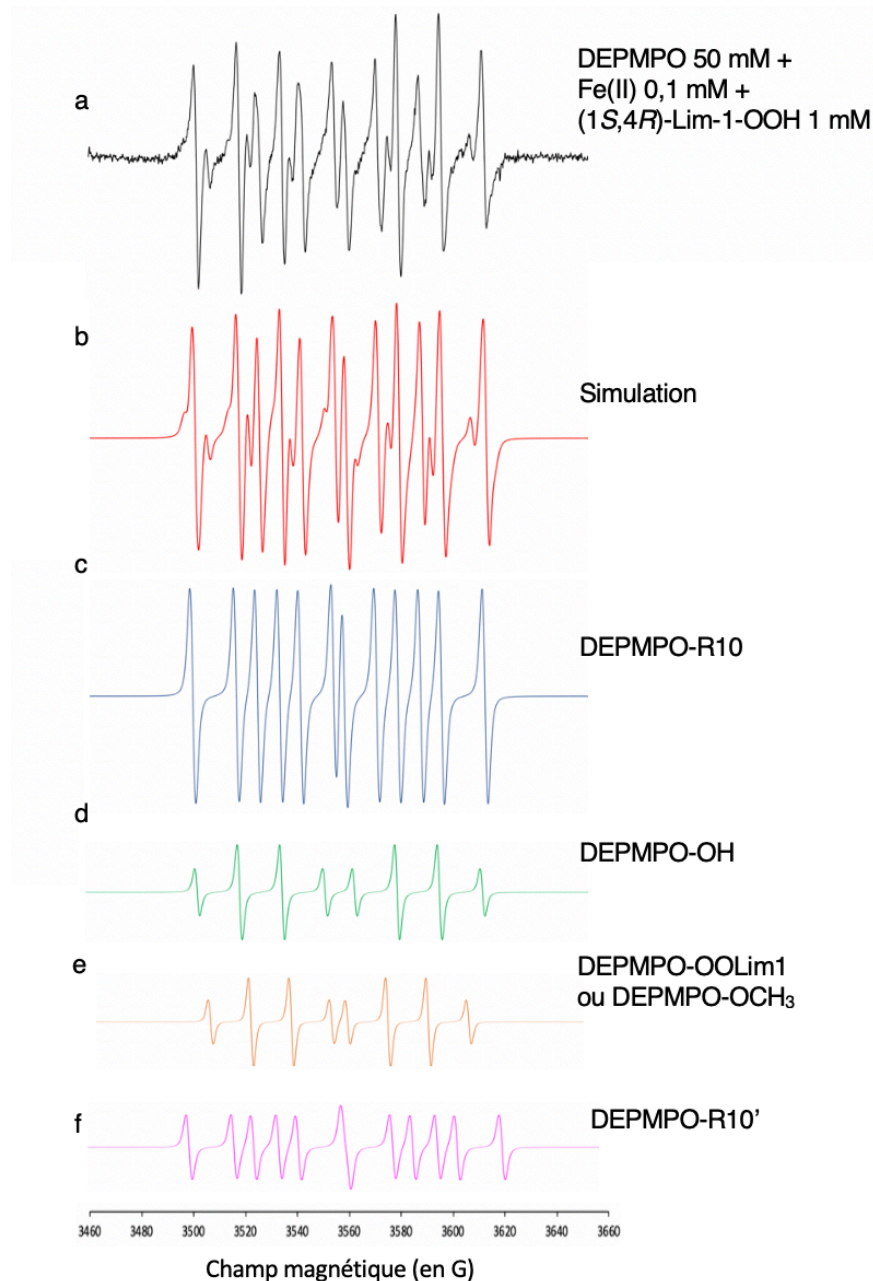


Figure 29 : (a) Spectre de RPE des adduits de spin formé avec le **DEPMPO** 50 mM/**(1S, 4R)-Lim-1-OOH** 1 mM/**Fe(II)** 0,1 mM ; (b) simulation du spectre expérimental et ; (c et d) sa déconvolution en **DEPMPO-R10** (ca. 73 %), **DEPMPO-OH** (ca. 8 %), **DEPMPO-OOLim1** ou **DEPMPO-OCH₃** (ca. 9 %) et **DEPMPO-R10'** (ca. 10 %).

Très semblables aux spectres obtenus avec le **Lim-2-OOH**, les adduits formés présentent des *hfccs* également très proches (*Tableau 4*).

Tableau 4 : hfccs, g et quantification relative des adduits de spin identifiés pour le système DEPMPPO 50 mM/ (1S, 4R)-Lim-1-OOH 1 mM/Fe(II) 0,1 mM.

DEPMPPO-R10 (ca. 73 %)	DEPMPPO-OH (ca. 9 %)	DEPMPPO-OOLim1 ou DEPMPPO-OCH ₃ (ca. 8 %)	DEPMPPO-R10' (ca. 10 %)
$g = 2,0057$	$g = 2,0058$	$g = 2,0057$	$g = 2,0058$
$a_N = 14,6$ G	$a_N = 14,0$ G	$a_N = 14,3$ G	$a_N = 14,8$ G
$a_H = 21,6$ G	$a_H = 13,9$ G	$a_H = 14,4$ G	$a_H = 21,3$ G
$a_P = 47,3$ G	$a_P = 47,4$ G	$a_P = 53,1$ G	$a_P = 52,6$ G

En présence de Fe(II) 1 mM, seuls les adduits DEPMPPO-R10 et DEPMPPO-R10' sont observables (Annexe 7). Dans les mêmes conditions, une augmentation de la concentration en (1S,4R)-Lim-1-OOH permet d'observer l'apparition de l'adduit DEPMPPO-OH avec une proportion relative de ca. 17 %.

Comme pour les études précédentes, nous avons essayé de déterminer le temps de vie des adduits de spin formés. Nous observons que durant les 9 premières heures, l'intensité de l'adduit DEPMPPO-R10 décroît linéairement. En ce qui concerne l'adduit DEPMPPO-OH, il n'est présent qu'à l'état de trace au bout de 30 min (Figure 30A). Par ailleurs, nous avons poursuivi cette cinétique jusqu'à la disparition totale du signal et nous avons pu observer qu'après $t = 120$ h, des traces d'adduits de spin correspondant au DEPMPPO-R10 semblent être présentes mais les différentes raies restent difficilement distinguables (Figure 30B).

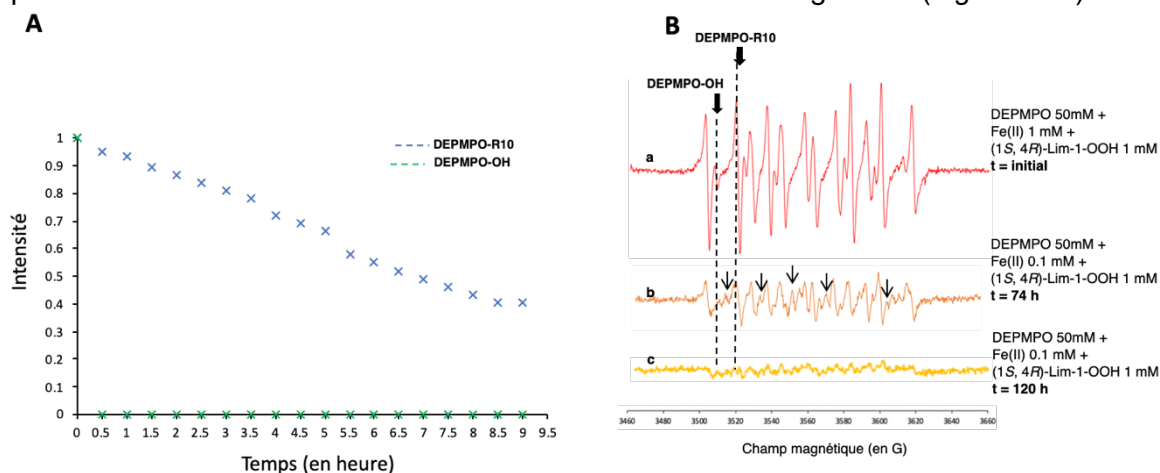


Figure 30 : (A) Cinétique des durées de vie des adduits formés lors de la réaction entre le DEPMPPO 50 mM/(1S,4R)-Lim-1-OOH 1 mM/ Fe(II) 0,1 mM et ; (B) Spectre de RPE (a) à un temps t initial ; (b) au bout de 74 h ; puis (c) après 120 h. Note : à $t = 74$ h, un adduit supplémentaire est observé (indiqué par \rightarrow) que l'on peut attribuer à des artéfacts engendrés par la dégradation/réarrangement des adduits initiaux.

2.2.4. Étude du (\pm)-Citr-7-OOH en solution

En s'intéressant maintenant à l'hydroperoxyde allylique (\pm)-Citr-7-OOH dérivée du (\pm)- β -citronellol, nous avons pu constater qu'en présence de 0,1 mM Fe(II), le **DEPMPO** était capable de piéger des radicaux hydroxyles, oxygénés mais également carbonés DEPMPO-R14 et DEPMPO-R14' (*Figure 31, Tableau 5*).

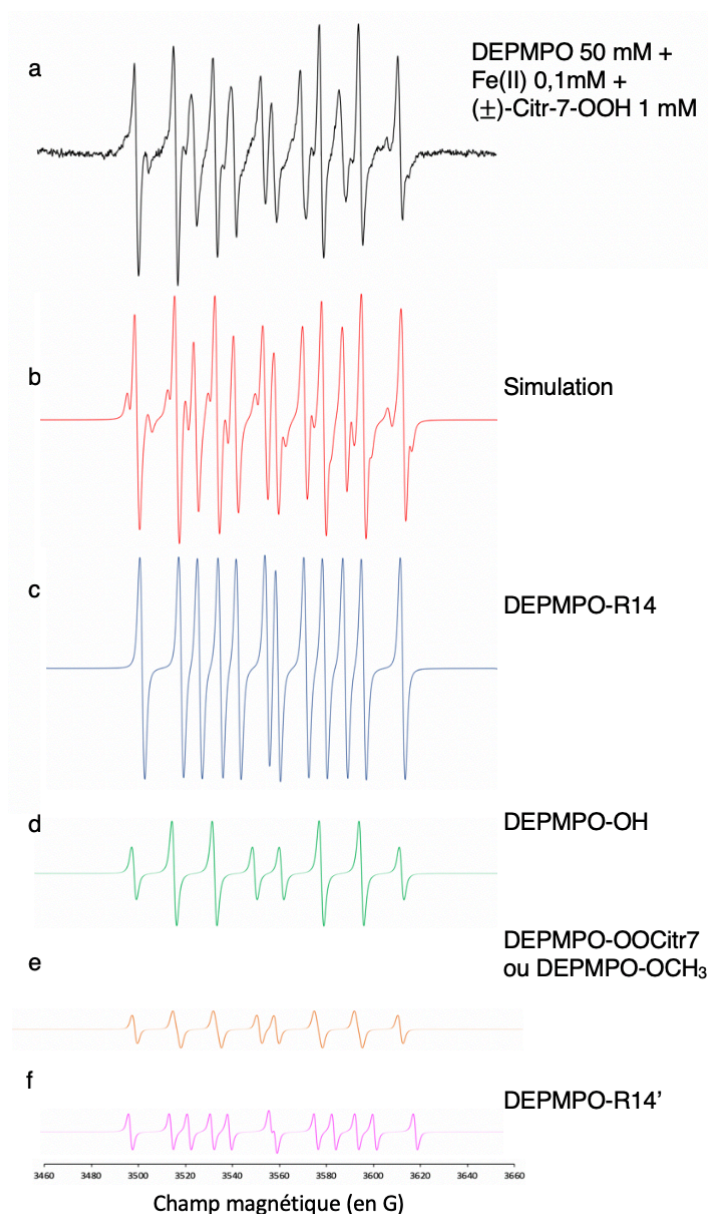


Figure 31 : (a) Spectre de RPE des adduits de spin formés avec le **DEPMPO** 50 mM/ (\pm)-Citr-7-OOH 1 mM/Fe(II) 0,1 mM ; (b) simulation de (a) et (c et d) sa déconvolution en DEPMPO-R14 (ca. 66 %), DEPMPO-OOCitr7 ou DEPMPO-OCH₃ (ca. 16 %), DEPMPO-OH (ca. 7 %) et DEPMPO-R14' (ca. 11 %).

Tableau 5 : *hfccs*, *g* et quantification relative des adduits de spin identifiés pour le système DEPMPO 50 mM/ (±)-Citr-7-OOH 1 mM/Fe(II) 0,1 mM.

DEPMPO-R14 (ca. 66 %)	DEPMPO-OOCitr7 ou DEPMPO-OCH ₃ (ca. 16 %)	DEPMPO-OH (ca. 7 %)	DEPMPO-R14' (ca. 11 %)
<i>g</i> = 2,0057	<i>g</i> = 2,0058	<i>g</i> = 2,0058	<i>g</i> = 2,0058
<i>a_N</i> = 14,7 G	<i>a_N</i> = 14,6 G	<i>a_N</i> = 14,3 G	<i>a_N</i> = 14,8 G
<i>a_H</i> = 21,6 G	<i>a_H</i> = 14,8 G	<i>a_H</i> = 13,5 G	<i>a_H</i> = 21,9 G
<i>a_P</i> = 47,0 G	<i>a_P</i> = 54,0 G	<i>a_P</i> = 47,5 G	<i>a_P</i> = 51,6 G

En augmentant la concentration en Fe(II) à 1 mM, l'adduit DEPMPO-OH devient difficilement observable, notamment du fait de l'apparition d'un second spin adduit DEPMPO-R15 résultant du piégeage d'un radical carboné (*Annexe 10*). En présence d'un excès de (±)-Citr-7-OOH (4 mM) par rapport au Fe(II) (1 mM), seuls les deux systèmes carbonés sont majoritairement observés, l'adduit DEPMPO-OH n'est présent qu'à l'état de traces.

En présence de Fe(II), le radical hydroxyle est piégé par les trois piègeurs de spin étudiés. Ces résultats nous ont permis de dresser une voie mécanistique où les radicaux carbonés sont générés *via* un réarrangement du radical oxygéné par une cyclisation intramoléculaire, l'abstraction d'hydrogène allylique ou encore par β-scission. Ces radicaux carbonés sont très susceptibles d'être à l'origine des adduits DEPMPO-R14 ou DEPMPO-R14' observés (*Figure 32*). Des radicaux peroxydes sont piégés en présence de DMPO (*Annexe 11*). A l'issue de la β-scission, le radical méthyle généré est capable de réagir avec l'oxygène moléculaire dissout dans la solution formant ainsi le radical CH₃COO· réagissant sur lui-même et formant le radical CH₃O· qui pourrait être à l'origine de l'adduit DMPO-OCH₃. Le radical oxygéné initialement formé est capable de réagir avec le (±)-Citr-7-OOH en lui permettant d'arracher un hydrogène pour former le (±)-Citr-7-OH ainsi que le radical (±)-Citr-7-OO· qui serait alors à l'origine de l'adduit observé avec le DMPO.

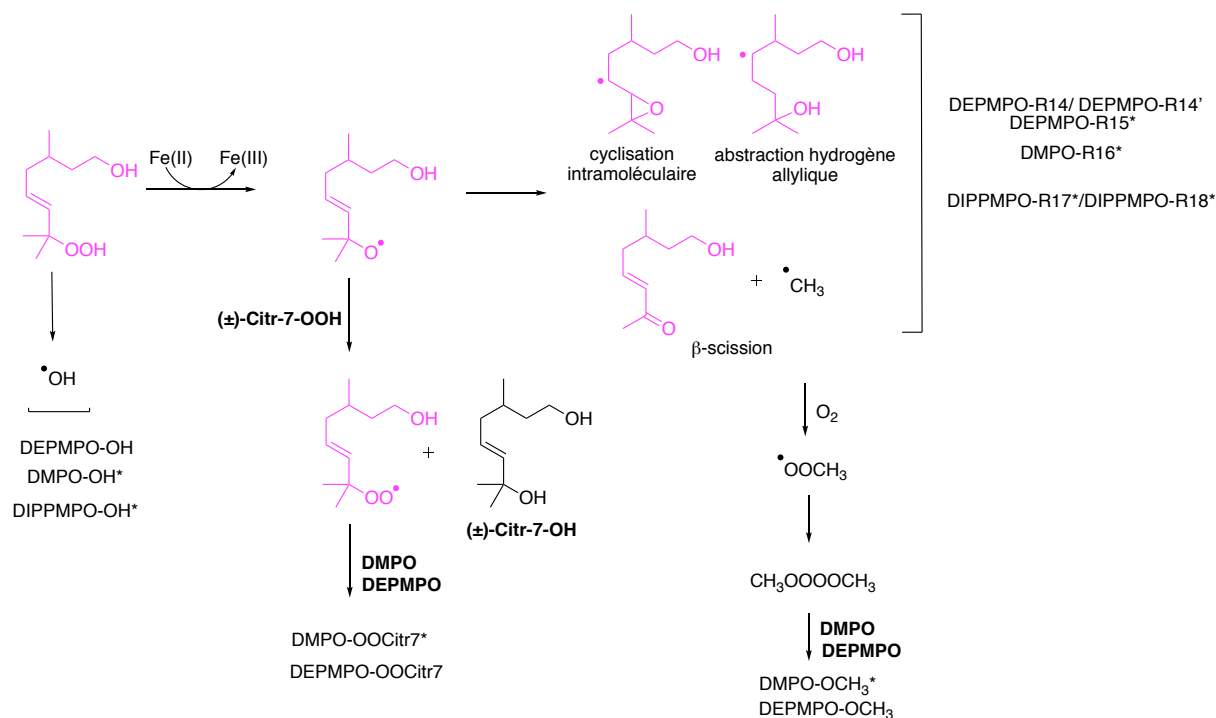


Figure 32 : Décomposition radicalaire du (±)-Cit-7-OOH en présence de Fe(II) : proposition de mécanismes en accord avec les spin adduits observés (* voir annexes).

De manière identique aux hydroperoxydes dérivés du *R*-(+)-limonène nous avons cherché à estimer la persistance des adduits de spin formés, ainsi une cinétique a été réalisée pour cette échantillon. Nous observons que les adduits sont moins persistants que ceux de l'étude du **Lim-2-OOH** ou **(1S, 4R)-Lim-1-OOH**. Après 30 min, l'adduit DEPMPPO-OH disparaît alors que l'adduit DEPMPPO-R14 persiste (Figure 33A). Dès 36 h, le DEPMPPO-R14 devient difficilement observable (Figure 33B). Au bout d'environ 72 h, aucun adduits de spin n'est détecté (Figure 33A).

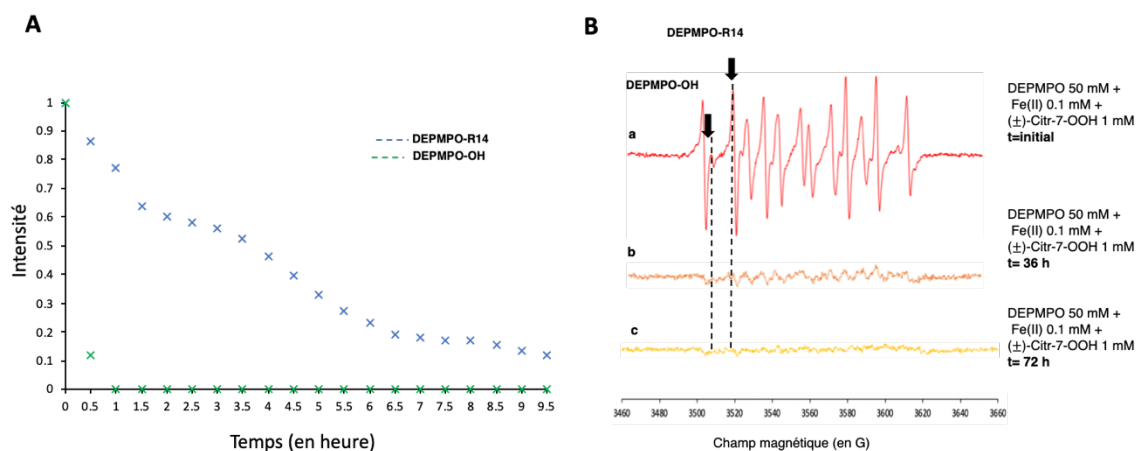


Figure 33 : (A) Cinétique des durées de vie des adduits formés lors de la réaction entre le **DEPMPPO** 50 mM/(±)-Cit-7-OOH 1 mM/ Fe(II) 0,1 mM et ; (B) Spectre de RPE (a) à un temps t initial ; (b) au bout de 36 h ; puis (c) après 72 h.

2.2.5. Étude du mélange d'hydroperoxydes (\pm)-Citr-6-OOH et (\pm)-Citr-7-OOH en solution

En raison de la difficulté de l'obtention du (\pm)-Citr-6-OOH, nous avons décidé de tester le mélange d'isomères (\pm)-Citr-6-OOH et (\pm)-Citr-7-OOH. Un profil de piégeage similaire à celui du (\pm)-Citr-7-OOH seul a été observé (*Figure 34*). Il faut remarquer que la distribution des adduits radicalaires détectés diffère de celle obtenue avec le (\pm)-Citr-7-OOH. Une majorité de DEPMPO-OH a été détecté. En outre l'obtention d'un radical carboné, un autre a pu être piégé en présence du mélange d'hydroperoxydes. Ce dernier pourrait provenir du (\pm)-Citr-6-OOH. L'abondance de DEPMPO-OH peut être expliquée par le fait qu'il y en ait largement plus dans le milieu provenant à la fois du (\pm)-Citr-7-OOH mais aussi du (\pm)-Citr-6-OOH (*Tableau 6*).

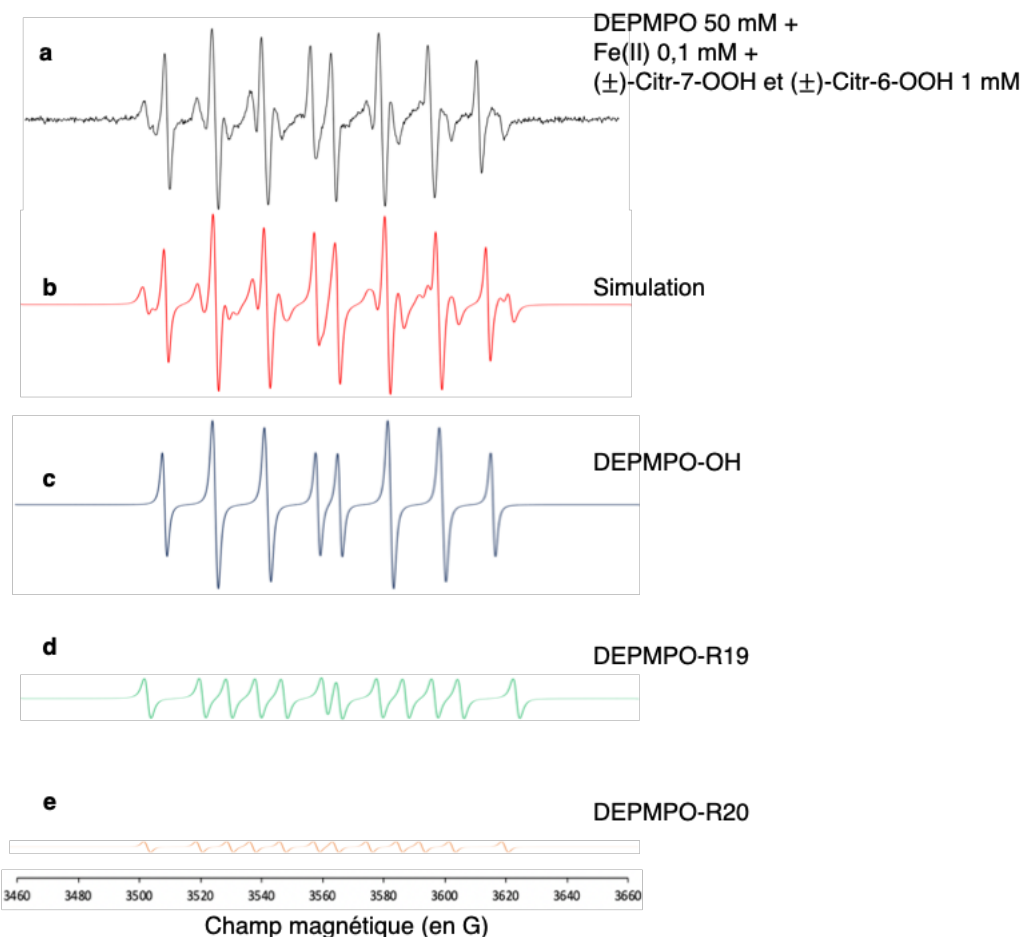


Figure 34 : (a) Spectre de RPE des adduits de spin formé avec le **DEPMPO** 50 mM/(\pm)-Citr-6-OOH et (\pm)-Citr-7-OOH (1 mM)/Fe(II) (0,1 mM) ; (b) simulation du spectre expérimental et (c, d et e) sa déconvolution en DEPMPO-OH (ca. 61 %) ; DEPMPO-R19 (ca. 29 %) et DEPMPO-R20 (ca. < 5 %).

Tableau 6 : hfccs, g et quantification relative des adduits de spin identifiés pour le système DEPMPO 50 mM/(±)-Citr-6-OOH et (±)-Citr-7-OOH 1 mM/Fe(II) 0,1 mM.

DEPMPO-R19 (ca. 29 %)	DEPMPO-R20 (ca. < 5 %)	DEPMPO-OH (ca. 61 %)
$g = 2,0049$	$g = 2,0050$	$g = 2,0050$
$a_N = 15,2 \text{ G}$	$a_N = 14,3 \text{ G}$	$a_N = 14,2 \text{ G}$
$a_H = 22,3 \text{ G}$	$a_H = 22,4 \text{ G}$	$a_H = 13,4 \text{ G}$
$a_P = 48,7 \text{ G}$	$a_P = 45,9 \text{ G}$	$a_P = 47,7 \text{ G}$

L'adduit issu du piégeage d'un radical carboné peut être expliqué par le clivage de la liaison O-O du (±)-Citr-6-OOH et/ou du (±)-Citr-7-OOH, puis au vu de l'instabilité des radicaux oxygénés, les réarrangements potentiels par cyclisation intramoléculaire, par abstraction d'hydrogène allylique et/ou par β-scission conduiraient à des radicaux carbonés (Figure 35). On se retrouve alors en présence d'un mélange de radicaux carbonés et oxygénés qui vont être piégés par les piègeurs de spin.

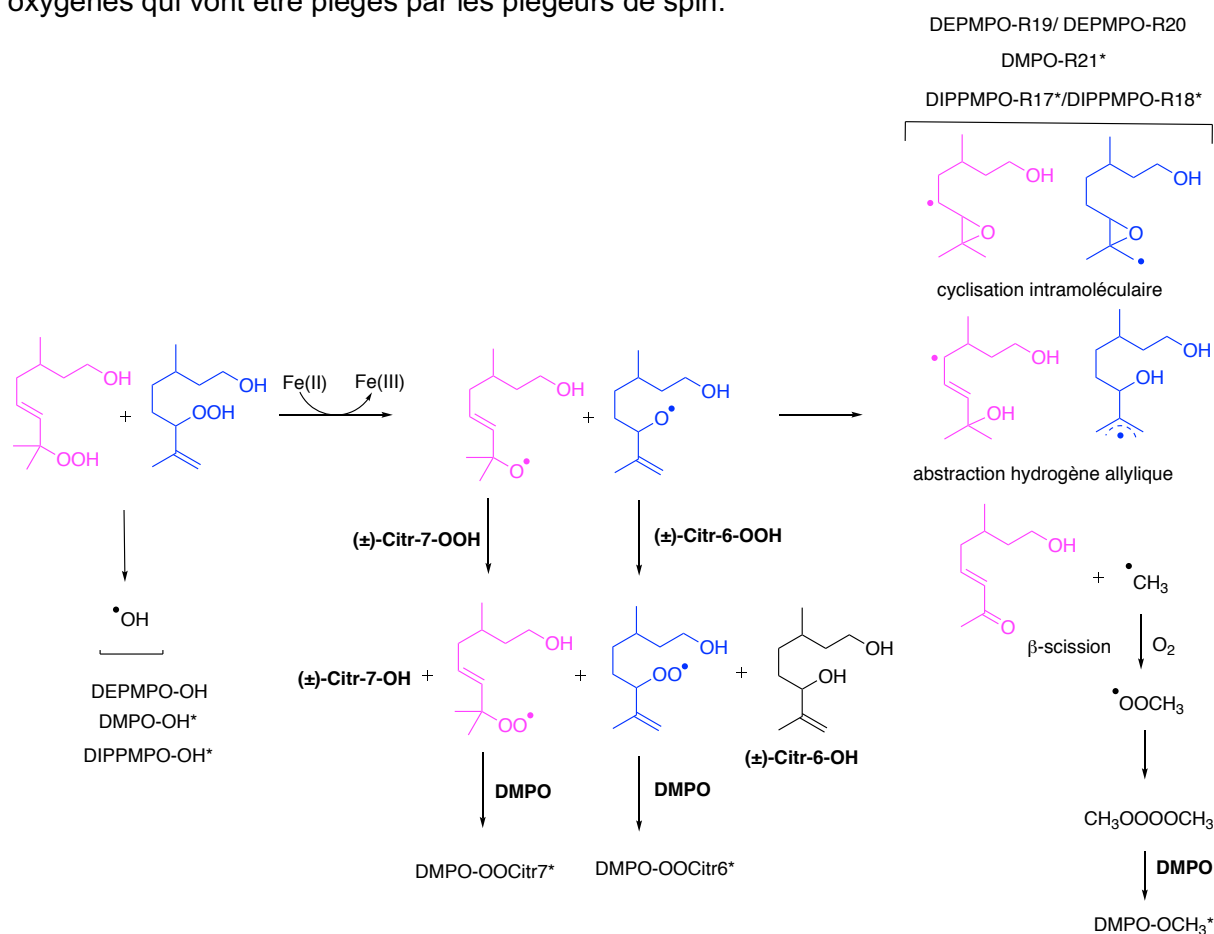


Figure 35 : Décomposition radicalaire du mélange (±)-Citr-6-OOH et (±)-Citr-7-OOH en présence de Fe(II) : proposition de mécanismes en accord avec les spin adduits observés (* voir annexes).

L'Annexe 13 présente les *hfccs* en présence de DEPMPO. Nous observons le piégeage de deux espèces radicalaires carbonées DEPMPO-R19, DEPMPO-R20 et du radical hydroxyle. La présence d'un nouvel adduit par rapport aux mêmes conditions expérimentales telles qu'utilisées avec le (\pm)-Citr-7-OOH suggère l'origine de ce dernier comme étant lié au (\pm)-Citr-6-OOH.

Concernant la durée de vie des adduits liés au mélange (\pm)-Citr-6-OOH et (\pm)-Citr-7-OOH en solution, une étude cinétique a été réalisée et s'est avérée être similaire à celle obtenue avec le (\pm)-Citr-7-OOH. Bien que le spectre à l'instant t_0 initial présente une abondance de l'adduit DEPMPO-OH, ce dernier n'est plus observable au bout de 30 min, seul les adduits DEPMPO-R19 et DEPMPO-R20 restent visibles (Figure 36A). A $t = 68$ h, les adduits sont difficilement détectables (Figure 36B).

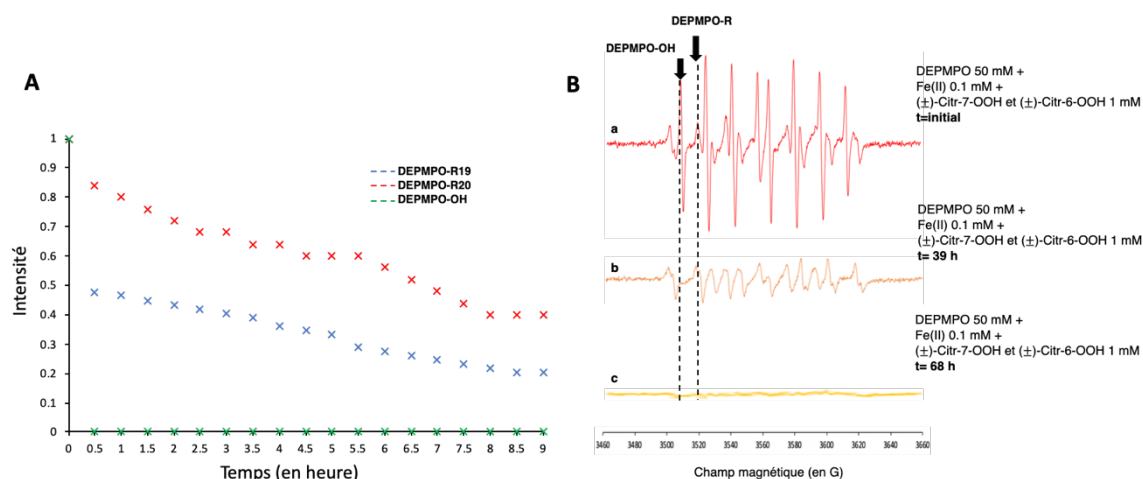


Figure 36 : (A) Cinétique des durées de vie des adduits formés lors de la réaction entre le DEPMPO 50 mM/(\pm)-Citr-6-OOH et (\pm)-Citr-7-OOH 1 mM/ Fe(II) 0,1 mM et ; (B) Spectre de RPE (a) à un temps t initial ; (b) au bout de 39 h ; puis (c) après 68 h.

2.3. Conclusion

L'approche par piégeage de spin en utilisant les pièges DMPO, DEPMPO et DIPPMPPO a permis de caractériser des intermédiaires radicalaires issus des composés d'étude en solution. Pour chacune des expériences, des contrôles ont été réalisés avec les piègeurs de spin en présence ou en absence de Fe(II). Ceci a permis de confirmer que l'initiation radicalaire induite par réaction de type Fenton entraîne la formation de radicaux carbonés et/ou oxygénés pour chacun des composés étudiés.

Il semblerait que les hydroperoxydes subissent d'abord un clivage de la liaison O-O puis se réarrangent suivant des mécanismes spécifiques. Des adduits de spin issus du piégeage

de radicaux hydroxyles ont été détectés quelque soit le piège utilisé. Néanmoins, les structures exactes des radicaux carbonés piégés n'ont pas pu être élucidées. Pour cela, il serait intéressant de combiner les techniques de spectrométrie de masse telles que la ESI-MS/MS (*Electro-Spray-Ionization tandem Mass Spectrometry* en anglais) et la HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*) pour séparer et caractériser directement les adduits formés comme cela a été décrit par Mason et al.⁴³

Par observations des différents spin adduits, des similitudes communes aux différents hydroperoxydes sont observées, bien que leurs proportions relatives apparaissent différentes. Pour ce qui est du **Lim-2-OOH** et le **(1S, 4R)-Lim-1-OOH**, on pourrait s'attendre à ce qu'ils aient un comportement similaire vis-à-vis des piègeurs de spin. Or, ce n'est pas le cas et les différences observées peuvent s'expliquer par leur isomérisation de position. Il n'est pas insensé de penser que les cinétiques de réarrangements par voie radicalaire soient fonction de la structure moléculaire du composé en question. Dans le but d'élucider cette relation entre les structures moléculaires et la nature exacte des radicaux mis en évidence, des investigations complémentaires de DFT (*Density Functional Theory*) pourraient être effectuées afin de déterminer les intermédiaires les plus enclins à se former.

Ces études ont révélé que plusieurs intermédiaires radicalaires issus des composés d'étude sont susceptibles de se former en fonction de leur structure chimique, ce qui suggère qu'une ou plusieurs modifications des protéines peuvent conduire à une sensibilisation. Cependant, il faut rappeler que ces études ont été réalisées en solution et elles sont donc relativement éloignées d'un scénario « réel » lors d'un contact avec la peau. Pour s'en rapprocher, une étude avec un modèle d'épidermes humain reconstitué a donc été menée.

Finalement, la décroissance relative plus rapide des spins adduits de type DEPMPO-OH en comparaison avec ceux de type DEPMPO-R, pointent également les limites de notre approche quant à l'extrapolation des quantités relatives (et donc absolue) de radicaux générés. Les ratios des spin-adduits qui sont données dans ce travail, le sont donc à titre indicatif et n'indiquent rien d'autre que les intensités relatives estimées lors des simulations des différents spectres RPE.

3. Identification des espèces radicalaires issues des composés cibles : études avec un modèle d'épidermes humain reconstitué

Après les essais en solution, le travail a été transposé sur un modèle 3D d'épiderme humain reconstitué (RHE). L'intérêt de ce travail était de mettre en évidence des composés étudiés au travers de mécanismes radicalaires lors d'un contact cutané. L'utilisation de ce modèle 3D a été préféré pour étudier la formation et le comportement de radicaux issus de des molécules d'étude tout en s'approchant au plus près d'un scénario « réel », mimant le contact entre ces composés et la peau.

3.1. Les épidermes humains reconstitués

La RPE associée au piégeage de spin sur un modèle 3D d'épiderme humain reconstitué n'avait auparavant jamais été développée pour l'étude de radicaux dérivés d'allergènes cutanés. Les RHE EpiSkin™ (Lyon, France) sont des cultures de kératinocytes normaux humains provenant de patients ayant subi des opérations chirurgicales, qui ont été reconstitués sur une matrice de collagène à l'interface air-liquide sur 13 jours. Ce modèle est histologiquement similaire à l'épiderme humain présentant un *stratum corneum* (couche cornée) ainsi que différents lipides présents dans les épidermes classiques comprenant les céramides (Figure 37).⁴⁴

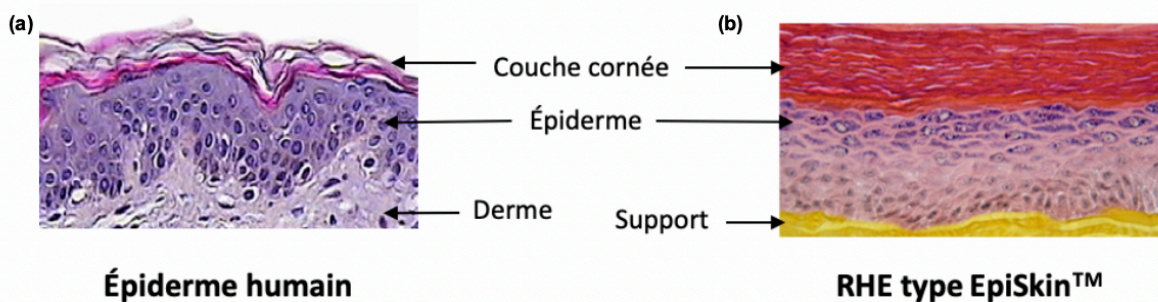


Figure 37 : Coupes histologiques (a) d'un épiderme humain et (b) du modèle EpiSkin™ utilisé lors de nos études.⁴⁴

Il existe deux modèles commercialisés de EpiSkin™ correspondant à deux formats. Le premier est un format large (1,07 cm²) et un format plus étroit (0,38 cm²). Dans le cadre de nos études, le format plus petit de 0,38 cm² a été utilisé pour des raisons pratiques de manipulation.

3.2. Procédure générale

A l'issue des études en solution, le **DEPMPO** a été choisi comme piègeur de spin pour poursuivre les études sur les RHE en raison de la persistance élevée des adduits formés avec les radicaux alkyl-peroxyde qui est, pour nous, un critère essentiel pour nos études.²³ Il a d'abord fallu trouver les conditions techniques adéquates de manière à obtenir des spectres RPE présentant un rapport signal/bruit (S/N) convenable. L'utilisation d'une solution aqueuse (ce qui complique la mesure en raison de sa constante diélectrique élevée), le maintien de la viabilité cellulaire de l'épiderme dans la cellule plate pendant l'expérience ainsi que l'utilisation d'une concentration importante d'hydroperoxyde vis-à-vis du **DEPMPO** faisaient partie des paramètres délicats à prendre en compte. Plusieurs procédures ont donc été mises à l'essai au laboratoire afin de mettre au point le protocole le plus adapté et le plus efficace.⁴⁵ Une approche par voie topique des molécules cibles a été retenue pour nos études en raison de résultats prometteurs obtenus précédemment. Les RHE ont tout d'abord été mis en contact avec le DEPMPO pour optimiser leur probabilité de présence sur le site de génération radicalaire et ce avant l'application des molécules cibles.⁴⁶

Dès leur réception, les RHE sont immédiatement replacés dans un milieu de maintenance EpiSkin™ riche en nutriments, dans une plaque de 12 puits (2 mL par puit) sous une hotte stérile à température ambiante. Les échantillons sont ensuite maintenus dans un incubateur pendant 24 h à 37 °C sous une atmosphère à 5% en CO₂ saturée en humidité avant leur utilisation. Cette procédure est à renouveler journalièrement.

Lors d'une expérience, le RHE est retiré du milieu de maintenance et le DEPMPO est ajouté sur la surface (20 µL à une concentration de 250 mM) et incubé pendant 15 minutes (37°C, 5% CO₂, humidité saturée). Passé ce temps, l'échantillon est décollé de son support pour être déposé sur une cellule plate (Wilmad, #WG-806-Q) où le composé d'étude solubilisé dans l'acétone (20 µL, la concentration en hydroperoxyde dépendant de l'expérience) est ajouté par voie topique. La cellule plate est dès lors fermée de façon hermétique avec une plaque de quartz et immédiatement placée dans la cavité du spectromètre pré-accordée avant de lancer une acquisition (*Figure 38*).

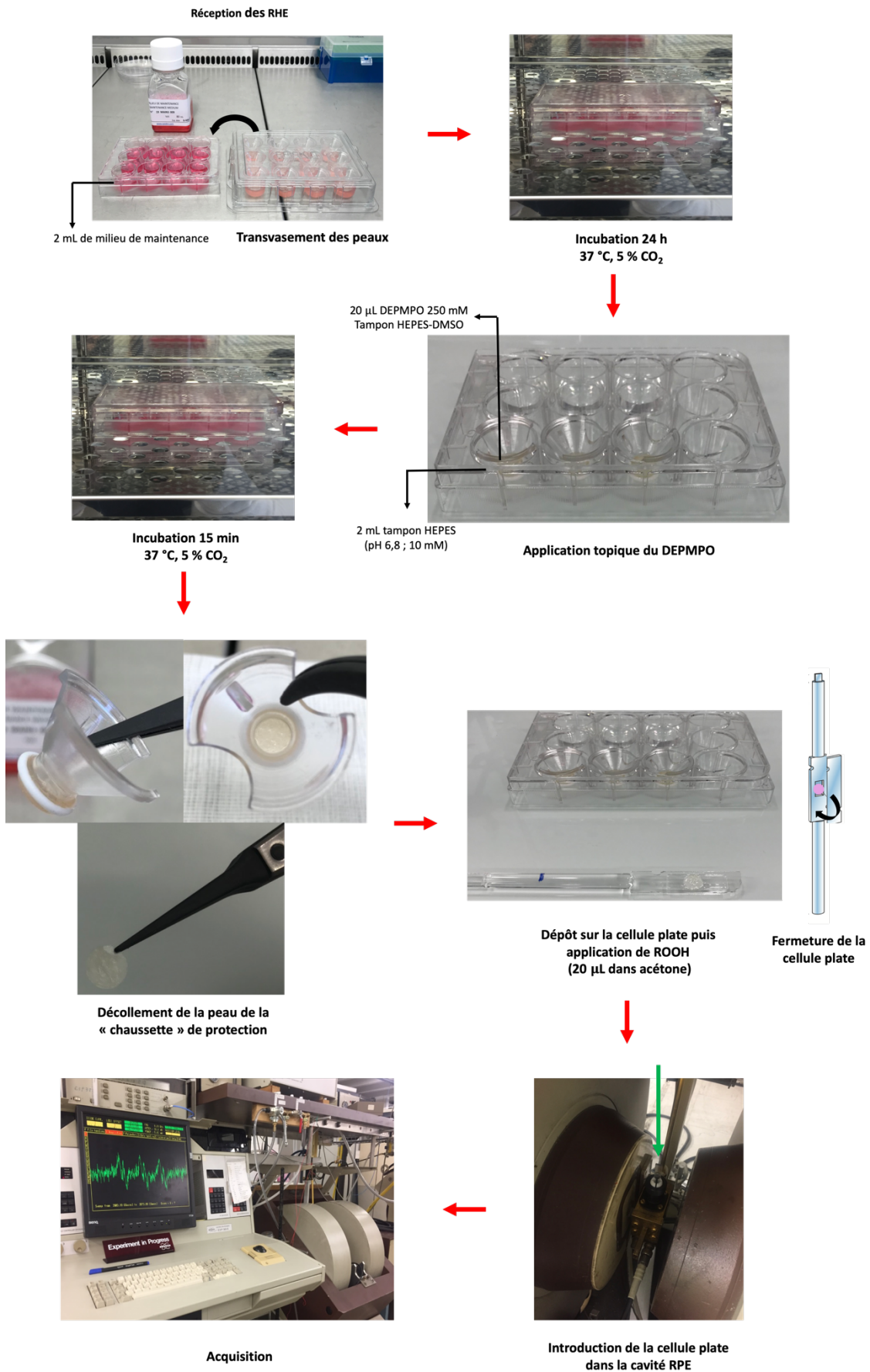


Figure 38 : Procédure générale par application topique développée pour les études avec les RHE par RPE.

Il est important de noter que toutes les expériences mettant en jeu les RHE ont été réalisées sans l'ajout de fer. Ici, l'initiation radicalaire est supposée être entraînée par des constituants endogènes de la peau (*i.e.* donneurs d'électrons, métaux, acides aminés, porphyrines...).

Pour ces expériences, le rapport signal sur bruit des spectres de RPE obtenus est inférieur à celui obtenu lors des expériences en solution. Pour cette raison et en fonction des spectres obtenus, l'estimation des valeurs de *hfccs* ou des facteur *g* ne peut pas être réalisée de manière aussi précise qu'en solution. En conséquence, les résultats expérimentaux obtenus sur les RHE vont être comparés à ceux obtenus en solution.

3.3. Résultats

Le protocole expérimental est détaillé dans la partie expérimentale de ce chapitre (p.279). Des expériences de contrôles ont été réalisées en absence et en présence de piègeur de spin, avec et sans la molécule cible.

3.3.1. Étude avec l'ascaridol

Les expériences contrôles n'ont donné aucun signal, indiquant que la présence d'**Asc** est nécessaire à la génération de radicaux dans les RHE. La simulation du spectre expérimental a pu être effectuée pour l'expérience en présence de DEPMPO 250 mM suivie de l'addition de 50 mM d'**Asc**. Cette simulation a permis la déconvolution de la signature RPE de deux radicaux carbonés (*Figure 39*) dont les caractéristiques sont regroupées dans le *Tableau 7*. Leur piégeage est en accord avec celui observé dans les études en solution.

Tableau 7 : *hfccs*, *g* et quantification relative des adduits de spin identifiés après application topique de DEPMPO 250 mM suivie de l'addition topique d'**Asc** 50 mM.

DEPMPO-R1 (ca. 83 %)	DEPMPO-R2 (ca. 17 %)
$g = 2.0049$	$g = 2.0048$
$a_N = 14.8 \text{ G}$	$a_N = 14.8 \text{ G}$
$a_H = 21.6 \text{ G}$	$a_H = 22.8 \text{ G}$
$a_P = 47.4 \text{ G}$	$a_P = 50.5 \text{ G}$

Les valeurs facteur g comme de $hfccs$ semblent être relativement en accord les études menées en solutions présentés dans le *Tableau 2*. Les différences observées, notamment pour l'un des radicaux piégés peut s'expliquer en partie par le fait que l'environnement des adduits de spin est différent en solution par rapport à celui d'un tissu hétérogène complexe tel que le RHE. Il convient de noter qu'après avoir pénétré dans le RHE, l'initiation radicalaire de l'**Asc** a dû être induite par le RHE lui-même : le Fe(II) n'ayant pas été ajouté dans ces expériences.

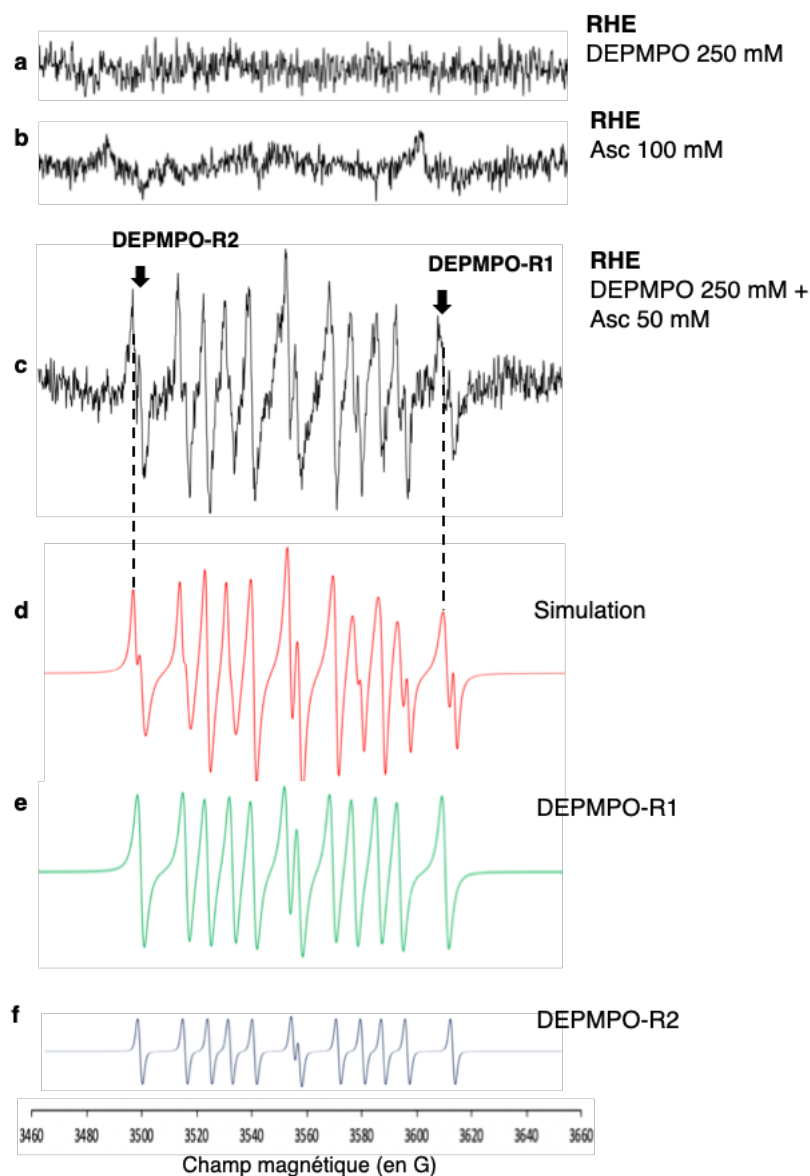


Figure 39 : Étude RPE sur RHE-**Asc** : (a) contrôle RHE-DEPMPO 250 mM ; (b) contrôle RHE-**Asc** 100 mM ; (c) spectre RPE de RHE après incubation de **DEPMPO** 250 mM suivie d'une addition **Asc** 50 mM ; (d) simulation de (c) et sa déconvolution en DEPMPO-R1 (e) (ca. 83 %) et DEPMPO-R2 (f) (ca. 17 %).

Dans le but de s'assurer de la reproductibilité de cette expérience, différentes concentrations en **Asc** ont été testées. Ainsi, avec 100, 25 et 10 mM les adduits DEPMPO-R1 et DEPMPO-R2 sont observés. Toutefois, avec 5 mM d'**Asc** nous n'arrivons plus à distinguer les adduits du bruit. Une concentration de 5 mM en **Asc** correspond donc à la concentration limite de détection pour ce composé (*Annexe 16*).

3.3.2. Étude avec les hydroperoxydes dérivés du *R*-(+)-limonène

De la même manière, les expériences contrôles n'ont donné aucun signal, indiquant que la présence **Lim-2-OOH** ou (**1S, 4R**)-**Lim-1-OOH** est nécessaire à la génération de radicaux dans les RHE. Dans le cas du **Lim-2-OOH**, les spectres obtenus avec les RHE présentent un rapport signal sur bruit faible permettant difficilement une simulation du spectre satisfaisante permettant d'attribuer les *hfccs* aussi précisément que pour les études en solutions. Pour cette raison, les résultats expérimentaux obtenus sont directement comparés à ceux obtenus en solution (*Figure 40*). Ainsi, la présence de deux adduits a pu être mise en évidence. Nous justifions de cette manière la présence de radicaux hydroxyles et carbonés, similaires à ceux en solution, sans pouvoir exclure la présence d'autres espèces en plus faible concentrations.

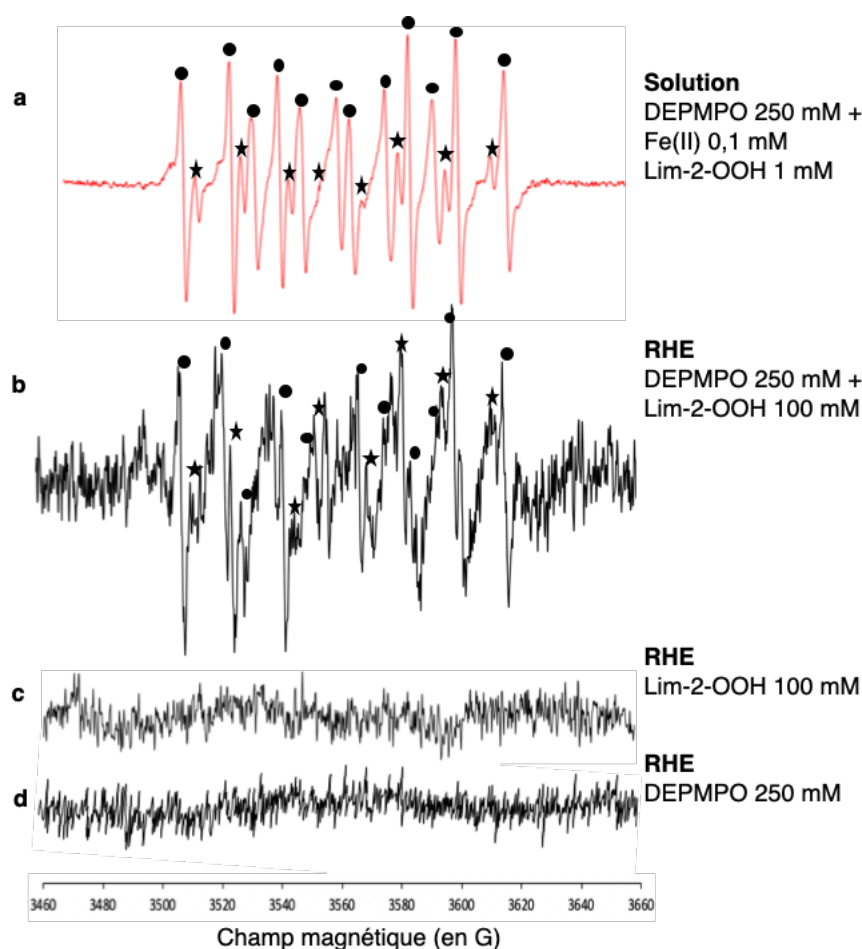


Figure 40 : Étude RPE sur RHE-Lim-2-OOH : (a) Spectre RPE en solution avec DEPMPPO 50 mM/Lim-2-OOH 1 mM/Fe(II) 0,1 mM dans HEPES (b) spectre RPE de RHE après incubation de DEPMPPO 250 mM suivie d'une addition Lim-2-OOH 100 mM ; (c) contrôle RHE-DEPMPPO 250 mM ; (d) contrôle RHE- Lim-2-OOH 100 mM ; Les étiquettes identifient chaque spin-adduit formé (cercles : DEPMPPO-carbone R6, étoiles : DEPMPPO-OH).

En ce qui concerne le (1S, 4R)-Lim-1-OOH, un meilleur rapport signal sur bruit est obtenu et une simulation est illustrée Figure 41, où le spin adduit DEPMPPO-R10 issu d'un radical carboné semble prédominer. Le Tableau 8 résume les caractéristiques des adduits de spin détectés. Des traces de l'adduit DEPMPPO-OH sont également observées.

Tableau 8 : *hfccs*, *g* et quantification relative des adduits de spin identifiés après application topique de DEPMPPO 250 mM suivie de l'addition de de (1S,4R)-Lim-1-OOH 100 mM.

DEPMPPO-R10 (ca. 95 %)	DEPMPPO-OH (< 5 %)
$g = 2.0058$	$g = 2.0059$
$a_N = 14.5 \text{ G}$	$a_N = 13.8 \text{ G}$
$a_H = 21.3 \text{ G}$	$a_H = 14.7 \text{ G}$
$a_P = 47.5 \text{ G}$	$a_P = 47.3 \text{ G}$

En comparant ces valeurs de *hfccs* avec celles obtenues dans les études en solution présentée dans le *Tableau 4* on observe une similarité, notamment pour l'un des radicaux piégés (DEPMPO-R10).

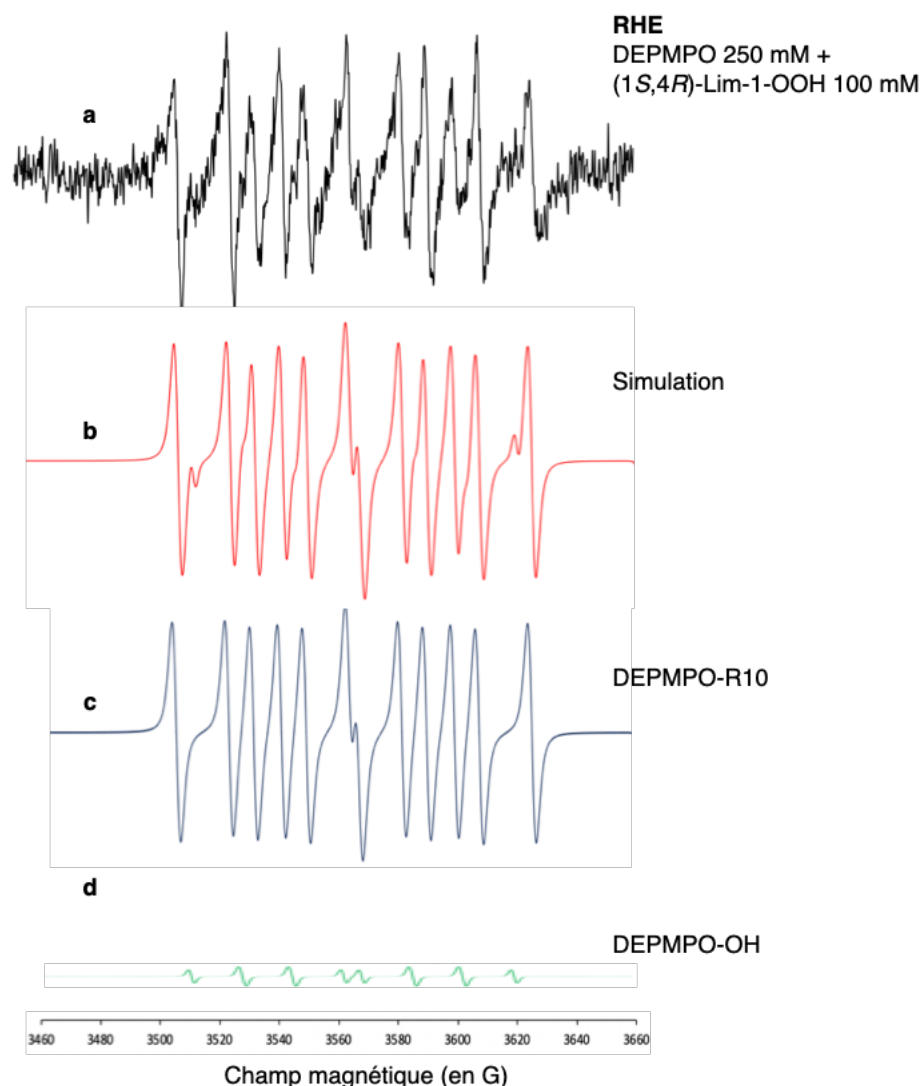


Figure 41 : Étude RPE sur RHE-(1S,4R)-Lim-1-OOH : (a) spectre RPE de RHE après incubation de **DEPMPO** 250 mM suivie d'une addition **(1S,4R)-Lim-1-OOH** 100 mM ; (b) simulation de (a) et sa déconvolution en DEPMPO-R10 (ca. 95 %) et DEPMPO-OH (< 5 %).

On pourrait s'attendre à avoir une similitude en termes de réactivité concernant le **Lim-2-OOH** et le **(1S,4R)-Lim-1-OOH** en raison des structure moléculaire commune ne différant que par la position de la fonction hydroperoxyde et allyle. Cependant, dans le cas du **(1S,4R)-Lim-1-OOH** le rapport signal sur bruit est plus élevé. Ceci nous permet de faire l'hypothèse d'une génération de radicaux centrés sur le carbone plus importante et/ou de cinétique plus rapide dans le cas du **(1S,4R)-Lim-1-OOH**.

Pour ces deux molécules, des concentrations plus faibles ont été testées (50, 25 et 10 mM). Le rapport signal sur bruit diminue avec la concentration ce qui rend difficile une

simulation satisfaisante. Les adduits de spin carbonés restent tout de même observables pour les deux isomères. En deçà de 5 mM, aucun signal n'est détecté (*Annexes 17 et 18*).

3.3.3. Étude avec le (±)-Citr-7-OOH

L'étude du (±)-Citr-7-OOH sur les RHE a montré que des radicaux hydroxyles et carbonés étaient piégés (*Tableau 9, Figure 42*).

Tableau 9 : *hfccs*, *g* et quantification relative des adduits de spin identifiés après application topique de DEPMPO 250 mM suivie de l'addition de (±)-Citr-7-OOH 50 mM.

DEPMPO-R14 (ca. 77 %)	DEPMPO-OH (ca. 23 %)
$g = 2,0058$	$g = 2,0059$
$a_N = 14,5 \text{ G}$	$a_N = 14,0 \text{ G}$
$a_H = 20,8 \text{ G}$	$a_H = 12,6 \text{ G}$
$a_P = 47,7 \text{ G}$	$a_P = 46,9 \text{ G}$

L'application du (±)-Citr-7-OOH nous conduit donc à un résultat similaire à celui obtenu en solution (*Tableau 5*) : des radicaux carbonés et hydroxyles sont détectés, ce qui est confirmé par la simulation des spectres expérimentaux obtenus (*Figure 42*).

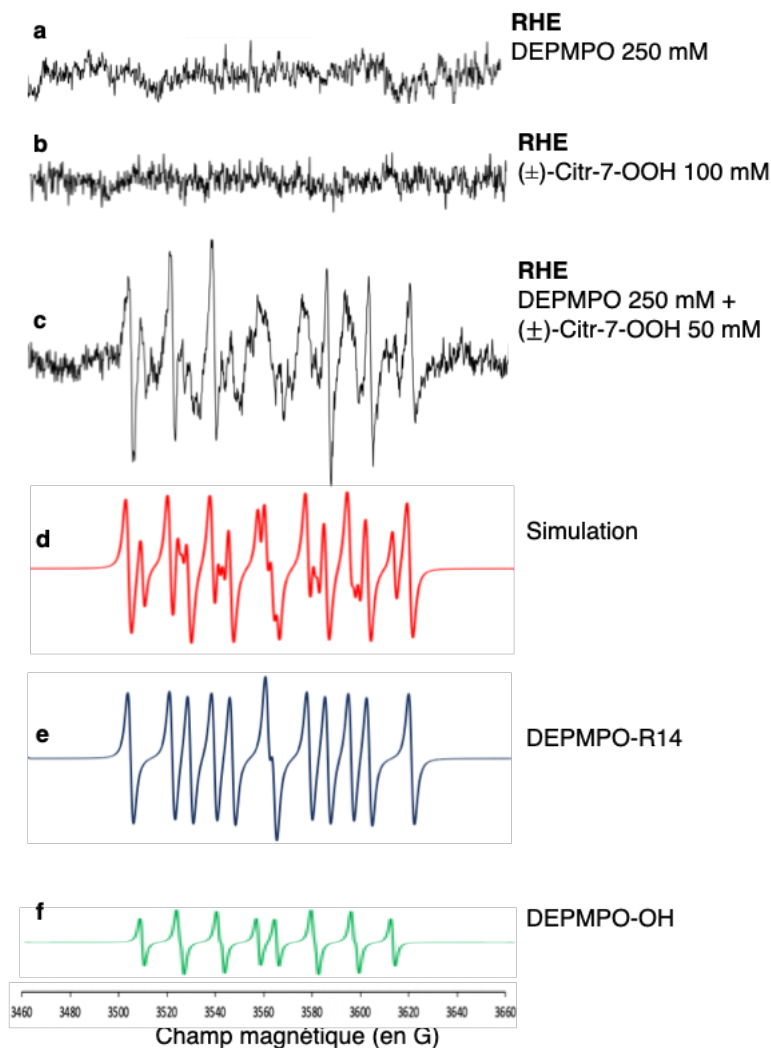


Figure 42 : Étude RPE sur RHE- (\pm)-Citric-7-OOH (a) contrôle RHE-DEPMPO 250 mM ; (b) contrôle RHE-(\pm)-Citric-7-OOH (100 mM) (c) spectre RHE sur RHE après incubation de DEPMPO 250 mM suivie d'une addition (\pm)-Citric-7-OOH 50 mM ; (d) simulation de (c) et sa déconvolution en DEPMPO-R14 (e) (ca. 77 %) et DEPMPO-OH (f) (ca. 23 %).

Pour (\pm)-Citric-7-OOH, des concentrations plus faibles ont également été testées (50, 25 et 10 mM). Le rapport signal sur bruit diminue avec la concentration ce qui rend difficile voire empêche une simulation satisfaisante. Les adduits de spin carbonés restent tout de même observables jusqu'à 5 mM où aucun signal n'est détecté (Annexe 19).

3.3.4. Étude avec le mélange (\pm)-Citric-7-OOH et (\pm)-Citric-6-OOH

Le mélange (\pm)-Citric-7-OOH et (\pm)-Citric-6-OOH nous conduit à un résultat similaire à celui obtenu avec le (\pm)-Citric-7-OOH seul dans le RHE. À savoir, le piégeage d'un radical carboné (DEPMPO-R19) mais également la présence de l'adduit correspondant au DEPMPO-OH ont

été observés puis confirmés par simulation (*Figure 43*). Le troisième adduit de spin observé en solution avec une proportion de < 5 %, a sans doute été généré mais en raison de la complexité du modèle RHE utilisé, il n'a probablement pas été piégé avant sa dégradation ou bien il se retrouve piégé mais en raison de sa faible proportion son signal est noyé dans le bruit (*Tableau 6*). De même, en solution, une proportion plus importante de DEPMPO-OH était généré par rapport au DEPMPO-R19, or, sur les RHE un profil différent est obtenu avec une majorité de DEPMPO-R19 par rapport au DEPMPO-OH (*Tableau 10*). Ceci peut être justifiée en raison de la complexité de la matrice.

Tableau 10 : hfccs, g et quantification relative des adduits de spin identifiés après application topique de DEPMPO 250 mM suivie de l'addition de 50 mM du mélange de (±)-Citr-6-OOH et (±)-Citr-7-OOH.

DEPMPO-R19 (ca. 83 %)	DEPMPO-OH (ca. 17 %)
$g = 2,0057$	$g = 2,0058$
$a_N = 14,7 \text{ G}$	$a_N = 14,0 \text{ G}$
$a_H = 21,5 \text{ G}$	$a_H = 12,6 \text{ G}$
$a_P = 48,0 \text{ G}$	$a_P = 47,5 \text{ G}$

Des concentrations plus faibles du mélange (±)-Citr-6-OOH et (±)-Citr-7-OOH ont également été testées (50, 25 et 10 mM) et une réactivité similaire au (±)-Citr-7-OOH seul est obtenue. Les adduits de spin carbonés restent tout de même observables jusqu'à 5 mM où aucun signal n'est détecté (*Annexe 20*).

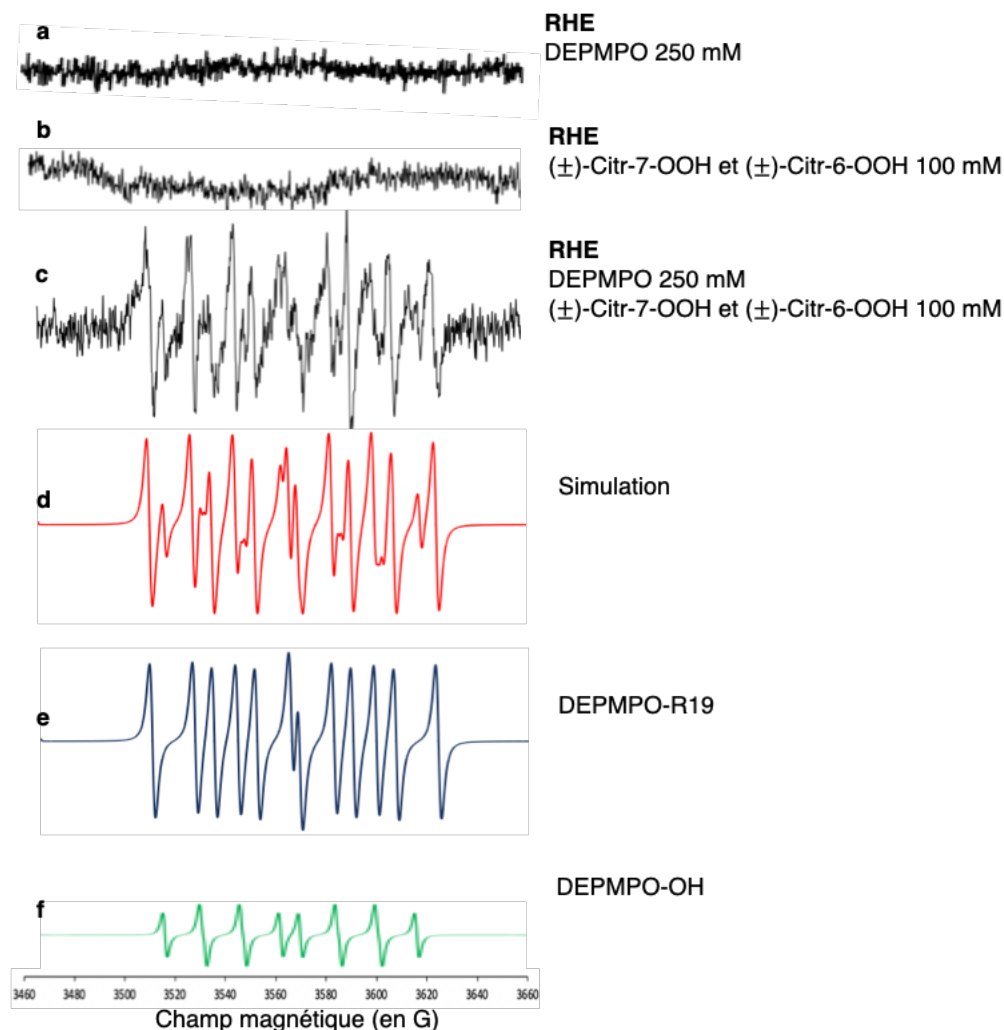


Figure 43 : Étude RPE sur RHE-(±)-Citric-6-OOH et (±)-Citric-7-OOH : (a) contrôle RHE-DEPMPO 250 mM ; (b) contrôle RHE-(±)-Citric-6-OOH et (±)-Citric-7-OOH 100 mM; (c) spectre RHE après incubation de DEPMPO suivie d'une addition de (±)-Citric-6-OOH et (±)-Citric-7-OOH 50 mM ; (d) simulation de (c) et sa déconvolution en DEPMPO-R19 (ca. 83 %) (e) et DEPMPO-OH (ca. 17 %) (f).

3.4. Discussion

Les expériences de contrôle avec le DEPMPO seul et en absence de composés d'étude, n'ont produit aucun signal indiquant que les radicaux sont formés à l'issue de l'application des hydroperoxydes.

Bien que les RHE soient des matrices complexes, le piégeage de radicaux s'est avéré être un succès en présence des molécules cibles. Bien que le rapport signal sur bruit ne nous ai pas toujours permis d'effectuer une simulation pertinente des données expérimentales, une comparaison avec les spectres obtenus lors des études en solution nous ont permis d'attribuer les signaux détectés.

Pour chacun des composés étudiés, nous retrouvons les signaux caractéristiques correspondant aux adduits formés et détectés lors des études en solution.

Cependant, les expériences de contrôles réalisées ne sont pas suffisantes pour exclure que le radical que l'on piège provienne d'une biomolécule du RHE qui aurait été généré lors de la formation du radical produit par nos molécules cibles.

4. Études en vue de l'identification de l'origine des radicaux carbonés produits.

Comme vu dans les sections précédentes, une limite de notre méthode est que nous ne pouvons pas directement déterminer l'origine exacte du radical piégé. Pour remédier à cela, des études de substitution au ^{13}C ont été réalisées sur une molécule modèle, commerciale, l'hydroperoxyde de cumène (**Cum-OOH**). Une étude précédente sur ce composé, a confirmé le piégeage de radicaux carbonés et oxygénés en solution et sur les RHE en présence de **DEPMPO**.⁴⁷ Lors de cette étude, le radical méthyle issu d'une β -scission du radical alkoxyline initialement formé a été supposé piégé ($a_N \approx 15,2 \text{ G}$; $a_H \approx 22,3 \text{ G}$ et $a_P \approx 47,7 \text{ G}$).²³ Dans le but de consolider cette hypothèse en solution et dans les épidermes, des études complémentaires avec du Cum-OOH substitué au ^{13}C ont été réalisées. Nous avons dans un premier temps mis au point une voie de synthèse du **Cum-OOH** substitué au ^{13}C dans les positions méthyliques. Le ^{13}C ayant un spin nucléaire non nul égal à $\frac{1}{2}$ la signature RPE d'un radical méthyle substitué au ^{13}C devrait être distincte. Ainsi, de façon à identifier l'origine du radical carboné dans les RHE, le **Cum-OOH** substitué au ^{13}C a été fait l'objet d'études en solution puis sur les RHE en utilisant la RPE couplée au piégeage de spin.⁴⁸

4.1. Synthèse du Cum-OOH substitué au ^{13}C

La mise au point de la synthèse en série non substituée a été en premier lieu réalisée dans le but de s'assurer de l'efficacité des diverses étapes lors de l'incorporation du méthyle contenant le ^{13}C et nous menant au produit final souhaité.

En s'appuyant sur les études de Lepoittevin et Karlberg, une acylation de Friedel et Crafts employant le benzène et le chlorure d'acétyle en présence de chlorure d'aluminium a été préconisée. De cette façon, l'acétophénone **48** a été obtenue avec 95% de rendement.⁴⁹

L'alcool tertiaire **49** a été synthétisé avec un rendement de 57 % à la suite de l'attaque nucléophile du méthyllithium sur l'acétophénone dans le tétrahydrofurane à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 21 h. La méthode la plus couramment utilisée pour la synthèse d'hydroperoxydes organiques consiste en l'action directe du peroxyde d'hydrogène en présence d'une catalyse acide sur le dérivé alcool correspondant. Cette synthèse en une étape repose sur la formation d'un carbocation tertiaire en présence d'acide sulfurique en quantité catalytique. Le peroxyde d'hydrogène réagit ensuite sur ce carbocation *via* une substitution nucléophile de type $\text{S}_{\text{N}}1$ pour donner le **Cum-OOH** avec un rendement de 29 % (Figure 44).

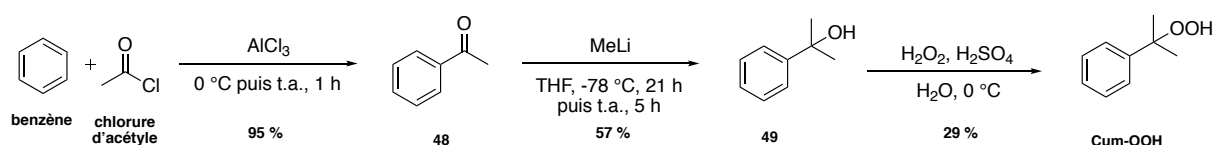


Figure 44 : Voie de synthèse du **Cum-OOH**.

Ainsi, seulement 3 étapes ont permis d'obtenir le **Cum-OOH**. La substitution au ^{13}C d'un groupement méthyle a été introduite en suivant cette voie de synthèse. De ce fait, l'incorporation du méthyle substitué au ^{13}C a été réalisée en utilisant le chlorure de 2- (^{13}C) acétyle commercial (Figure 45). La 1- (^{13}C) -acétophénone **50** a ainsi été obtenue avec 77 % de rendement, l'alcool tertiaire **51** correspondant a pu être isolé avec 53 % de rendement suite à la réaction avec le méthyllithium et enfin, le ^{13}C -MeCum-OOH avec un méthyle substitué au ^{13}C est ainsi obtenu avec 32 % de rendement.

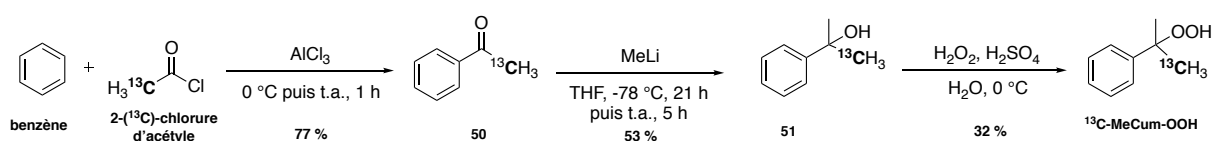
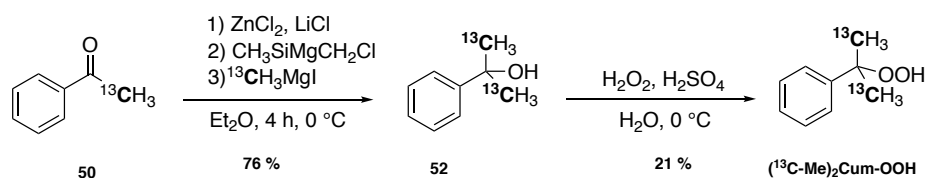


Figure 45 : Synthèse du ^{13}C -MeCum-OOH.

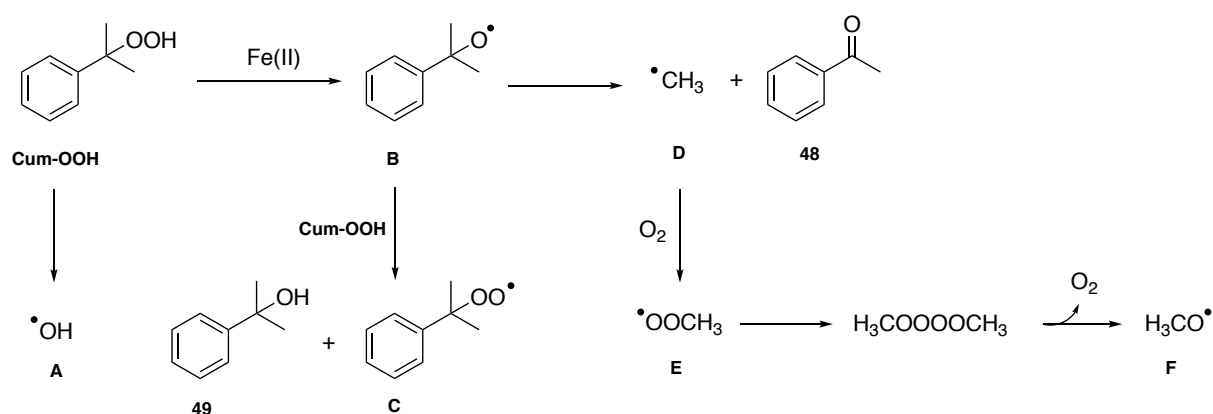
Afin d'obtenir des résultats encore plus significatifs en RPE, une synthèse du **Cum-OOH** contenant les deux méthyles substitués au ^{13}C a été développée. A partir de la 1- (^{13}C) acétophénone **50**, l'alcool tertiaire a été synthétisé en incorporant le deuxième méthyle substitué au ^{13}C *via* de l'iodure de ^{13}C -méthylmagnésium avec 76 % de rendement. Enfin, la $\text{S}_{\text{N}}1$ conduit au $(^{13}\text{C-Me})_2\text{Cum-OOH}$ avec un rendement de 21 % (Figure 46).


 Figure 46 : Synthèse du $(^{13}\text{C-Me})_2\text{Cum-OOH}$.

Ainsi, le $^{13}\text{C-MeCum-OOH}$ et $(^{13}\text{C-Me})_2\text{Cum-OOH}$ ont été obtenus et ont été utilisés pour les études de RPE en solution et sur les RHE.

4.2. Étude du piégeage radicalaire en solution

Le **Cum-OOH** génère plusieurs types de radicaux lorsqu'il est mis en présence de Fe(II) en quantité catalytique. Il est important de noter que deux radicaux oxygénés sont d'abord produits (**A** et **B**, Figure 47).⁴⁷ Le radical **B** peut se réarranger suivant deux voies possibles. Tout d'abord, **B** est capable de réagir avec le **Cum-OOH** lui-même et lui permettant d'arracher un hydrogène pour former le 2-phényl-propan-2-ol **49** ainsi que le radical **C**. Il peut également subir une β -scission générant un radical méthyle **D** et l'acétophénone **48**. Le radical méthyle **D** est capable de réagir avec le dioxygène atmosphérique formant ainsi le radical $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$ **E** réagissant sur lui-même et formant le $\text{CH}_3\text{O}^\bullet$ **F**.


 Figure 47 : Nature des radicaux formés en solution pour le **Cum-OOH**.

De cette façon, des analyses en solution ont d'abord été réalisées pour évaluer les radicaux formés à partir des composés substitués au ^{13}C par rapport aux études précédentes faites avec du **CumOOH** non substitué. Le **DEPMPO** a été choisi comme piègeur de spin pour ces études car il a été montré qu'il permettait une vision large de toutes sortes de radicaux

dérivés de **Cum-OOH**. L'initiation radicalaire a été déclenchée par une quantité catalytique de Fe(II) (0,1 mM) induisant une réaction de type Fenton. Le **DEPMPO** a été employé en concentration excessive (25 mM) par rapport aux hydroperoxydes substitués au ^{13}C (0,54 mM).

Les premières études ont été complétées avec le ^{13}C -**MeCum-OOH** monosubstitué. La *Figure 48c* montre le spectre expérimental de RPE obtenu. La simulation du signal a permis d'identifier un mélange de différents adduits de spin formés par addition de radicaux transitoires à courte durée de vie dérivés du ^{13}C -**MeCum-OOH**. En accord avec les recherches préliminaires réalisées au sein du laboratoire de Dermatochimie, les adduits de spin ont été identifiés par leurs *hfccs*.⁴⁷

Ces constantes sont caractéristiques de radicaux HO^\bullet , de radicaux centrés sur le carbone, probablement méthyle $\cdot\text{CH}_3$, méthoxy et/ou éventuellement peroxy. Par ailleurs, lors de la comparaison avec l'échantillon non substitué, on observe dans ce cas une constante hyperfine supplémentaire, attribuée à la présence de la sonde paramagnétique d'un noyau ^{13}C à spin nucléaire $I = \frac{1}{2}$. La simulation du spectre expérimental (*Figure 48d*) a conduit à des valeurs *hfccs* « classique » $a_{\text{N}} = 15,5 \text{ G}$, $a_{\text{H}} = 22,6 \text{ G}$ et $a_{\text{P}} = 48,3 \text{ G}$ ainsi qu'une nouvelle constante attribuée au ^{13}C notée $a_{^{13}\text{C}}$ de ca. 6,3 G. Attendu que seule la moitié des radicaux méthyles étaient substitués en ^{13}C , il a été possible distinguer deux adduits de spin correspondant à deux radicaux carbonés piégés avec des *hfccs* a_{N} , a_{H} et a_{P} similaires, soit non substitués ou substitués au ^{13}C (*Figure 48g et Figure 48h*). Cependant, aucune référence n'a été trouvée sur les valeurs de *hfccs* pour le couplage avec des atomes de ^{13}C en position β d'un radical nitroxyde.

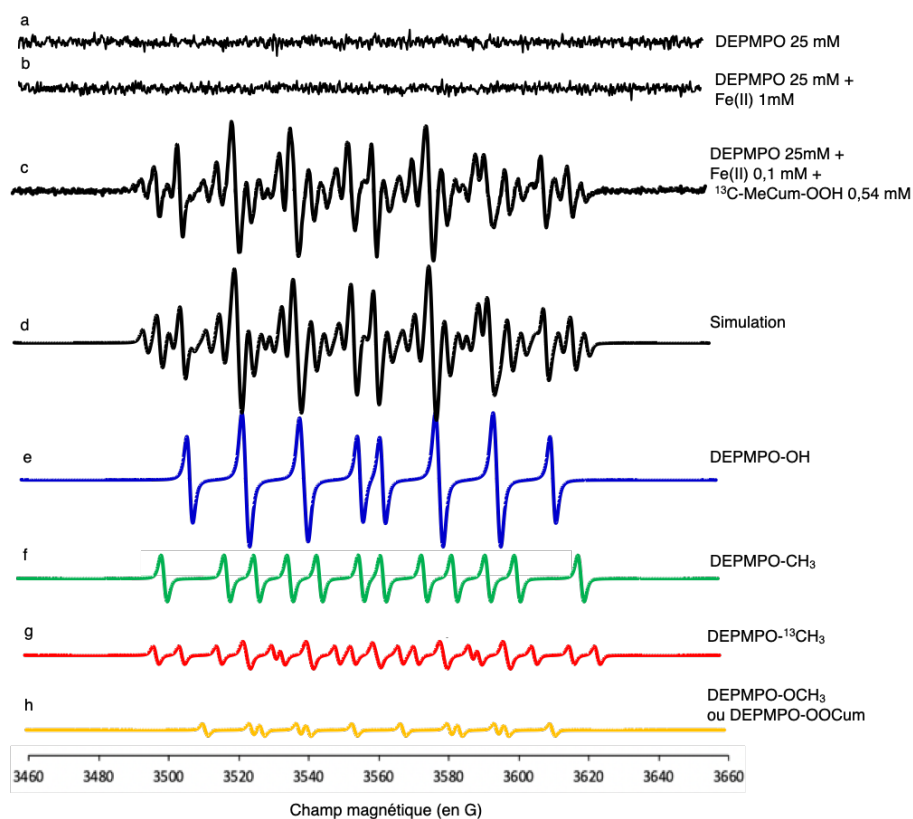


Figure 48 : Spectres de RPE concernant le $^{13}\text{C-MeCum-OOH}$ (a) contrôle-DEPMPO 25 mM seul ; (b) contrôle-DEPMPO 25 mM/Fe(II) 1 mM ; (c) spectre expérimental pour le $^{13}\text{C-MeCum-OOH}$ 0,54 mM/Fe(II) 0,1 mM/DEPMPO 25 mM ; (d) simulation avec Easyspin/Matlab et (e); DEPMPO-OH (ca. 45 %) ; DEPMPO-CH₃ (ca. 28 %) ; DEPMPO- $^{13}\text{CH}_3$ (ca. 23 %) et DEPMPO-OCH₃ ou DEPMPO-OOCum (< 5 %).

Ainsi, pour corroborer le fait que des radicaux ^{13}C -méthyles avaient été piégés par le DEPMPO, des études ont été menées avec du $(^{13}\text{C-Me})_2\text{Cum-OOH}$ di-substitué ayant deux groupements méthyles substitués au ^{13}C exclusivement. La Figure 49a correspond au spectre expérimental associé au composé di-substitué en solution. La simulation a montré un mélange de différents adduits de spin formés de nouveau par piégeage de radicaux HO \cdot , centrés sur le carbone, méthoxy- et/ou peroxyde possibles (Figure 49c, Figure 49d et Figure 49e). L'adduit de spin DEPMPO- $^{13}\text{CH}_3$ précédemment assigné a été de nouveau détecté dans une proportion relativement plus élevée par rapport aux études réalisées avec le $^{13}\text{C-MeCum-OOH}$ et ayant des valeurs *hfccs* très comparables de $a_{\text{N}} = 15,4$ G, $a_{\text{H}} = 22,6$ G, $a_{\text{P}} = 48,3$ G et $a_{^{13}\text{C}} = 6,4$ G.

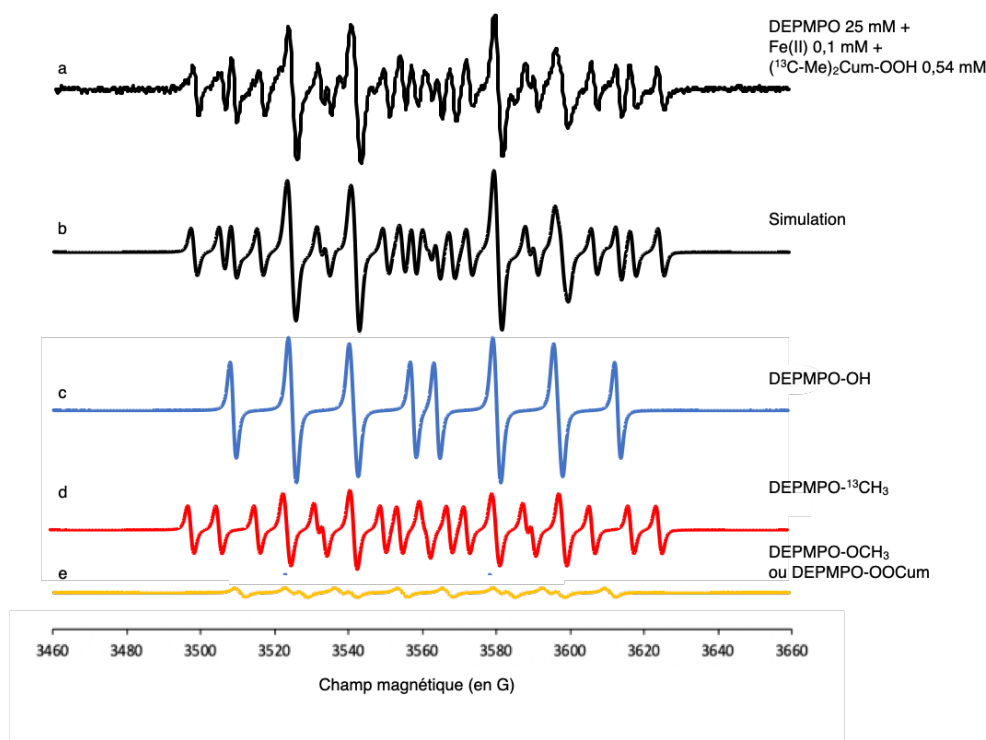


Figure 49 : Spectre de RPE des adduits formés avec le **DEPMPPO** 25 mM/ $(^{13}\text{C-Me})_2\text{-Cum-OOH}$ 0,54 mM/ Fe(II) 0,1 mM ; (b) simulation avec Easyspin/Matlab et (c, d et e) déconvolution de DEPMPPO-OH (ca. 55 %) ; DEPMPPO- $^{13}\text{CH}_3$ (ca. 42 %) et DEPMPPO-OCH₃ ou DEPMPPO-OOCum (< 5 %).

Les différentes valeurs des *hfccs* ont été regroupées dans le *Tableau 11*. Ces valeurs obtenues par simulation restent cohérentes entre elles pour chacun des noyaux (^1H , ^{14}N et ^{31}P) en fonction du radical piégé en présence des composés ^{13}C -substitués.

Tableau 11 : Valeurs des *hfccs* obtenues pour chaque adduit de spin formé en fonction des composés étudiés en solution

Composés	a_{N} (G)	a_{H} (G)	a_{P} (G)	$a_{^{13}\text{C}}$ (G)	g	Adduit de spin attribué
Cum-OOH	14,2	13,5	47,4		2,0055	DEPMPPO-OH
	15,4	22,6	48,1		2,0053	DEPMPPO-CH ₃
	11,3	13,7	48,5		2,0055	DEPMPPO-OCH ₃ ou DEPMPPO-OOCum
$^{13}\text{CMe-Cum-OOH}$	14,2	13,3	47,4		2,0056	DEPMPPO-OH
	15,4	22,6	48,0		2,0053	DEPMPPO-CH ₃
	15,5	22,6	48,3	6,3	2,0053	DEPMPPO- $^{13}\text{CH}_3$
	11,3	13,7	48,3		2,0055	DEPMPPO-OCH ₃ ou DEPMPPO-OOCum
$(^{13}\text{CMe})_2\text{Cum-OOH}$	14,2	13,3	47,4		2,0053	DEPMPPO-OH
	15,4	22,6	48,3	6,4	2,0051	DEPMPPO- $^{13}\text{CH}_3$
	11,6	14,4	48,1		2,0055	DEPMPPO-OCH ₃ ou DEPMPPO-OOCum

'Nous avons cherché par la suite à comparer les spectres expérimentaux des trois composés synthétisés (Figure 50).

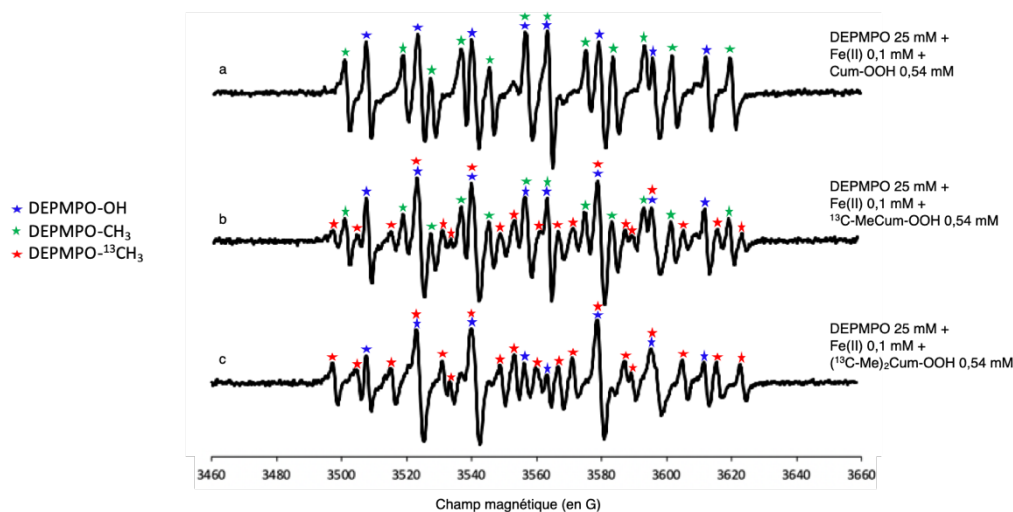


Figure 50 : Comparaison entre les spectres RPE expérimentaux en solution avec (a) DEPMPPO 25 mM/Cum-OOH 0,54 mM/Fe 0,1 mM ; (b) DEPMPPO 25 mM/¹³C-MeCum-OOH 0,54 mM/Fe 0,1 mM et (c) DEPMPPO 25 mM/(¹³C-Me)₂Cum-OOH 0,54 mM/Fe 0,1 mM. En raison du faible rapport signal/bruit, l'adduit DEPMPPO-OCH₃ et/ou DEPMPPO-OOCum ne sont pas indiqués.

Il peut être constaté que l'amplitude relative de l'adduit de spin DEPMPPO-CH₃ dérivé de Cum-OOH (étoile verte) a été significativement réduite lors de l'introduction d'un seul groupe ¹³C-méthyle dans la molécule de Cum-OOH (Figure 50a) et cet adduit disparaît presque totalement en cas de double substitution au ¹³C (Figure 50c) au bénéfice de l'adduit de spin correspondant au ¹³C-méthyle piégé (Figures 50b et 50c). Ces résultats ont confirmé que les radicaux centrés sur le carbone dérivés de Cum-OOH étaient, dans ces conditions expérimentales, des radicaux méthyles issus de processus radicalaires de la β-scission du ¹³C-MeCum-OOH déjà observé préalablement avec le Cum-OOH. Les résultats obtenus en solution permettent donc bien de mettre en évidence la formation du radical méthyle issu du Cum-OOH. Il a été intéressant de vérifier par la suite si cette approche s'avérait transférable aux RHE.

4.3. Étude sur les RHE

Afin de réaliser les expériences, le RHE a été préalablement incubé avec le piègeur de spin tel que décrit précédemment dans la section 3 de ce chapitre. Les radicaux formés à partir de Cum-OOH dans le modèle de peau étant à la fois de courte durée et potentiellement générés à de faibles concentrations, il était souhaitable que le piègeur de spin soit aussi près que possible du site de génération des radicaux avant l'application topique des

hydroperoxydes. Des spectres similaires à ceux obtenus lors des expériences en solution ont été obtenus. Cependant, il est à noter que d'autres raies sont apparues dans les spectres qui ne se superposaient à aucune des études en solution, ce qui peut être expliqué par la nature très complexes des matrices RHE.

D'un point de vue général, les observations faites en solution s'appliquent également sur les RHE. L'apparition d'un adduit de spin contenant le radical substitué au ^{13}C est bien mise en avant avec le $^{13}\text{C-MeCum-OOH}$ et le signal de ce dernier est plus intense avec le $(^{13}\text{C-Me})_2\text{Cum-OOH}$ avec en parallèle une diminution du signal correspondant au méthyle non substitué (Figure 51).

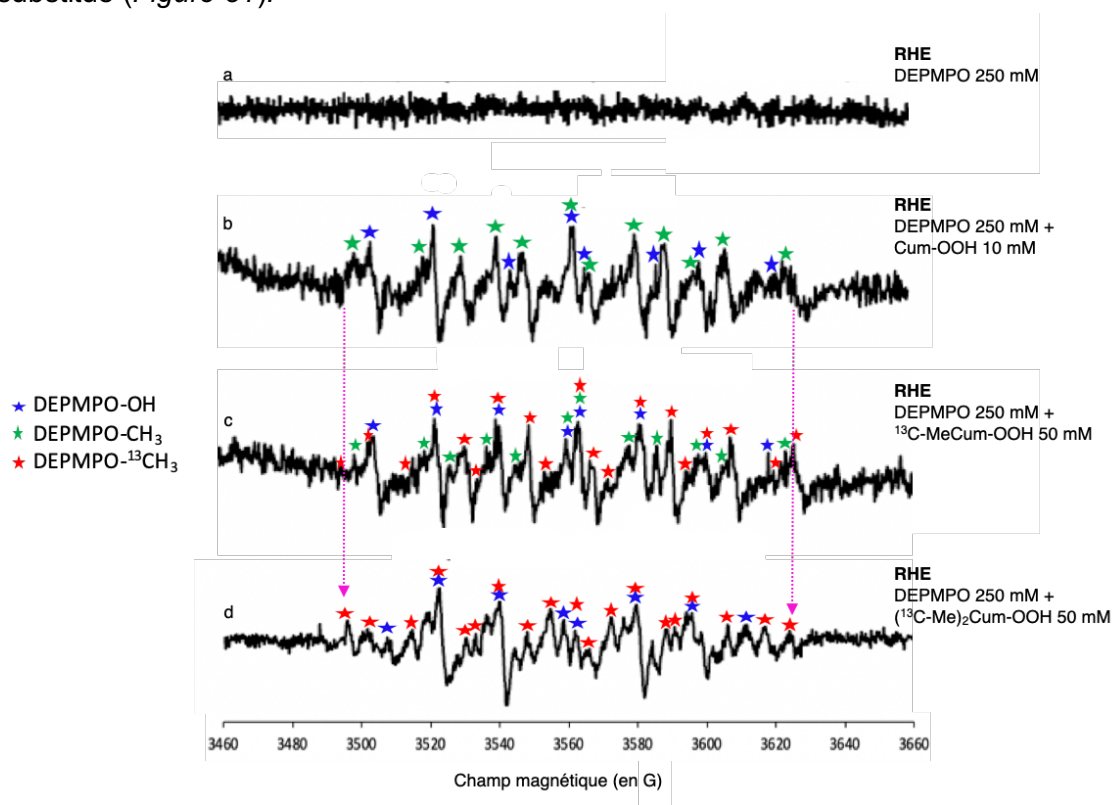


Figure 51 : Étude RPE sur RHE ; (a) contrôle RHE-DEPMPO 250 mM ; (b) spectre RHE après incubation de DEPMPO suivie d'une addition de Cum-OOH 10 mM ; (c) spectre RHE après incubation de DEPMPO suivie d'une addition de $^{13}\text{C-MeCum-OOH}$ 50 mM ; (d) spectre RHE après incubation de DEPMPO suivie d'une addition de $(^{13}\text{C-Me})_2\text{Cum-OOH}$ 50 mM.

Les résultats des études réalisées en solution et celles sur les RHE, apparaissent similaires (Figure 52). Les pics principaux pourraient être attribués aux adduits de spin DEPMPO-OH, DEPMPO-CH₃ et DEPMPO- $^{13}\text{CH}_3$ par comparaison avec les données précédentes en solution.

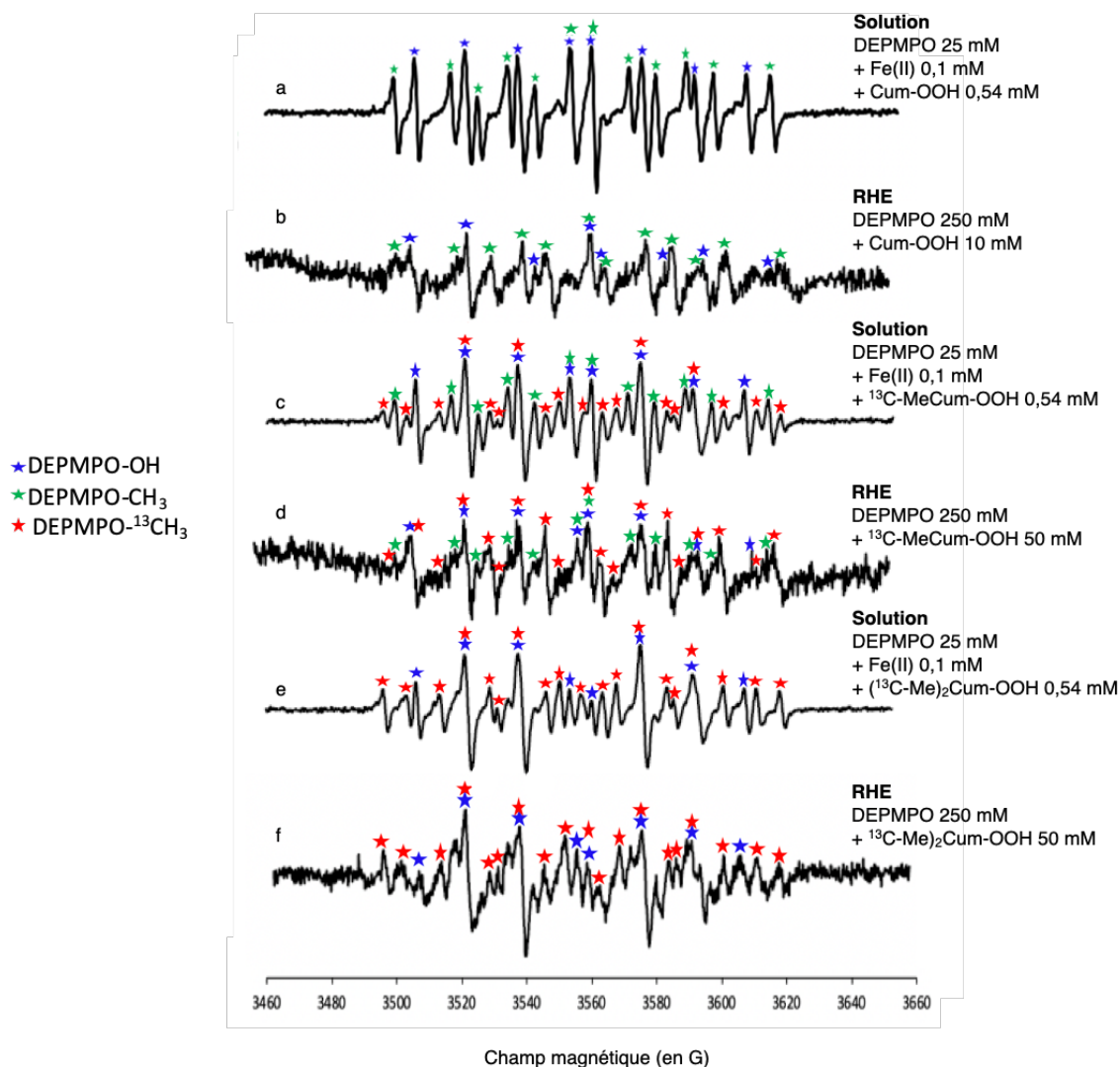


Figure 52 : Spectres de RPE obtenus (a, c et e) en solution **DEPMPPO** 25 mM / composé d'intérêt 0,54 mM /Fe(II) 0,1 mM (1 scan) ; (b) sur les RHE avec **DEPMPPO** 250 mM/**Cum-OOH** 10mM ((accumulation 10 scans) ; (d) **DEPMPPO** 250 mM/ $^{13}\text{C-MeCum-OOH}$ 50 mM (accumulation 10 scans) ; (f) sur les RHE avec **DEPMPPO** 250 mM/ $(^{13}\text{C-Me})_2\text{Cum-OOH}$ 50 mM (accumulation 10 scans).

4.4. Discussion

Les résultats de RPE en solution et sur les RHE présentent des similitudes à l'issue des essais en présence des composés **Cum-OOH**, $^{13}\text{C-MeCum-OOH}$ et $(^{13}\text{C-Me})_2\text{Cum-OOH}$. Cependant, les RHE sont par nature un modèle beaucoup plus complexes que les systèmes étudiés en solutions qui sont épurés à l'extrême. Le faible rapport signal sur bruit ne permet néanmoins pas d'estimer précisément les proportions relatives des différents adduits. On a pu tout de même suggérer que les radicaux méthyles issus de la décomposition radicalaire de **Cum-OOH** peuvent être formés dans les RHE. Le spectre de l'expérience avec le **Cum-OOH** substitué au ^{13}C à deux reprises est discriminant quant à l'origine du radical méthyl détecté.

Le signal correspondant au $\text{DEPMPO-}^{13}\text{CH}_3$ a été détecté lors d'expériences des expériences mettant en jeu les $^{13}\text{C-MeCum-OOH}$ et $(^{13}\text{C-Me})_2\text{Cum-OOH}$ ce qui confirme l'origine des radicaux méthyle.

Les expériences de contrôle avec le **DEPMPO** seul, en absence de molécules d'intérêts, n'ont pas produit de signaux indiquant que le **DEPMPO** a bel et bien piégé des radicaux méthyles provenant de l'hydroperoxyde que ce soit en solution ou sur les RHE.

5. Conclusion ...et perspectives

La technique de piégeage de spin combinée à la RPE nous a permis d'étudier la formation de radicaux issus de composés cibles dans un modèle d'épiderme 3D. Les études en solution nous ont permis d'attribuer les différents types de radicaux, oxygénés ou carbonés, que ces composés sont capables de générer en raison d'un réarrangement de leur structure moléculaire en présence de Fe(II). Ceci suggère que des modifications chimiques diverses des protéines cutanées pourraient conduire à une sensibilisation par contact avec ces allergènes.

Une fois cette approche transposée sur les RHE, les rapports signaux sur bruit sont significativement plus faibles rendant difficile toutes simulations. Malgré cela, il nous a été possible de caractériser la génération radicalaire en présence de composés modèles sur les RHE. Pour ce faire, il a été cependant nécessaire d'augmenter la concentration de ces hydroperoxydes comme celles du piégeur de spin pour obtenir un meilleur rapport signal sur bruit notamment pour le **Lim-2-OOH**.

En ce qui concerne l'initiation de la génération radicalaire, il pourrait s'agir du fer résiduel dans le RHE ou des acides aminés eux-mêmes. Il serait intéressant d'étudier en solution des acides aminés susceptibles d'engendrer la réaction radicalaire avec notamment la cystéine pour laquelle on a pu voir la formation d'adduits potentiels dans le chapitre précédent.

En parallèle, nous avons commencé à étudier le potentiel de la substitution au ^{13}C sur les positions réactives afin d'élucider la nature exacte des radicaux carbonés formés. En utilisant le **Cum-OOH**, nous avons montré que le piégeage de radicaux méthyles avait bien eut lieu en utilisant des dérivés substitués au ^{13}C du **Cum-OOH** par RPE en solution et sur les RHE, suggérant ainsi que ces radicaux méthyles pourraient être impliqués dans la formation des antigènes responsables de la sensibilisation cutanée au **Cum-OOH**. Il serait maintenant intéressant d'utiliser la substitution au ^{13}C pour aider à élucider les mécanismes radicalaires liés à la sensibilisation cutanée à d'autres composés allergènes tels que les hydroperoxydes de limonène et de linalol par exemple.

Enfin, les RHE présentent des similitudes avec les tissus humains en termes de morphologie, de composition lipidique et de marqueurs biochimiques. Il s'agit d'un outil essentiel dans le cadre des tests liés aux irritations et de pénétration des produits chimiques en contact avec la peau. Pour des questions juridiques et éthiques, le modèle EpiSkin™ est utilisé en remplacement des tests *in vivo*. Pour nos études sur l'allergie cutanée, le choix EpiSkin™ est une très bonne alternative à l'utilisation de tissus humains et animaux.⁵⁰

Annexes

Les annexes reprennent toutes les données expérimentales qui ont lieu en solution, y compris les valeurs g ($g = \pm 0,0005$), les $hfccs$ et les rapports des produits de spin formés dans les mélanges. Des expériences contrôles, effectuées avec les piègeur de spin avec ou sans Fe(II) 1 mM, ont été réalisées avant chaque étude. Les ratios des spin-adduits qui sont données dans ce travail, le sont à titre indicatif et n'indiquent rien d'autre que les intensités relatives estimées lors des simulations des différents spectres RPE.

Annexe 1. Étude du piégeage de radicaux de l'**Asc** en solution avec du **DEPMPO** à 50 mM

Tableau 1 : Variation de la concentration en Fe(II) - **DEPMPO** 50 mM et **Asc** 1 mM.

Fe(II)	Adduit de spin $hfccs$ (en G)	Adduit de spin $hfccs$ (en G)
1 mM	DEPMPO-R1 (56 %)	DEPMPO-R2 (44 %)
	$g=2,0056$	$g=2,0055$
	$a_N=14,8$	$a_N=15,1$
	$a_H=21,3$	$a_H=24,0$
	$a_P=47,4$	$a_P=49,4$
0,1 mM	DEPMPO-R1 (83 %)	DEPMPO-R2 (17 %)
	$g=2,0056$	$g=2,0057$
	$a_N=14,7$	$a_N=15,0$
	$a_H=21,5$	$a_H=25,8$
	$a_P=47,2$	$a_P=47,7$

Tableau 2 : Variation de la concentration en **Asc** - **DEPMPO** 50 mM et Fe 1 mM.

Asc	Adduit de spin $hfccs$ (en G)	Adduit de spin $hfccs$ (en G)
4 mM	DEPMPO-R1 (52 %)	DEPMPO-R2 (48 %)
	$g=2,0056$	$g=2,0055$
	$a_N=14,8$	$a_N=15,2$
	$a_H=21,3$	$a_H=23,9$
	$a_P=47,3$	$a_P=49,6$

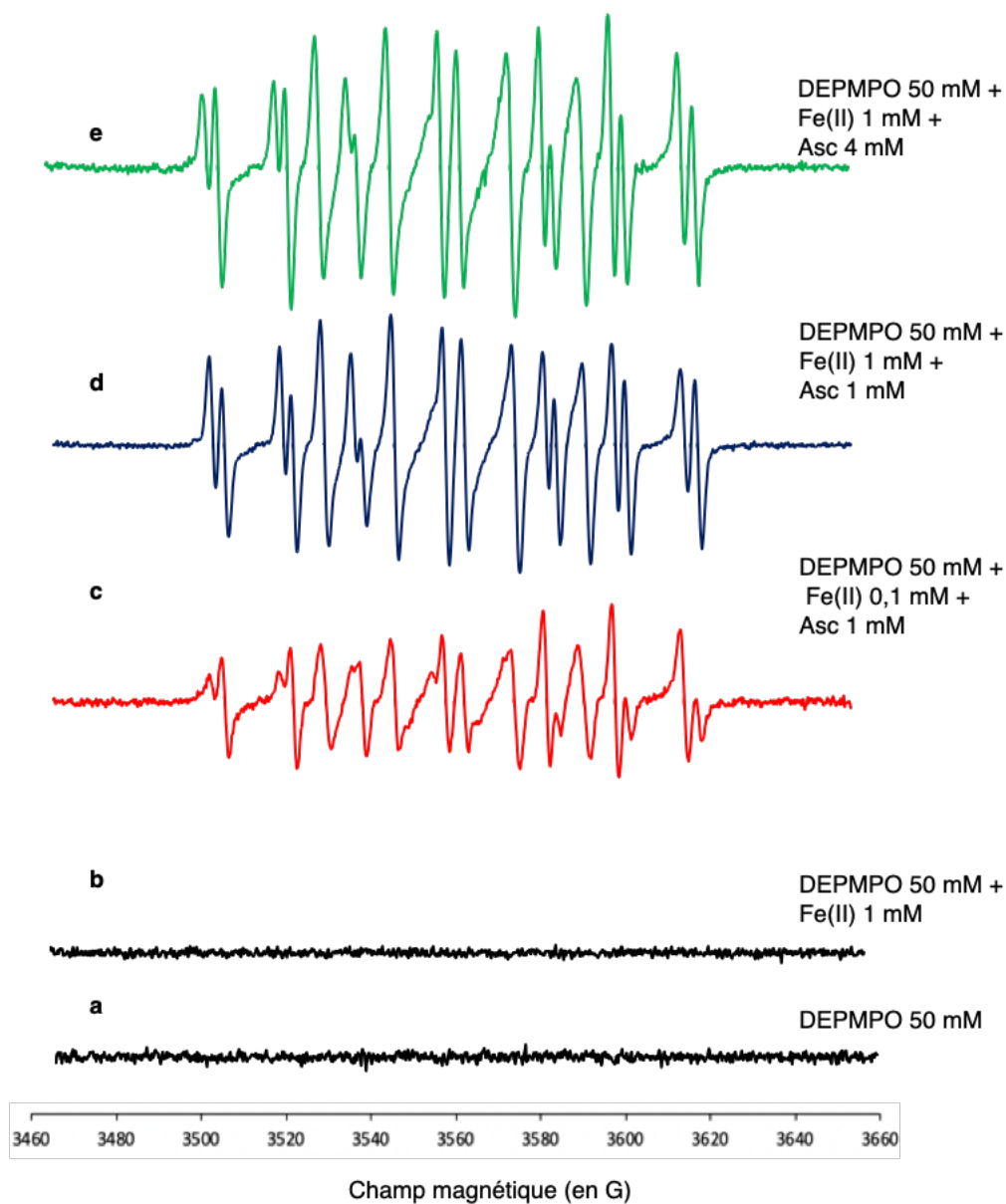


Figure 1 : Spectre RPE en solution : (a) contrôle **DEPMPO** 50 mM ; (b) contrôle **DEPMPO** 50 mM/**Fe(II)** 1 mM (c) spectre **DEPMPO** 50 mM/**Asc** 1 mM/**Fe(II)** 0,1 mM ; (d) spectre **DEPMPO** 50 mM/**Asc** 1 mM/**Fe(II)** 1 mM ; (e) spectre **DEPMPO** 50 mM/**Asc** 4 mM/**Fe(II)** 1 mM.

Annexe 2. Étude du piégeage de radicaux de l'**Asc** en solution avec du **DMPO** à 50 mM

Tableau 3 : Variation de la concentration en Fe(II) - **DMPO** 50 mM et **Asc** 1 mM.

Fe(II)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)
1 mM	DMPO-R3 $g=2,0049$ $a_N=16,2$ $a_H=24,7$
0,1 mM	DMPO-R3 $g= 2,0049$ $a_N= 16,1$ $a_H= 24,5$

Tableau 4 : Variation de la concentration en **Asc** - **DMPO** 50 mM et Fe 1 mM.

Asc	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)
4 mM	DMPO-R3 $g=2,0049$ $a_N=16,2$ $a_H=24,6$

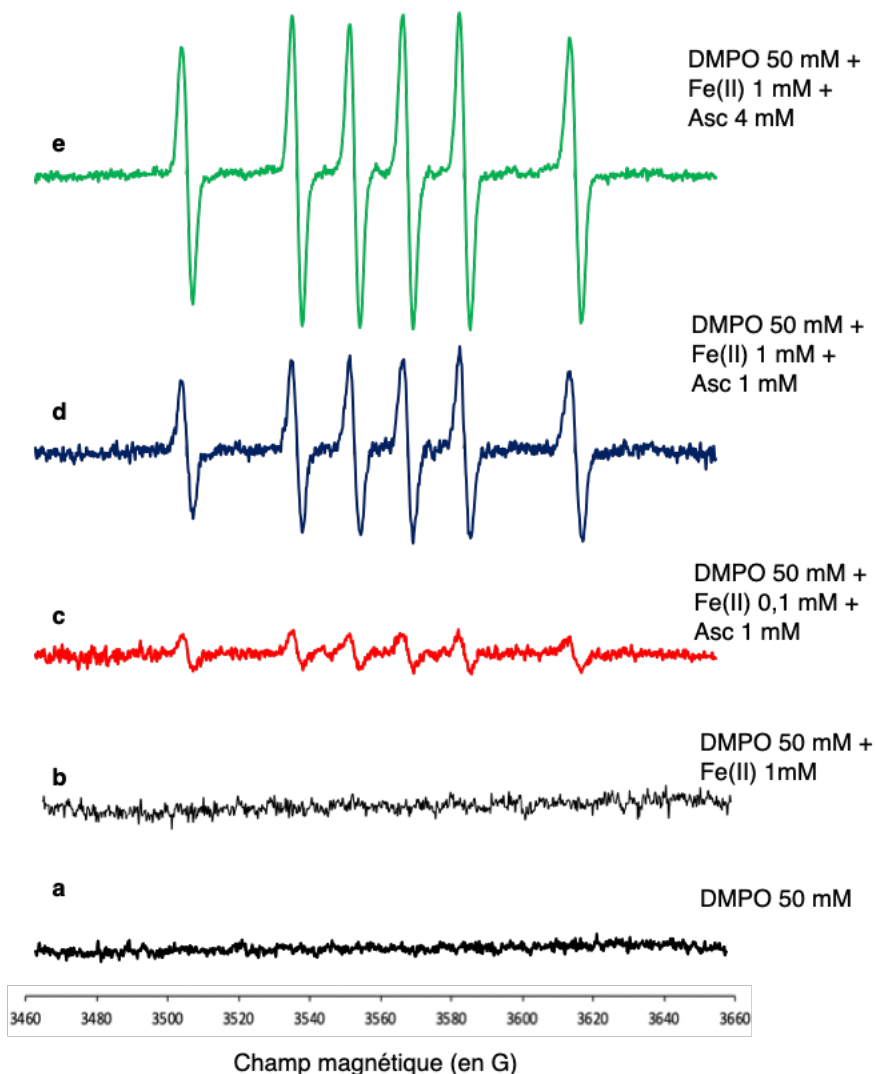


Figure 2 : Spectre RPE en solution : (a) contrôle **DMPO** 50 mM ; (b) contrôle **DMPO** 50 mM/**Fe(II)** 1 mM (c) spectre **DMPO** 50 mM/**Asc** 1 mM/**Fe(II)** 0,1 mM ; (d) spectre **DMPO** 50 mM/**Asc** 1 mM/**Fe(II)** 1 mM ; (e) spectre **DMPO** 50 mM/**Asc** 4 mM/**Fe(II)** 1 mM.

En présence de **DMPO**, seul un adduit de spin correspondant au piégeage d'un radical carboné est visible, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par l'équipe de Geroldinger.⁴⁰

Annexe 3. Étude du piégeage de radicaux de l'Asc en solution avec du **DIPPMPO** à 50 mM

Tableau 5 : Variation de la concentration en Fe(II) - **DIPPMPO** 50 mM et **Asc** 1 mM.

Fe(II)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)
1 mM	DIPPMPO-R4 (85 %) $g= 2,0050$ $a_N=15,1$ $a_H= 24,0$ $a_P= 49,4$	DIPPMPO-R5 (15 %) $g= 2,0051$ $a_N=15,0$ $a_H=20,8$ $a_P= 47,6$
0,1 mM	DIPPMPO-R4 (90 %) $g= 2,0050$ $a_N=15,1$ $a_H=23,8$ $a_P=49,5$	DIPPMPO-R5 (10 %) $g= 2,0050$ $a_N=14,9$ $a_H= 21,0$ $a_P=47,8$

Tableau 6 : Variation de la concentration en Asc - **DIPPMPO** 50 mM et Fe 1 mM.

Asc	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)
4 mM	DIPPMPO-R4 (83 %) $g= 2,0050$ $a_N= 15,0$ $a_H= 23,9$ $a_P= 49,4$	DIPPMPO-R5 (17 %) $g=2,0051$ $a_N=14,9$ $a_H=20,7$ $a_P=47,7$

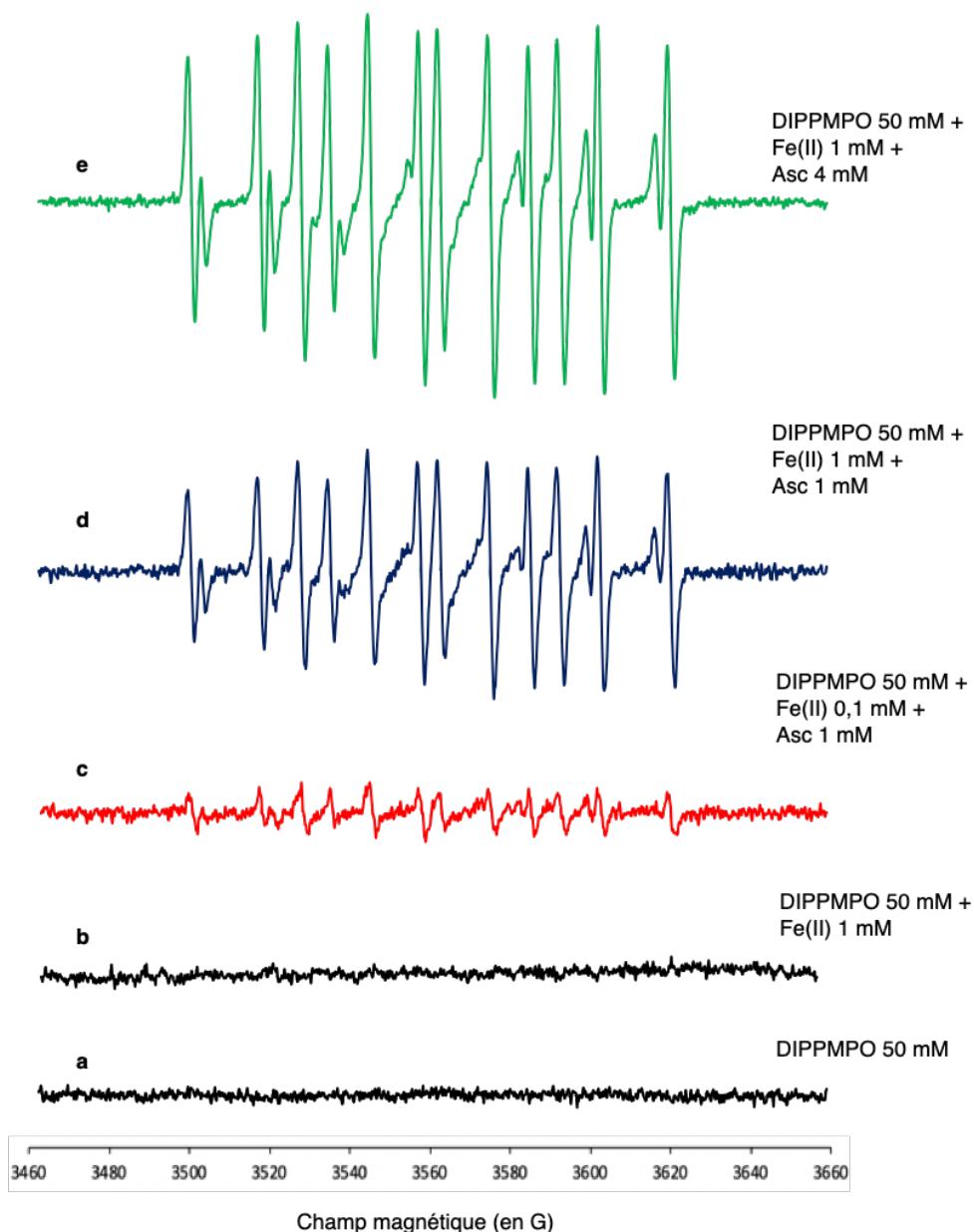


Figure 3 : Spectre RPE en solution : (a) contrôle **DIPPMPPO** 50 mM ; (b) contrôle **DIPPMPPO** 50 mM/**Fe(II)** 1 mM ; (c) spectre **DIPPMPPO** 50 mM/**Asc** 1 mM/**Fe(II)** 0,1 mM ; (d) spectre **DIPPMPPO** 50 mM/**Asc** 1 mM/**Fe(II)** 1 mM ; (e) spectre **DIPPMPPO** 50 mM/**Asc** 4 mM/**Fe(II)** 1 mM.

Les études avec le **DIPPMPPO** fournissent des données similaires aux **DEPMPO**, à savoir la formation de deux adduits de spins issus du piégeage de deux radicaux. Lorsqu'on augmente la concentration en **Asc** jusqu'à 4 mM, les proportions relatives de chacun des adduits de spin formés restent stables de même après augmentation de la concentration en **Fe(II)** (0,1 mM à 1 mM).

Annexe 4. Étude du piégeage de radicaux du **Lim-2-OOH** en solution avec du **DEPMPO** à 50 mM.

Tableau 7 : Variation de la concentration en Fe(II) - **DEPMPO** 50 mM et **Lim-2-OOH** 1 mM.

Fe(II)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)
1 mM	DEPMPO-R6 (70 %) $g=2,0057$ $a_N=14,6$ $a_H=21,6$ $a_P=47,1$	DEPMPO-OH (10 %) $g=2,0059$ $a_N=14,2$ $a_H=13,5$ $a_P=47,5$	DEPMPO-OOLim2 (7 %) $g = 2,0057$ $a_N = 14,9$ $a_H = 14,1$ $a_P = 52,5$	DEPMPO-R6' (13 %) $g = 2,0058$ $a_N = 14,1$ G $a_H = 21,6$ G $a_P = 53,3$ G
0,1 mM	DEPMPO-R6 (73 %) $g = 2,0058$ $a_N = 14,5$ $a_H = 21,6$ $a_P = 47,0$	DEPMPO-OH (9 %) $g = 2,0059$ $a_N = 14,1$ $a_H = 13,5$ $a_P = 47,6$	DEPMPO-OOLim2 (9 %) $g = 2,0057$ $a_N = 14,5$ $a_H = 14,6$ $a_P = 53,5$	DEPMPO-R6' (9 %) $g = 2,0058$ $a_N = 14,6$ G $a_H = 21,2$ G $a_P = 52,8$ G

Tableau 8 : Variation de la concentration en **Lim-2-OOH** - **DEPMPO** 50 mM et Fe(II) 1 mM.

Lim-2-OOH	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)
4 mM	DEPMPO-R6 (67 %) $g=2,0058$ $a_N=14,6$ $a_H=21,5$ $a_P=47,2$	DEPMPO-OH (13 %) $g=2,0059$ $a_N=14,2$ $a_H=13,6$ $a_P=47,6$	DEPMPO-OOLim2 (13%) $g = 2,0057$ $a_N = 14,5$ $a_H = 14,6$ $a_P = 53,5$	DEPMPO-R6' (7 %) $g = 2,0058$ $a_N = 14,6$ G $a_H = 21,2$ G $a_P = 52,8$ G

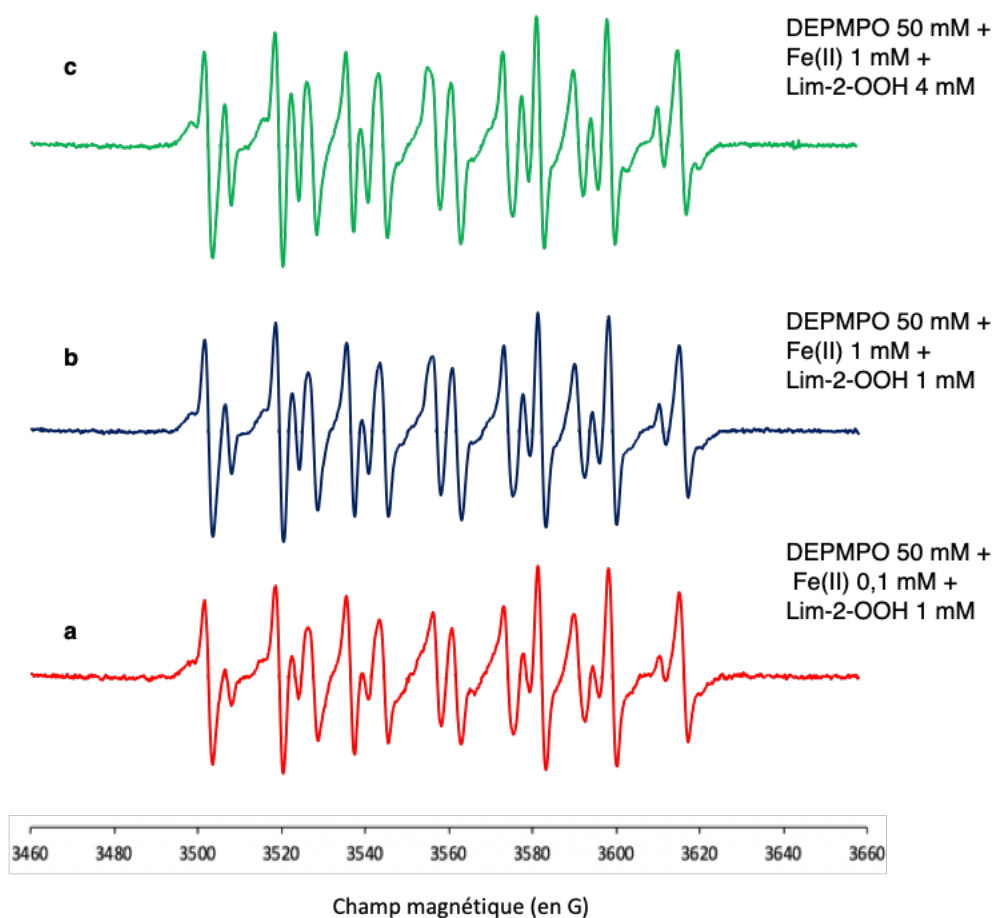


Figure 4 : Spectre RPE en solution : (a) spectre **DEPMPO** 50 mM/**Lim-2-OOH** 1 mM/**Fe(II)** 1 mM ; (b) spectre **DEPMPO** 50 mM/**Lim-2-OOH** 1 mM/**Fe(II)** 1 mM ; (c) spectre **DEPMPO** 50 mM/**Lim-2-OOH** 4 mM/**Fe(II)** 1 mM.

Annexe 5. Étude du piégeage de radicaux du **Lim-2-OOH** en solution avec du **DMPO** à 50 mM.

Tableau 9 : Variation de la concentration en Fe(II) - **DMPO** 50 mM et **Lim-2-OOH** 1 mM.

Fe(II)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)
1 mM	DMPO-R7 (10 %)	DMPO-R8 (8 %)	DMPO-OH (82 %)
	$g=2,0050$	$g=2,0049$	$g=2,0050$
	$a_N=14,5$ $a_H=21,0$	$a_N=15,9$ $a_H=24,7$	$a_N=14,9$ $a_H=14,8$
0,1 mM	DMPO-R7 (< 5 %)		DMPO-OH (97 %)
	$g=2,0050$		$g=2,0050$
	$a_N=14,7$ $a_H=21,6$		$a_N=15,1$ $a_H=15,1$

Tableau 10 : Variation de la concentration en Lim-2-OOH - **DMPO** 50 mM et Fe(II) 1 mM.

Lim-2-OOH	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)
4 mM	DMPO-R7 (8 %)	DMPO-R8 (8 %)	DMPO-OH (84 %)
	$g=2,0049$	$g=2,0049$	$g=2,0050$
	$a_N=14,6$ $a_H=20,9$	$a_N=15,9$ $a_H=24,6$	$a_N=15,1$ $a_H=14,9$

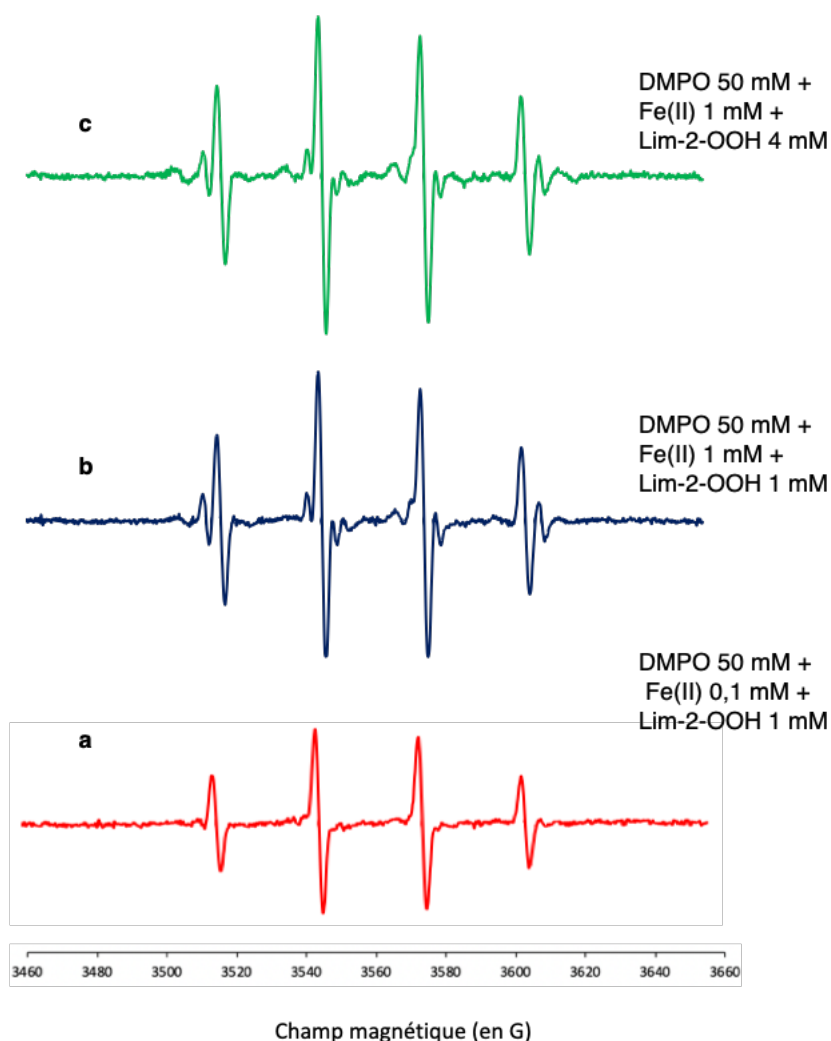


Figure 5 : Spectre RPE en solution : (a) spectre **DMPO** 50 mM/**Lim-2-OOH** 1 mM/**Fe(II)** 1 mM ; (b) spectre **DMPO** 50 mM/**Lim-2-OOH** 1 mM/**Fe(II)** 1 mM ; (c) spectre **DMPO** 50 mM/**Lim-2-OOH** 4 mM/**Fe(II)** 1 mM.

Les études parallèles avec le **DMPO** ont montré le piégeage de deux radicaux en présence de quantité catalytique de fer, le **DMPO-OH** étant majoritaire (ca. 97 %) par rapport à l'adduit résultant du piégeage d'un radical carboné **DMPO-R7** (< 5 %). Puis, l'apparition d'un troisième adduit de spin résultant d'un piégeage d'un second radical carboné **DMPO-R8** a été observé lorsque la concentration en **Fe(II)** devient 10 fois plus importante.

Annexe 6. Étude du piégeage de radicaux du **Lim-2-OOH** en solution avec du **DIPPMPO** à 50 mM

Tableau 11 : Variation de la concentration en Fe(II) - **DIPPMPO** 50 mM et **Lim-2-OOH** 1 mM.

Fe(II)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)
1 mM	DIPPMPO-R9 (21 %) $g=2,0057$ $a_N=14,4$ $a_H=20,7$ $a_P=46,5$	DIPPMPO-OH (79 %) $g=2,0059$ $a_N=14,1$ $a_H=13,7$ $a_P=47,3$
0,1 mM	DIPPMPO-R9 (17 %) $g=2,0057$ $a_N=14,4$ $a_H=20,6$ $a_P=46,3$	DIPPMPO-OH (83%) $g=2,0059$ $a_N=14,2$ $a_H=13,6$ $a_P=47,4$

Tableau 12 : Variation de la concentration en **Lim-2-OOH** - **DIPPMPO** 50 mM et Fe(II) 1 mM.

Lim-2-OOH	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)
4 mM	DIPPMPO-R9 (25 %) $g=2,0056$ $a_N=14,5$ $a_H=20,2$ $a_P=46,0$	DIPPMPO-OH (75 %) $g=2,0058$ $a_N=14,2$ $a_H=13,4$ $a_P=47,2$

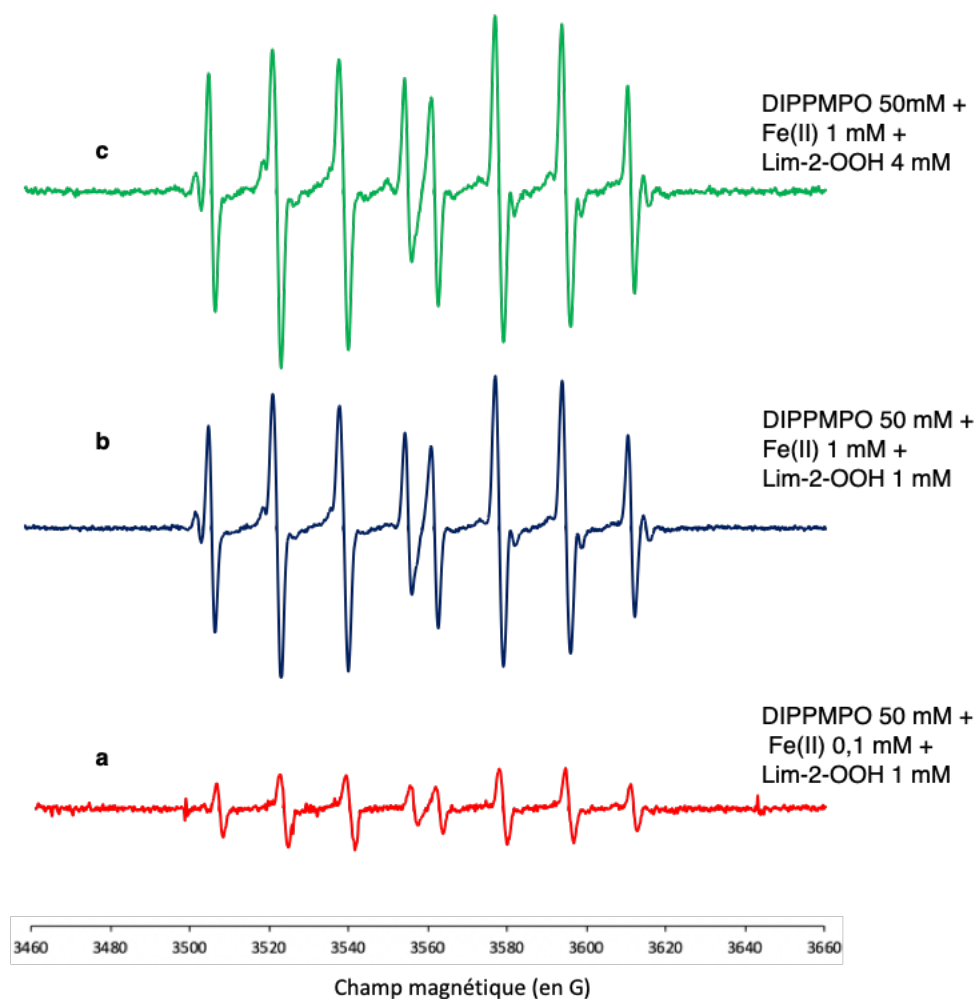


Figure 6 : Spectre RPE en solution : (a) spectre **DIPPMPPO** 50 mM/**Lim-2-OOH** 1 mM/**Fe(II)** 1 mM ; (b) spectre **DIPPMPPO** 50 mM/**Lim-2-OOH** 1 mM/**Fe(II)** 1 mM ; (c) spectre **DIPPMPPO** 50 mM/**Lim-2-OOH** 4 mM/**Fe(II)** 1 mM.

Les données expérimentales correspondant à la réactivité **DIPPMPPO** nous montre la formation de deux adduits pour des concentrations respectifs de **Fe(II)** à 0.1 mM et de **Lim-2-OOH** 1 mM correspondant au piégeage du radical hydroxyle et d'un radical carboné **DEPMPO-R9**. L'adduit **DIPPMPPO-R9** augmente avec la concentration de **Fe(II)** (1 mM) mais avec une proportion relative inférieure à l'adduit **DIPPMPPO-OH** (ca. 21 et 79 % pour **DIPPMPPO-R9** et **DIPPMPPO-OH** respectivement).

Annexe 7. Étude du piégeage de radicaux du **(1S,4R)-Lim-1-OOH** en solution avec du **DEPMPO** à 50 mM.

Tableau 13 : Variation de la concentration en Fe(II) - **DEPMPO** 50 mM et **(1S,4R)-Lim-1-OOH** 1 mM.

Fe(II)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)
1 mM	DEPMPO-R10 $g=2,0056$ $a_N=14,9$ $a_H=22,1$ $a_P=47,9$			DEPMPO-R10' (10 %) $g = 2,0058$ $a_N = 14,8$ G $a_H = 21,3$ G $a_P = 52,6$ G
0,1 mM	DEPMPO-R10 (73 %) $g=2,0057$ $a_N=14,6$ $a_H=21,5$ $a_P=47,4$	DEPMPO-OH (9 %) $g=2,0058$ $a_N=14,3$ $a_H=13,4$ $a_P=47,5$	DEPMPO-OOLim1 ou DEPMPO-OCH ₃ (8 %) $g = 2,0057$ $a_N = 14,3$ G $a_H = 14,4$ G $a_P = 53,1$ G	DEPMPO-R10' (10 %) $g = 2,0058$ $a_N = 14,8$ G $a_H = 21,3$ G $a_P = 52,6$ G

Tableau 14 : Variation de la concentration en **(1S,4R)-Lim-1-OOH** - **DEPMPO** 50 mM et Fe(II) 1 mM.

(1S,4R)- Lim-1-OOH	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)
4 mM	DEPMPO-R10 (60 %) $g=2,0057$ $a_N=14,6$ $a_H=21,8$ $a_P=47,5$	DEPMPO-OH (17 %) $g=2,0058$ $a_N=14,1$ $a_H=13,2$ $a_P=47,3$	DEPMPO-OOLim1 ou DEPMPO-OCH ₃ (8 %) $g = 2,0057$ $a_N = 14,6$ G $a_H = 14,0$ G $a_P = 53,4$ G	DEPMPO-R10' (10 %) $g = 2,0058$ $a_N = 14,9$ G $a_H = 20,9$ G $a_P = 52,9$ G

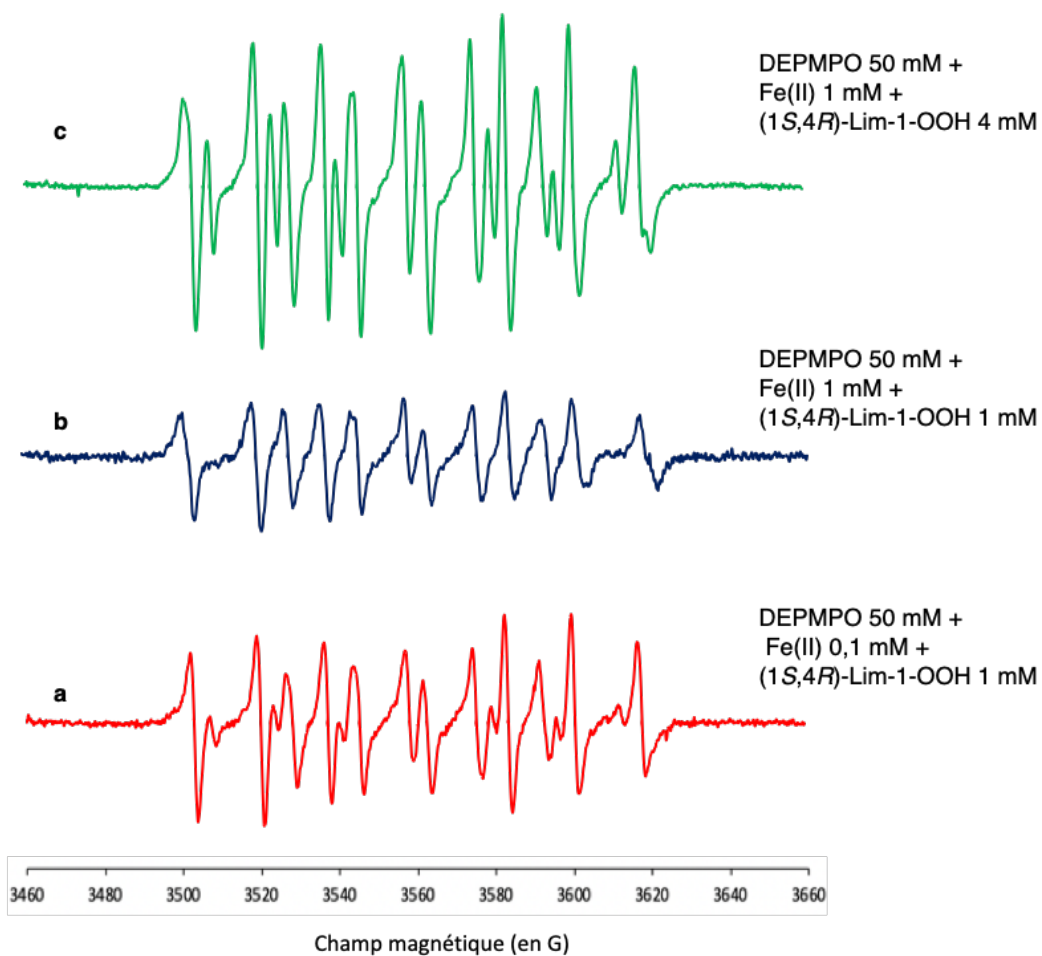


Figure 7 : Spectre RPE en solution : (a) spectre avec **DEPMPPO** 50 mM/(1S,4R)-Lim-1-OOH 1 mM/Fe(II) 0,1 mM ; (b) spectre avec **DEPMPPO** 50 mM/(1S,4R)-Lim-1-OOH 1 mM/Fe(II) 1 mM ; (c) spectre avec **DEPMPPO** 50 mM/(1S,4R)-Lim-1-OOH 4 mM/Fe(II) 1 mM.

Annexe 8. Étude du piégeage de radicaux du **(1S,4R)-Lim-1-OOH** en solution avec du **DMPO** à 50 mM

Tableau 15 : Variation de la concentration en Fe(II) - **DMPO** 50 mM et **(1S,4R)-Lim-1-OOH** 1 mM.

Fe(II)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)
1 mM	DMPO-R11 (41 %) $g=2,0048$ $a_N=16,5$ $a_H=23,5$	DMPO-R12 (< 5 %) $g=2,0050$ $a_N=14,6$ $a_H=21,5$	DMPO-OH (56 %) $g=2,0050$ $a_N=15,1$ $a_H=15,1$
0,1 mM	DMPO-R11 (9 %) $g=2,0048$ $a_N=16,6$ $a_H=23,5$	DMPO-R12 (< 5 %) $g=2,0049$ $a_N=14,6$ $a_H=21,5$	DMPO-OH (87 %) $g=2,0050$ $a_N=15,1$ $a_H=15,1$

Tableau 16 : Variation de la concentration en **(1S,4R)-Lim-1-OOH** - **DMPO** 50 mM et Fe(II) 1 mM.

(1S,4R)-Lim-1-OOH	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)
4 mM	DMPO-R11 (55 %) $g=2,0048$ $a_N=16,6$ $a_H=23,5$	DMPO-R12 (< 5 %) $g=2,0050$ $a_N=14,5$ $a_H=21,5$	DMPO-OH (42 %) $g=2,0050$ $a_N=15,15$ $a_H=14,9$

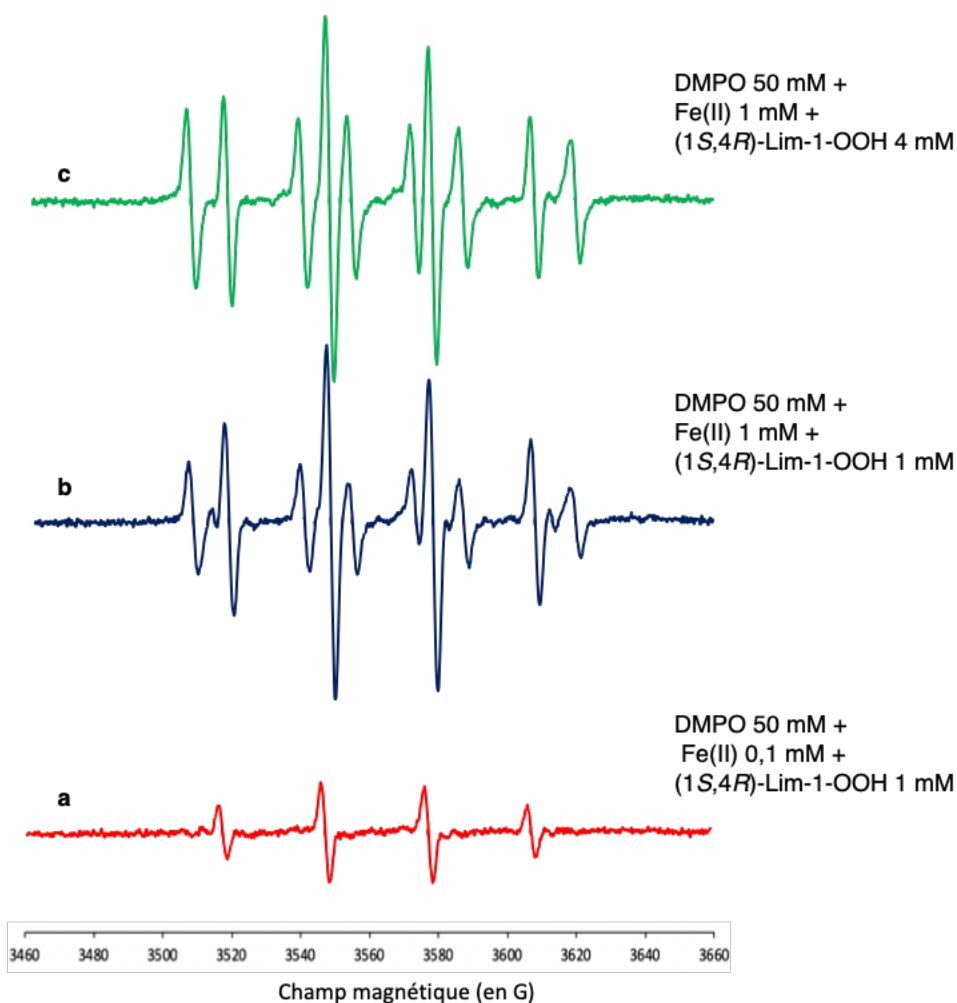


Figure 8 : Spectre RPE en solution : (a) spectre avec **DMPO 50 mM/(1S,4R)-Lim-1-OOH 1 mM/Fe(II) 0,1 mM** ; (b) spectre avec **DMPO 50 mM/(1S,4R)-Lim-1-OOH 1 mM/Fe(II) 1 mM** ; (c) spectre avec **DMPO 50 mM/(1S,4R)-Lim-1-OOH 4 mM/Fe(II) 1 mM**.

Outre le piégeage du radical hydroxyle et d'un radical carboné, un adduit supplémentaire est observé avec le DMPO issu du piégeage d'un radical carboné différent (DMPO-R11 et DMPO-R12). La proportion relative de l'adduit DMPO-R11 augmente avec la concentration de Fe(II) tandis que l'adduit DMPO-R12 reste en proportion constante qu'il y ait ou non une concentration 4 fois plus importante de **(1S, 4R)-Lim-1-OOH**.

Annexe 9. Étude du piégeage de radicaux du **(1S,4R)-Lim-1-OOH** en solution avec du **DIPPMPO** à 50 mM

Tableau 17 : Variation de la concentration en Fe(II) - **DIPPMPO** 50 mM et **(1S,4R)-Lim-1-OOH** 1 mM.

Fe(II)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)
1 mM	DIPPMPO-R13 (47 %) $g=2,0057$ $a_N=15,1$ $a_H=21,8$ $a_P=48,6$	DIPPMPO-OH (53 %) $g=2,0059$ $a_N=14,1$ $a_H=13,6$ $a_P=47,3$
0,1 mM	DIPPMPO-R13 (20 %) $g=2,0057$ $a_N=14,8$ $a_H=21,7$ $a_P=48,7$	DIPPMPO-OH (80 %) $g=2,0058$ $a_N=14,2$ $a_H=13,4$ $a_P=47,4$

Tableau 18 : Variation de la concentration en **(1S,4R)-Lim-1-OOH** - **DIPPMPO** 50 mM et Fe(II) 1 mM.

(1S,4R)-Lim-1-OOH	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)
4 mM	DIPPMPO-R13 (79 %) $g=2,0057$ $a_N=15,2$ $a_H=22,4$ $a_P=48,4$	DIPPMPO-OH (21 %) $g=2,0058$ $a_N=13,8$ $a_H=14,3$ $a_P=47,3$

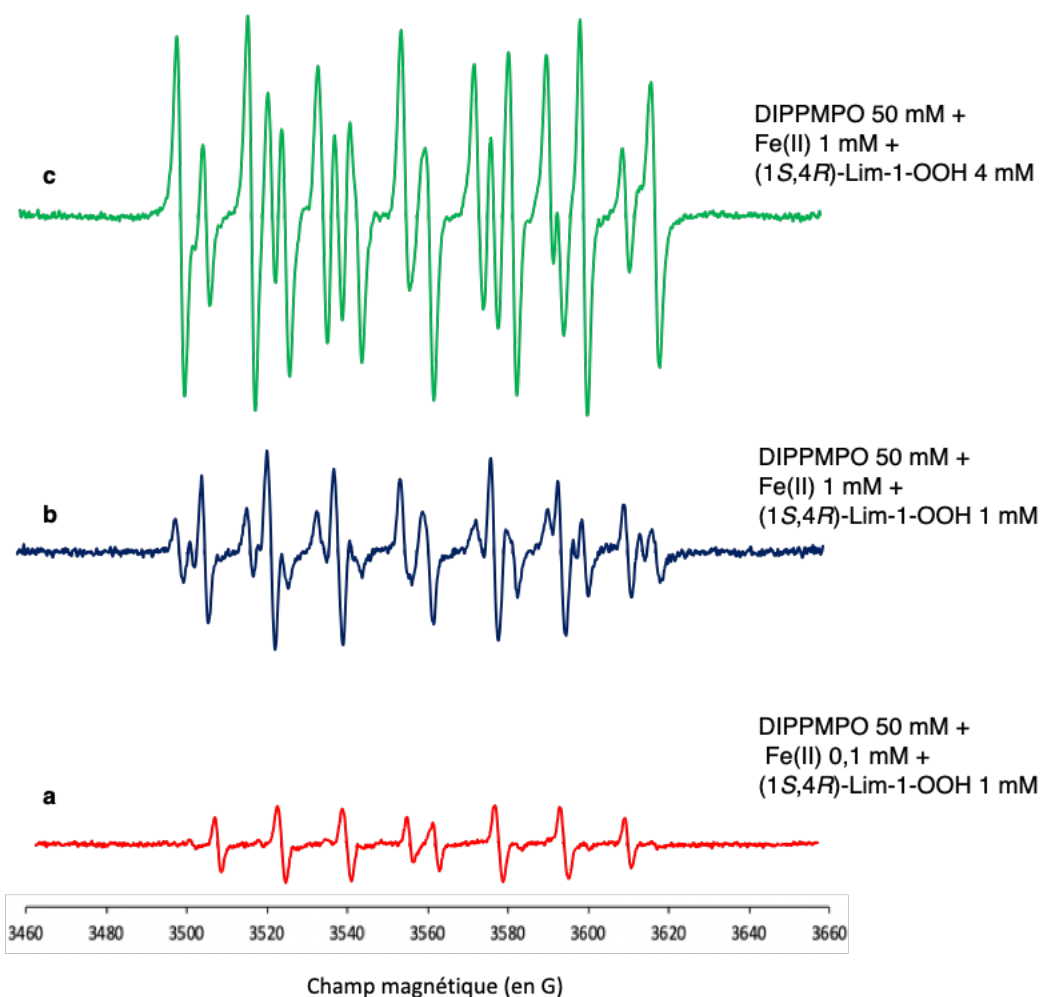


Figure 9 : Spectre RPE en solution : (a) spectre avec DIPPMPPO 50 mM/(1S,4R)-Lim-1-OOH 1 mM et Fe(II) 0,1 mM ; (b) spectre avec DIPPMPPO 50 mM/(1S,4R)-Lim-1-OOH 1 mM/Fe(II) 1 mM ; (c) spectre avec DIPPMPPO 50 mM/(1S,4R)-Lim-1-OOH 4 mM/Fe(II) 1 mM.

Pour le DIPPMPPO, le radical hydroxyle semble être piégé majoritairement en présence de 0,1 mM de Fe(II). Puis, en quantité équimolaire de (1S,4R)-Lim-1-OOH, il semble y avoir autant d'adduits issu du piégeage d'un radical carboné DIPPMPPO-R13 que de DIPPMPPO-OH. En présence de 4 mM, on retrouve une proportion de DIPPMPPO-R13 plus importante que l'adduit DIPPMPPO-OH.

Annexe 10. Étude du piégeage de radicaux du (\pm)-Citr-7-OOH en solution avec du **DEPMPO** à 50 mM

Tableau 19 : Variation de la concentration en Fe(II) - **DEPMPO** 50 mM et (\pm)-Citr-7-OOH 1 mM.

Fe(II)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)
1 mM	DEPMPO-R14 (45 %) $g=2,0056$ $a_N=14,8$ $a_H=21,4$ $a_P=47,2$				DEPMPO-R15 (55 %) $g=2,0057$ $a_N=15,0$ $a_H=24,3$ $a_P=47,9$
0,1 mM	DEPMPO-R14 (66 %) $g = 2,0057$ $a_N = 14,7$ $a_H = 21,6$ $a_P = 47,0$	DEPMPO-OH (7 %) $g = 2,0058$ $a_N=14,3$ $a_H=13,5$ $a_P=47,5$	DEPMPO-OOCitr7 ou DEPMPO-OCH ₃ (16 %) $g = 2,0058$ $a_N = 14,6 G$ $a_H = 14,8 G$ $a_P = 54,0 G$	DEPMPO-R14' (11 %) $g = 2,0058$ $a_N = 14,8 G$ $a_H = 21,9 G$ $a_P = 51,6 G$	

Tableau 20 : Variation de la concentration en (\pm)-Citr-7-OOH - **DEPMPO** 50 mM et Fe(II) 1 mM.

(\pm)-Citr-7-OOH	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)
4 mM	DEPMPO-R14 (40 %) $g=2,0056$ $a_N=14,8$ $a_H=21,4$ $a_P=47,2$	DEPMPO-OH (8 %) $g=2,0058$ $a_N=14,3$ $a_H=13,5$ $a_P=47,5$	DEPMPO-R15 (52 %) $g=2,0057$ $a_N=15,0$ $a_H=24,3$ $a_P=47,9$

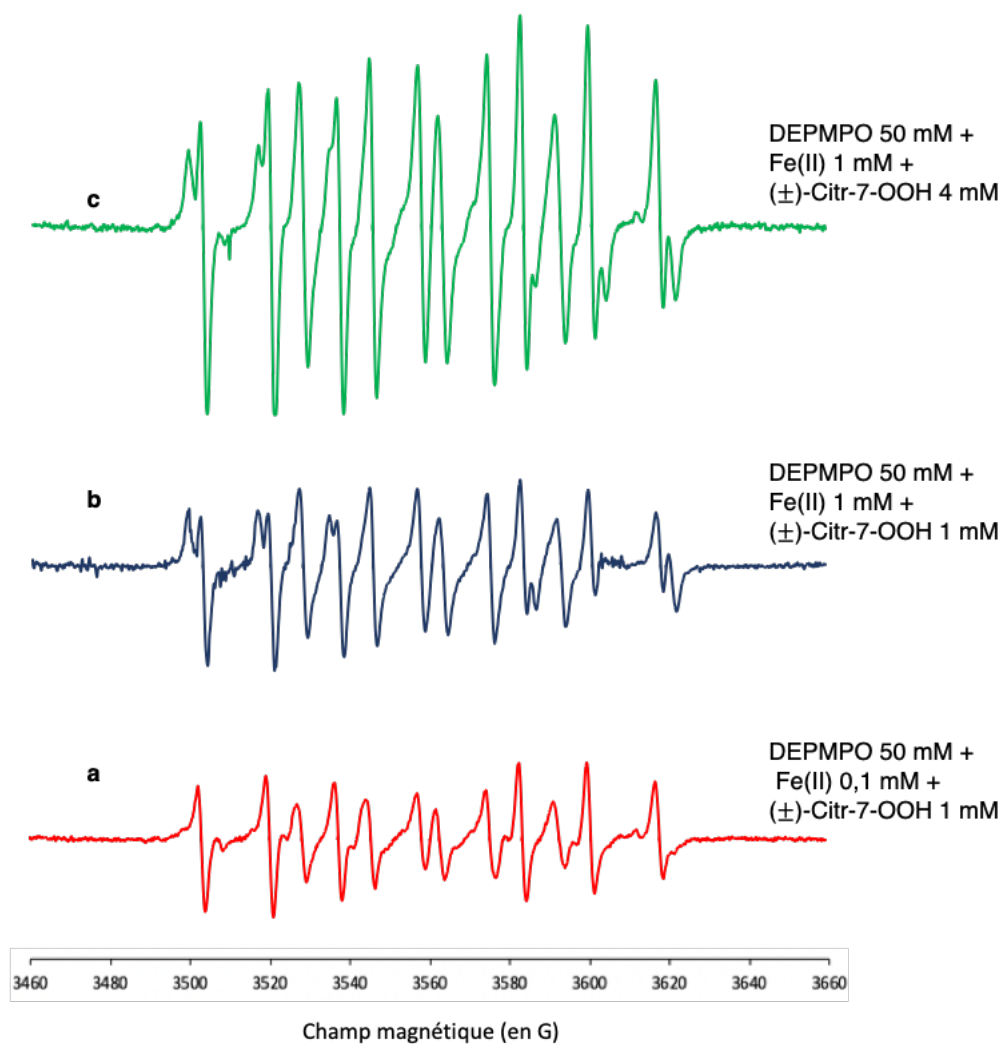


Figure 10 : Spectre RPE en solution : (a) spectre avec **DEPMPPO** 50 mM/(±)-**Citr-7-OOH** 1 mM /Fe(II) 0,1 mM ; (b) spectre avec **DEPMPPO** 50 mM/(±)-**Citr-7-OOH** 1 mM/Fe(II) 1 mM ; (c) spectre avec **DEPMPPO** 50 mM/(±)-**Citr-7-OOH** 4 mM/Fe(II) 1 mM.

Annexe 11. Étude du piégeage de radicaux du (\pm)-Citr-7-OOH en solution avec du DMPO à 50 mM

Tableau 21 : Variation de la concentration en Fe(II) - DMPO 50 mM et (\pm)-Citr-7-OOH 1 mM.

Fe(II)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)
1 mM	DMPO-R16 (64 %)	DMPO-OH (36 %)
	$g=2,0049$	$g=2,0050$
	$a_N=16,2$	$a_N=15,1$
	$a_H=24,1$	$a_H=14,9$
0,1 mM	DMPO-R16 (37 %)	DMPO-OH (63 %)
	$g=2,0057$	$g=2,0051$
	$a_N=16,3$	$a_N=15,1$
	$a_H=23,8$	$a_H=15,0$

Tableau 22 : Variation de la concentration en (\pm)-Citr-7-OOH - DMPO 50 mM et Fe(II) 1 mM.

(\pm)-Citr-7-OOH	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)
4 mM	DMPO-R16 (50 %)	DMPO-OCH ₃ /OOCitr (6 %)	DMPO-OH (44 %)
	$g=2,0045$	$g=2,0044$	$g=2,0046$
	$a_N=16,1$	$a_N=13,2$	$a_N=15,2$
	$a_H=23,5$	$a_H=9,25$	$a_H=14,9$

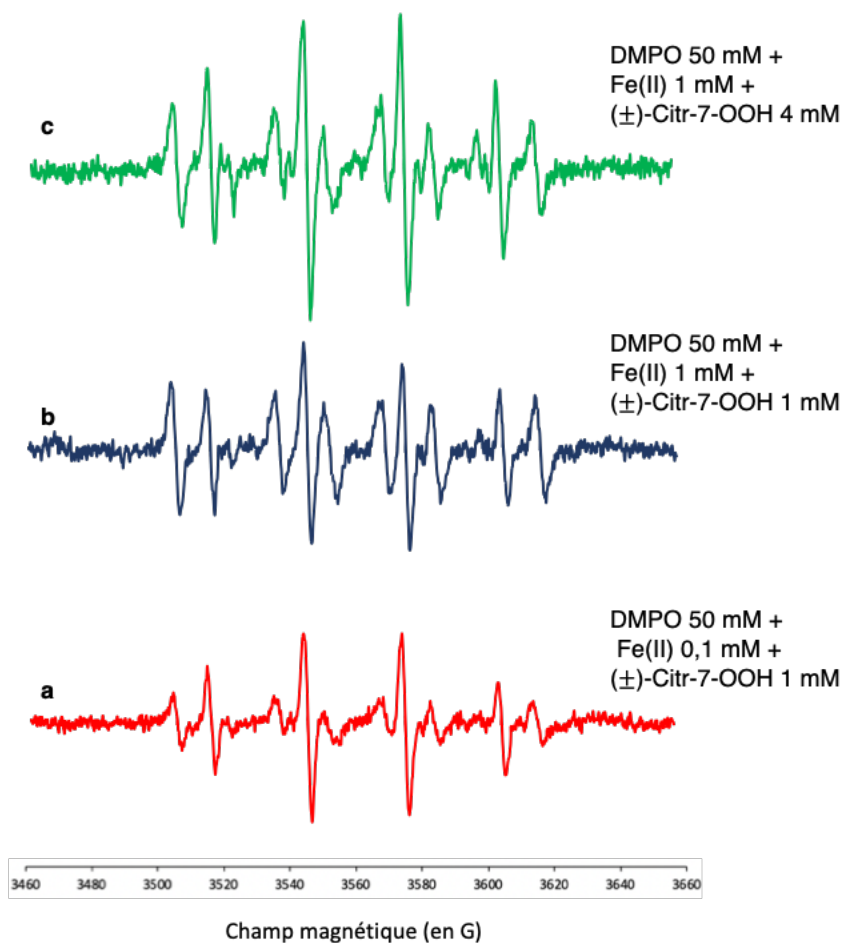


Figure 11 : Spectre RPE en solution : (a) spectre avec **DMPO 50 mM/(±)-Citr-7-OOH 1 mM/Fe(II) 0,1 mM** ; (b) spectre avec **DMPO 50 mM/(±)-Citr-7-OOH 1 mM/Fe(II) 1 mM** ; (c) spectre avec **DMPO 50 mM/(±)-Citr-7-OOH 4 mM/Fe(II) 1 mM**.

En présence de DMPO, l'adduit DMPO-OH est détecté et plus la concentration en Fe(II) augmente, plus la concentration en DMPO-OH semble diminuer au profit de l'adduit DMPO-R16. Avec 4 mM de (±)-**Citr-7-OOH** pour 1 mM de Fe(II) on observe la formation d'un nouvel adduit avec des constantes de couplage $a_N = 13,2$ et $a_H = 9,25$ caractéristiques d'un radical \cdot OCH₃ ou \cdot OOCitr7 dont la formation est expliquée sur la Figure 32.

Annexe 12. Étude du piégeage de radicaux du (\pm)-Citr-7-OOH en solution avec du **DIPPMPO** à 50 mM

Tableau 23 : Variation de la concentration en Fe(II) - **DIPPMPO** 50 mM et (\pm)-Citr-7-OOH 1 mM.

Fe(II)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)
1 mM	DIPPMPO-R17 (22 %) $g=2,0056$ $a_N=15,9$ $a_H=23,1$ $a_P=47,7$	DIPPMPO-R18 (57 %) $g=2,0057$ $a_N=14,8$ $a_H=21,8$ $a_P=47,0$	DIPPMPO-OH (21 %) $g=2,0058$ $a_N=14,2$ $a_H=13,4$ $a_P=47,2$
0,1 mM	DIPPMPO-R17 (40 %) $g=2,0057$ $a_N=15,0$ $a_H=24,3$ $a_P=47,9$	DIPPMPO-R18 (<5%) $g=2,0057$ $a_N=14,5$ $a_H=21,4$ $a_P=47,2$	DIPPMPO-OH (60%) $g=2,0058$ $a_N=14,2$ $a_H=13,6$ $a_P=47,3$

Tableau 24 : Variation de la concentration en (\pm)-Citr-7-OOH - **DIPPMPO** 50 mM et Fe(II) 1 mM.

(\pm)-Citr-7-OOH	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)
4 mM	DIPPMPO-R17 (43 %) $g=2,0056$ $a_N=15,5$ $a_H=23,6$ $a_P=48,1$	DIPPMPO-R18 (47 %) $g=2,0057$ $a_N=14,9$ $a_H=21,8$ $a_P=47,0$	DIPPMPO-OH (10%) $g=2,0058$ $a_N=14,2$ $a_H=13,4$ $a_P=47,3$

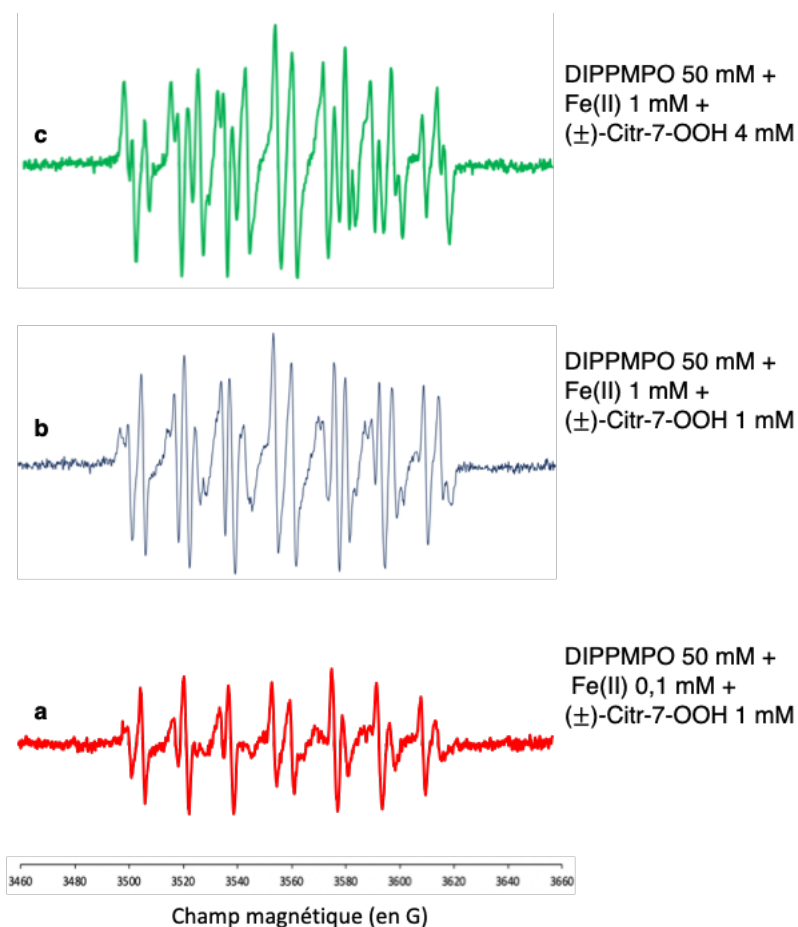


Figure 12 : Spectre RPE en solution : (a) spectre avec **DIPPMP-OH** 50 mM/(±)-Citr-7-OOH 1 mM/Fe(II) 0,1 mM ; (b) spectre avec **DIPPMP-OH** 50 mM/(±)-Citr-7-OOH 1 mM/Fe(II) 1 mM ; (c) spectre avec **DIPPMP-OH** 50 mM/(±)-Citr-7-OOH 4 mM/Fe(II) 1 mM.

Avec le DIPPMP-OH, on observe le piégeage du radical hydroxyle de manière plus abondante par rapport aux adduits DIPPMP-OH-R17 et DIPPMP-OH-R18 à 0,1 mM de Fe(II). En augmentant la concentration en Fe(II) à 1 mM, nous obtenons une quantité relative en DIPPMP-OH moins importante notamment en augmentant la concentration en (±)-Citr-7-OOH à 4 mM. Avec 1 mM de Fe(II), les proportions en DIPPMP-OH-R18 augmentent jusqu'à être majoritaire au sein de ce système. Avec 4 mM de (±)-Citr-7-OOH, les adduits DIPPMP-OH-R17 et DIPPMP-OH-R18 se retrouvent dans le système en proportion équivalente.

Annexe 13. Étude du piégeage de radicaux du mélange (±)-Citr-6-OOH et (±)-Citr-7-OOH en solution avec du **DEPMPO** à 50 mM

Tableau 25 : Variation de la concentration en Fe(II) - **DEPMPO** 50 mM et du mélange (±)-Citr-6-OOH et (±)-Citr-7-OOH 1 mM.

Fe(II)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)
1 mM	DEPMPO-R19 (62 %)	DEPMPO-R20 (< 5 %)	DEPMPO-OH (33 %)
	$g=2,0048$	$g=2,0049$	$g=2,0050$
	$a_N=15,4$	$a_N=14,8$	$a_N=14,1$
	$a_H=22,7$	$a_H=21,6$	$a_H=13,3$
	$a_P=48,6$	$a_P=45,1$	$a_P=47,8$
0,1 mM	DEPMPO-R19 (29 %)	DEPMPO-R20 (< 5 %)	DEPMPO-OH (61 %)
	$g=2,0049$	$g=2,0050$	$g=2,0050$
	$a_N=15,2$	$a_N=14,3$	$a_N=14,2$
	$a_H=22,3$	$a_H=22,4$	$a_H=13,4$
	$a_P=48,7$	$a_P=45,9$	$a_P=47,7$

Tableau 26 : Variation de la concentration en mélange (±)-Citr-6-OOH et (±)-Citr-7-OOH - **DEPMPO** 50 mM et Fe(II) 1 mM.

(±)-Citr-6-OOH et (±)-Citr-7-OOH	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)
4 mM	DEPMPO-R19 (33 %)	DEPMPO-R20 (10 %)	DEPMPO-OH (66 %)
	$g=2,0049$	$g=2,0050$	$g=2,0050$
	$a_N=15,3$	$a_N=14,7$	$a_N=14,2$
	$a_H=22,4$	$a_H=23,0$	$a_H=13,3$
	$a_P=48,6$	$a_P=45,8$	$a_P=47,7$

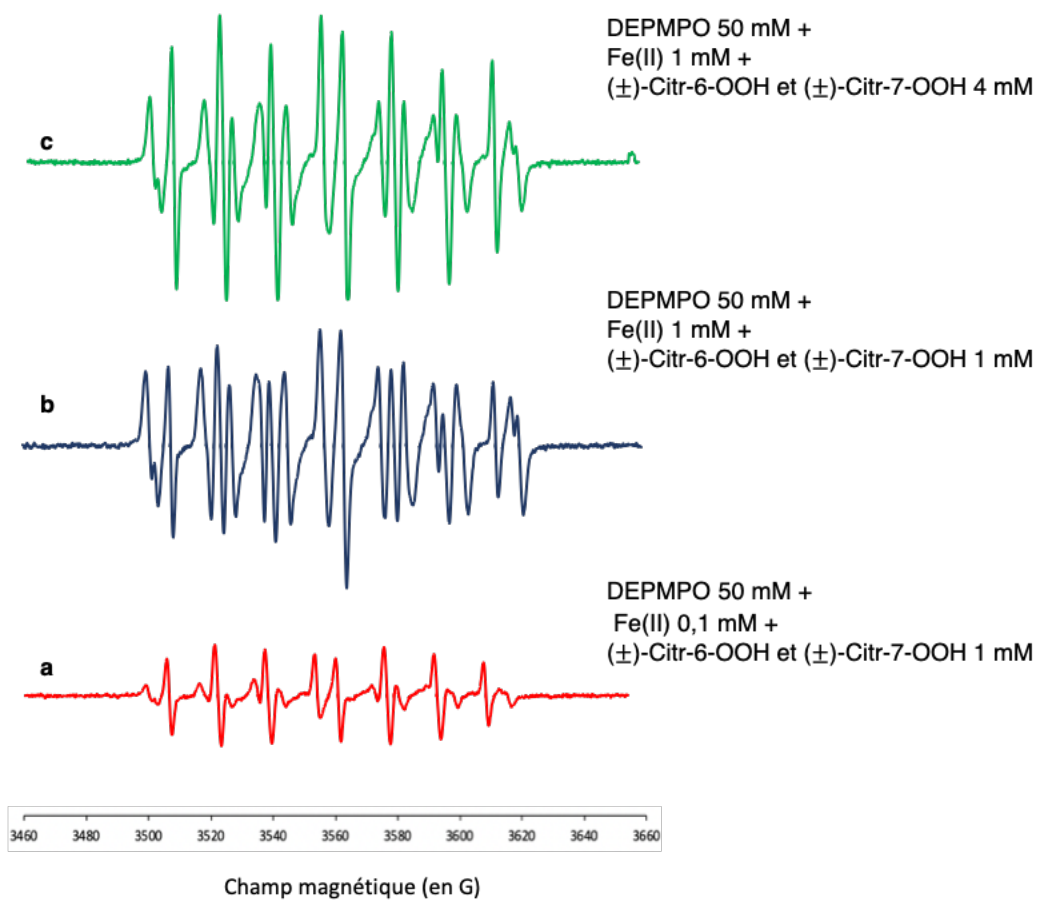


Figure 13 : Spectre RPE en solution : (a) spectre avec **DEPMPO 50 mM/(±)-Citr-6-OOH et (±)-Citr-7-OOH 1 mM/Fe(II) 0,1 mM** ; (b) spectre avec **DEPMPO 50 mM, (±)-Citr-6-OOH et (±)-Citr-7-OOH 1 mM/Fe(II) 1 mM** ; (c) spectre avec **DEPMPO 50 mM/(±)-Citr-6-OOH et (±)-Citr-7-OOH 4 mM/Fe(II) 1 mM**.

Annexe 14. Étude du piégeage de radicaux du mélange (±)-Citr-6-OOH et (±)-Citr-7-OOH en solution avec du **DMPO** à 50 mM

Tableau 27 : Variation de la concentration en Fe(II) - **DMPO** 50 mM et (±)-Citr-6-OOH et (±)-Citr-7-OOH 1 mM.

Fe(II)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)
1 mM	DMPO-R21 (92 %)	DMPO-OH (7 %)
	$g=2,0045$	$g=2,0046$
	$a_N=16,4$	$a_N=14,9$
	$a_H=23,8$	$a_H=15,5$
0,1 mM	DMPO-R21 (24 %)	DMPO-OH (76 %)
	$g=2,0045$	$g=2,0046$
	$a_N=16,1$	$a_N=15,1$
	$a_H=23,5$	$a_H=15,1$

Tableau 28 : Variation de la concentration en (±)-Citr-6-OOH et (±)-Citr-7-OOH - **DMPO** 50 mM et Fe(II) 1 mM.

(±)-Citr-6-OOH et (±)-Citr-7-OOH	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)
4 mM	DMPO-R21 (50 %)	DMPO-OCH ₃ /OOCitr (6 %)	DMPO-OH (44 %)
	$g=2,0045$	$g=2,0044$	$g=2,0046$
	$a_N=16,1$	$a_N=13,8$	$a_N=15,2$
	$a_H=23,5$	$a_H=9,25$	$a_H=14,8$

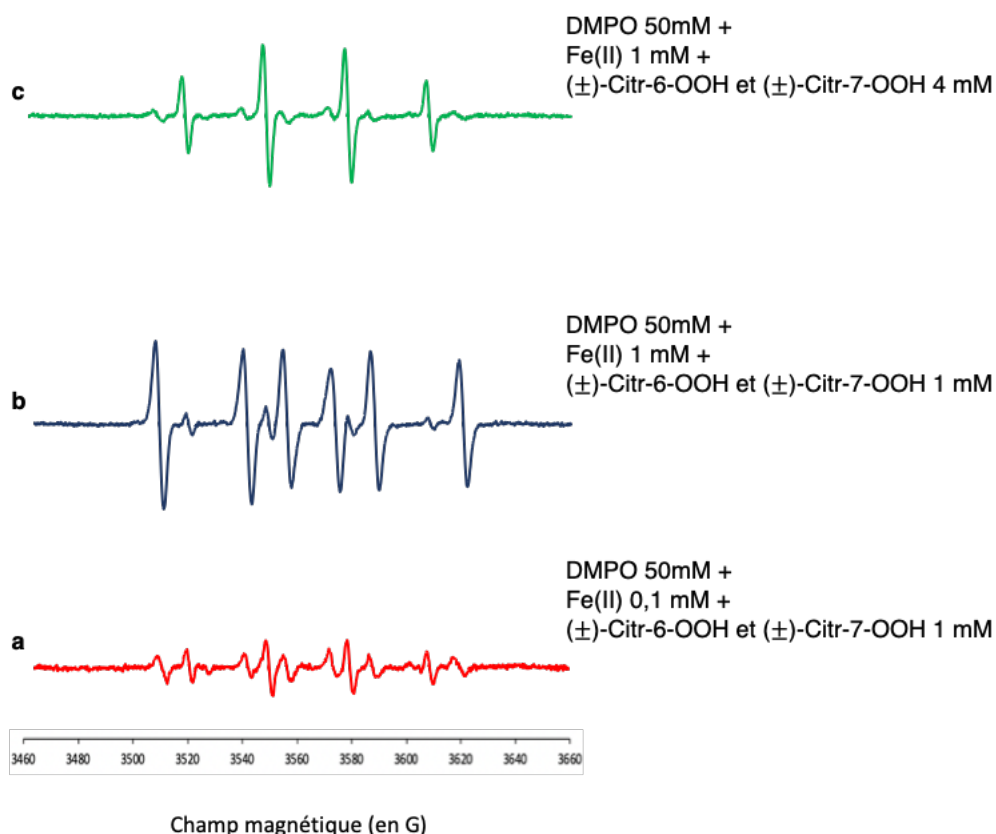


Figure 14 : Spectre RPE en solution : (a) spectre avec **DMPO** 50 mM/(±)-**Citr-6-OOH** et (±)-**Citr-7-OOH** 1 mM/Fe(II) 0,1 mM ; (b) spectre avec **DMPO** 50 mM, (±)-**Citr-6-OOH** et (±)-**Citr-7-OOH** 1 mM/Fe(II) 1 mM ; (c) spectre avec **DMPO** 50 mM/(±)-**Citr-6-OOH** et (±)-**Citr-7-OOH** 4 mM/Fe(II) 1 mM.

En présence de DMPO, à des concentrations élevées en mélange (±)-**Citr-6-OOH** / (±)-**Citr-7-OOH** et en Fe(II) (4 mM et 1 mM respectivement), un adduit avec des *hfccs* similaires à l'adduit DMPO-OCH₃ ou DMPO-OOCitr7 a été observé en faible quantité en plus de l'adduit DMPO-R21 et DMPO-OH. Lorsqu'on passe à des quantités équimolaires de Fe(II) et de peroxyde (1 mM), l'adduit DMPO-R21 est obtenu en très grande majorité (ca. 92 %). Lorsque le Fe(II) est ajouté en quantité catalytique (0,1 mM), on retrouve une majorité d'adduits DMPO-OH par rapport au DMPO-R21.

Annexe 15. Étude du piégeage de radicaux du mélange (±)-Citr-6-OOH et (±)-Citr-7-OOH en solution avec du **DIPPMPO** à 50 mM

Tableau 29 : Variation de la concentration en Fe(II) – **DIPPMPO** 50 mM et (±)-Citr-6-OOH et (±)-Citr-7-OOH 1 mM.

Fe(II)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)
1 mM	DIPPMPO-R22 (38 %) $g=2,0056$ $a_N=15,0$ $a_H=23,4$ $a_P=47,0$	DIPPMPO-R23 (27 %) $g=2,0057$ $a_N=14,4$ $a_H=21,6$ $a_P=46,9$	DIPPMPO-OH (35 %) $g=2,0058$ $a_N=14,2$ $a_H=13,4$ $a_P=47,2$
0,1 mM	DIPPMPO-R22 (30 %) $g=2,0057$ $a_N=14,7$ $a_H=24,4$ $a_P=46,9$		DIPPMPO-OH (70%) $g=2,0058$ $a_N=14,4$ $a_H=13,4$ $a_P=47,8$

Tableau 30 : Variation de la concentration en (±)-Citr-6-OOH et (±)-Citr-7-OOH – **DIPPMPO** 50 mM et Fe(II) 1mM.

(±)-Citr-6-OOH et (±)-Citr-7-OOH	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)	Adduit de spin <i>hfccs</i> (en G)
4 mM	DIPPMPO-R22 (39 %) $g=2,0056$ $a_N=15,6$ $a_H=23,4$ $a_P=48,2$	DIPPMPO-R23 (50 %) $g=2,0056$ $a_N=14,8$ $a_H=21,9$ $a_P=46,9$	DIPPMPO-OH (11%) $g=2,0058$ $a_N=14,3$ $a_H=13,5$ $a_P=47,3$

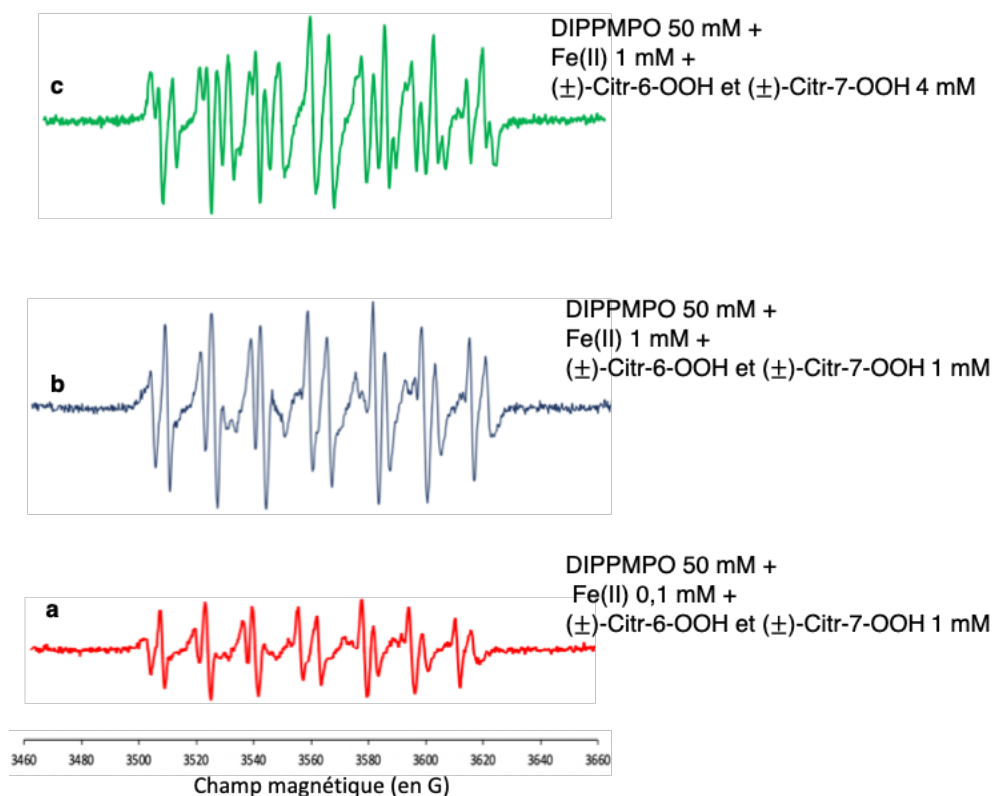


Figure 15 : Spectre RPE en solution : (a) spectre avec **DIPPMPPO** 50 mM/(±)-Citr-6-OOH et (±)-Citr-7-OOH 1 mM/Fe(II) 0,1 mM ; (b) spectre avec **DIPPMPPO** 50 mM/(±)-Citr-6-OOH et (±)-Citr-7-OOH 1 mM/Fe(II) 1 mM ; (c) spectre avec **DIPPMPPO** 50 mM/(±)-Citr-6-OOH et (±)-Citr-7-OOH 4 mM/Fe(II) 1 mM.

Le piégeage des radicaux issu du mélange par le DIPPMPPO nous fournit des résultats similaires à ceux du piégeage des radicaux provenant du (±)-Citr-7-OOH seul (cf. Annexe 12).

Annexe 16. Étude du piégeage de radicaux issus de l'Asc sur les RHE avec du **DEPMPO** 250 mM

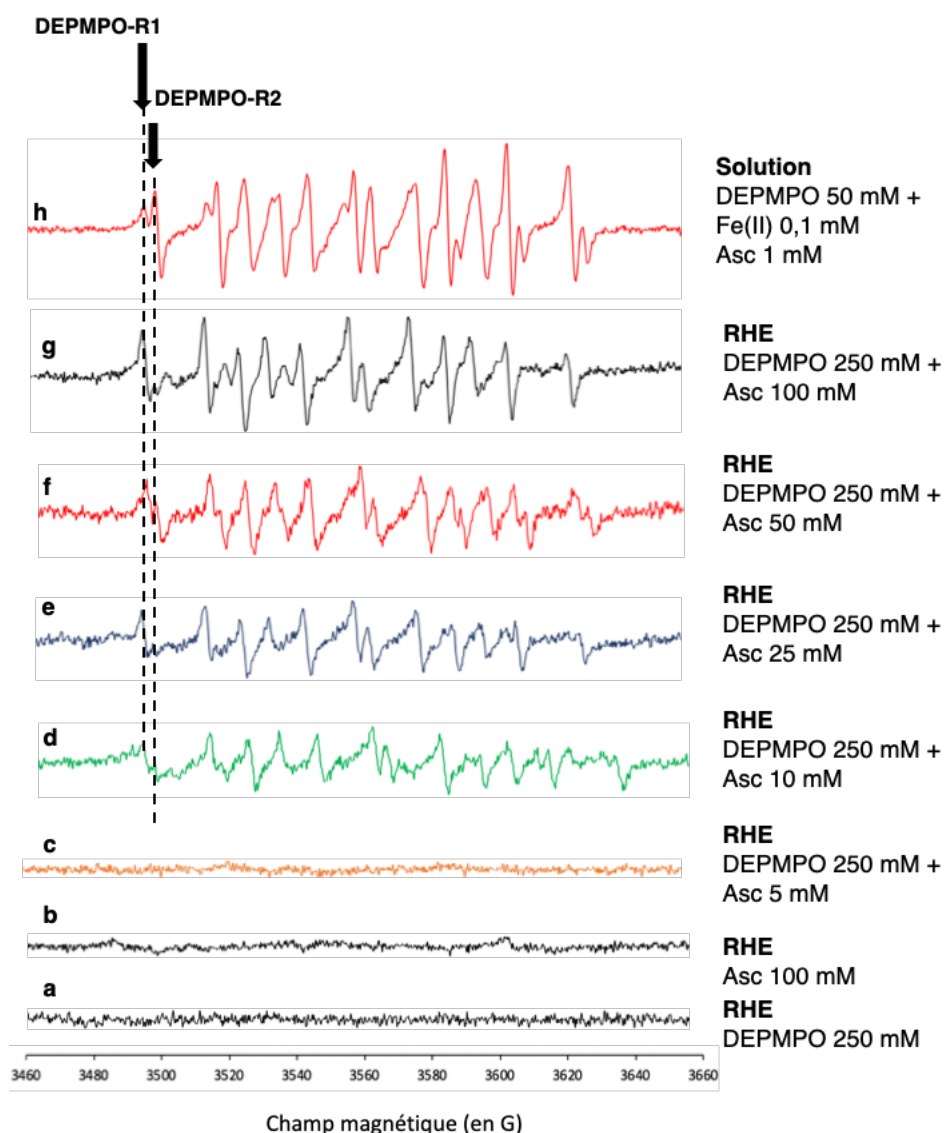


Figure 16 : Spectres RPE sur RHE obtenus : (a) contrôle RHE-DEPMPO 250 mM ; (b) contrôle RHE-Asc 100 mM ; (c) spectre RHE après incubation de DEPMPO 250 mM suivie de l'addition d'Asc 5 mM ; (d) spectre RHE après incubation de DEPMPO 250 mM suivie de l'addition d'Asc 10 mM ; (e) spectre RHE après incubation de DEPMPO 250 mM suivie de l'addition d'Asc 25 mM ; (f) spectre RHE après incubation de DEPMPO 250 mM suivie de l'addition d'Asc 50 mM ; (g) spectre RHE après incubation de DEPMPO 250 mM suivie de l'addition d'Asc 100 mM ; (h) spectre en solution DEPMPO 50 mM/Asc 1 mM/Fe(II) 0,1 mM.

Annexe 17. Étude du piégeage de radicaux issus du **Lim-2-OOH** sur les RHE avec du **DEPMPO** 250 mM

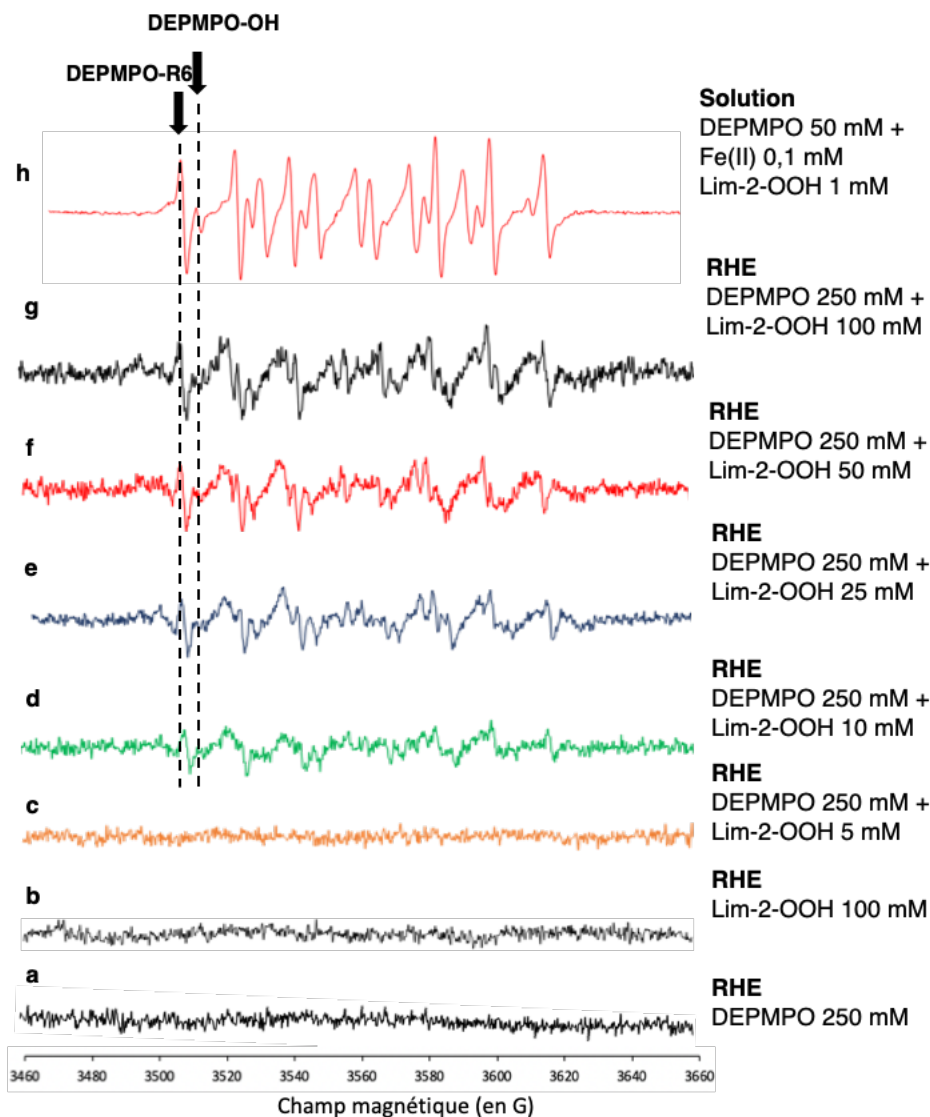


Figure 17 : Spectres RPE sur RHE obtenus : (a) contrôle RHE-DEPMPO 250 mM ; (b) contrôle RHE-Lim-2-OOH 100 mM ; (c) spectre RHE après incubation de DEPMPO 250 mM suivie de l'addition Lim-2-OOH 5 mM ; (d) spectre RHE après incubation de DEPMPO 250 mM suivie de l'addition Lim-2-OOH 10 mM ; (e) spectre RHE après incubation de DEPMPO 250 mM suivie de l'addition Lim-2-OOH 25 mM ; (f) spectre RHE après incubation de DEPMPO 250 mM suivie de l'addition Lim-2-OOH 50 mM ; (g) spectre RHE après incubation de DEPMPO 250 mM suivie de l'addition Lim-2-OOH 100 mM ; (h) spectre en solution DEPMPO 50 mM/ Lim-2-OOH 1 mM/Fe(II) 0,1 mM.

Annexe 18. Étude du piégeage de radicaux issus du (1S, 4R)-Lim-1-OOH sur les RHE avec du **DEPMPO** 250 mM

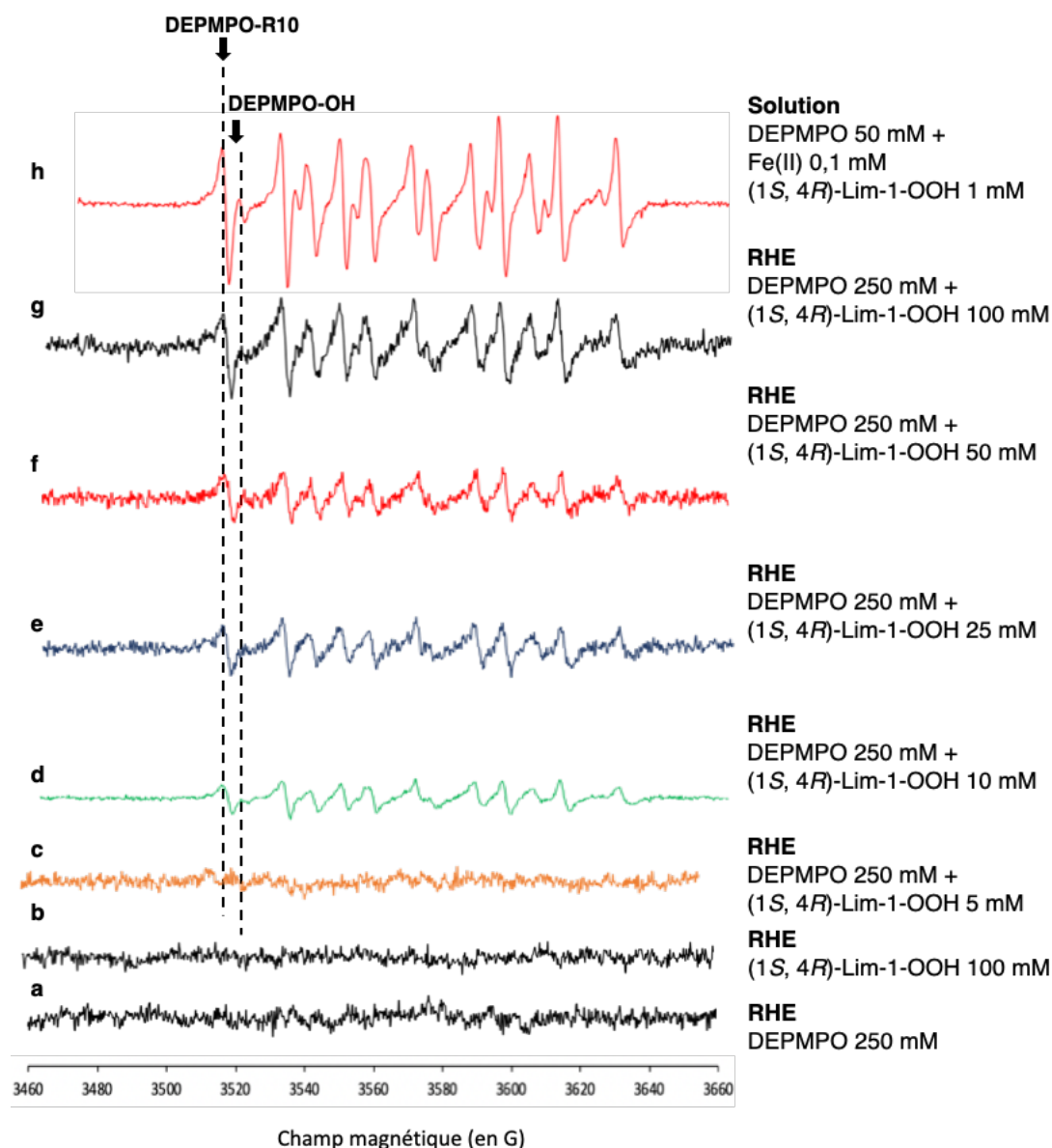


Figure 18 : Spectres RPE sur RHE obtenus : (a) contrôle RHE-**DEPMPO** 250 mM ; (b) contrôle RHE-(1S, 4R)-Lim-1-OOH 100 mM ; (c) spectre RHE après incubation de **DEPMPO** 250 mM suivie de l'addition (1S, 4R)-Lim-1-OOH 5 mM ; (d) spectre RHE après incubation de **DEPMPO** 250 mM suivie de l'addition (1S, 4R)-Lim-1-OOH 10 mM ; (e) spectre RHE après incubation de **DEPMPO** 250 mM suivie de l'addition (1S, 4R)-Lim-1-OOH 25 mM ; (f) spectre RHE après incubation de **DEPMPO** 250 mM suivie de l'addition (1S, 4R)-Lim-1-OOH 50 mM ; (g) spectre RHE après incubation de **DEPMPO** 250 mM suivie de l'addition (1S, 4R)-Lim-1-OOH 100 mM ; (h) spectre en solution **DEPMPO** 50 mM/(1S, 4R)-Lim-1-OOH 1 mM/Fe(II) 0,1 mM.

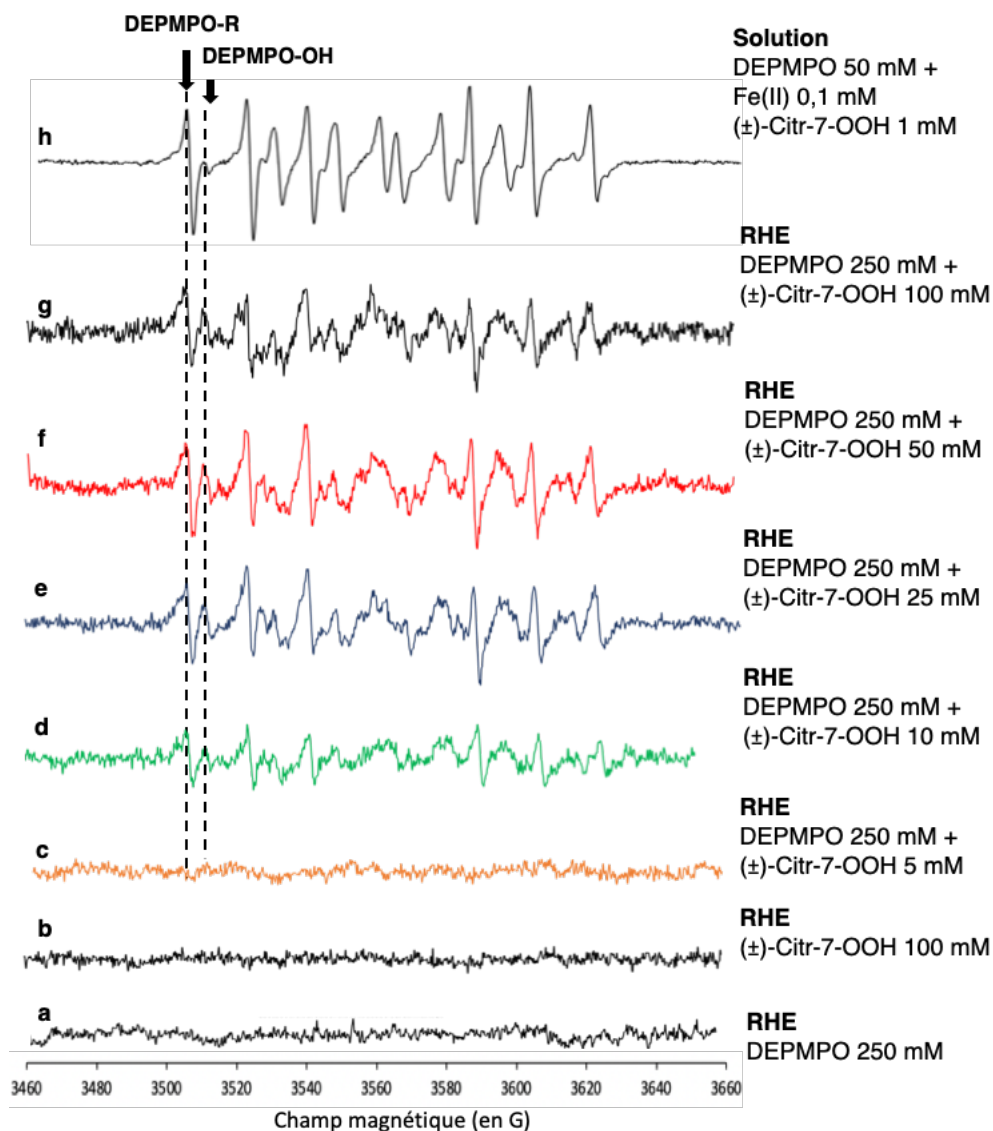
Annexe 19. Étude du piégeage de radicaux issus du (\pm)-Citr-7-OOH sur les RHE avec du DEPMPPO 250 mM


Figure 19 : Spectres RPE sur RHE obtenus : (a) contrôle RHE-DEPMPPO 250 mM ; (b) contrôle RHE-(\pm)-Citr-7-OOH 100 mM ; (c) spectre RHE après incubation de DEPMPPO 250 mM suivie de l'addition (\pm)-Citr-7-OOH 5 mM ; (d) spectre RHE après incubation de DEPMPPO 250 mM suivie de l'addition (\pm)-Citr-7-OOH 10 mM ; (e) spectre RHE après incubation de DEPMPPO 250 mM suivie de l'addition (\pm)-Citr-7-OOH 25 mM ; (f) spectre RHE après incubation de DEPMPPO 250 mM suivie de l'addition (\pm)-Citr-7-OOH 50 mM ; (g) spectre RHE après incubation de DEPMPPO 250 mM suivie de l'addition (\pm)-Citr-7-OOH 100 mM ; (h) spectre en solution DEPMPPO 50 mM/(\pm)-Citr-7-OOH 1 mM/Fe(II) 0,1 mM.

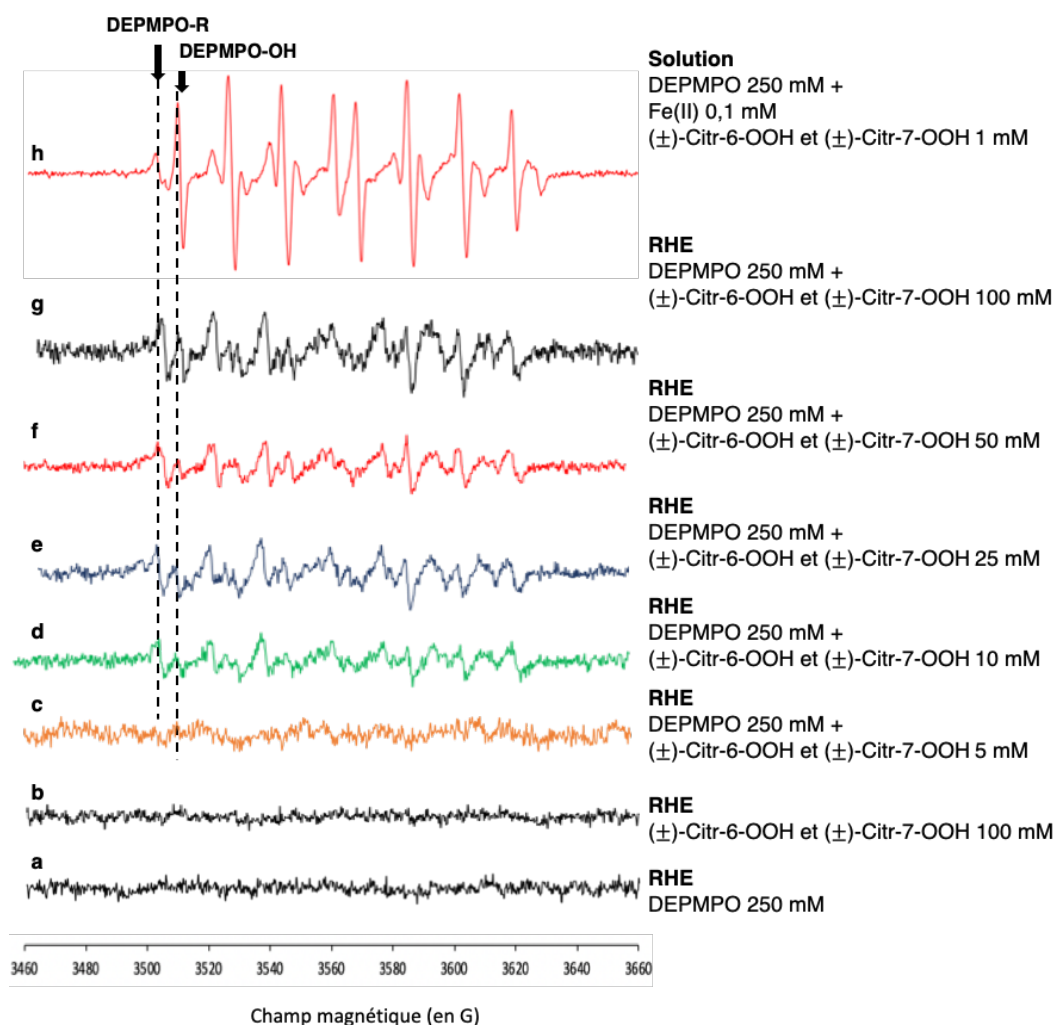
Annexe 20. Étude du piégeage du mélange (±)-Citr-6-OOH et (±)-Citr-7-OOH sur les RHE avec du **DEPMPO** 250 mM


Figure 20 : Spectres RPE sur RHE obtenus : (a) contrôle RHE-DEPMPO 250 mM ; (b) contrôle RHE-(±)-Citr-6-OOH et (±)-Citr-7-OOH 100 mM ; (c) spectre RHE après incubation de **DEPMPO** 250 mM suivie de l'addition (±)-Citr-6-OOH et (±)-Citr-7-OOH 5 mM ; (d) spectre RHE après incubation de **DEPMPO** 250 mM suivie de l'addition (±)-Citr-6-OOH et (±)-Citr-7-OOH 10 mM ; (e) spectre RHE après incubation de **DEPMPO** 250 mM suivie de l'addition (±)-Citr-6-OOH et (±)-Citr-7-OOH 25 mM ; (f) spectre RHE après incubation de **DEPMPO** 250 mM suivie de l'addition (±)-Citr-6-OOH et (±)-Citr-7-OOH 50 mM ; (g) spectre RHE après incubation de **DEPMPO** 250 mM suivie de l'addition (±)-Citr-6-OOH et (±)-Citr-7-OOH 100 mM ; (h) spectre en solution **DEPMPO** 50 mM/(±)-Citr-6-OOH et (±)-Citr-7-OOH 1 mM/Fe(II) 0,1 mM.

Partie expérimentale

Chapitre 3

1. Materials and methods

1.1. Studies in solution

1.1.1. Chemicals and reagents

Spin-traps α -phenyl-*N*-*tert*-butyl nitron (PBN) (98%) and 5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide (DMPO) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and used as received. 5-Diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline *N*-oxide (DEPMPO) and 5-(diisopropoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DIPPMPO) were synthesized as reported in the literature.

HEPES ($\geq 99.5\%$), ferrous sulfate heptahydrate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) and acetonitrile (99.8%) were acquired from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), and sodium phosphates monobasic NaH_2PO_4 and dibasic Na_2HPO_4 from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Aqueous solutions were prepared with deionized water.

2- (^{13}C) Acetylchloride and (^{13}C) methyl iodide were purchased from Euriso-Top (Saint-Aubin, France). All other reagents and solvents were purchased from Sigma-Aldrich or Fisher Scientific (Illkirch-Graffenstaden, France) and were used as received.

1.1.2. Buffer solutions

Phosphate buffer solution PB (10 mM, pH 7.4) was prepared with 41.5 mL Na_2HPO_4 (20 mM), 9.5 mL NaH_2PO_4 (20 mM), then completed with deionized water up to 100 mL.

HEPES buffer (10 mM, pH 6.8) was prepared with 1.19 g HEPES in 400 mL deionized water, 4 g NaCl and 0.1 g KCl. To attain pH 6.8, NaOH pellets were added. If the pH went too high, it was lowered back by carefully adding HCl until the pH remained stable to 6.8. Deionized water was added for a final volume of 500 mL.

1.1.3. EPR equipment

EPR spectra were recorded on an EPR X-band spectrometer (ESP300E, Bruker Biospin GmbH, Germany) equipped with a standard TE102 rectangular resonator (Bruker Biospin GmbH, Germany). The g calibration was performed using Bruker standard (strong pitch) with known isotropic g factor of 2.0028. The principal experimental parameters values were: microwave power 5 mW, modulation amplitude 1 G and resulting sweep time of ca. 164 s for a single scan. Spectra were recorded at room temperature ($295\text{ K} \pm 1\text{ K}$). All experimental EPR spectra were analyzed by means of computer simulation using labmade scripts based on Easyspin toolbox under Matlab (Mathworks) environment.

1.1.4. General procedure: in solution (presented here for ascaridole (Asc) and valid for all target compounds)

Stock solutions were prepared for **Asc** (10 mM, HEPES/CH₃CN 9:1), spin trap (100 mM in HEPES) and FeSO₄·7H₂O (10 mM in HEPES). 25 µL of spin-trap solution were mixed with FeSO₄·7H₂O (i.e. 0.5 µL for a final concentration in the reaction mixture of 0.1 mM), 5 µL **Asc** solution added and the final volume completed to 50 µL. This way, final concentrations in the reaction mixture were 50 mM spin trap, 1 mM of target compound and 0.1 mM Fe(II). The reaction mixture was subjected to stirring, further introduced into an EPR quartz capillary tube (20 µL), sealed on both ends and EPR spectra registered.

1.2. Reconstructed human epidermis studies (RHE)

1.2.1. Chemicals and reagents

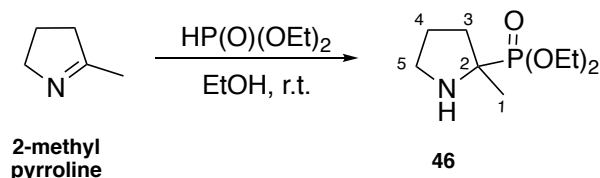
EpiSkin™ (Lyon, France) is an *ex vivo* reconstructed human epidermis (RHE) from normal human keratinocytes cultured for 13 days on a collagen matrix at the air-liquid interface. The small 0.38 cm² format was chosen for the studies. Immediately after arrival in the laboratory, the RHE were removed from the agarose-nutrient solution in the shipping multiwell plate under a sterile airflow. They were immediately placed in a plate in which each well was previously filled with 2 mL EpiSkin™ maintenance or growth medium at room temperature. Samples were placed in the incubator at 37 °C, 5 % CO₂ and saturated humidity at least 24 h before incubation.

1.2.2. General procedure: topical application to the RHE (presented here for ascaridole (Asc) and valid for all target compounds).

The RHE were first of all pre-treated with DEPMPO in dimethylsulfoxide/HEPES 1:1 (250 mM, 20 µL) and incubated during 15 min (37 °C, 5 % CO₂). After this time, pre-treated RHE were placed in an EPR tissue cell equipped with a silica window (Willmad, #ER162TC-Q) and **Asc** (100 mM, 50 mM, 25 mM, 10 mM or 5 mM in acetone, 20 µL) was topically applied to the epidermis taking care to ensure that the solution was only applied to it. EPR spectra were then recorded with the previously described EPR equipment. In here, the principal experimental parameters values were: microwave power 5 mW, modulation amplitude 1 G and resulting sweep time of ca. 328 s for a single scan. Up to 10 scans were accumulated to improve the signal-to-noise ratio.

2. Synthesis of 5-diethoxy-phosphoryl-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide (DEPMPO)

Diethyl-(2-methyl-2-pyrrolidinyl)phosphonate (46)



Diethylphosphite (98 %, 31.2 mL, 241.2 mmol, 1.2 eq) was slowly added to a solution of 2-methylpyrroline (95 %, 20.0 mL, 201 mmol, 1.0 eq) in ethanol (60 mL) in a round bottom flask under an argon atmosphere. The reaction mixture was stirred for 7 days at room temperature. Then the solvent was evaporated under reduced pressure to give a brown oil. A solution of hydrochloric acid (10 % in water, 200 mL) was added and the solution was washed with dichloromethane (3 × 80 mL). The aqueous phase was basified with a saturated solution of sodium carbonate until pH 9. The aqueous phase was extracted with chloroform (3 × 100 mL). Combined organic phases were dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give diethyl-(2-methyl-2-pyrrolidinyl)phosphonate (**46**) as a brown oil (36.3 g, 164.1 mmol, 81 %).

Formula: C₉H₂₀NO₃P

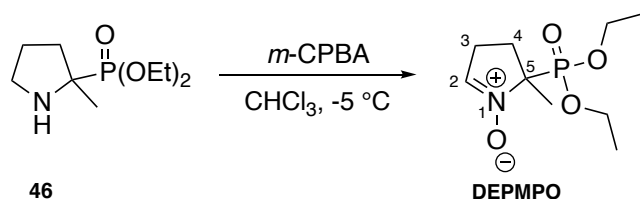
Molar mass: 221.24 g.mol⁻¹

CAS number: 157230-68-7

TLC: R_f = 0.6 (dichloromethane/ethanol 9:1); Rev: PMA/Ce

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.27 (td, 2 × 3H, ³J_{H-H} = 6.9 Hz, ⁴J_{H-P} = 1.5 Hz, 2 × OCH₂CH₃), 1.30 (d, 3H, ³J_{H1-P} = 15.8 Hz, **H-1**), 1.85-1.53 (m, 2 × 2H, **H-4** and **H-3**), 2.21-2.12 (m, 1H, -NH), 2.96-2.91 (m, 1H, **H-5**), 3.04-2.99 (m, 1H, **H-5**), 4.14-4.08 (m, 2 × 2H, 2 × -OCH₂CH₃)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 16.6 (d, ³J_{C-P} = 6.25 Hz, 2 × -OCH₂CH₃), 24.3 (d, ²J_{C1-P} = 6.25 Hz, **C-1**), 25.8 (d, ³J_{C4-P} = 5.0 Hz, **C-4**), 34.6 (d, ²J_{C3-P} = 3.75 Hz, **C-3**), 47.2 (d, ³J_{C5-P} = 6.25 Hz, **C-5**), 59.4 (d, ¹J_{C2-P} = 163.75 Hz, **C-2**), 62.2 (d, ²J_{C-P} = 4.4 Hz, -OCH₂CH₃), 62.4 (d, ²J_{C-P} = 4.4 Hz, -OCH₂CH₃)

5-Diethoxy-phosphoryl-5-methyl-1-pyrroline-*N*-oxyde (DEPMPO)

Diethyl-(2-methyl-2-pyrrolidinyl)phosphonate (**46**) (15.0 g, 67.8 mmol, 1.0 eq) was dissolved in chloroform (150 mL). The temperature of the solution was maintained under -5°C . A suspension of 3-chloroperbenzoic acid (77 %, 31.0 g, 135 mmol, 2 eq) in chloroform was slowly added. The green solution became milky. A saturated solution of sodium carbonate (130 mL) was added and the solution was vigorously stirred. After 45 min, a clear green color appeared. Organic phases were washed with a sodium chloride saturated solution (150 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel chromatography (dichloromethane/ethanol 9:1) and 5-diethoxy-phosphoryl-5-methyl-1-pyrroline-*N*-oxyde (**DEPMPO**) was obtained as an orange oil (2.89 g, 12.3 mmol, 18 %).

Formula: $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{NO}_4\text{P}$

Molar mass: $235.22 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

CAS number: 157230-67-6

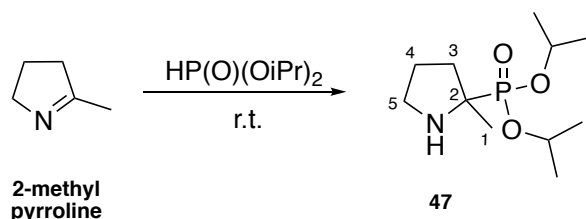
TLC: $R_f = 0.3$ (dichloromethane/ethanol 9:1); Rev: PMA/Ce

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.29 (t, $2 \times 3\text{H}$, $^3J_{\text{H-H}} = 6.9 \text{ Hz}$, $2 \times -\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 1.63 (d, 3H , $^3J_{\text{H-P}} = 14.6 \text{ Hz}$, $-\text{CH}_3$), 1.99-2.09 (m, 1H, **H-4**), 2.49-2.57 (m, 1H, **H-4**), 2.69-2.76 (m, 1H, **H-3**), 2.77-2.84 (m, 1H, **H-3**), 4.12-4.17 (m, 2H , $2 \times -\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 4.17-4.22 (m, 1H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 4.23-4.30 (m, 1H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 6.86 (td, 1H, $^3J_{\text{H}_2\text{-H}_3} = 2.8 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{H}_2\text{-P}} = 2.8 \text{ Hz}$, **H-2**)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 16.5 (d, $^2J_{\text{P-C}} = 6.2 \text{ Hz}$, $2 \times -\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 20.9 (s, $-\text{CH}_3$), 25.9 (s, **C-3**), 31.1 (s, **C-4**), 62.9 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.5 \text{ Hz}$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 64.1 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.25 \text{ Hz}$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 75.8 (d, $^1J_{\text{C}_5\text{-P}} = 153.75 \text{ Hz}$, **C-5**), 134.9 (s, **C-2**)

3. Synthesis of 5-diethoxy-phosphoryl-5-methyl-1-pyrroline-*N*-oxyde (DIPPMPO)

Diisopropyl (2-methyl-2-pyrrolidinyl)phosphonate (**47**)



Diisopropylphosphite (98 %, 20 mL, 120.3 mmol, 1.0 eq) was slowly added to a solution of 2-methylpyrroline (95 %, 11.4 mL, 120.3 mmol, 1.0 eq) in a round bottom flask under an argon atmosphere. The reaction mixture was stirred in the dark for 5 days and then diisopropylphosphite (4 mL, 24.1 mmol, 0.2 eq) was added to complete the reaction. When 2-methylpyrroline was no longer detectable by TLC (after 10 days) the solvent was evaporated under reduced pressure to give a brown oil. A solution of hydrochloric acid (10 %, 100 mL) was then added and the solution was washed with dichloromethane (3 × 60 mL). The aqueous phase was basified with a saturated solution of sodium carbonate until pH 9 then extracted with chloroform (3 × 80 mL). Organic phases were dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to obtain diisopropyl(2-methyl-2-pyrrolidinyl)phosphonate (**47**) as a brown oil (22.3 g, 89.3 mmol, 74 %).

Formula: C₁₁H₂₄NO₃P

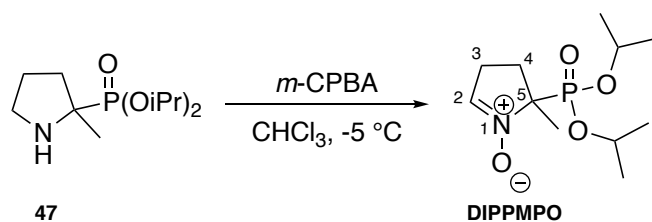
Molar mass: 249.29 g.mol⁻¹

CAS number: 176645-37-7

TLC: R_f = 0.57 (dichloromethane/ ethanol 9:1); Rev: PMA/Ce

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.26-1.33 (m, 15H, 2 × -CH(CH₃)₂ and **H-1**), 1.49-1.91 (m, 4H, **H-4** and **H-3**), 2.09-2.26 (m, 1H, -NH), 2.93-3.08 (m, 2H, **H-5**), 4.66-4.81 (m, 2H, 2 × -CH(CH₃)₂)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 24.0 (d, ²J_{C1-P} = 6.2 Hz, **C-1**), 24.1, 24.2, 24.4 and 24.5 (4 × -CH(CH₃)₂), 25.8 (d, ²J_{C3-P} = 5.00 Hz, **C-3**), 34.6 (d, ³J_{C4-P} = 2.5 Hz, **C-4**), 47.2 (d, ³J_{C5-P} = 7.55 Hz, **C-5**), 59.2 (d, ¹J_{C2-P} = 164.0, **C-2**), 70.3 (d, ²J_{C-P} = 7.55 Hz, -CH(CH₃)₂), 70.5 (d, ²J_{C-P} = 7.53 Hz, -CH(CH₃)₂)

5-Diethoxy-phosphoryl-5-methyl-1-pyrroline-N-oxyde (DIPPMPO)

Diisopropyl(2-methyl-2-pyrrolidinyl)phosphonate (**47**) (10.0 g, 40.1 mmol, 1.0 eq) was dissolved in chloroform (100 mL). The temperature of the solution was maintained under $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$. A suspension of 3-chloroperbenzoic acid (77 %, 13.8 g, 79.9 mmol, 2.0 eq) in chloroform was slowly added. The green solution became milky. A saturated solution of sodium carbonate (90 mL) was added and the solution was vigorously stirred. After 45 min, a clear green color appeared. The organic phase was washed with a sodium chloride solution (100 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel chromatography (dichloromethane/ethanol 9:1) and 5-diethoxy-phosphoryl-5-methyl-1-pyrroline-N-oxyde (**DIPPMPO**) was obtained as an orange oil (4.89 g, 18.6 mmol, 46 %).

Formula: $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{NO}_4\text{P}$

Molar mass: 263.27 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

CAS number: 527704-58-1

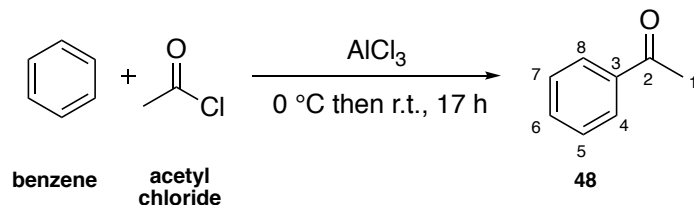
TLC: $R_f = 0.45$ (dichloromethane/ethanol 9:1); Rev: PMA/Ce

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.33-1.37 (m, 12H, $2 \times -\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.66 (d, 3H, $^3J_{\text{P-H}} = 14.75\text{ Hz}$, $-\text{CH}_3$), 2.02-2.11 (m, 1H, **H-4**), 2.51-2.60 (m, 1H, **H-4**), 2.73-2.86 (m, 2H, **H-3**), 4.78 (hept, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 6.4\text{ Hz}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4.87 (hept, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 6.2\text{ Hz}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 6.88-6.99 (m, 1H, **H-2**)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 21.03 ($-\text{CH}_3$), 23.7 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 4.11\text{ Hz}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 24.0 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 3.85$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 24.2 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 3.7\text{ Hz}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 24.5 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 3.93\text{ Hz}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 25.8 (d, $^2J_{\text{C4-P}} = 6.25\text{ Hz}$, **C-4**), 31.2 (**C-3**), 71.6 (d, $^2J_{\text{P-C}} = 7.26\text{ Hz}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 72.8 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.4\text{ Hz}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 75.2 (d, $^1J_{\text{C5-P}} = 150.3\text{ Hz}$, **C-5**), 134.7 (d, $^3J_{\text{C2-P}} = 8.5\text{ Hz}$, **C-2**)

4. Synthesis of cumene hydroperoxide (Cum-OOH)

Acetophenone (48)



To a suspension of aluminium chloride (1.18 g, 8.8 mmol, 1.4 eq) in anhydrous benzene (3 mL) at 0 °C, acetyl chloride was added dropwise (0.45 mL, 6.31 mmol, 1.0 eq) under an argon atmosphere. Once the addition completed, the mixture was stirred for 17 h at room temperature. After that time, the mixture was placed into an ice bath and distilled water (3 mL) was added dropwise until it became white followed by addition of hypochloric acid 2 M (6 mL). The two phases were separated and the aqueous phase was extracted with diethyl ether (4 × 20 mL). The organic phases were combined, washed with brine (2 × 40 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to obtain acetophenone (48) as a yellow oil corresponding to (726.2 mg, 6.05 mmol, 95%).

Formula: C₈H₈O

Molar mass: 120.15 g.mol⁻¹

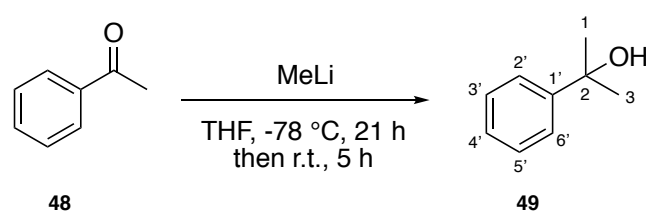
CAS number: 98-86-2

TLC: R_f = 0.56 (pentane/EtOAc 9:1); Rev: PMA/Ce

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2.61 (s, 3H, H-1), 7.44-7.50 (m, 2 H, H-5 and H-7), 7.54-7.59 (m, 1H, H-6), 7.95-7.98 (m, 2H, H-4 and H-8)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 26.7 (C-1), 128.4 (2C, C-5 and C-7), 128.6 (2C, C-4 and C-8), 133.2 (C-6), 137.1 (C-3), 198.3 (C-2)

2-Phenylpropan-2-ol (49)



In a two-necked round-bottom flask under an argon atmosphere, acetophenone (**48**) (995.30 mg, 8.28 mmol, 1 eq) was dissolved in 10 mL of anhydrous tetrahydrofuran at -78 °C. Methylithium (6.20 mL, 9.94 mmol, 1.6 M in Et₂O, 1.2 eq) was added drop by drop and the mixture was stirred at -78 °C for 21 h then at room temperature for 5 h. Ammonium chloride was added (15 mL) and the solution was extracted with diethyl ether (4 × 30 mL). Organic phases were combined, dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give an orange oil. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (pentane/EtOAc 9:1 then 5:5) to afford 2-phenylpropan-2-ol (**49**) as a yellow oil (634.9 mg, 4.66 mmol, 56 % yield).

Formula: C₉H₁₂O

Molar mass: 136.19 g.mol⁻¹

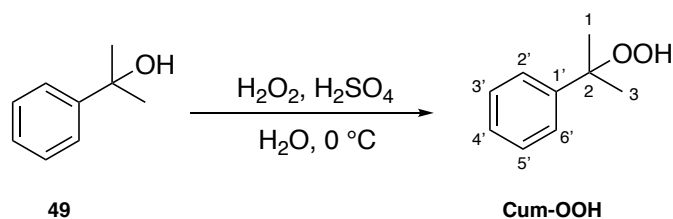
CAS number: 617-94-7

TLC: R_f = 0.5 (pentane/EtOAc 7:3); Rev: PMA/Ce

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.59 (s, 6H, **H-1** and **H-3**), 7.24-7.27 (m, 1H, **H-4'**), 7.33-7.37 (m, 2 H, **H-5'** and **H-3'**), 7.49-7.51 (m, 2 × 1H, **H-2'** and **H-6'**)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 31.9 (2C, **C-1** and **C-3**), 72.7 (**C-2**), 124.5 (2C, **C-6'** and **C-2'**), 126.8 (**C-4'**), 128.4 (2C, **C-5'** and **C-3'**), 149.2 (**C-1'**)

2-Hydroperoxypropan-2-yl-benzene (**Cum-OOH**)



To a solution of hydrogen peroxide (30 % in water, 30 mL) at 0 °C, one drop of concentrated sulfuric acid (98 %) was added. After 30 min stirring, 2-phenylpropan-2-ol (**49**) (634.90 mg, 4.66 mmol, 1 eq) was added and the reaction mixture was vigorously stirred at 0 °C during 4 h, and then extracted with ethyl acetate (3 × 30 mL). The organic layers were combined, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on neutralized silica gel (pentane/EtOAc 5:1 to 1:1) to obtain 2-hydroperoxypropan-2-yl-benzene (**Cum-OOH**) as an orange oil (203.2 mg, 1.33 mmol, 29 %).

Formula: C₉H₁₂O₂**Molar mass:** 152.19 g.mol⁻¹**CAS number:** 80-15-9**TLC:** R_f = 0.6 (pentane/EtOAc 8:2); Rev: PMA/Ce**¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm):** 1,62 (s, 6 H, **H-1** and **H-3**), 7.29-7.32 (m, 1H, **H-4'**), 7.38-7.41 (m, 2 H, **H-5'** and **H-3'**), 7.47-7.49 (m, 2 × 1H, **H-2'** and **H-6'**)**¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm):** 26.2 (2C, **C-1** and **C-3**), 84.2 (**C-2**), 125.5 (2C, **C-6'** and **C-2'**), 127.7 (**C-4**), 128.7 (2C, **C-5'** and **C-3'**), 144.7 (**C-1'**)

5. Synthesis of 1-(¹³C)cumene hydroperoxide (¹³C-Me-CumOOH)

1-(¹³C)acetophenone (**50**)

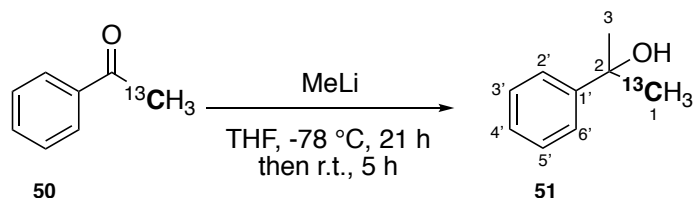


To a suspension of aluminium chloride (2.07 g, 15.5 mmol, 1.4 eq) in anhydrous benzene (6 mL) at 0°C, 2-(¹³C)acetyl chloride was added dropwise (0.8 mL, 11.07 mmol, 1.0 eq) under an argon atmosphere. Once the addition completed, the mixture was stirred for 17 h at room temperature. After that time, the mixture was placed into an ice bath and distilled water (6 mL) was added dropwise until it became white, followed by addition of a solution of hypochloric acid 2 M (12 mL). The two phases were separated and the aqueous phase was extracted with diethyl ether (4 × 40 mL). The organic phases were combined, washed with brine (2 × 40 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to obtain 1-(¹³C)acetophenone (**50**) as a yellow oil (1.04 g, 8.58 mmoles, 77 % yield).

Formula: C₇¹³C₂H₈O**Molar mass:** 121.14 g.mol⁻¹**CAS number:** 71777-36-1**TLC:** R_f = 0.56 (pentane/EtOAc 9:1); Rev: PMA/Ce**¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm):** 2.61 (d, 3H, ¹J_{H1-C1} = 127.6 Hz, **H-1**), 7.44-7.50 (m, 2H, **H-5** and **H-7**), 7.54-7.60 (m, 1H, **H-6**), 7.95-7.99 (m, 2H, **H-4** and **H-8**)

^{13}C NMR (125MHz, CDCl_3) δ (ppm): 26.8 (C-1), 128.4 (2C, C-5 and C-7), 128.7 (2C, C-4 and C-8), 133.2 (C-6), 137.1 (d, $^2J_{\text{C}3-\text{C}1} = 13.5$ Hz, C-3), 198.4 (d, $^1J_{\text{C}2-\text{C}1} = 42.5$ Hz, C-2)

1-(^{13}C)2-Phenylpropan-2-ol (51)



In a two-necked round-bottom flask under an argon atmosphere 1-(^{13}C)acetophenone (**50**) (450 mg, 3.71 mmol, 1 eq) was dissolved in 6 mL of anhydrous tetrahydrofuran at $-78\text{ }^\circ\text{C}$. Methyl lithium (2.8 mL, 4.46 mmol, 1.6 M in Et_2O , 1.2 eq) was added drop by drop and the mixture was stirred at $-78\text{ }^\circ\text{C}$ for 21 h then at room temperature for 5 h. Ammonium chloride was added (7 mL) and the solution was extracted with diethyl ether (4×20 mL). Organic phases were combined, dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give an orange oil. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (pentane/ EtOAc 9:1 then 5:5) to afford 1-(^{13}C)2-phenylpropan-2-ol (**51**) as a yellow oil (269.4 mg, 1.96 mmol, 53 % yield).

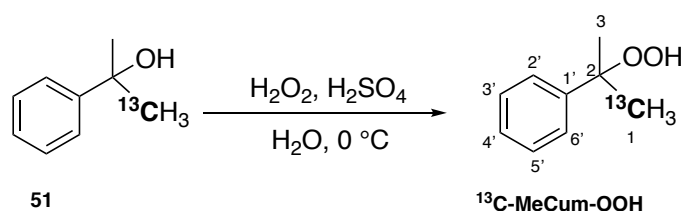
Formula: $\text{C}_8^{13}\text{CH}_{12}\text{O}$

Molar mass: $137.19\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

TLC: $R_f = 0.5$ (pentane/ EtOAc 7:3); Rev: PMA/Ce

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.59 (d, 3H, $^1J_{\text{H}1-\text{C}1} = 126.5$ Hz, H-1), 1.59 (d, 3H, $^3J_{\text{H}3-\text{C}1} = 4.1$ Hz, H-3), 7.24-7.27 (m, 1H, H-4'), 7.34-7.37 (m, 2H, H-3' and H-5'), 7.49-7.51 (m, 2H, H-2' and H-6')

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 31.9 (2C, C-1 and C-3), 72.7 (d, $^1J_{\text{C}2-\text{C}1} = 39.3$ Hz, C-2), 124.5 (2C, C-2' and C-6'), 126.8 (C-4'), 128.4 (2C, C-3' and C-5'), 149.2 (C-1')

1-(¹³C)Cumene hydroperoxide (¹³C-MeCum-OOH)

To an aqueous solution of hydrogen peroxide (30 % in water, 12.7 mL) at 0°C, one drop of concentrated sulfuric acid (98 %) was added. After 30 min stirring, 1-(¹³C)2-phenylpropan-2-ol (**51**) (268.1 mg, 1.95 mmol, 1 eq) was added and the reaction mixture was vigorously stirred at 0°C during 4 h, followed by extraction with ethyl acetate (3 × 10 mL). The organic layers were combined, dried over magnesium sulfate, filtered, and concentrated under reduce pressure. The crude product was purified by column chromatography on neutralized silica gel (pentane/EtOAc 5:1 then 1:1) to obtain 1-(¹³C)cumene hydroperoxide (¹³C-MeCum-OOH) as an orange oil (136.0 mg, 0.88 mmol, 32 % yield).

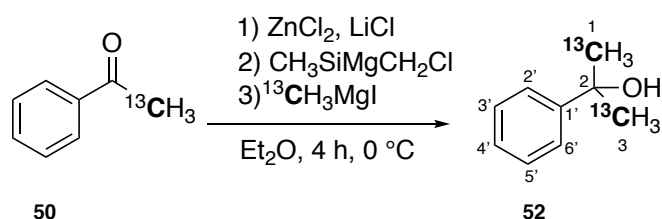
Formula: C₈¹³CH₁₂O₂

Molar mass: 153.19 g.mol⁻¹

TLC: R_f = 0.6 (pentane/EtOAc 8:2); Rev: PMA/Ce

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.62 (d, 3H, ³J_{H1-C1} = 4.4 Hz, **H-1**), 1.62 (d, 3H, ¹J_{H3-C1} = 127.7 Hz, **H-3**), 7.29-7.34 (m, 2 × 1H, **H-3'** and **H-5'**), 7.38-7.41 (m, 1H, **H-4'**), 7.47-7.49 (m, 2 × 1H, **H-2'** and **H-6'**)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 26.2 (2C, **C-1** and **C-3**), 84.1 (d, ¹J_{C2-C1} = 39.9 Hz, **C-2**), 125.5 (2C, **C-2'** and **C-6'**), 127.6 (**C-4'**), 128.7 (2C, **C-3'** and **C-5'**), 144.7 (**C-1'**)

6. Synthesis of 1,3-(¹³C)cumene hydroperoxide ((¹³C-Me)₂CumOOH)1,3-(¹³C)2-Phenylpropan-2-ol (**52**)

Previous synthesis of (¹³C)methylmagnesium iodide: In a 50 mL two-necked round-bottom flask under argon atmosphere, magnesium (305 mg, 12.53 mmol, 1.2 eq) was flame-dried

before to add a spatula tip of iodine and anhydrous diethyl ether (10 mL). (^{13}C)Methyl iodide (0.65 mL, 10.44 mmol, 1 eq) was then added to the reaction mixture heated slightly with a hairdryer to initiate the reaction. Diethyl ether was added (10 mL) and the reaction heated again slightly. The reaction mixture was then stirred at room temperature during 24 h. A solution of (^{13}C)methylmagnesium iodide 0.5 M in diethyl ether was this way obtained.

In a two-necked round-bottom flask under an argon atmosphere, zinc chloride (79.1 mg, 0.58 mmol, 0.2 eq) was placed and dried under reduced pressure. Lithium chloride (295.0 mg, 6.94 mmol, 2.4 eq) was added and the flask was again dried under reduced pressure. To the mixture, (trimethylsilyl)methylmagnesium chloride (2.30 mL, 1.2 mmol, 0.4 eq) was added dropwise at room temperature and the reaction was stirred for 15 min. (^{13}C)Methylmagnesium iodide (10 mL, 4.9 mmol, 0.5 M in diethyl ether, 1.7 eq) was then added dropwise and the reaction stirred for 45 min and then cooled down to 0°C . 1- ^{13}C Acetophenone (**50**) (350 mg, 2.89 mmol, 1 eq) was added during 1 h with the use of a syringe and the reaction was stirred for about 3 h at 0°C . After this time, the reaction mixture was quenched with ammonium chloride (10 mL), extracted with ethyl acetate (3×10 mL) and washed with brine (10 mL). The organic phases were combined and dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to obtain an orange oil. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (pentane/EtOAc 12:1) and 1,3- ^{13}C 2-phenylpropan-2-ol (**52**) was obtained as a yellow oil (303.7 mg, 2.19 mmol, 76 % yield).

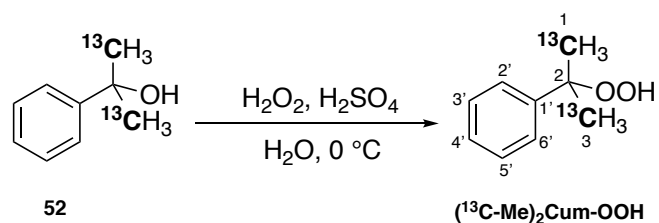
Formula: $\text{C}_7^{13}\text{C}_2\text{H}_{12}\text{O}$

Molar mass: $138.18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

TLC: $R_f = 0.4$ (pentane/EtOAc 9:1); Rev: PMA/Ce

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.59 (dd, 3H, $^1J_{\text{H}1/3-\text{C}3/1} = 121.3 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H}1/3-\text{C}3/1} = 1.7 \text{ Hz}$, **H-1** or **H-3**), 1.59 (d, 3H, $^1J_{\text{H}1/3-\text{C}3/1} = 130.7 \text{ Hz}$, **H-1** or **H-3**), 7.25-7.28 (m, 1H, **H-4'**), 7.34-7.37 (m, 2H, **H-3'** and **H-5'**), 7.50-7.51 (m, 2H, **H-2'** and **H-6'**)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 31.8 (2C, **C-1** and **C-3**), 74.0 (t, $^1J_{\text{C}2-\text{C}1/3} = 38.9 \text{ Hz}$, **C-2**), 124.5 (2C, **C-2'** and **C-6'**), 126.8 (**C-4'**), 128.3 (2C, **C-3'** and **C-5'**), 149.2 (**C-1'**)

1,3-(¹³C)Cumene hydroperoxide((¹³C-Me)₂Cum-OOH)

To an aqueous solution of hydrogen peroxide (30 % in water, 7.5 mL) was added at 0°C one drop of concentrated sulfuric acid (98%). After 30 min, 1,3-(¹³C)2-phenylpropan-2-ol (**52**) (155.9 mg, 1.13 mmol, 1 eq) was added and the reaction mixture was vigorously stirred at 0°C during 4 h, followed by extraction with ethyl acetate (3 × 10 mL). The organic layers were combined, dried over magnesium sulfate, filtered, and concentrated under reduce pressure. The crude product was purified by column chromatography on neutralized silica gel (pentane/EtOAc 5:1 and 1:1) to obtain 1,3-(¹³C)cumene hydroperoxide (**(¹³C-Me)₂Cum-OOH**) as an orange oil (36.7 mg, 0.24 mmol, 21 % yield).

Formula: C₇¹³C₂H₁₂O₂

Molar mass: 154.18 g.mol⁻¹

TLC: R_f = 0.6 (pentane/EtOAc 8:2); Rev: PMA/Ce

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.62 (d, 3H, ¹J_{H1/3-C3/1} = 123.8 Hz, **H-1** or **H-3**), 1.62 (d, 3H, ¹J_{H1/3-C3/1} = 132.1 Hz, **H-1** or **H-3**), 7.29-7.32 (m, 1H, **H-4'**), 7.37-7.41 (m, 2H, **H-3'** and **H-5'**), 7.47-7.49 (m, 2H, **H-2'** and **H-6'**)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 26.2 (2C, **C-1** and **C-3**), 84.1 (t, ¹J_{C2-C1/3} = 39,9 Hz, **C-2**), 125.5 (2C, **C-2'** and **C-6'**), 127.6 (**C-4'**), 128.7 (2C, **C-3'** and **C-5'**), 144.7 (**C-1'**)

Références bibliographiques

Chapitre 3

1. Kao, D.; Chaintreau, A.; Lepoittevin, J.-P.; Giménez-Arnau, E. Synthesis of allylic hydroperoxides and EPR spin-trapping studies on the formation of radicals in iron systems as potential initiators of the sensitizing pathway. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 6188-6200.
2. Johansson, S.; Giménez-Arnau, E.; Grøtli, M.; Karlberg, A.-T.; Börje, A. Carbon- and oxygen-centered radicals are equally important haptens of allylic hydroperoxides in allergic contact dermatitis. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 1536-1547.
3. Giménez-Arnau, E.; Haberkorn, L.; Grossi, L.; Lepoittevin, J.-P. Identification of radical species derived from allergenic 15-hydroperoxyabiatic acid and insights into the behaviour of cyclic tertiary allylic hydroperoxides in Fe(II)/Fe(III) systems. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 5680-5691.
4. Mutterer, V.; Giménez-Arnau, E.; Karlberg, A.-T.; Lepoittevin, J.-P. Synthesis and allergenic potential of a 15-hydroperoxyabiatic acid-like model: trapping of radical intermediates. *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, *13*, 1028-1036.
5. Gerlach, W.; Stern, O. The experimental proof of magnetic moment of silver atoms. *Z. Phys.* **1921**, *8*, 110-111.
6. Rabi, I. I.; Zacharias, J. R.; Millman, S.; Kusch, P. A new method of measuring nuclear magnetic moment. *Phys. Rev.* **1938**, *53*, 318.
7. Breit, G.; Rabi, I. I. Measurement of nuclear spin. *Phys. Rev.* **1931**, *38*, 2082-2083.
8. <https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1944/rabi/facts/>
9. Zavoisky, E. K. Paramagnetic relaxation of liquid solutions for perpendicular fields. *J. Phys.* **1945**, *28*, 170-173.
10. Loubser, J. H. N.; Wyk, J. A. van. Electron Spin Resonance in the Study of Diamond. *Rep. Prog. Phys.* **1978**, *41*, 1201-1248.
11. Kuppusamy, P. EPR Spectroscopy in Biology and Medicine. *Antioxid. Redox Signal.* **2004**, *6*, 583-585.
12. Gallez, B.; Baudalet, C.; Jordan, B. F. Assessment of tumor oxygenation by electron paramagnetic resonance: principles and applications. *NMR in Biomed.* **2004**, *17*, 240-262.
13. Yoshimura, T.; Yokoyama, H.; Fujii, S.; Takayama, F.; Oikawa, K.; Kamada, H. *In vivo* EPR detection and imaging of endogenous nitric oxide in lipopolysaccharide-treated mice. *Nat. Biotech.* **1996**, *14*, 992-994.
14. <https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1902/zeeman/facts/>
15. Jiang, J.; Weber, R. T. EPR Spectrometer Users Manual Basic Operations. EPR Division Bruker BioSpin Corporation Billerica, MA USA.
16. Bertrand, P. Le phénomène de résonance paramagnétique électronique. Dans : la spectroscopie de résonance paramagnétique électronique : fondements. EDP Sciences., Les Ulis, France **2010**, 3-26.
17. W.R. Hagen, in *Biomolecular EPR spectroscopy*, CRC press, Boca Raton, **2009**.

18. Carey, F. A.; Sundberg, R. J. Les réactions radicalaires. Dans : Chimie organique avancée. Tome 1. Structure moléculaire et mécanismes réactionnels. De Boeck & Larcier S.A., Paris, France, Bruxelles, Belgique, **1996**, 651-727.
19. Lauricella, R.; Tuccio, B. Détection et caractérisation de radicaux libres après piégeage de spins. Dans : La spectroscopie de résonance paramagnétique électronique. Applications. EDP sciences., Les Ulis, France, **2014**, 49-78.
20. Janzen, E. G. Spin trapping. *Acc. Chem. Res.* **1971**, *4*, 31-40.
21. Buettner, G. R. Spin-trapping: ESR parameters of spin adducts. *Free Radic. Biol. Med.* **1987**, *3*, 259-303.
22. Tebben, L.; Studer, A. Nitroxides: applications in synthesis and in polymer chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5034-5068.
23. Karoui, H.; Chalier, F.; Finet, J. -P.; Tordo, P. DEPMPO: an efficient tool for the coupled ESR-spin trapping of alkylperoxyl radicals in water. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 2473-2480.
24. Frejaville, C.; Karoui, H.; Tuccio, B.; Le Moigne, F.; Culcasi, M.; Pietri, S.; Lauricella, R.; Tordo, P. 5-(Diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline *N*-oxide: A new efficient phosphorylated nitron for the *in vitro* and *in vivo* spin trapping of oxygen-centered radicals. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 258-265.
25. <https://tools.niehs.nih.gov/stdb/index.cfm>
26. Stoll, S.; Schweiger, A. EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. *J. Magn. Reson.* **2006**, *178*, 42-55.
27. Triquigneaux, M.; Charles, L.; André-Barrès, C.; Tuccio, B. Ene-reaction between a dienolic compound and 2-methyl-2-nitrosopropane: an EPR-MS study. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 6220-6223.
28. Forrester, A. R.; Hepburn, S. P. Spin traps. A cautionary note. *J. Chem. Soc. C Org.* **1971**, 701-703.
29. Ebersson, L. Inverted Spin Trapping. Reactions between the radical cation of α -phenyl-*N*-*tert*-butylnitron and Ionic and Neutral Nucleophiles. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1992**, *10*, 1807-1813.
30. Scott, M. J.; Billiar, T. R.; Stoyanovsky, D. A. *N*-*Tert*-Butylmethanimine *N*-Oxide is an efficient spin-trapping probe for EPR analysis of glutathione thyl radical. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1-11.
31. Fenton, H. J. H. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc. Trans.* **1894**, *65*, 899-910.
32. Edmonds, P. D.; Sancier, K. M. Evidence for free radical production by ultrasonic cavitation in biological media. *Ultrasound Med. Biol.* **1983**, *9*, 635-639.
33. Liu, K. J.; Miyake, M.; Panz, T.; Swartz, H. Evaluation of DEPMPO as a spin trapping agent in biological systems. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 714-721.

34. Chalièr, F.; Tordo, P. 5-Diisopropoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline *N*-oxide, DIPPMPPO, a crystalline analog of the nitronè DEPMPPO: synthesis and spin trapping properties. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2002**, 2, 2110-2117.
35. Barbati, S.; Clément, J. L.; Olive, G.; Roubaud, V.; Tuccio, B.; Tordo, P. In Minisci F. Ed. *Free Radicals in Biology and Environment*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, **1997**, 39-47.
36. Rudeck, M.; Volk, T.; Sitte, N.; Grune, T. Ferritin oxidation *in vitro*: implication of iron release and degradation by the 20 S proteasome. *Life* **2000**, 49, 451-456.
37. Winterbourn, C. C. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol. Lett.* **1995**, 82, 969-974.
38. Pazos, M.; Andersen, M. L.; Skibsted, L. H. Amino acid and protein scavenging of radicals generated by iron/hydroperoxide system: an electron spin resonance spin trapping study. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 10215-10221.
39. Stolze, K.; Udilova, N.; Nohl, H. Spin trapping of lipid radicals with DEPMPPO- Derived spin traps: detection of superoxide, alkyl and alkoxy radicals in aqueous and lipid phase. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, 29, 1005-1014.
40. Sahli, F.; Silva e Sousa, M.; Vileno, B.; Lichter, J.; Lepoittevin, J.-P.; Blömeke, B.; Giménez-Arnau, E. Understanding the skin sensitization capacity of ascaridole: a combined study of chemical reactivity and activation of the innate immune system (dendritic cells) in the epidermal environment. *Arch. Toxicol.* **2019**, 93, 1337-1347.
41. Geroldinger, G.; Tonner, M.; Hettegger, H.; Bacher, M.; Monzote, L.; Walter, M.; Staniek, K.; Rosenau, T.; Gille, L. Mechanism of ascaridole activation in Leishmania. *Biochem. Pharmacol.* **2017**, 132, 48-62.
42. Mori, H. M.; Iwahashi, H. Detection and identification of 1-methylethyl and methyl radicals generated by irradiating tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil with visible light (436 nm) in the presence of flavin mononucleotide and ferrous ion. *Free Radic. Res.* **2013**, 47, 657-663.
43. Guo, Q.; Qian, S. Y.; Mason, R. P. Separation and identification of DMPO adducts of oxygen-centered radicals formed from organic hydroperoxides by HPLC-ESR, ESI-MS and MS/MS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, 14, 862-871.
44. 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.
45. Kuresepi, S. Alternative mechanisms in skin allergy processes: contribution of radical reactions from the molecule to the tissue. Doctorat de l'Université de Strasbourg, France **2018**.
46. Timmins, G. S.; Davies, M. J. Free radical formation in murine skin treated with tumour promoting organic peroxides. *Carcinogenesis* **1993**, 14, 1499-1503.
47. Kuresepi, S.; Vileno, B.; Turek, P.; Lepoittevin, J.-P.; Giménez-Arnau, E. Potential of EPR spin-trapping to investigate *in situ* free radicals generation from skin allergens in reconstructed human epidermis: cumene hydroperoxide as proof of concept. *Free Radic. Res.* **2018**, 52, 171-179.

48. Sahli, F.; Godard, A.; Vileno, B; Lepoittevin, J.-P.; Giménez-Arnau, E. Formation of methyl radicals derived from cumene hydroperoxide in reconstructed human epidermis: an EPR spin trapping confirmation by using ^{13}C -substitution. *Free. Radic. Res.* **2019**, *53*, 737-747.
49. Lepoittevin, J. -P.; Karlberg, A.-T. Interactions of allergenic hydroperoxides with proteins: a radical mechanism? *Chem. Res. Toxicol.* **1994**, *7*,130-133.
50. OECD. *Test No. 439: In vitro* skin irritation: Reconstructed human epidermis test method. OECD Guidelines for the testing of chemicals, Section 4, OECD Publishing **2015**.

Chapitre 4

**Mesure du potentiel de réduction des allergènes
étudiés par voltampérométrie cyclique**

Introduction

Ces molécules cibles, constituant des allergènes potentiels, peuvent être de puissants oxydants capables d'interférer avec l'équilibre redox des cellules. Leurs potentiels d'oxydo-réduction, jamais étudiés auparavant à notre connaissance, ont été mesurés par voltampérométrie cyclique en collaboration avec le Laboratoire Electrochimie et Chimie Physique du Corps Solide (LECPCS, Université de Strasbourg, CNRS UMR 7177).

D'un point de vue théorique, un potentiel est appliqué à une solution contenant le composé à tester et le courant résultant dû à la réaction de réduction est mesuré. Dès lors, l'enregistrement d'une courbe intensité-potential (I, E) à l'aide du mode « voltamétrie cyclique » peut permettre d'observer des signaux relatifs à la réduction et la ré-oxydation d'un composé à l'interface électrode - solution. Ces signaux se présentent sous la forme de pics (pics de réduction et de ré-oxydation) permettant la mesure du courant électrique échangé à l'interface durant la réduction ou la ré-oxydation d'une molécule.

Les premières études effectuées en présence d'une solution contenant du **Cum-OOH** dans un tampon phosphate et avec une électrode en carbone vitreux (marque Radiometer) n'ont pas été un succès. Aucun signal relatif à la réduction direct du **Cum-OOH** n'a été observé.

Un travail préalable sur l'électrode de carbone a donc été accompli. Celle-ci a été dans un premier temps modifiée à l'aide d'un catalyseur constitué de graphène réduit (rGO) avec un polyoxométallate du type Dawson $[P_2W_{18}O_{62}]^{6-}$ dans un premier temps photoréduit sous la forme $[P_2W_{18}O_{62}]^{12-}$ qui présente une couleur bleu sombre. L'ajout d'oxyde de graphène (GO) à la solution de $[P_2W_{18}O_{62}]^{12-}$ permet *via* une réaction d'oxydo-réduction l'obtention de $[P_2W_{18}O_{62}]^{6-}@rGO$. Cette association de $[P_2W_{18}O_{62}]^{6-}@rGO$ a servi pour la modification de l'électrode de carbone vitreux. Le dérivé polyoxométallate est un médiateur redox permettant un transfert d'électrons beaucoup plus rapide tandis que le graphène (rGO) permettant une bonne conduction électrique à l'interface. Du Nafion® a été ajouté afin de stabiliser et fixer la surface de dépôt. La conductivité reste importante malgré la présence de ce dernier.

L'emploi de l'électrode modifiée $[P_2W_{18}O_{62}]^{6-}@rGO/Nafion®$ avait fourni une réponse voltampérométrique pour l'étude électrochimie d'une solution de **Cum-OOH** où le courant de pic du signal observé est directement proportionnel à la concentration en **Cum-OOH** introduit dans la solution.

Dans le cadre de ce travail de thèse, les conditions expérimentales optimales ont été développées en présence de **Cum-OOH** avant d'être transposées à l'étude électrochimie des autres allergènes synthétisés au cours de ce travail.

Dans un premier temps, il s'agira d'effectuer un bref rappel sur le principe de la voltamétrie cyclique ainsi que les différents types d'électrodes utilisées en électrochimie. Nous introduirons également les différents catalyseurs susceptibles de favoriser les transferts électroniques lors des mesures de potentiel de réduction. Ensuite, les différentes conditions retenues pour mener à bien ces études seront détaillées avant de présenter et de discuter des résultats obtenus.

1. Principe de la voltampérométrie cyclique et les différents types d'électrode de carbone

1.1. Voltampérométrie cyclique

La voltampérométrie cyclique (VC) est une technique électrochimique très utilisée pour étudier les processus de réduction et d'oxydation des espèces moléculaires. La VC repose sur la mesure du courant I parcourant une cellule électrochimique et résultant d'un balayage linéaire en potentiel entre les limites E_{inf} et E_{sup} choisies par l'expérimentateur. Le balayage du potentiel a lieu dans un sens puis dans l'autre, conduisant à un cycle de mesure. Ainsi, plusieurs cycles consécutifs peuvent être exécutés, chacun étant représenté par un tracé du courant enregistré en fonction du potentiel appliqué (courbe (I,E)), appelé voltamogramme. Le courant mesuré est la somme de deux contributions à l'interface électrode/solution, en absence de régime de convection forcée (cas de l'électrode qui tourne) : le **courant capacitif** lié à l'existence de la double couche électrique, et le **courant faradique** associé aux processus d'oxydoréduction.

La voltampérométrie cyclique (VC) repose sur un principe de rampe de potentiel avec une inversion du sens de balayage de potentiel à une certaine valeur de potentiel imposée par l'expérimentateur. Ceci entraîne un balayage cyclique et plusieurs cycles sont susceptibles d'être réalisés. Dans la plupart des cas, la VC est employée en régime de diffusion naturelle (dit pure) c'est à dire en absence d'agitation de la solution ou de mouvement de l'électrode.

Deux conventions sont couramment utilisées pour la mesure de potentiel par VC : la convention US (américaine) et la convention IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Les données visuelles rapportées dans les deux conventions semblent faire l'objet d'une rotation de 180 °C (*Figure 1*).

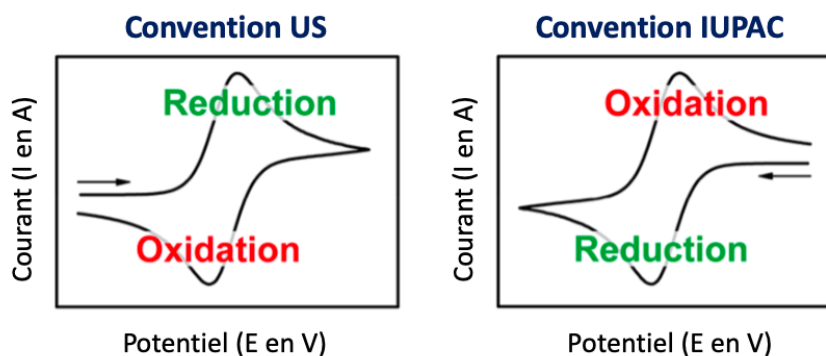


Figure 1 : Allure de la voltammétrie cyclique suivant les conventions (a) US ; et (b) IUPAC.

Lors de l'enregistrement d'un voltamogramme, c'est tout d'abord le courant de réduction puis d'oxydation du système d'étude qui est mesuré. Dans le cadre de nos études, la convention IUPAC a été adoptée.

L'allure générale du potentiel et du courant à l'issue d'une expérience de voltammétrie cyclique du couple le ferrocénium (Fc^+) et le ferrocène (Fc) est présentée en Figure 2.

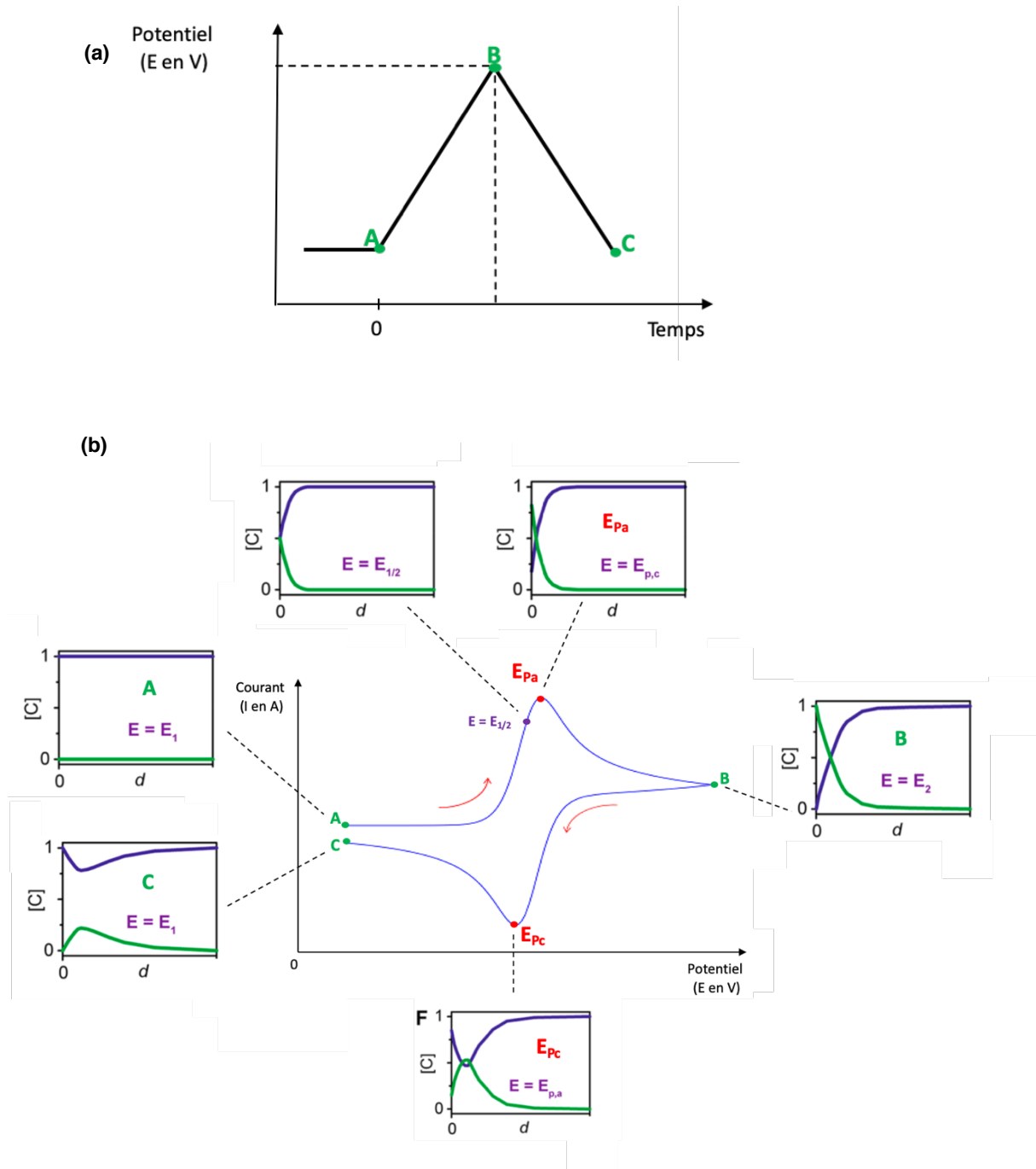


Figure 2 : Voltammétrie cyclique d'un système réversible : (a) Potentiel appliqué en fonction du temps pour une expérience de voltampérométrie cyclique, les potentiels initial, intermédiaire et final étant représentés (A, B et C, respectivement) ; (b) Allure du voltamogramme cyclique réversible résultant avec I_{Pa} , le courant anodique ; I_{Pc} , courant cathodique ; E_{Pa} , potentiel d'oxydation anodique ; E_{Pc} , potentiel de réduction cathodique et $E_{1/2}$, le potentiel à mi-hauteur du pic cathodique. Représentation des profils de concentrations pour l'oxydant Fc^+ (en bleu) et le réducteur Fc (en vert) aux points caractéristiques du voltamogramme.

La voltampérométrie cyclique constitue une méthode cinétique transitoire où l'on applique un potentiel à une électrode de travail. Elle est décrite par une fonction triangulaire symétrique dans le temps. Cette méthode permet également de dissocier les systèmes réversibles et irréversibles, lents et rapides.

La réversibilité électrochimique fait référence à la cinétique de transfert d'électrons entre l'électrode et l'analyte. Lorsqu'il y a une faible barrière au transfert d'électrons (réversibilité électrochimique), l'équilibre de Nernst est établi immédiatement après tout changement du potentiel appliqué. Ainsi, dans le cas de l'équilibre entre le ferrocénium (Fc^+) et le ferrocène (Fc) est défini par l'équation de Nernst suivante :

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{(\text{Ox})}{(\text{Red})} = E_0 + 2,3026 \frac{RT}{nF} \log_{10} \frac{(\text{Ox})}{(\text{Red})} \quad (\text{I})$$

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{Fc}^+]}{[\text{Fc}]} = E_0 + 2,3026 \frac{RT}{nF} \log_{10} \frac{[\text{Fc}^+]}{[\text{Fc}]} \quad (\text{II})$$

avec : E_0 , le potentiel standard du couple Ox/Red ;
 R , la constante des gaz parfaits (8,314 J/mol/K) ;
 T , la température en Kelvin (K) ;
 F , la constante de Faraday (96485 C/mol) ;
 $\frac{[\text{Ox}]}{[\text{Red}]}$, les concentrations en Oxydant et Réducteur dans la solution ;
 n , le nombre d'électron transférés dans l'événement redox.

On peut également noter que dans le cas d'un système réversible, le potentiel de pic est indépendant de la vitesse de balayage et que l'intensité du pic est proportionnelle à la racine carrée de la vitesse de balayage. Pour une réduction, le potentiel d'électrode est défini par les relations suivantes :

$$E = E_i - vt \quad \text{au balayage aller} \quad (\text{III})$$

$$E = E_i - 2v\tau - vt \quad \text{au balayage retour} \quad (\text{IV})$$

avec : E_i , le potentiel initial (en volt) ;
 v , vitesse de balayage ($\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$) ;
 t , temps écoulé entre le début du balayage ;
 τ , temps écoulé entre le début du balayage aller et l'inversion du sens de balayage.

Lorsqu'on est en présence d'un système réversible, le pic de réoxydation de l'espèce réduite est observé lors du balayage retour. Il présente une intensité identique en valeur absolue que le pic aller. L'allure générale des courbes obtenues ainsi que les grandeurs

expérimentales mesurées lors d'un processus réversible cyclique du couple le ferrocénium (Fc^+) et le ferrocène (Fc) est présentée en *Figure 3*.

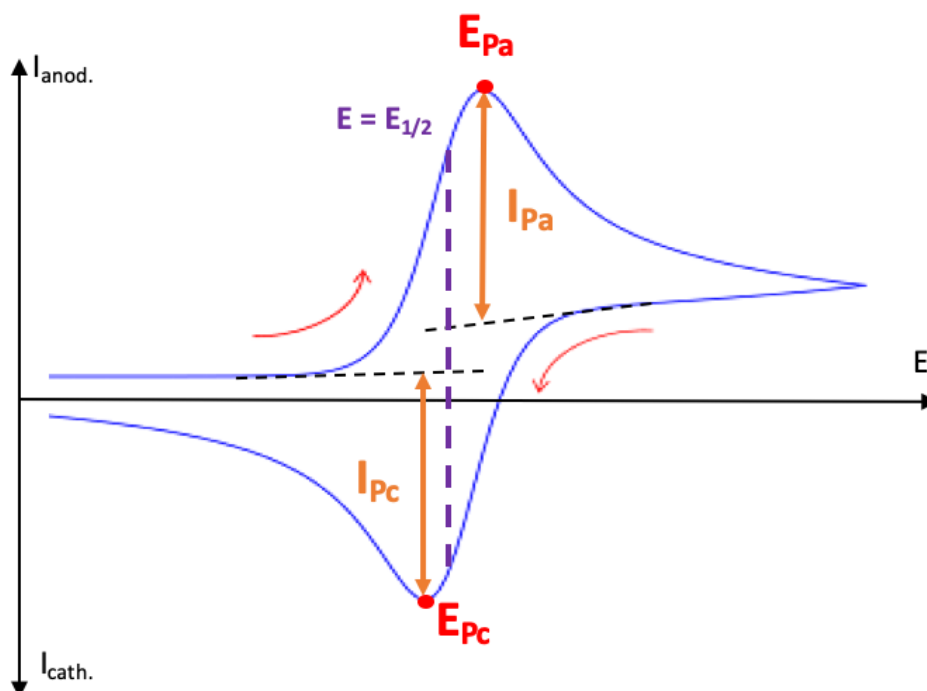


Figure 3 : Voltamogramme du système réversible Fc^+/Fc .

Pour les procédés de transfert d'électrons électrochimiquement réversibles impliquant des espèces redox à diffusion libre, l'équation Randles-Sevcik décrit comment le courant de I_p augmente linéairement avec la racine carrée de la vitesse de balayage :

$$I_p = \pm 0,446 \times n \cdot F \cdot A \cdot [Fc]^0 \cdot \left(\frac{n \cdot F \cdot v \cdot D_0}{RT} \right)^{1/2} \quad (V)$$

Soit à 25°C :

$$I_p = \pm 2,99 \times 10^5 \cdot A \cdot n \cdot (\alpha n)^{1/2} \cdot [Fc]^0 \cdot D_0^{1/2} \cdot v^{1/2} \quad (VI)$$

Et le rapport,

$$\frac{I_{pa}}{I_{pc}} = 1 \quad (VII)$$

avec : A , la surface spécifique des électrodes en cm^2 ;
 D_0 , le coefficient de diffusion des substances à mesurer oxydées en $cm^2 \cdot s^{-1}$;
 $[Fc]^0$ la concentration globale des composés à mesurer en $mol \cdot cm^{-3}$;
 α , coefficient de transfert (où $0 < \alpha < 1$).

Si le processus de réduction est rapide réversible chimiquement et électrochimiquement, la différence entre les potentiels entre les pics aller et retour (ΔE_p) et définie par les équations suivantes :

$$E_{Pc} = E_{1/2} - \frac{0,0295}{n} \quad (VIII)$$

$$E_{Pa} = E_{1/2} + \frac{0,0295}{n} \quad (IX)$$

$$\Delta E_P = |E_{Pc} - E_{Pa}| = \frac{0,0590}{n} \quad \text{à } 25 \text{ } ^\circ\text{C} \quad (X)$$

Ainsi, à 25 °C, cette différence ΔE_P est de 59 mV pour un échange d'un électron avec E_{Pa} et E_{Pc} , indépendant de la vitesse de balayage et I_P proportionnelle à la racine carrée de la vitesse de balayage. La réversibilité chimique sert à indiquer si la substance à analyser est stable à la réduction et peut être réoxydée en balayage retour.

Par contre, lorsqu'il existe une barrière élevée au transfert d'électrons (irréversibilité électrochimique), les réactions de transfert d'électrons sont lentes. Des potentiels plus négatifs (surtension cathodique) sont nécessaires pour observer des réactions de réduction. Or, pour un système irréversible, le pic retour n'est pas observé et le pic aller reste proportionnelle à la racine carrée de la vitesse de balayage, caractérisé par les équations suivantes :

$$I_P = \pm 0,99. A. n. (\alpha n)^{1/2} . [Fc]^0 . D_0^{1/2} . v^{1/2} \quad (XI)$$

$$E_P - E_{P/2} = \frac{0,048}{\alpha n} \quad (XII)$$

$$\Delta E_P = E_{P2} - E_{P1} = \frac{0,059}{\alpha n} \log \frac{v_1}{v_2} \quad (XIII)$$

En VC, les vitesses de balayage varient en générale de quelques mV/s (voire $\mu\text{V/s}$) à plusieurs centaines ou millions de V/s. Il faut noter que le courant faradique n'est proportionnel qu'à la racine carrée de la vitesse de balayage alors que le courant capacitif augmente proportionnellement avec la vitesse de balayage lorsque que le signal est contrôlé par la diffusion des molécules à l'électrode. De ce fait, si l'on emploie une vitesse de balayage trop importante, un pic peu discernable du courant résiduel induit par le courant capacitif est observé. L'obtention d'un pic retour entraîne l'utilisation d'un balayage de potentiel suffisamment rapide dans le but de laisser l'espèce formée diffuser. Couramment, les vitesses de balayage utilisées en VC sont de l'ordre de 10 à 500 mV/s.

Lors des mesures de potentiels par la VC, les cellules électrochimiques utilisées sont des « vases » en verre de contenance 20-90 mL. Ils sont dotés d'un couvercle avec quatre ouvertures permettant de disposer les électrodes dans la cellule. Ainsi, un système de trois électrodes est utilisé : une électrode de travail, une contre-électrode et une électrode de référence. Il est toutefois possible d'utiliser d'autres types de cellule avec des volumes de solution beaucoup plus petit, typiquement entre 2 et 20 mL. Nous avons retenu ce type de cellule. Au cours de nos expériences, l'absence de dioxygène dissout (O_2) est importante. Or, ce dernier peut être réduit à l'électrode et peut fausser la lecture de nos résultats. Dès lors, la quatrième ouverture permet de maintenir un flux d'argon dans la solution (flux en surface de la solution et flux dans la solution lors du dégazage). Pendant que le courant circule entre

l'électrode de travail et la contre-électrode, l'électrode de référence est utilisée pour mesurer avec précision le potentiel appliqué par rapport à une réaction de référence stable. Un potentiostat (PARSTAT 2263) est utilisé pour contrôler le potentiel appliqué de l'électrode de travail par rapport au potentiel de l'électrode de référence (*Figure 4*). Ainsi, chacune des électrodes est connecté au potentiostat *via* un système de câble.

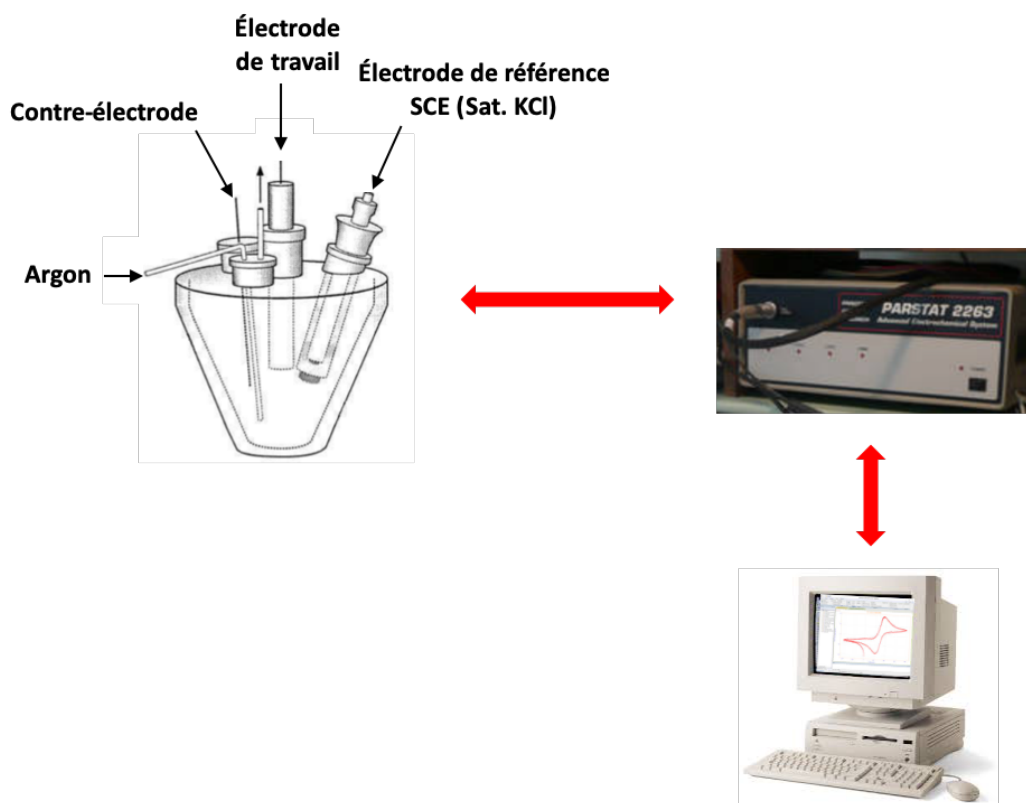


Figure 4 : Schéma d'une cellule de mesure voltammétrique.

Électrode de référence

Celle-ci possède un potentiel d'équilibre défini et stable. Elle sert de point de référence par rapport auquel le potentiel d'autres électrodes peut être mesuré dans une cellule électrochimique. Parmi les électrodes de référence couramment utilisées dans les milieux aqueux, on retrouve l'électrode au Calomel Saturé au chlorure de potassium (ECS, SCE en anglais), l'électrode Standard à Hydrogène (ESH) et l'électrode AgCl/Ag. Ces électrodes de référence sont généralement séparées de la solution par un fritté.

Nous avons travaillé avec l'électrode au calomel saturé au chlorure de potassium (ECS). Cette électrode, qui fait intervenir le couple $\text{Hg}_2\text{Cl}_2(\text{s})/\text{Hg}(\text{l})$ (calomel : Hg_2Cl_2), possède un potentiel fixe de $E = 0,248 \text{ V}$ à une température θ de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Ce potentiel est maintenu constant grâce à une concentration en chlorure de potassium d'environ $3,5 \text{ M}$ correspondant à la solution saturée en KCl et la présence de cristaux de KCl non dissous (*Figure 5*). On ne trempe pas cette électrode de référence directement dans la solution d'étude de manière à éviter une contamination avec les ions K^+ et Cl^- . On utilise une allonge, dans laquelle on l'introduira. Cette allonge contient la même solution aqueuse tamponnée d'étude et le même électrolyte support. Néanmoins, en l'absence de la molécule à étudier de manière à réduire au maximum le potentiel de jonction. Le système électrode de référence et allonge est ensuite introduit dans la cellule.

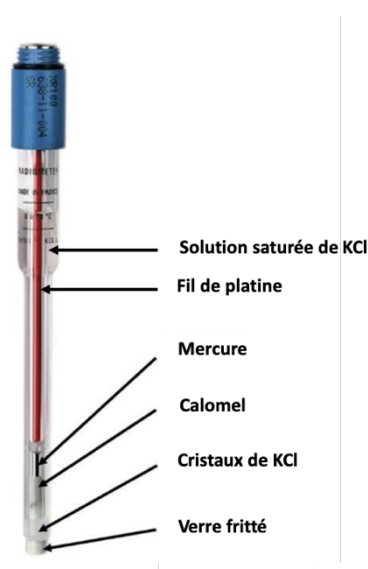


Figure 5 : Schéma d'une électrode au calomel saturée en chlorure de potassium.

Contre-électrode ou électrode auxiliaire

La contre-électrode a pour rôle de compléter le circuit électrique. Le courant est enregistré sous forme de flux d'électrons entre l'électrode de travail et la contre-électrode. De cette façon, lors de l'étude du courant de réduction sur l'électrode de travail, la réaction d'oxydation se produit au sein de la contre électrode. Dès lors, cette dernière est choisie de sorte à être la plus inerte que possible. La surface de la contre-électrode doit en principe être beaucoup plus importante que celle de l'électrode de travail. Le but est de s'assurer que la cinétique de la réaction de transfert d'électrons, qui a lieu au niveau de la contre-électrode, ne limite pas à celle ayant lieu au sein de la l'électrode de travail. Ainsi, le même courant, au signe prêt, doit circuler dans l'électrode de travail et la contre-électrode. Un fil ou un disque de platine est généralement utilisé comme contre-électrode pour faire circuler les électrons (*Figure 6*).

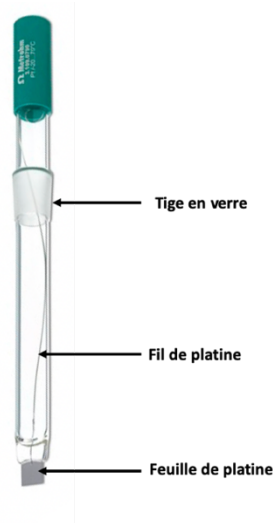


Figure 6 : Schéma d'une contre-électrode de platine.

Électrode de travail

L'électrode de travail constitue l'événement électrochimique d'intérêt, car elle est le siège des réactions de réduction ou d'oxydation étudiée. C'est sa valeur de potentiel qui est enregistrée. L'aspect le plus important de l'électrode de travail est qu'elle est composée d'un matériau redox inerte dans le domaine potentiel d'intérêt. Le type d'électrode de travail peut varier d'une expérience à une autre pour fournir différentes fenêtres potentielles ou pour réduire ou promouvoir l'adsorption en surface de l'espèce d'intérêt. Il existe donc différents types d'électrodes. Les plus courantes sont constituées de métaux inertes telles que l'or, le platine, l'argent, ou encore le carbone (Figure 7). Comme l'événement électrochimique d'intérêt se produit à la surface de l'électrode de travail, il est impératif que cette dernière soit extrêmement propre et que sa surface soit bien définie. Pour cela, il existe des procédures de polissage déterminées en fonction du type d'électrode variant tout de même et d'un laboratoire à l'autre.

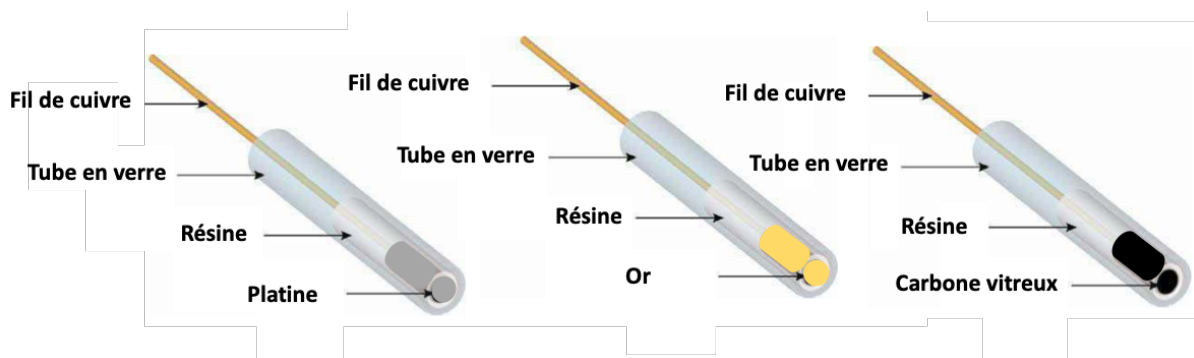


Figure 7 : Schéma des différents types d'électrodes de travail (platine, or et carbone).

Les matériaux carbonés permettent d'explorer des potentiels plus négatifs que ceux exploités avec une électrode d'or ou de platine. Ainsi, l'utilisation d'électrode de carbone offre l'avantage d'une l'analyse et d'une détection de gammes de molécules.

Parmi les électrodes de carbone, un certain nombre a été recensé. Dans le cadre de nos études, nous avons procédé avec différentes électrodes de types carbone.

1.2. Les différents types d'électrodes de carbone

La nature de l'électrode de travail utilisée va jouer un rôle essentiel sur la réponse électrochimique. Le matériau choisi doit présenter une allure favorable quant à la réalisation d'une réaction d'oxydoréduction sur la sonde électrochimique utilisée. Une réaction rapide, sans modification de la surface mais également reproductible, est un critère efficace de sélection.

Les électrodes de carbone sont employées en raison de leur compétence en tant que conducteur et du nombre d'électrons libres dont elles disposent pour le transfert. Non seulement le carbone est un conducteur efficace, mais il possède un point de fusion très élevé. Cela signifie qu'il peut être utilisé pour faciliter un large éventail de réactions différentes. Parmi les autres avantages de l'utilisation du carbone, le coût relativement faible, la longévité et la facilité de l'approvisionnement.

Le carbone, correspond à l'un des atomes les plus répandus sur Terre. Il se présente naturellement sous de nombreuses formes. On parle alors d'allotropes de carbone. Dans la nature, trois formes allotropiques sont collectées et utilisées depuis des siècles par l'homme : le diamant, le graphite et le carbone amorphe. Par ailleurs, les chercheurs ont été amenés à concevoir de nouveau type de carbone à l'échelle nanométrique tels que les fullerènes, les nanotubes de carbone ou bien le graphène avec des propriétés relativement différentes de celles du carbone naturel. Ces dernières correspondent aux formes cristallines de carbone les plus courantes.

Le diamant constitue la forme la plus stable de carbone pur formé à des températures et des pressions élevées sous la croûte terrestre. Le diamant correspond à un réseau tétraédrique présentant un atome de carbone à chaque sommet. Chaque atome de carbone forme quatre liaisons covalentes avec quatre atomes voisins, remplissant complètement sa couche externe d'électrons et donnant l'un des matériaux les plus durs et les plus précieux de l'histoire humaine.¹

Le graphite est composé d'un empilement de feuillets de graphène faiblement liés les uns aux autres par des interactions de type Van Der Waals. Il est constitué d'un réseau hexagonal d'atomes de carbone d'hybridation sp^2 .

Parmi les graphites, les fullerènes, ont été découverts par Harold Kroto, Robert F. Curl Jr. et Richard E. Smalley en 1985, après avoir étudiés des amas de carbone produits par vaporisation du graphite par chauffage au laser.² Les fullerènes présentent une structure proche de celle du graphite. Ils sont composés d'un empilement de feuilles de graphène avec des anneaux hexagonaux liés, mais ils peuvent également contenir des anneaux pentagonaux ou même heptagonaux.^{3,4} Il s'agit d'une espèce stable, dont la forme est celle d'un ballon de football en raison de leur forme polygone de 32 faces, 20 hexagones et 12 pentagones pour l'espèce C_{60} .⁵ Cette découverte a stimulé la communauté scientifique à se pencher sur d'autres structures qui pouvaient être formées à partir du graphite. Cette découverte leur valut le prix Nobel de chimie en 1996.⁶

Après la découverte du fullerène, l'observation des nanotubes de carbone en 1991 a été décelée par un scientifique japonais, S. Iijima.⁷ En raison de leurs propriétés électriques, mécaniques et thermiques de bonnes envergures, les nanotubes de carbones ont fait l'objet de nombreuses études durant les deux dernières décennies. Les nanotubes de carbone ont été découverts lorsqu'un dépôt solide s'est formé sur l'anode après une décharge électrique.⁸ Ainsi, ce dépôt solide était constitué de minuscules tubes correspondant à l'enroulement d'une seule feuille d'atomes de carbone, graphène, disposés en anneaux hexagonaux, il s'agissait de nanotubes de carbone. Ces cylindres se présentent généralement avec des extrémités fermées et de longueur variant de 2 à 10 micromètres et de diamètre entre 5 à 40 nanomètres (Figure 8).⁹

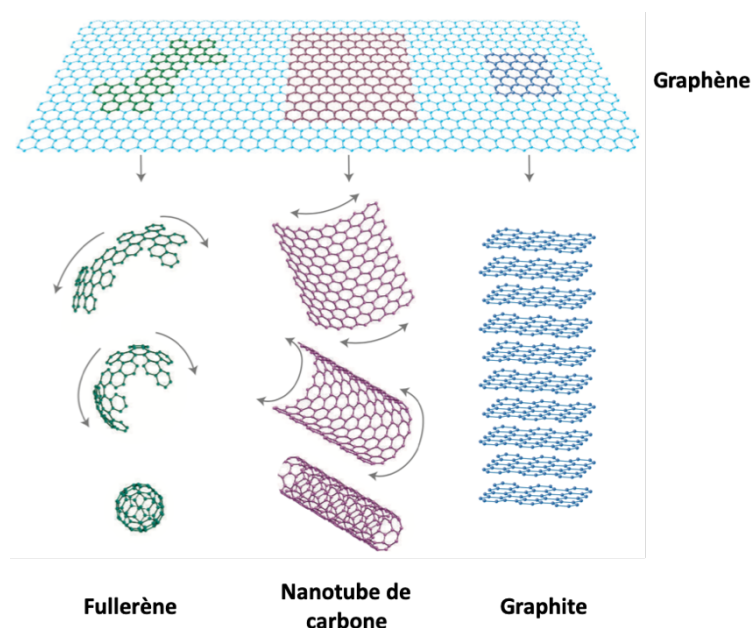


Figure 8 : Origine des différentes formes allotropique du carbone.

Par ailleurs, l'existence de formes allotropiques du carbone moins répandues ont été découverte tels que la lonsdaléite, la chaoite, ou encore le carbone vitreux.

Habituellement, les électrodes de carbone sont formées de carbone graphitique comme le carbone vitreux, de graphite pyrolytique hautement ordonné exposant les faces cristallographiques du plan de bord ou du plan de base, de poudre de graphite, ou plus récemment, d'électrodes modifiées par des nanotubes de carbone, en plus des électrodes conductrices en diamants dopés au bore.¹⁰

Pour pouvoir les utiliser en électrochimie, ces matériaux doivent être inertes chimiquement. Ainsi, en raison de l'existence de plusieurs structures du carbone qui diffèrent en termes de porosité ou bien de conductivité, nous nous sommes intéressés aux électrodes de carbone vitreux, pyrolytique ou encore noir de carbone.

1.2.1. Électrode de carbone vitreux

En électrochimie, ce sont les électrodes en carbone vitreux qui sont le plus utilisées. Le carbone vitreux correspond à une forme non-graphitante (*Figure 9*).¹¹ Il allie à la fois des propriétés vitreuses et céramiques lui permettant une bonne conductivité électrique et une inertie chimique. Sa dénomination provient de son aspect similaire au verre, en raison de sa fragilité, sa faible porosité le rend imperméable aux liquides et aux gaz. Il s'agit d'un matériau dur et cassant, contrairement aux formes graphitiques molles du carbone, et présente une résistance aux hautes températures (jusqu'à 3000 °C).

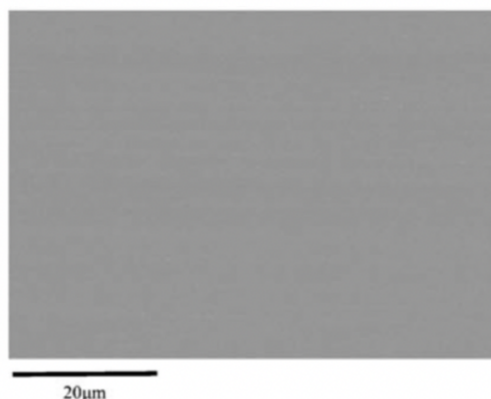


Figure 9 : Imagerie par microscopie électronique à balayage d'une surface de carbone vitreux.

Le carbone vitreux provient de cellulose ou de résines dont la carbonisation est contrôlée. Il est utilisé dans le domaine industriel pour la fusion du verre ou dans la conception de composé binaire dans le cadre de l'électronique. Au vu de sa biocompatibilité, il sert également de constituants biomédicaux dans le développement des électrodes de pacemakers.

Ce type d'électrode est très utilisée dans la littérature car il s'agit d'un matériau présentant des avantages de transfert d'électrons très important ainsi qu'une fenêtre électrochimique très étendue.

1.2.2. Électrode de carbone pyrolytique

Le carbone pyrolytique est une forme de graphite nanocristallin obtenue par décomposition thermique d'hydrocarbure tel que le propane, le propylène, acétylène ou bien le méthane, ceci en absence d'oxygène. Lors de la décomposition, le graphite cristallise formant ainsi la résine pyrolysée appelé graphite pyrolytique hautement orienté (HOPG). Il s'agit d'une forme très pure et ordonnée de graphite synthétique. Il se caractérise par un faible angle d'étalement de la mosaïque, ce qui signifie que les cristallites de graphite individuels sont bien alignés les uns par rapport aux autres.

Dans le cas d'une électrode de carbone pyrolytique, la surface de l'électrode se compose de deux types de plans graphitiques : les deux faces cristallographiques du graphite peuvent présenter des cinétiques de transfert d'électrons très différentes.^{12,13}

Ainsi, dans la structure stratifiée du graphite, nous pouvons identifier deux types de plan graphitique : le plan de base (BPPG, Basal Plan Pyrolytic Graphite electrode) qui contient tous les atomes de carbone dans une feuille de graphène, ou le plan de bord (EPPG, Edge Plan Pyrolytic Graphite electrode) qui est perpendiculaire au plan de base (*Figure 10*).¹¹ En raison de la nature de la liaison chimique dans le graphite, les deux plans présentent des propriétés électrochimiques sensiblement différentes. Dans le cas de la plupart des couples redox, la cinétique de l'électrode au niveau du graphite du plan de bord est considérablement plus rapide qu'au niveau du graphite du plan de base.¹⁴ Il a été démontré expérimentalement par voltamétrie cyclique que le taux de transfert d'électrons est généralement beaucoup plus élevé aux sites du plan de bord qu'au plan de base, c'est-à-dire que la constante de vitesse $k_{\text{edge}}^0 \gg k_{\text{basal}}^0$ en considérant que le taux de transfert d'électrons au plan de base est négligeable.¹³

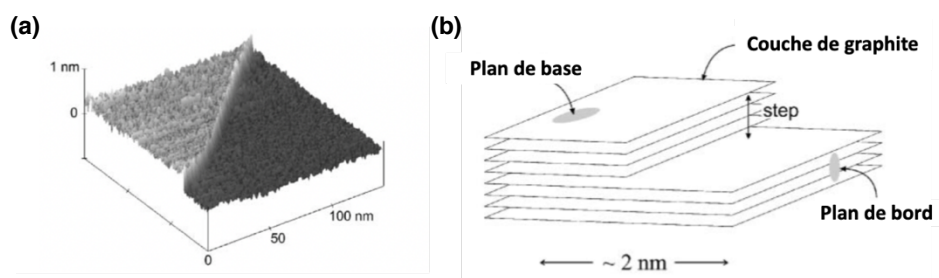


Figure 10 : (a) Imagerie par microscopie à effet tunnel d'une étape de monocouche sur une surface HOPG ; (b) Schéma de la couche de graphite.

De plus, dans le cas de la surface de l'électrode EPPG, telle que celle illustrée à la *Figure 11a*, la réponse voltampérométrique est tellement dominée par la grande proportion de sites dans le plan du bord qu'elle peut être traitée comme étant presque homogène.¹¹

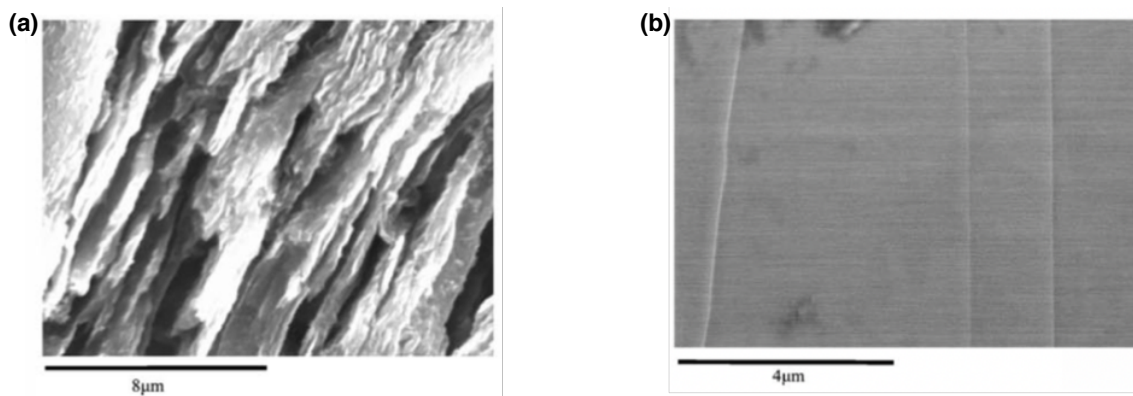


Figure 11 : Imagerie par microscopie du carbone pyrolytique (a) EPPG et (b) BPPG.

À partir de 1998, Kim et *al.*¹⁵ ont envisagé d'utiliser ce type de matériau en tant qu'électrode de travail. Il a été montré que ce matériau offrait un signal semblable à celui obtenu avec une électrode de carbone vitreux et reproductible. Toutefois, il ne se dégradait pas dans le temps. Le carbone pyrolytique apparaît comme une bonne alternative au carbone vitreux. De nos jours, ce matériau est davantage utilisé en tant qu'électrode de travail.

1.2.3. Le noir de carbone

Le noir de carbone est la particule conductrice relativement utilisée lors de la fabrication des composites et des polymères conducteurs (CPC) en raison de leur faible coût mais également en raison de sa faible densité.

Le noir de carbone se présente sous la forme d'une poudre inodore constituée de particules. Ces particules sont des masses sphéroïdales (de 10 à 500 nm) constituées par des atomes de carbone présentant une organisation plus ou moins graphitique. Cette poudre est obtenue lors de décomposition de gaz d'hydrocarbures.

La poudre de noir de carbone est présente de manière plus ou moins compactée. Pour cette raison, sa conductivité électrique n'est pas connue avec précision mais il a été prouvé que la conductivité électrique intrinsèque de cette poudre dépend de sa surface spécifique, sa structure et sa composition chimique.¹⁶

Le noir de carbone est généralement utilisé par dépôt de cette poudre sur une électrode de carbone afin d'augmenter la conductivité.

Le noir de carbone présente une bonne inertie chimique, mais subit tout de même une certaine corrosion au fil du temps. Généralement, il n'est pas utilisé seul en raison de sa cinétique en transfert de charges faible et d'un courant résiduel élevé. Il est associé à du Nafion®. Le noir de carbone du type vulcan xc-72 présente une excellente conductivité en la présence de ce dernier.

Les membranes perfluorosulfonées comme le Nafion® sont les ionomères les plus utilisés dans les piles à combustible à membrane d'échange de protons ou encore dans l'électrolyse de l'eau en raison de leur conductivité ionique élevée lorsqu'elles sont hydratées. Ceci résulte de leur structure chimique : une matrice hydrophobe en téflon sur laquelle sont encrées des chaînes perfluorovinyléther présentant une terminaison de groupes sulfonés hydrophiles. En général, ces dernières sont compensées par des cations pour assurer l'électroneutralité. Par conséquent, le Nafion® peut se présenter sous diverses formes cationiques et la forme acide $\text{-RSO}_3\text{H}$ (que l'on écrit plutôt sous la forme $\text{-RSO}_3^- \text{H}^+$ en raison d'une acidité forte) est la plus courante. C'est sous la forme acide que la conductivité ionique du Nafion® est la plus importante, puisque les protons peuvent être transportés par deux mécanismes.¹⁷ Le premier est la diffusion de protons à travers des sites sulfonés et le second concerne le transport d'un proton d'une molécule d'eau à son voisin par modification du réseau de liaison hydrogène.¹⁸ Enfin, l'ajout de Nafion® permet également de fixer un dépôt à la surface d'une électrode.

La plupart du temps, en électrochimie, des modifications de la surface de travail sont effectués dans le but de les fonctionnaliser c'est à dire d'augmenter la capacité de transfert de charges. Ceci permet d'observer davantage la réponse électrochimique lorsque celle-ci n'est pas détectée de manière directe. Un bon nombre de ces modifications de surface lors de la thèse a été réalisé en présence de composés appelés polyoxométallates capables d'échanger un nombre important d'électrons. Le polyoxométallate joue dans ce cas le rôle de médiateur rédox.

2. Présentation générale des polyoxométallates

Les polyoxométallates (communément appelé POMs), sont des oxydes métalliques constitués de métaux de transition dans leur état d'oxydation le plus élevé (V^{V} , Nb^{V} , Mo^{VI} , W^{VI} ...). Ces derniers sont liés entre eux grâce à des ligands oxo O_2^- .

Il existe une grande variété de structures. Ces composés sont capables d'échanger un certain nombre d'électrons tout en gardant leurs structures inchangées.

2.1. Description et synthèse des polyoxométallates

Découvert en 1820, les POMs sont des polyanions inorganiques résultant de la condensation d'oxoanions $[\text{MO}_4^{2-}]$ en milieu acide, où M représente un métal de transition (V^{V} , Nb^{V} , Mo^{VI} , W^{VI} ...).¹⁹ Le métal de transition M se situe dans un milieu quasi octaédrique riche en atomes d'oxygène. De ce fait, M se trouve dans son degré d'oxydation en générale le plus haut, et dans la plupart des cas de configuration d^0 . Lorsque la condensation a lieu autour d'un ou plusieurs hétéroatomes X avec X correspondant à un atome de phosphore, silicium ou bien cobalt, la géométrie alors adoptée se retrouve sous la forme d'un tétraèdre. On parlera alors d'hétéropolyanions.²⁰

Le plus souvent, c'est en solution aqueuse que sont synthétisés les POMs. La structure souhaitée est formée en respectant minutieusement les modifications des paramètres de synthèse notamment les variations de pH, de température, de la concentration des réactifs utilisés ou encore la nature de l'acide mis en jeu.²¹

2.2. Structures classiques des polyoxométallates et leurs dérivés

L'agencement des ions métalliques M et X est capable de s'effectuer suivant différentes manières conduisant à la formation de structures variées de POM. Ainsi, il existe quatre familles importantes de POM se distinguant chacune par leurs structures : les hétéropolyanions de types Dawson, Keggin et Anderson, et les isopolyanions du type Lindqvist.

2.2.1. Structure Keggin

En 1826, J. Berzelius avait synthétisé le premier POM sous la forme de phosphomolybdate, $[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]^{3-}$. Durant cette synthèse, un précipité jaune était observé lors de l'ajout de molybdate de sodium sur une solution d'acide phosphorique.²² Or, ce n'est qu'en 1933 que les informations structurales d'un composé similaire le $[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]^{3-}$, ont été apporté par J. F. Keggin, par diffraction des rayons X. Ainsi, la famille des Keggin est constitué des composés de structures $[\text{XM}_{12}\text{O}_{40}]^{n-}$.

La structure Keggin est un hétéropolyanion. Il s'agit d'un hétéroatome central lié à quatre atomes d'oxygène XO_4 formant un tétraèdre entouré de quatre groupements trimétalliques $\{\text{M}_3\text{O}_{13}\}$ composés de trois octaèdres $\{\text{MO}_6\}$ formant $[(\text{XO}_4)\text{M}_{12}\text{O}_{36}]^{n-}$. Les deux sommets de deux octaèdres différents relient les groupes trimétalliques entre eux (*Figure 12*).

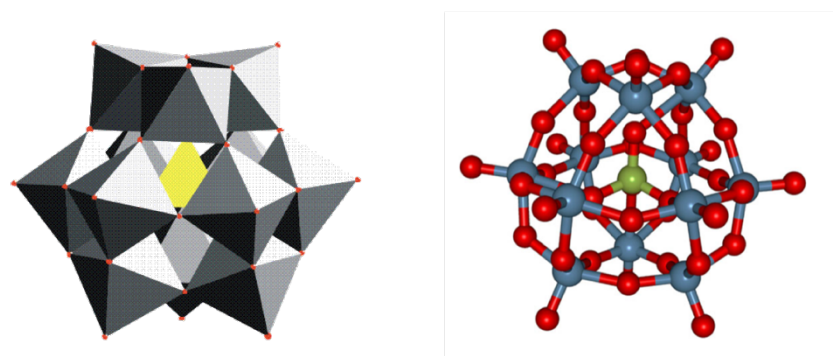


Figure 12 : (a) Représentation polyédrique de la structure Keggin ; (b) représentation éclatée du POM $[XM_{12}O_{40}]^{n-}$. Les éléments métallique M sont représentés en gris, l'hétéroatome en jaune et les atomes d'oxygène en rouge.²¹

La présence d'un axe de symétrie dans la structure Keggin permet la rotation possible d'un angle de 60° permettant la formation de multiples isomères. Ainsi, cinq structures sont capables de se former et sont désignées par les préfixes α , β , γ , δ et ϵ .²³ Les quatre derniers résultent des rotations successives de 60° des unités M_3O_{13} autour de trois axes de symétrie de l'isomère α . Toutefois, uniquement trois d'entre elles ont pu être isolés. La première isolé par Keggin de type $[XM_{12}O_{40}]^{n-}$ correspond à l'isomère α identifié comme étant l'isomère le plus stable (Figure 13).

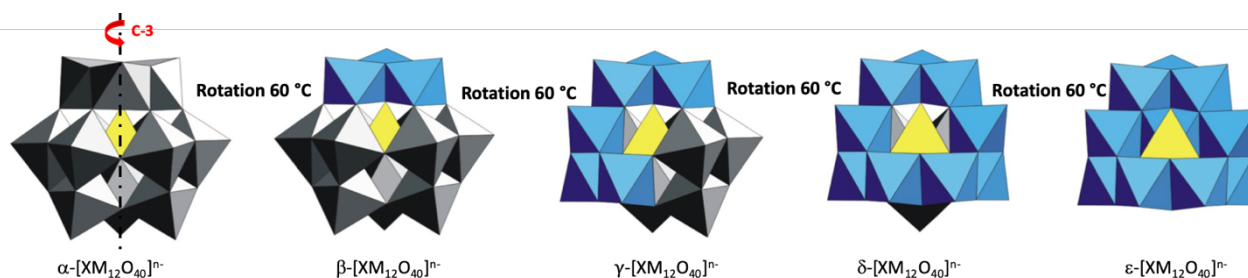


Figure 13 : Isomères $\alpha, \beta, \delta, \gamma$ et ϵ du POM de type Keggin.²¹

2.2.2. Structure Wells-Dawson

La structure Wells-Dawson ou simplement Dawson, de type $[X_2M_{18}O_{62}]^{n-}$, est un autre POM bien connu. Déterminé par B. Dawson, il s'agit d'une structure basée sur l'assemblage de deux unités tronquées XM_9 de la structure Keggin : deux de ces fragments peuvent être assemblés symétriquement pour former le cluster $X_2M_{18}O_{34}$.²⁴

Contrairement à la structure Keggin entièrement régulière, les dix-huit centres métalliques ne sont pas entièrement équivalents. La structure Dawson est constituée de deux anneaux

$\{M_3O_{13}\}$, situés dans les régions polaires, également appelés chapeaux et de deux anneaux $\{M_6O_{30}\}$ (trois dimères $\{M_2O_{10}\}$) situés dans la région équatoriale, formant la ceinture chacune liée trois fois à l'hétéroélément (*Figure 14*).

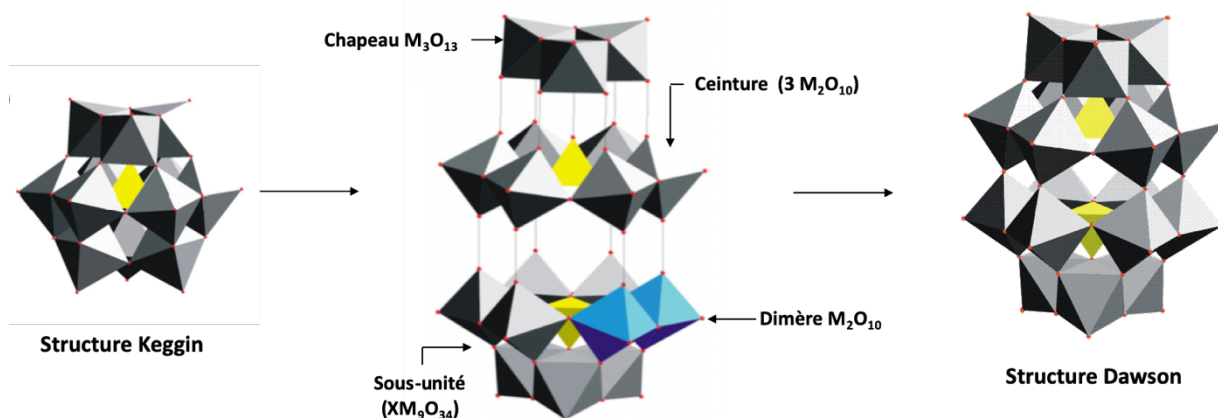


Figure 14 : Représentation de la structure Dawson.²¹

Six isomères ont été proposés par Constant et *al.*²⁵, les isomères (α , β , γ et α^* , β^* , γ^*). Les isomères α et β sont formés lors d'une rotation de 60 °C d'un ou des deux motifs $\{M_3O_{13}\}$. B. Dawson a isolé l'isomère α qui présente un axe de rotation d'ordre trois ainsi qu'un plan de symétrie passant entre les deux ceintures. L'isomère β provient de la rotation de 60 °C d'un des chapeaux de l'isomère α . Enfin, l'isomère γ est obtenu par rotation de 60 °C du second chapeau de l'isomère β . La technique de RMN du ^{183}W a permis de distinguer les isomères α et β .

Les isomères α^* , β^* , et γ^* , proviennent de la rotation de 60 °C d'un motif $\{XM_9\}$ des isomères α , β , et γ (*Figure 15*).

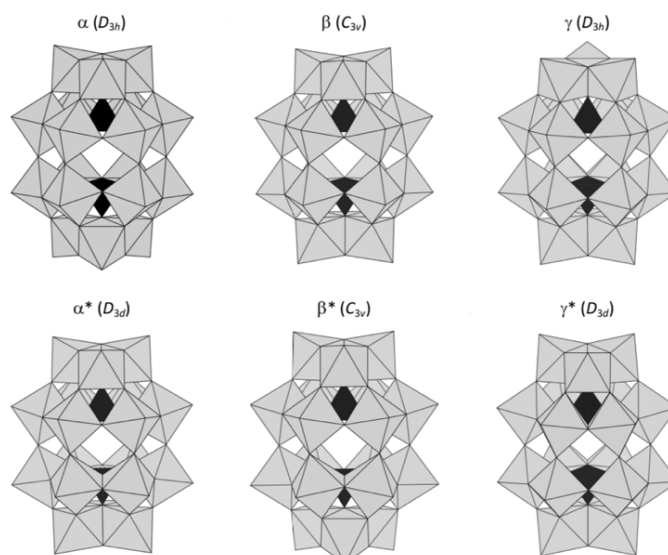


Figure 15 : Représentation des six isomères rotatifs de la structure de Dawson α , β , γ , α^* , β^* , et γ^* .

Ces hétéropolyanions de type Dawson ont la possibilité de perdre un ou plusieurs groupements oxométalliques, lors d'une hydrolyse partielle avec une valeur de pH adéquate, leur permettant de se comporter comme des composés dits lacunaires. Lorsqu'un seul motif oxométallique est éliminé, un composé monolacunaire, de formule α - $[\text{P}_2\text{W}_{17}\text{O}_{61}]^{10-}$ est obtenu. Lorsque la lacune se trouve dans la ceinture, l'isomère est noté α_1 . Dans le cas où, la lacune se situe au niveau de l'octaèdre du chapeau, on parlera d'isomère α_2 . Toutefois, lors de la perte de l'un des deux chapeaux, il est susceptible de se retrouver avec une espèce trivacante comme, par exemple, le composé de formule α - $[\text{P}_2\text{W}_{15}\text{O}_{56}]^{12-}$ (Figure 16).

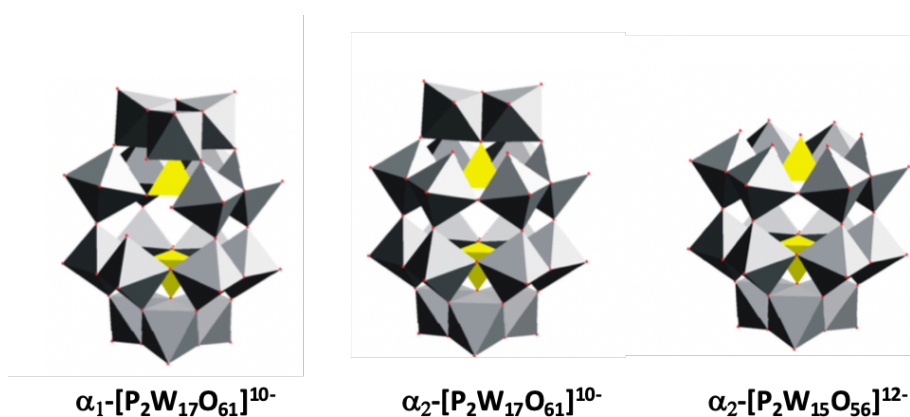


Figure 16 : Représentation (a) des isomères α et β du composé monovacant et (b) de l'isomère α du composé trivacant.²¹

Des métaux de nature différentes tel que le fer ou le vanadium, peuvent être utilisés pour combler les sites vacants de l'espèce α - $[\text{P}_2\text{W}_{15}\text{O}_{56}]^{12-}$ (Figure 17).²⁶

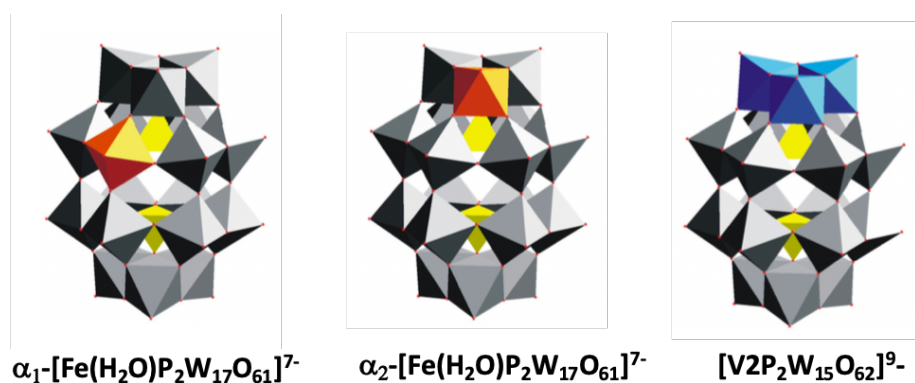


Figure 17 : Représentation (a) des isomères α et β du composé monovacant et (b) de l'isomère α du composé trivacant.²¹

Il existe également des structures dites « sandwich » correspondant à des composés issus de l'assemblage de deux espèces trivacantes $\alpha\text{-}[\text{P}_2\text{W}_{15}\text{O}_{56}]^{12-}$, dans lesquels des ions métalliques tel que Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} ou encore Fe^{3+} sont capables d'être pris en sandwich. Il s'agit de structure d'hétéropolyanions de type Dawson. C'est en 1983 que ces composés ont été introduit pour la première fois par R. G. Finke.²⁷

Ces structures sont pour la plupart stables en solution aqueuse à un intervalle de pH compris entre 0 et 8 ce qui favorise les études dans ces solutions et leur utilisation dans le domaine électro-catalytiques.²⁸ La Figure 18 présente un exemple de POMs de type « sandwich » issu respectivement de la famille de composé Dawson.

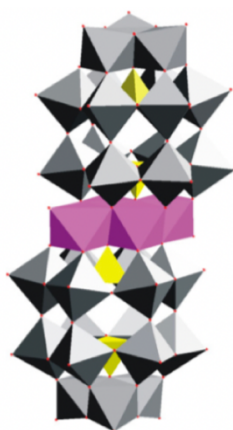


Figure 18 : Représentation de la structure « sandwich » de type Dawson.²¹

La présence de plusieurs centres métalliques mais également leurs diversités et leurs associations possibles dans les molécules de POMs de type « sandwich » mixtes vont conduire à des propriétés électro-catalytiques qui seront davantage améliorées et plus importantes en termes d'échanges d'électrons.²⁹

Dans le cadre de nos études de mesure de potentiel, nous nous sommes intéressés uniquement au composé sandwich type Dawson, seul composé utilisé au cours de cette thèse.

2.2.3. Autres structures

Il existe également des structures dites hétéropolyanions $[M'M_6O_{24}]^{n-}$ ou isopolyanions de types $[M_6O_{19}]^{n-}$. Ce sont les composés de type Anderson ($[M'M_6O_{24}]^{n-}$) et de Lindqvist ($[M_6O_{19}]^{n-}$) qui sont représentés *Figure 19*.

La structure Anderson correspond à une couronne composée de six octaèdres reliés les uns aux autres au niveau des arêtes.³⁰ L'atome métallique occupe la place centrale de cette couronne qui se situe alors au sien d'un environnement octaédrique. Le métal est relié aux six atomes d'oxygène des octaèdres de la couronne. L'atome métallique central M' peut être du type Fe, Mn, Co, Ir, Pt, Au, etc... tandis que les six autres atomes métalliques M sont souvent du type Mo(VI).

La structure de Lindqvist se présente sous la forme $[M_6O_{19}]^{n-}$ et provient de la mise en commun de six octaèdres possédant un atome d'oxygène en commun.³¹ M peut être dans ce cas du V(V).

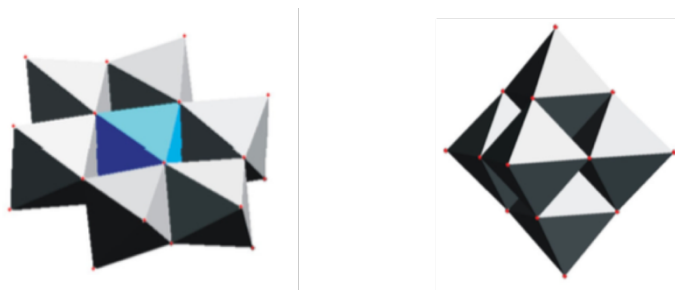


Figure 19 : Représentation des structures (a) Anderson ($[M'M_6O_{24}]^{n-}$) ; (b) Lindqvist ($[M_6O_{19}]^{n-}$).²¹

2.3. Principales propriétés des polyoxométallates

Les POMs possèdent un certain nombre de propriétés électriques, photoniques et magnétiques, ainsi que chimique. De plus, compte tenu de la grande variété structurale des POMs, les applications attrayantes de POMs sont continuellement rapportées depuis leur découverte.

Les POMs sont solubles dans les solutions aqueuses en raison de leur ionicité importante. Ils sont également le siège de protonation qui génère la formation d'hétéropolyacides considérés comme des acides fort.

En raison du degré d'oxydation des métaux présent dans les POMs, il s'agit d'espèces réductibles. La réduction des POMs forme des espèces appelées POMs bleues et brunes. Les formes ré-oxydées des POMs peuvent accepter et libérer plusieurs électrons sans se décomposer ou modifier leurs structures et présentent en général une succession de vagues de réductions réversibles à un ou plusieurs électrons. Suivant le pH de la solution, on peut observer un pur échange d'électron ou un échange électron-proton couplé.

Les polyoxotungstates illustrent bien ce phénomène qui correspond à des réductions de type $W^{VI} \rightarrow W^V$. Durant ces réductions, comme indiqué ci-dessus, des protonations à pH faible peuvent avoir lieu et de ce fait, le pH de la solution joue un rôle important quant au profil électrochimique de ces POMs.

Des vagues supplémentaires peuvent être observées pour les POMs contenant des métaux de transitions tels que le fer, le cuivre ou le manganèse en raison de leur implication dans les processus redox (réductions de Fe^{III} ou Cu^{II} , oxydation de Mn^{II} , etc...) (*Figure 20a*).³²

Les POMs sont des oxydes métalliques capables d'absorber dans l'ultraviolet (UV) et possède une bande dans l'UV proche situé entre 200 et 350 nm (*Figure 20b*). Ceci est caractéristique d'un phénomène de type LMCT (Ligand to Metal Charge Transfer) qui a lieu entre les orbitales 3, 4, ou 5d des métaux et les orbitales 2p des oxygènes. De nombreux POMs subissent ainsi une photo-réduction sous irradiation UV en présence de composés organiques comme les alcools tels que le propan-2-ol (*Figure 20c*). À l'état réduit, les solutions POMs se présentent avec une coloration bleue très intense et de ce fait elles sont capables d'absorber dans le visible. Les spectres d'absorption dans le visibles montrent, vers 600 nm, une large bande qui a tendance à augmenter lorsque le nombre d'électrons échangés devient important. Cette bande est le résultat d'un transfert électronique d'intervalence, avec des transitions du type d-d par exemple. Très généralement, lors de la réduction des polyanions, une diminution de l'intensité des bandes à transfert de charges situé dans l'UV peut être également observée (*Figure 20b et Figure 20c*).

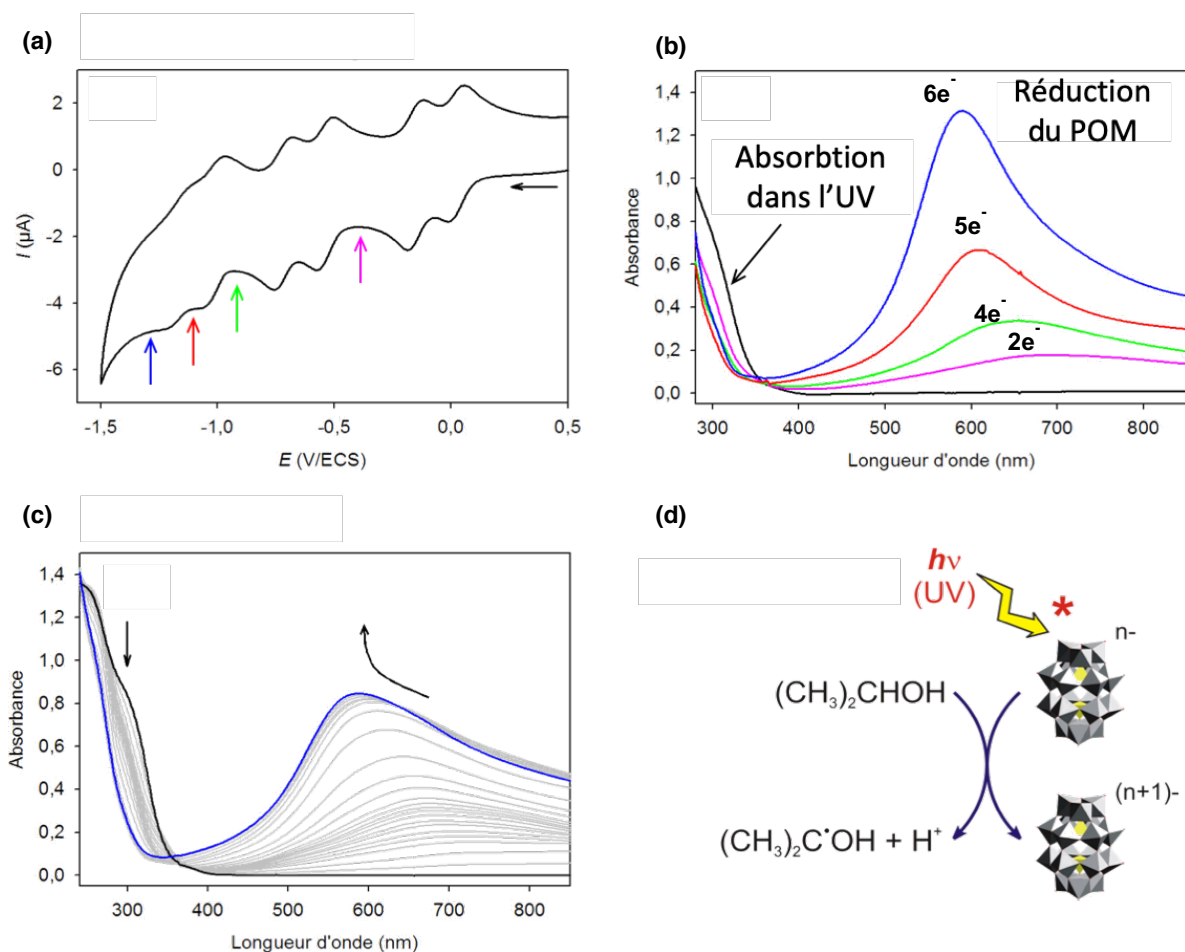


Figure 20 : (a) Voltamétrie cyclique de 0,2 mM α -[P₂W₁₈O₆₂]⁶⁻ en milieu 0,4 M AcOLi + AcOH à pH 6, faisant apparaître quatre vagues de réduction réversibles mono-électroniques et une vague de réduction bi-électronique. Electrode de travail : carbone vitreux. $\nu = 10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; (b) Spectre d'absorption UV-visible d'une solution de α -K₂[P₂W₁₈O₆₂] à $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ en milieu Na₂SO₄ à 0,5 mol.L⁻¹ et pH 5,5 (—) sans électrolyse ; (—) après électrolyse à -0,40 V/ECS (2^{ème} vague de réduction) ; (—) après électrolyse à -0,90 V/ECS (4^{ème} vague de réduction) ; (—) après électrolyse à -1,12 V/ECS (5^{ème} vague de réduction) et (—) après électrolyse à -1,30 V/ECS (6^{ème} vague de réduction). Electrode : carbone vitreux ; parcours optique : 1 cm. (c) Spectre d'absorption UV-visible d'une solution de α -K₂[P₂W₁₈O₆₂] à $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ et 0,13 mol.L⁻¹ (1%) de propan-2-ol ; (d) Illustration de la photocatalyse du POM sous illumination UV en présence de propan-2-ol.

2.4. Domaine d'application des polyoxométallates

La large gamme d'application des POMs repose sur leur aptitude à agir en tant que réservoirs d'électrons conjugués en raison de leur extrême variabilité concernant leurs propriétés moléculaires, y compris leur taille, leur forme, leur potentiel redox, leur densité de charge, leur solubilité, ou encore leur acidité. Ainsi, leurs domaines d'applications sont variés

et nombreux. Les POMs sont utilisés aussi bien dans le domaine médicale, biochimique, analytiques que dans le domaine de la catalyse.

En médecine, c'est principalement pour leurs propriétés antivirale, antitumorale et anticancéreuse qu'ils sont utilisés.³³ Il a été montré que des POMs étaient capables de tuer les cellules cancéreuses lors de l'injection d'un mélange d'acides phosphotungstique et phosphomolybdique de type Keggin à des patients atteints de cancers de l'intestin.³⁴ Les tumeurs cancéreuses n'étaient plus détectées à l'issue des analyses médicales au bout de quelques semaines après. Ceci a pu être expliqué par le fait que les POMs sont susceptibles d'être réduits en composés convenablement toxiques pouvant détruire les cellules cancéreuses.³⁵ Il a également été montré que les POMs possédaient des propriétés antivirales envers le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), à l'origine du sida. Bien que leur mode d'action soit à ce jour inconnu, M. Hervé *et al.* ont proposés que certains POMs, notamment le notamment le HPA-23 ($[\text{NH}_4]_{17}\text{Na}[\text{Na}(\text{SbW}_7\text{O}_{24})_3(\text{Sb}_3\text{O}_7)_2] \cdot 14\text{H}_2\text{O}$), jouerait un rôle dans l'inhibition de la transcriptase inverse, enzyme qui rétro-transcrit l'ARN viral en ADN viral.³⁶

Les POMs sont également exploitées pour des applications environnementales dans le cadre de la dépollution des eaux ou de l'air. De plus, ils sont capables, par photocatalyse, de dégrader les polluants organiques tels que les pesticides ou encore les dérivés chlorés du phénol.^{37,38} L'activité photocatalytique réductrice des POMs a été étudiés notamment vis-à-vis des cations issus de métaux lourds et toxiques tels que Hg^{II} [5] et Cr^{VI} [6]. La présence de POMs permet aux ions Hg^{II} de former des nanoparticules métalliques (Hg^0)_n qui précipitent (ou changent de phase pour former $\text{Hg}(\text{l})$) alors dans le milieu, tandis que les ions Cr^{V} sont capables d'être réduits en Cr^{III} moins toxiques que les ions Cr^{VI} et conduisant facilement à $\text{Cr}^{\text{III}}(\text{OH})_3$ qui précipite là encore dans le milieu, entraînant leur élimination par filtration.^{39,40}

En raison de leur facilité à se réduire, les POMs sont employés dans la catalyse dans la réduction de divers substrats ainsi à la surface d'une électrode, le POM réduit est ensuite ré-oxydé en réduisant à son tour le substrat tel que l'eau ou O_2 . C'est le cas rapporté lors de l'activation de la surface d'électrode de carbone vitreux par un POM qui fournit une plus grande efficacité lors de la réaction de dégagement d'hydrogène ou de la réduction du dioxygène O_2 .^{41,42}

3. Mesure du potentiel de réduction de l'hydroperoxyde de cumène

Pour l'étude du potentiel de nos allergènes, nous avons dû, d'abord, mettre en place des conditions expérimentales optimales. Pour cela, nous avons décidé de travailler avec un hydroperoxyde commerciale, l'hydroperoxyde de cumène (**Cum-OOH**). Une fois, ces

conditions optimisées avec ce composé, nous les avons appliquées aux études avec les molécules cibles.

3.1. Mesure directe

Dans un premier temps, des mesures dites directes, c'est à dire sans modification de la surface de l'électrode ont été réalisées. Pour ce faire, en raison de l'existence de différentes formes allotropes du carbone, diverses électrodes de carbone ont été testées. Dans ces expériences, les électrodes sont introduites dans une solution tampon phosphate de 10 mM, pH = 7,4 (V = 10 mL). Des expériences de contrôles sont réalisées avant l'ajout d'une solution de 1 mol.L⁻¹ de **Cum-OOH** dans une solution de tampon phosphate (10 mM) à pH = 7,4 (20 µL / ajout) (*Figure 21*). Un ajout de 20 µL d'une solution de 1 mol.L⁻¹ de **Cum-OOH** dans une solution de 10 mL correspond à un ajout de 2 mM de **Cum-OOH**.

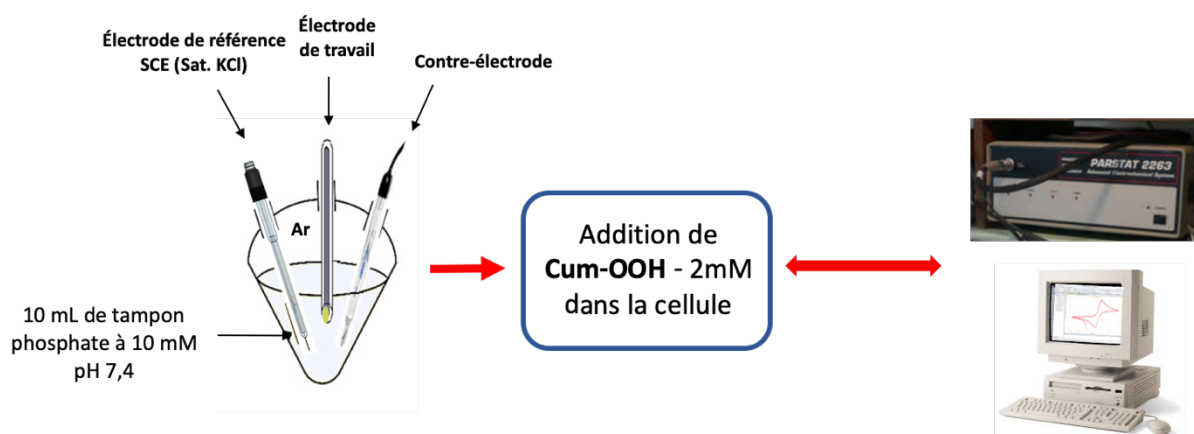
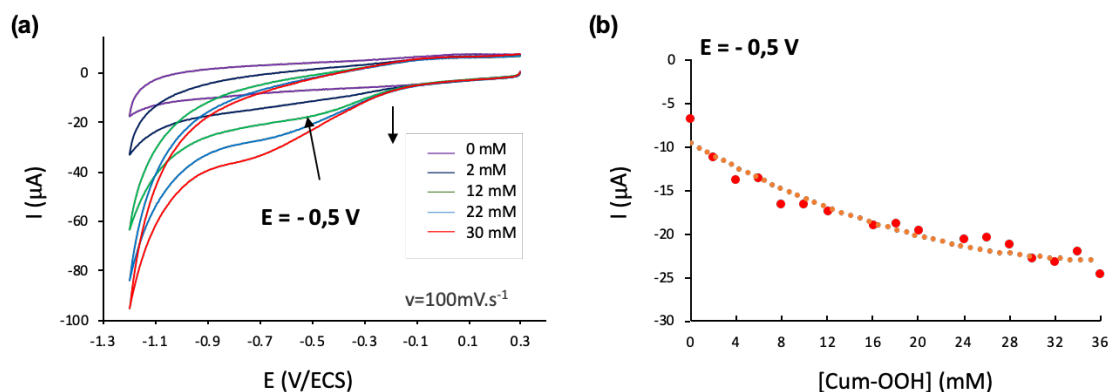


Figure 21 : Protocole expérimental mis au point pour les mesures directes.

3.1.1. Avec une électrode de carbone pyrolytique

L'étude est réalisée avec deux types d'électrodes de carbone pyrolytique BPPG et EPPG. Les résultats sont présentés pour les deux types d'électrodes pyrolytiques (*Figure 22*).

Basal Plan



Edge Plan

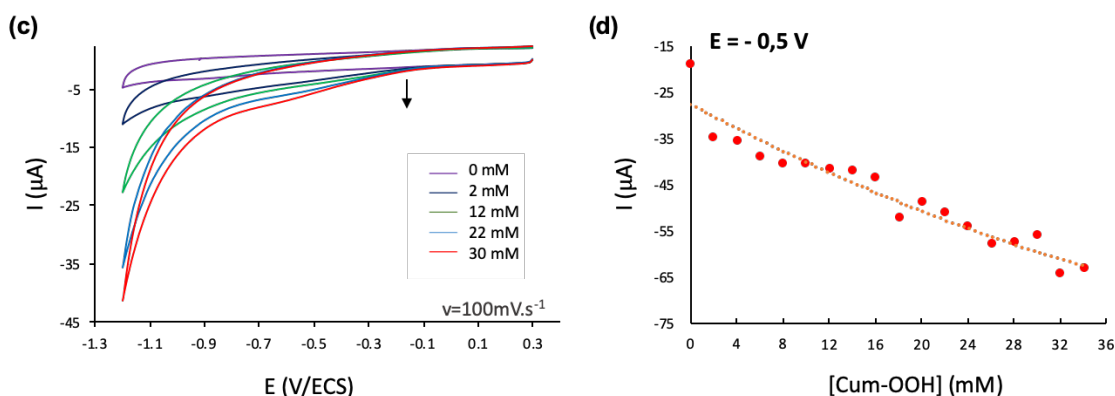


Figure 22 : Mesure directe avec les électrodes de carbone pyrolytique ; (a) voltamétrie cyclique avec l'électrode de carbone BGGP de **Cum-OOH** ; (b) Variation du courant de pic I_{p_c} en réduction en fonction de la concentration en **Cum-OOH** à une valeur de potentiel de $E = -0.5 \text{ V}$; (c) voltamétrie cyclique avec l'électrode de carbone EGGP de **Cum-OOH** ; (d) Variation du courant de pic en réduction I_{p_c} en fonction de la concentration en **Cum-OOH** à un potentiel de $E = -0.5 \text{ V}$. Dans les 2 type d'électrode de carbone pyrolytique, le diamètre était de 2 mm), ce qui correspond à une surface de $0,0314 \text{ cm}^2$. $v = 100 \text{ mV.s}^{-1}$.

À l'issue des résultats de ces deux types d'électrodes pyrolytique, nous observons une réponse sous forme d'une vague irréversible avec un potentiel situé entre $E = -0.3 \text{ V}$ à $E = -0.7 \text{ V}$. Le potentiel maximum du pic se décale au fur et à mesure de l'ajout de **Cum-OOH** (Figure 22a et Figure 22c). Ceci est classique dans le cas d'une réaction irréversible.

Pour ces deux électrodes, l'intensité du courant de pic en réduction I_{p_c} diminue (c'est-à-dire augmente en intensité, le courant étant négatif pour une réduction) plus la concentration en **Cum-OOH** présente dans le milieu est importante (Figure 22b et Figure 22d).

En présence de EPPG, le courant faradique associé à cette vague est un peu moins intense qu'avec une électrode du type BPPG. Cependant, pour les types d'électrodes, nous observons que plus la concentration augmente, plus la valeur de l'intensité du courant diminue.

Bien que ces deux électrodes soient de type pyrolytique, nous observons une meilleure réponse voltamétrique avec l'électrode de carbone de plan basal ce qui peut apparaître

contradictoire devant les résultats décrits par Banks *et al.*¹³ qui avaient montré que le taux de transfert d'électrons en présence de EPPG était beaucoup plus élevé que celui d'une BPPG. La différence observée peut être expliquée par la nature du composé étudié en l'occurrence le **Cum-OOH** et son interaction lors de l'absorption sur les deux types de plans (basale / edge).

3.1.2. Avec une électrode de carbone vitreux tournante du type « Radiometer »

L'électrode tournante est une électrode de carbone vitreux dont la rotation maintient le flux de matière stable dans la couche de diffusion. Pour ce faire, la rotation est fixée par un appareillage régulateur de vitesse relié à l'électrode tournante (*Figure 23*).

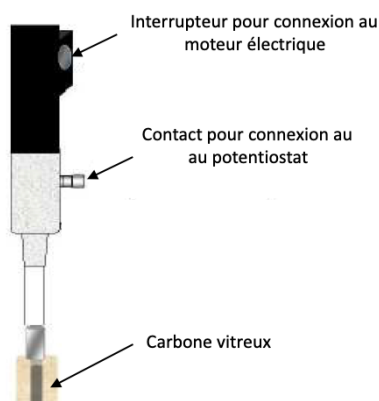


Figure 23 : Schéma d'une électrode tournante.

L'utilisation d'une électrode de carbone vitreux ne modifie pas le montage permettant d'effectuer la mesure voltammétrique.

Ainsi, dans la même optique que précédemment, un volume de 20 μL de **Cum-OOH**, d'une solution de 1 mol.L^{-1} , par mesure est ajouté à la solution contenue dans la cellule électrochimique. Les résultats obtenus sont présentés à la *Figure 24*.

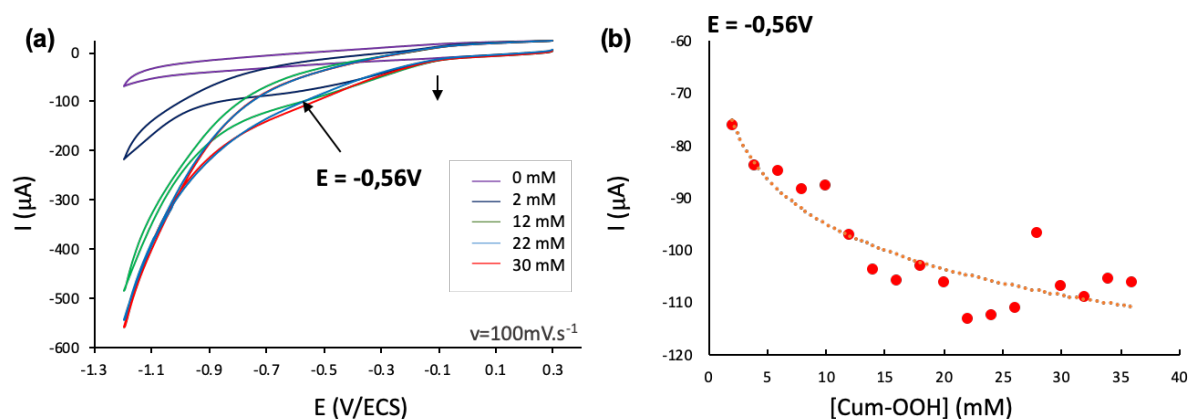


Figure 24 : Mesure directe avec l'électrode tournante de carbone vitreux ; (a) Voltammétrie cyclique ; (b) Variation du courant de pic I_{pc} en fonction de la concentration en **Cum-OOH** à un potentiel de $E = -0.56$ V. Le diamètre était de 3 mm), ce qui correspond à une surface de $0,0707 \text{ cm}^2$, soit une surface 2,25 fois plus grande que pour les électrodes pyrolytiques. $v = 100 \text{ mV.s}^{-1}$.

On observe toujours une réponse voltamétrique dans les mêmes domaines de potentiel. Le signal observé semble un peu moins bien résolu mais avec un courant de pic qui peut sembler plus grand. Il faut néanmoins noter, que le courant de pic dépend de la surface de l'électrode de travail. Les électrodes pyrolytiques avaient un diamètre de 2 mm (surface : 0.0314 cm^2) contre 3 mm dans le cas de l'électrode tournante Radiometer (surface : $0,0707 \text{ cm}^2$, 2,25 fois plus grande que pour les électrodes pyrolytiques). Si on rapporte le courant mesuré à la surface de l'électrode, la densité de courant mesuré est comparable.

L'ensemble des mesures nous permet de déduire qu'un potentiel caractéristique de la réduction du **Cum-OOH** est situé vers $E = -0,56\text{V}$. À ce potentiel, l'intensité au pic de réduction diminue (augmente en valeur absolue) avec une augmentation de la concentration en **Cum-OOH** (Figure 24b) montrant que le courant du pic en réduction est proportionnel à la concentration en solution.

3.1.3. Avec une électrode de carbone vitreux de Lorraine

L'utilisation de ce type d'électrode nous fournit une réponse bien plus représentative. En effet, une vague de potentiel est observée entre $E = -0.40 \text{ V}$ et $E = 0.84 \text{ V}$ avec un signal qui apparaît dès le premier ajout (2 mM de **Cum-OOH**, Figure 25a).

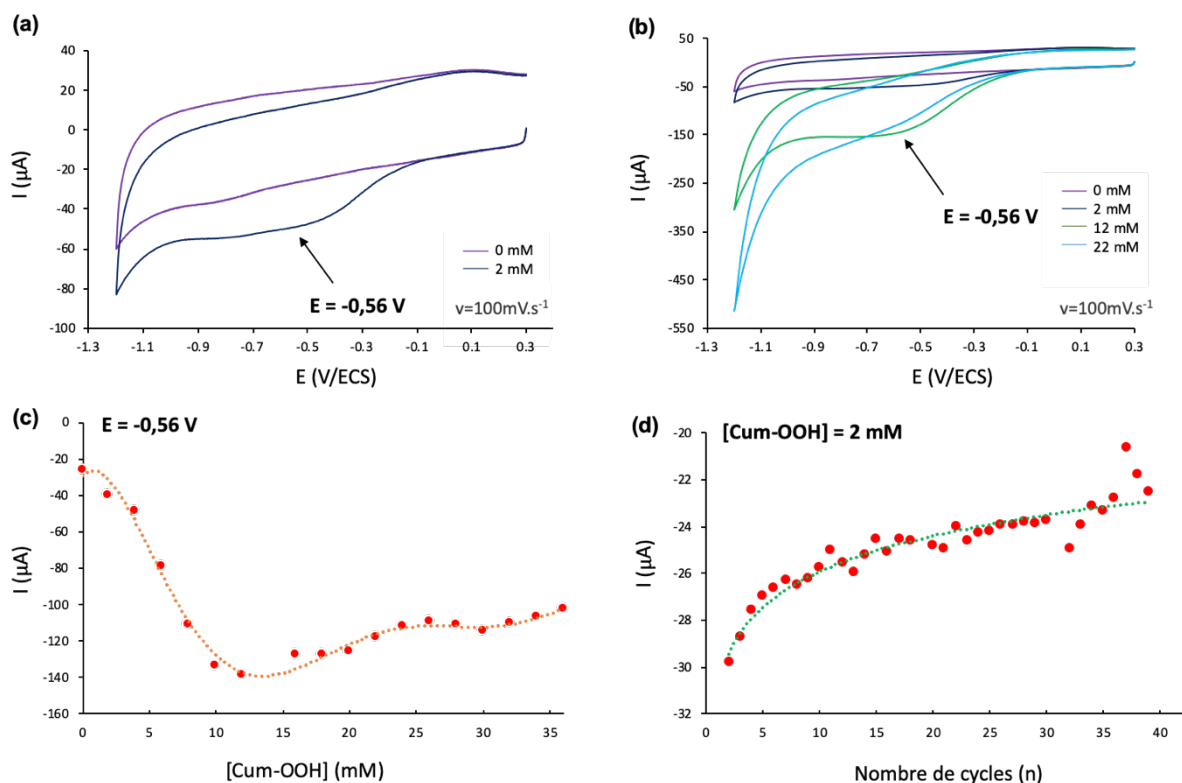


Figure 25 : Mesure directe avec une électrode de carbone vitreux ; (a) Voltammétrie cyclique à 0 et 2 mM ; (b) Évolution de la mesure de voltammétrie cyclique après un ajout de 12 mM puis 22 mM de **Cum-OOH** ; (c) Variation du courant I en fonction de la concentration en **Cum-OOH** à un potentiel de $E = -0.56 \text{ V}$. $v = 100 \text{ mV.s}^{-1}$.

L'ajout consécutif de 2 mM jusque 12 mM de **Cum-OOH** entraîne la présence d'un signal en réduction mieux défini vers -0.56 V (Figure 25b).

On peut noter que le courant de pic augmente en intensité entre 2 mM et 10 mM en **Cum-OOH** puis commence à diminuer de manière notable (Figure 25c). Ce comportement peut s'expliquer tout d'abord par une saturation possible de l'électrode de travail qui n'a plus le temps d'échanger tous les électrons avec les molécules de **Cum-OOH** qui arrivent au voisinage de l'électrode par diffusion pure. Les molécules de **Cum-OOH** arrivant à l'électrode n'ont donc plus le temps d'échanger des électrons avec l'électrode, d'être réduit et repart en solution. Cependant, dans ce cas de figure, on devrait obtenir un vrai plateau et non pas une diminution de courant du signal tel qu'observée.

Cette diminution et la non présence d'un plateau pourrait s'expliquer par un nombre de cycle de mesure important. Dans notre cas, à chaque cycle de mesure, on augmente de 2 mM la concentration de **Cum-OOH** (Figure 25c). De plus, on peut noter que pour une concentration initiale de **Cum-OOH** égale à 2 mM, l'intensité du signal en réduction tend à diminuer si on répète de manière itérative le nombre de scan (Figure 25d). Ceci tend à indiquer qu'au cours de l'électroréduction, la formation des intermédiaires de réaction radicalaires inhibe l'électrode

de carbone en se greffant sans doute à la surface de l'électrode. Dans ce cas, la modification de l'électrode est irréversible et augmente avec le nombre de cycle de mesure mais aussi avec la concentration initiale en solution de **Cum-OOH**. Ceci aboutit à la modification irréversible de l'état de surface de l'électrode carbone qui devient sans doute moins conductrice. Dans ce cas également, le transfert d'électrons avec le **Cum-OOH** qui arrive par diffusion vers l'électrode devient de plus en plus lent, le transfert se faisant à plus longue distance. Le transfert d'électrons moins rapide donne ainsi un courant de pic plus faible.

En polissant l'électrode de travail, on note en effet que l'on retrouve le signal correspondant au premier balayage ce qui semble confirmer l'hypothèse.

Après l'étude de ces quatre types d'électrodes, l'électrode de carbone vitreux (carbone de Lorraine) nous a permis de mesurer de manière directe un signal bien résolu pour la réduction de **Cum-OOH** avec un potentiel de réduction vers $E = -0.56$ V. De ce fait, l'électrode de carbone vitreux de Lorraine a été sélectionnée pour la poursuite des études avec une série d'allergènes cutanées synthétisés.

Dans un second temps, nous avons décidé de modifier cette électrode de carbone vitreux de Lorraine avec un polyoxométallate de type Dawson présentant une structure en sandwich. Celui-ci peut jouer le rôle de médiateur rédox dans le but d'augmenter de manière significative la réponse électrochimique pour la réduction des allergènes tel que le **Cum-OOH**. La présence du médiateur rédox a pour but d'augmenter la vitesse d'échange d'électrons et de ce fait d'augmenter l'intensité du signal. Ainsi, une étude avec le **Cum-OOH** commercial a tout été d'abord mise au point pour optimiser les conditions expérimentales avec ce type d'électrode avant de transférer la méthodologie à nos molécules cibles.

3.2. Mesure indirecte-modification de l'électrode de carbone vitreux de Lorraine

Afin d'augmenter la cinétique du transfert électronique, l'électrode de carbone vitreux de Lorraine a été modifiée avec des polyoxométallates du type Dawson. Un dérivé sandwich sous forme d'un dimère a été sélectionné pour cette étude. Le choix du POM a été fait en raison du nombre d'électrons échangé par vague de réduction qui se trouve être deux fois plus important par rapport au composé Dawson parent α -[P₂W₁₈O₆₂]⁶⁻.⁴³ Dans nos études, nous avons décidé de travailler avec le sandwich Na₁₄[Co^{II}₂(H₂O)₂Fe^{III}₂(P₂W₁₅O₅₆)₂].64H₂O, synthétisé par l'équipe de Ruhlmann et al.⁴⁴ (Figure 26). Ce composé sera par la suite abrégé {Co₂Fe₂P₄W₃₀}.

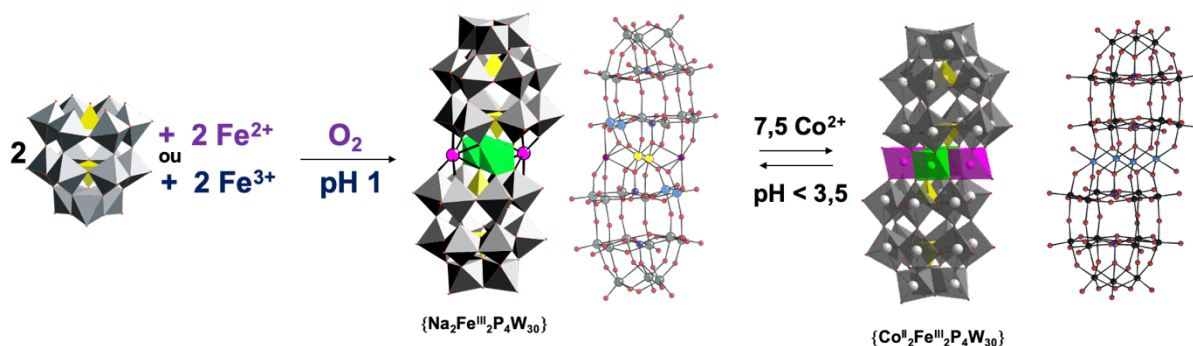


Figure 26 : Synthèse de $\text{Na}_{14}[\text{Co}^{\text{II}}_2(\text{H}_2\text{O})_2\text{Fe}^{\text{III}}_2(\text{P}_2\text{W}_{15}\text{O}_{56})_2] \cdot 64\text{H}_2\text{O}$.^{44, 45}

Dans un premier temps, le complexe précurseur $[\text{Na}_2\text{Fe}_2(\text{P}_2\text{W}_{15}\text{O}_{56})_2]^{16-}$ abrégé $\{\text{Na}_2\text{Fe}_2\text{P}_4\text{W}_{30}\}$ est construit *in situ* à $\text{pH} = 1,0$ par réaction de deux équivalents du trivalent α - $[\text{P}_2\text{W}_{15}\text{O}_{56}]^{12-}$ avec deux équivalents de $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{NO}_3)_3$.⁴⁵ Puis, un excès de Co^{2+} , 7,5 équivalents, a été ajouté entraînant une légère augmentation du pH (environ 3,5). L'excès de Co^{2+} est nécessaire pour remplacer complètement les atomes de Na^+ présents dans le cluster central $\{\text{Na}_2\text{Fe}_2\}$ par un déplacement de l'équilibre vers le centre saturé $\{\text{Co}_2\text{Fe}_{20}\}$ souhaité. Le pH est également un facteur déterminant pour la formation de $[\text{Co}_2\text{Fe}_2(\text{P}_2\text{W}_{15}\text{O}_{56})_2]^{14-}$ abrégé $\{\text{Co}_2\text{Fe}_2\text{P}_4\text{W}_{30}\}$.⁴⁴ Hill *et al.*⁴⁶ ont montré que si l'on se trouve à un pH relativement élevé (environ $\text{pH} 8-9$), la dégradation du POM serait alors induite, ce qui est en accord avec le phénomène classique de dégradation du squelette du POM en milieu alcalin.

Enfin, au cours des processus de photocatalyse, les POMs jouent le rôle de catalyseurs et dans le but de comprendre les mécanismes engendrés, nous nous sommes, dans un premier temps, intéressé à la photoréduction des POMs sous illumination UV.

3.2.1. Phtoréduction du polyoxométallate de type Dawson $\{\text{Co}_2\text{Fe}_2\text{P}_4\text{W}_{30}\}$

Les POMs forment une classe distincte de composés inorganiques métal oxygène en grappe qui est unique dans sa polyvalence topologique et électronique et utile dans des domaines aussi divers que la catalyse, l'analyse, la biochimie, la médecine et la science des matériaux.

Il a été montré que lorsque les POMsⁿ⁻ sont photochimiquement excités par illumination, ils deviennent alors des oxydants puissants capables d'extraire des électrons de composés organiques tel que le propan-2-ol conduisant à la photo-réduction des POMsⁿ⁻ et à la formation des POMs⁽ⁿ⁺¹⁾⁻ monoréduits. Cette opération peut se répéter plusieurs fois. Ainsi, les POMs⁽ⁿ⁺¹⁾⁻ peuvent à leur tour être excités par illumination et échanger un second électron en présence d'un médiateur rédox irréversible tel que le propan-2-ol. Dans le cas d'un polyanion du type

Dawson α -[P₂W^{VI}₁₈O₆₂]⁶⁻, il est possible d'injecter 6 électrons pour obtenir le dérivé de couleur bleu sombre [P₂W^V₆W^{VI}₁₂O₆₂]¹²⁻.

Photoréduction du {Co₂Fe₂P₄W₃₀}

Une solution aqueuse désoxygénée (30 minutes par barbotage avec Ar) contenant 2,13 × 10⁻⁵ mol.L⁻¹ de {Co₂Fe₂P₄W₃₀} et 0,13 mol.L⁻¹ de propan-2-ol (soit 1 % en volume) est irradiée par de la lumière UV-visible à l'aide d'une lampe Arc Xenon (300 W). Pour éviter l'échauffement de la solution un filtre avec de l'eau est utilisé pour couper tous les rayonnements dans l'infrarouge.

Progressivement, la solution se colore en bleu qui est de plus en plus foncée, ce qui se traduit par une accumulation de POMs à l'état réduit dans la solution et la présence d'une bande d'intervalle de plus en plus intense. L'évolution du spectre d'absorption au cours de l'irradiation est représentée *Figure 27b* et *Figure 27c*.

Avant irradiation (spectre bleu), seule est présente la bande à transfert de charges du POM {Co₂Fe₂P₄W₃₀} est caractérisée par la présence des bandes de transfert de charges LMCT de l'oxygène (Oxo) vers le tungstène (VI) (O-(2p) vers W(5d)) dans le spectre UV ($\lambda < 380$ nm) et aucune absorption dans le visible (*Figure 27b*).

Progressivement, une large bande d'absorption dans le visible apparaît entre 500 et 800 nm. Cette bande d'intervalle correspond à des transferts de charges entre de l'atome de tungstène au sein de l'espèce réduite (W^V-O-W^{VI} → W^{VI}-O-W^V). La délocalisation est de plus en plus importante avec le nombre d'électrons injectés dans le dérivé sandwich polyoxométallate. Ce transfert de charges se traduit par la coloration bleue de la solution. L'apparition des formes réduites dans le milieu entraîne également une diminution dans les bandes de transfert de charges observées en UV (*Figure 27c*).

Un décalage vers les petites longueurs d'onde du maximum de la bande d'intervalle au cours de l'irradiation (596 nm) montre la réduction graduelle du POM, en accord avec les études de E. Papaconstantinou et M. T. Pope.^{47,48} L'allure des courbes de l'évolution temporelle de l'absorbance à deux longueurs d'onde données, l'une dans l'UV ($\lambda_{\max} = 300$ nm) et l'autre dans le visible ($\lambda_{\max} = 596$ nm), faisant apparaître un palier vers 300 minutes pour obtenir [Co^{II}₂(H₂O)₂Fe^{II}₂(P₂W₁₅O₅₆)₂]²⁸⁻ résultant de la réduction des deux atomes de Fe (III) en Fe(II) et la réduction des 2 sous-unités {P₂W₁₅O₅₆} (2 fois 6 électrons) correspond à une injection dans la structure de 14 électrons au total (*Figure 27d*).

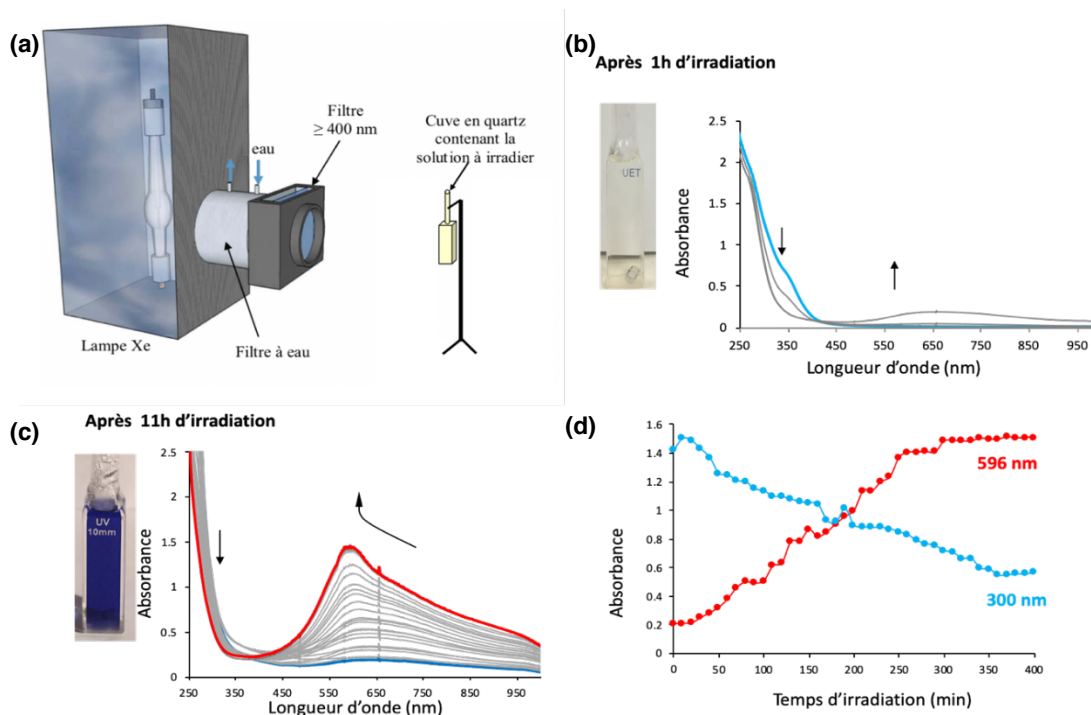
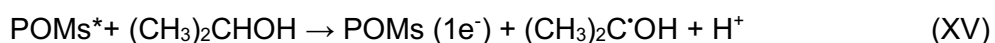


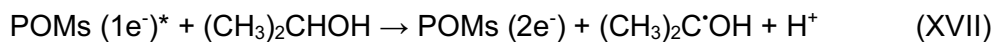
Figure 27 : (a) Montage utilisée pour la photoirradiation ; (b) Spectres d'absorption UV-visible au cours de l'irradiation lumineuse d'une solution aqueuse désoxygénée contenant $2,5 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹ du {Co₂Fe₂P₄W₃₀} et 0,13 mol.L⁻¹ de propan-2-ol après 1 h d'irradiation ; (c) Spectres d'absorption UV-visible au cours de l'irradiation lumineuse d'une solution aqueuse désoxygénée contenant $2,5 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹ du {Co₂Fe₂P₄W₃₀} et 0,13 mol.L⁻¹ (1%) de propan-2-ol après 11 h d'irradiation ; (d) Évolution temporelle de l'absorbance à 300 nm et 596 nm. Parcours optique : 1 cm.

Lorsque l'illumination est stoppée, le spectre d'absorption UV-visible-NIR reste identique pendant au moins 20 heures, ce qui traduit la bonne stabilité du POM photo-réduit en conditions anaérobies.⁴³ Mais, lorsque la cellule est ouverte à l'air, la couleur bleue de la solution disparaît en quelques heures et le spectre initial de {Co₂Fe₂P₄W₃₀} est récupéré indiquant l'oxydation totale des formes réduites par le dioxygène. Cette réaction est néanmoins lente.

Mécanisme proposé

Lors de l'irradiation du POM, les bandes de transfert de charges sont caractéristiques de la formation d'un état excité très oxydant permettant d'oxyder le propan-2-ol en radical alcool puis en acétone :





Le POM (2e-) biréduit peut également être excité et échanger des électrons avec le propan-2-ol. Cependant, dans le cas du dérivé sandwich polyoxométallate $[\text{Co}^{\text{II}}_2\text{Fe}^{\text{III}}_2(\text{P}_2\text{W}^{\text{VI}}_{15}\text{O}_{56})_2]^{14-}$, les deux premiers échanges d'électrons correspondent à la réduction des deux atomes de Fe(III) en Fe(II) donnant $[\text{Co}^{\text{II}}_2\text{Fe}^{\text{II}}_2(\text{P}_2\text{W}^{\text{VI}}_{15}\text{O}_{56})_2]^{16-}$, les réductions suivantes étant liées à la réduction des atomes de W(VI) en W(V).

Par conséquent, avec le polyoxométallate sandwich utilisé $[\text{Co}^{\text{II}}_2\text{Fe}^{\text{III}}_2(\text{P}_2\text{W}^{\text{VI}}_{15}\text{O}_{56})_2]^{14-}$ sous illumination en présence d'un excès d'un donneur sacrificiel d'électron tel que le propan-2-ol, une photo-réduction à quatorze électrons peut être obtenue (2 électrons pour la réduction des deux atomes de Fe(III) en Fe(II) plus 2×6 électrons pour la réduction de 2×6 W(VI) en W(V)) d'où la nécessité d'attendre au moins 300 minutes la fin de la réaction. On aboutit ainsi à un composé réduit quatorze fois $[\text{Co}^{\text{II}}_2\text{Fe}^{\text{II}}_2(\text{P}_2\text{W}^{\text{V}}_6\text{W}^{\text{VI}}_{11}\text{O}_{56})_2]^{28-}$.

3.2.2. Modification des électrodes par le POM@GO

Le graphène a attiré beaucoup d'attention en raison de ses propriétés électroniques et optiques, ainsi que de sa grande robustesse et de sa stabilité environnementale, qui lui permettent de nombreuses applications.^{49,50} Des développements récents utilisent l'oxyde de graphène (GO) comme précurseur de matériaux à base de graphène, qui nécessite un procédé approprié pour obtenir de l'oxyde de graphène réduit (rGO) par des procédés chimiques, thermiques ou photoinduit (*Figure 28*).⁵¹

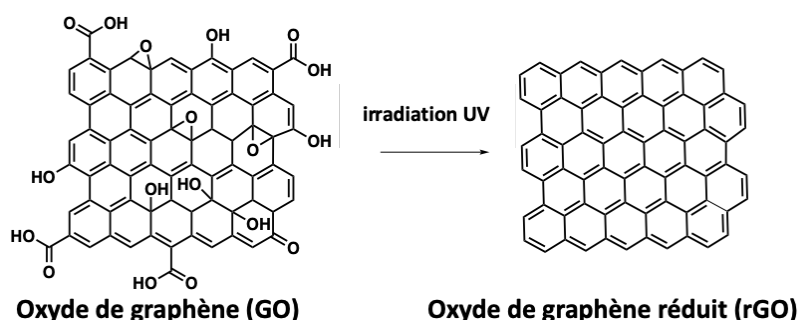


Figure 28 : Photoréduction de l'oxyde de graphène (GO) en oxyde de graphène réduit (rGO).

Récemment, il a été démontré que la photoréduction de l'oxyde de graphène pouvait être assistée par les polyoxométallates formant ainsi ce qui est appelé des nanocomposites.⁵¹ Il a également été constaté que la photoréduction assistée par les POMs, peuvent se produire

dans des films assemblés couche par couche qui peuvent être transformés en dispositifs électroniques à base de graphène comme des transistors et des microélectrodes.⁵¹

De plus, des nanocomposites POM@rGO ayant des propriétés électroanalytiques sensibles et électrocatalytiques importantes ont également été conçues par photoréduction assistée par du POM. Ces travaux ont démontré que les POMs sont des photocatalyseurs nanométriques adaptés à la préparation des rGO. De plus, les POMs possèdent une bonne capacité d'accepteur d'électrons mais également des caractéristiques semi-conductrices à zéro dimension.⁵²

Le transfert subséquent d'électrons des POMs photoréduits vers le GO conduit à la réduction de GO (*Figure 29*). Pour ce faire, à l'issue de la photo irradiation de 11 heures (une nuit, pour être sûr d'avoir totalement réduit $\text{Co}_2\text{Fe}_2\text{P}_4\text{W}_{30}$ ($14e^-$) sous forme $\text{Co}_2\text{Fe}_2\text{P}_4\text{W}_{30}$ ($28e^-$) une quantité de GO est introduite dans la cellule en quartz sous agitation. Cette manœuvre doit être effectuée rapidement en empêchant l'entrée de dioxygène dans la solution entraînant l'oxydation de la forme réduite de $\text{Co}_2\text{Fe}_2\text{P}_4\text{W}_{30}$ ($28e^-$) de tel sorte que :



La quantité en GO a été déterminée à l'issue d'une multitude de test faisant varier les proportions en GO. A l'issue de cette photoirradiation, la solution obtenue présente un précipité noir en suspension qui dans le but d'assurer la conductivité, ne doit pas se trouver en quantité trop importante. Dans ce cas, la présence d'agrégat de rGO sur l'électrode empêcherait le bon transfert des électrons. La présence du POM réduit qui s'absorbe en surface du rGO permet d'éviter son agrégation. Dans le cas d'une quantité de POM utilisée trop faible, une grande partie du GO ne sera pas réduite et la quantité de POM ne sera pas suffisante pour empêcher l'agrégation aboutissant à une conductivité qui sera mauvaise. Ainsi, après divers essais en présence de différents volumes de GO : 150, 125, 100, 75, 50, 25, 10 et 5 μL de GO, c'est avec 25 μL de GO (2mg/mL, dispersion dans H_2O) que qu'on obtient un matériau présentant les meilleures performances en terme de conductivité électrique.

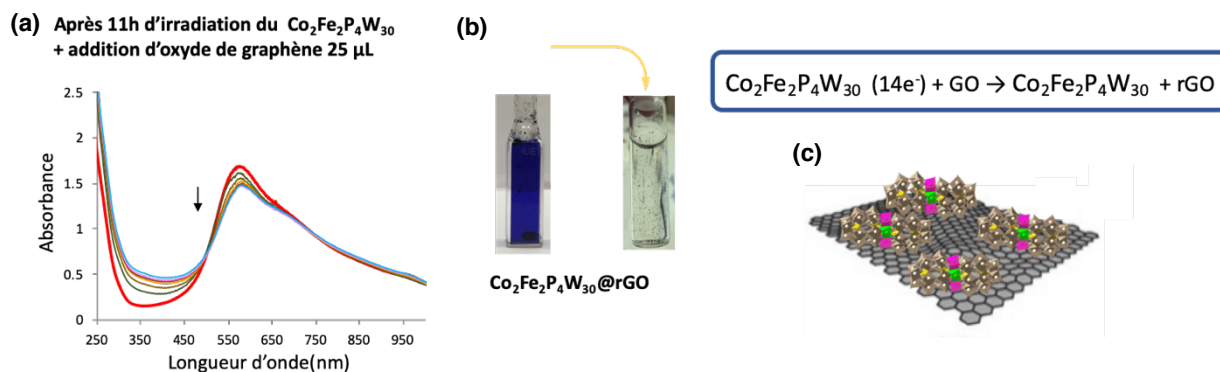


Figure 29 : (a) Spectre UV-visible au cours de la photoréduction de GO en rGO ; (b) apparition de précipité correspondant à rGO. $\text{Co}_2\text{Fe}_2\text{P}_4\text{W}_{30}$ ($28e^-$) présente coloration bleue. La solution se décolore en condition aérobie avec le temps après l'ajout de GO. En fin de réduction une suspension noire correspondant au rGO est obtenue ; (c) représentation de rGO assisté par le POM réduit $\text{Co}_2\text{Fe}_2\text{P}_4\text{W}_{30}$ ($28e^-$) communément abrégé $\text{Co}_2\text{Fe}_2\text{P}_4\text{W}_{30}@r\text{GO}$.

Une fois cette solution préparée, l'ultime étape consiste en la modification de l'électrode de carbone vitreux initialement polie. Pour ce faire, l'électrode de carbone doit avoir subi des processus de polissage permettant d'avoir une surface d'électrode propre et non polluée. La présence d'impuretés conduirait à une réponse électrochimique pouvant fausser l'interprétation de nos résultats. Sur cette électrode, une quantité de $\text{Co}_2\text{Fe}_2\text{P}_4\text{W}_{30}@r\text{GO}$ est ensuite déposée ($5 \mu\text{L}$ / dépôt) puis laissée à l'air libre pour séchage. Une fois la gouttelette évaporée, un autre dépôt est effectué et ce jusqu'à atteindre la quantité souhaitée. Une fois, terminé, une quantité de Nafion® est déposée dans le but de stabiliser et fixer le film déposé (Figure 30).

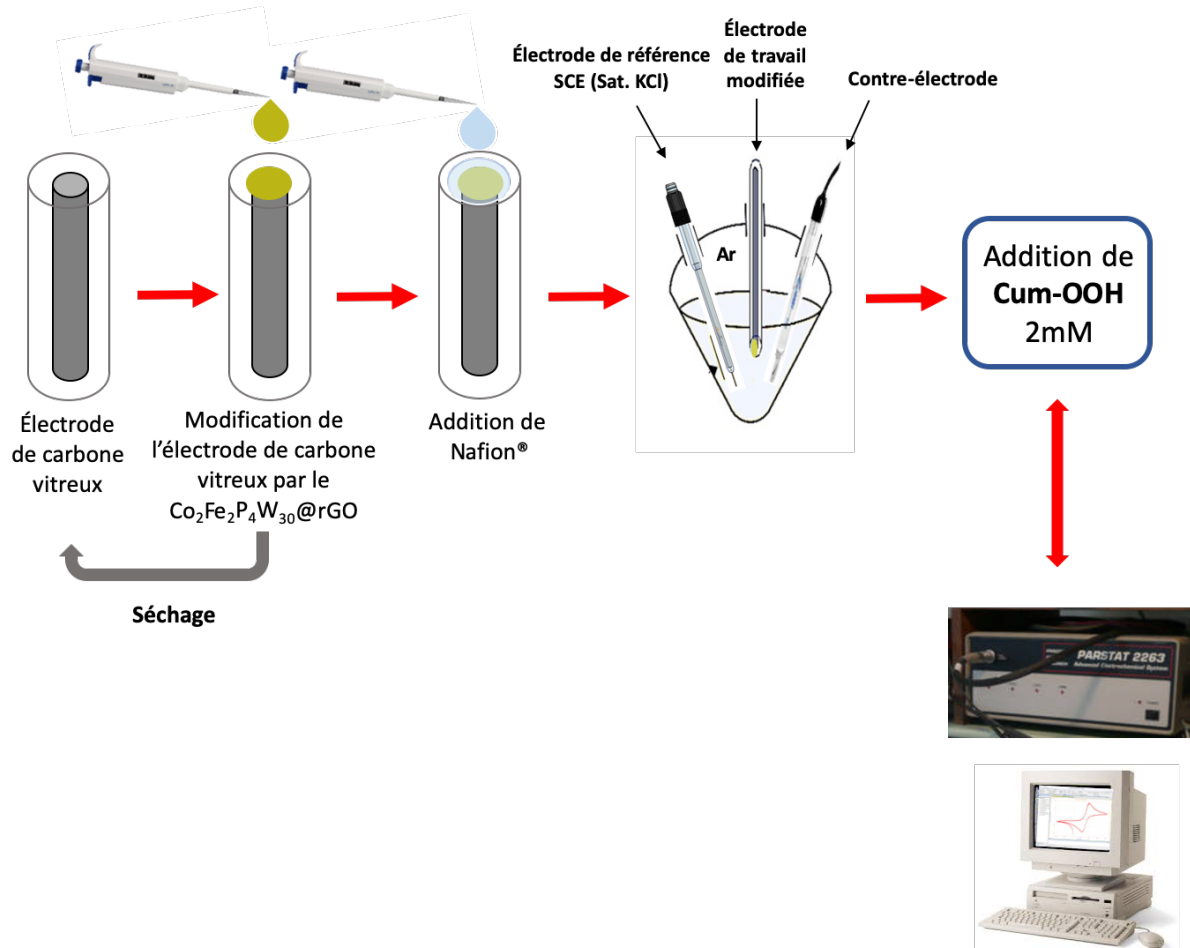


Figure 30 : Étapes de modification de l'électrode de carbone vitreux.

Ainsi, le **Cum-OOH** peut être réduit à la surface de cette électrode modifiée engendrant la formation de radicaux carbonés et oxygénés (Figure 31). Ceux-ci, dans un second temps, peuvent inhiber l'électrode modifiée (Nafion® et POM@rGO). Les radicaux peuvent ainsi se greffer sur le rGO aboutissant à une diminution de la conductivité du graphène oxyde réduit.

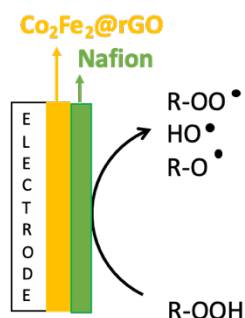


Figure 31 : Réaction de l'hydroperoxyde (R-OOH) avec le film conduisant à la formation de radicaux qui expliquerait à l'origine de la réponse voltamétrique observée.

Dans le cadre de la mesure du potentiel de réduction de **Cum-OOH**, nous avons dans un premier temps fait varier les quantités de **Co₂Fe₂P₄W₃₀@rGO** sur l'électrode puis celle du Nafion® dans le but d'obtenir les conditions expérimentales optimales nous permettant d'observer la meilleure réponse voltamétrique. Ainsi, nous avons travaillé avec les quantités en **Co₂Fe₂P₄W₃₀@rGO** et Nafion® présentées dans le *Tableau 1*.

Tableau 1 : Résumé des essais réalisés en faisant varier les quantités en en **Co₂Fe₂P₄W₃₀@rGO** et Nafion®

Co₂Fe₂P₄W₃₀@rGO (μ L)	Nafion® (μ L)
200	5
180	5
160	10
160	5
140	20
140	5
100	20
100	5
50	20
50	5

Les conditions optimales ont été déterminées tout d'abord en comparant les différents spectres de voltamétrie cyclique après une variation des quantités en **Co₂Fe₂P₄W₃₀@rGO** pour 5 μ L Nafion®.

On observe que le Nafion® influence le signal détecté. En effet, en présence de 5 μ L de Nafion®, on peut observer les réductions successives caractéristiques d'un polyoxométallate avant l'ajout de **Cum-OOH** (*Figure 32a*), les deux premières réductions sont associées aux réductions des deux Fe(III) en Fe(II) mais se déroulent de manière successive et sont monoélectroniques. Les signaux détectés montrent ainsi une évolution du dérivé sandwich polyoxométallate induit par le bas pH imposé par le Nafion® (pH proche de 0). $[\text{Co}^{\text{II}}_2\text{Fe}^{\text{III}}_2(\text{P}_2\text{W}^{\text{VI}}_{15}\text{O}_{56})_2]^{14-}$ évolue ainsi à bas pH imposé par le Nafion® et montre l'éviction des deux atomes de Co^{2+} aboutissant à la formation du dérivé sandwich $[\text{H}_2\text{Fe}^{\text{III}}_2(\text{P}_2\text{W}^{\text{VI}}_{15}\text{O}_{56})_2]^{16-}$ suite à l'éviction des deux atomes de Co^{2+} . Cela a déjà été observé également en solution à des pH inférieurs à 2,5. Cette éviction avait été suivi par spectroscopie UV-visible, électrochimie et RMN du ^{13}P .³²

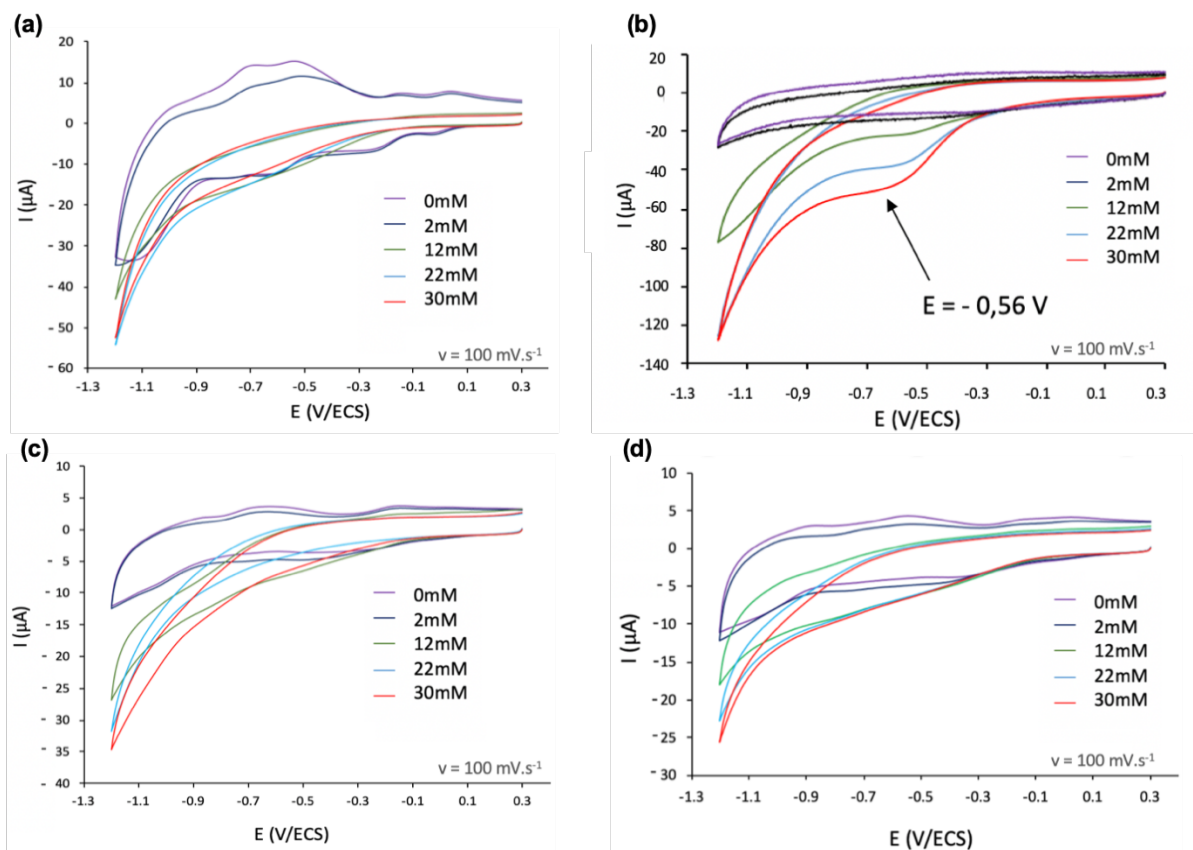


Figure 32 : Voltamétrie cyclique du **Cum-OOH** avec une électrode de carbone vitreux modifiée par 5 μL de Nafion® et (a) 100 μL de **Co₂Fe₂P₄W₃₀@rGO** ; (b) 140 μL de **Co₂Fe₂P₄W₃₀@rGO** ; (c) 160 μL de **Co₂Fe₂P₄W₃₀@rGO** et (d) 180 μL de **Co₂Fe₂P₄W₃₀@rGO**. $v = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Par contre pour l'électrode préparée avec 100 μL de **Co₂Fe₂P₄W₃₀@rGO** en présence de 5 μL de Nafion® (Figure 32a) présentant une bonne réponse électrochimique pour le polyanion, l'ajout de **Cum-OOH** induit une perte des signaux initiaux. On n'observe pas dans ce cas le signal typique de la réduction de **Cum-OOH**.

De plus, en présence d'une quantité plus importante de **Co₂Fe₂P₄W₃₀@rGO** pour la préparation de l'électrode modifiée (140 μL) en présence de **Cum-OOH**, une meilleure réponse pour la réduction de **Cum-OOH** est observée (Figure 32b) malgré le fait que l'on ne voit presque pas la réduction du polyanion.

Enfin, avec une quantité encore plus élevée de **Co₂Fe₂P₄W₃₀@rGO** (160 μL et 180 μL), le signal de réduction de **Cum-OOH** est de nouveau difficilement observable et faible (Figure 32c et Figure 32d).

En conclusion, le meilleur système est celui constitué de 140 μL de **Co₂Fe₂P₄W₃₀@rGO** en présence de 5 μL de Nafion®. L'électrode modifiée permet une bonne détection de la réduction de **Cum-OOH** bien que les signaux de réduction du composé sandwich **Co₂Fe₂P₄W₃₀** ne soient plus visibles.

On observe que la quantité de Nafion® influence également le signal détecté. En effet, en présence de 5 μL de Nafion® avec 140 μL de $\text{Co}_2\text{Fe}_2\text{P}_4\text{W}_{30}\text{@rGO}$, on peut observer lors de l'ajout de **Cum-OOH** (Figure 33a) les signaux caractéristiques de la réduction de **Cum-OOH**. On observe, lors de l'addition de quantité croissante de **Cum-OOH** une vague de réduction caractéristique déjà observée par réduction directe à $E = -0,56\text{ V}$ (Figure 33a).

Cependant, en présence d'une quantité plus importante (20 μL) de Nafion®, l'intensité du courant mesurée lors de l'ajout de **Cum-OOH** (Figure 33b) devient très faible. La faible quantité du médiateur rédox et du graphène oxyde réduit $\text{Co}_2\text{Fe}_2\text{P}_4\text{W}_{30}\text{@rGO}$ à l'interface ne permet pas d'avoir un échange efficace d'électron.

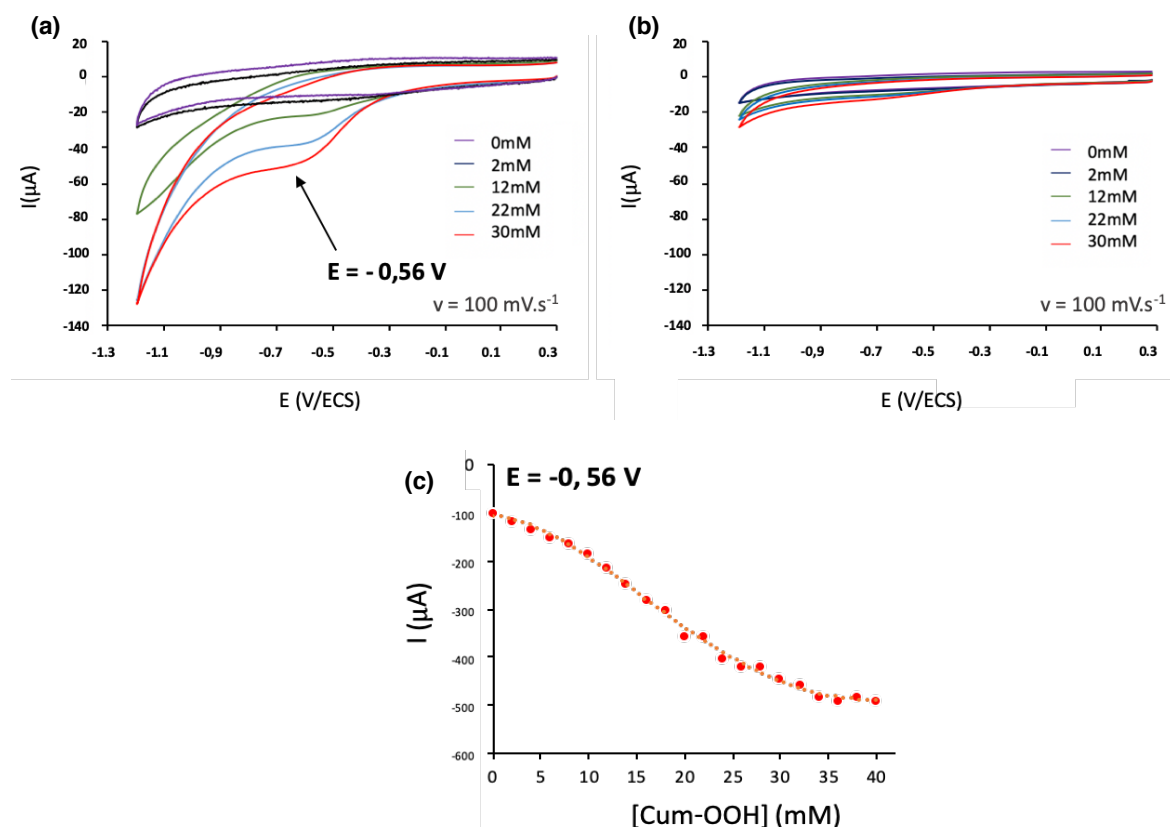


Figure 33 : Comparaison des voltamétries cycliques en faisant varier les quantités de Nafion® (a) avec 5 μL ; (b) avec 20 μL ; (c) Variation du courant I_p en fonction de la concentration en **Cum-OOH** à un potentiel de 0,56 V issue de l'étude (a). $v = 100\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Il est important de noter qu'au potentiel de $E = -0,56\text{ V}$, l'intensité du courant de pic I_p diminue (augmente en valeur absolue) plus la concentration en **Cum-OOH** dans le milieu augmente (Figure 37c). De nouveau, lorsque l'on atteint des concentrations supérieures à 20 mM en **Cum-OOH**, on atteint un palier montrant de nouveau une « saturation » du signal.

Le comportement électrochimique de ce complexe sandwich mixte métallique a été étudié en solution aqueuse et, comparé à celui que nous avons obtenu (Figure 34).^{32,44} À pH 3,5, il a été montré que $\text{Co}_2\text{Fe}_2\text{P}_4\text{W}_{30}$ était stable et dans la plage de potentiel négatif, on observe

d'abord une vague de réduction du Fe (III) en Fe (II), suivie de trois processus successifs de réduction du tungstène, ce qu'on retrouve en comparant la VC obtenue dans nos conditions expérimentales.³²

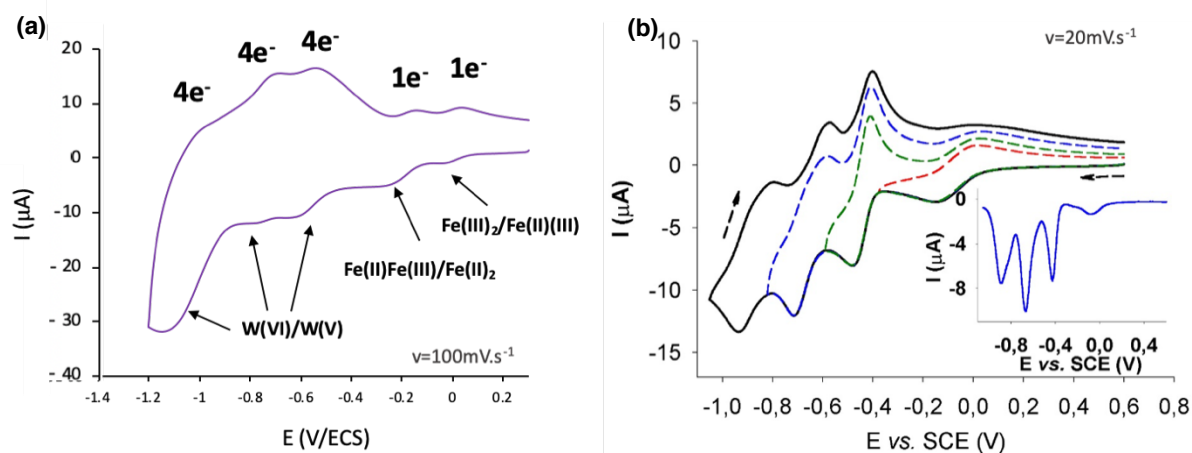


Figure 34 : Voltamétrie cyclique (a) 100 μL $\text{Co}_2\text{Fe}_2\text{P}_4\text{W}_{30}\text{@rGO}$ en présence de 5 μL de Nafion® ; (b) Voltamétrie cyclique de $\text{Co}_2\text{Fe}_2\text{P}_4\text{W}_{30}$ dans 0,5 M $\text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4$ à pH 2,52 avec une électrode de carbone vitreux.³²

La Figure 35 présente les VC de $\text{Co}_2\text{Fe}_2\text{P}_4\text{W}_{30}\text{@rGO}$ à différentes vitesses de balayage (de 5 à 500 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$). La Figure 35c montre que la courbe du courant cathodique et anodique est proportionnelle à la vitesse de balayage ; lorsque la vitesse de balayage augmente, les courants de crête anodique et cathodique décroissent linéairement. Cela indique que le processus d'oxydoréduction électrochimique est un phénomène de transfert d'électrons dominé par la surface du catalyseur $\text{Co}_2\text{Fe}_2\text{P}_4\text{W}_{30}\text{@rGO}$.⁵³ Ces résultats démontrent clairement que le processus de transfert de charges dans $\text{Co}_2\text{Fe}_2\text{P}_4\text{W}_{30}\text{@rGO}$ est un phénomène de surface.⁵³

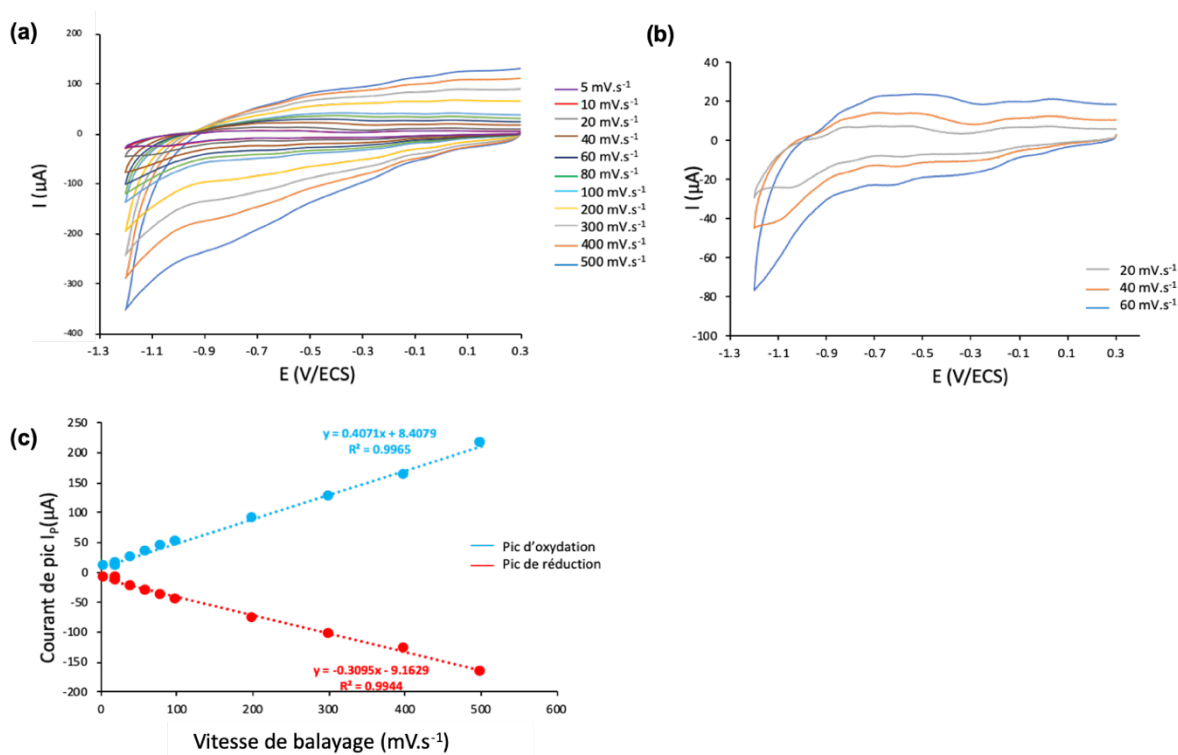


Figure 35 : Voltamétrie cyclique de (a) $\text{Co}_2\text{Fe}_2\text{P}_4\text{W}_{30}@r\text{GO}$ à différente vitesse de balayage (de 500 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ à 5 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$; (b) $\text{Co}_2\text{Fe}_2\text{P}_4\text{W}_{30}@r\text{GO}$ à 20 ; 40 et 60 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ (c) Étude de la variation du courant en fonction de la vitesse de balayage au niveau de la troisième réduction.

4. Mesure du potentiel de réduction des molécules cibles

Pour la mesure des potentiels de réduction de nos molécules cibles, notre choix s'est tourné vers l'utilisation d'électrode de carbone vitreux de Lorraine en raison de ces résultats lors des tests avec le **Cum-OOH**. Pour ce faire, des mesures directes sur l'électrode de carbone vitreux ont tout d'abord été réalisées, suivies des mesures indirectes avec une électrode de carbone modifiée par du $\text{Co}_2\text{Fe}_2\text{P}_4\text{W}_{30}@r\text{GO}$ en présence de Nafion®.

4.1. Mesure du potentiel de l'ascaridol

Mesure directe du potentiel de l'Asc

En utilisant le protocole identique aux études avec le **Cum-OOH**, 2 mM (20 μL) d'une solution de 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ d'Ascaridol (**Asc**) est introduite dans la cellule de travail. Puis une mesure est réalisée. Ainsi, la Figure 36 présente les résultats obtenus.

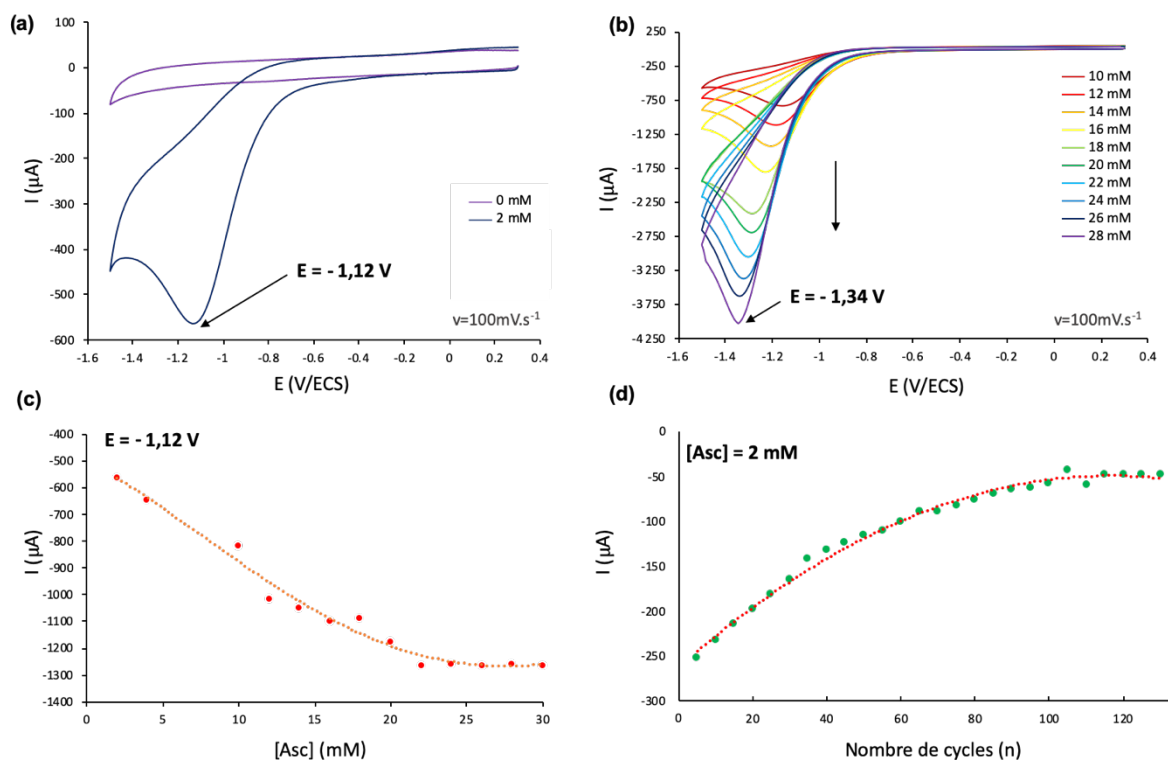


Figure 36 : (a) Voltamétrie cyclique de l'Asc, à 2 mM avec une électrode de carbone vitreux ; (b) Évolution de la voltamétrie cyclique de l'Asc, après ajout successif de 2 mM d'Asc ; (c) Évolution du courant I en fonction de la concentration ; (d) Évolution du courant I en fonction du nombre de cycle avec une concentration de 2 mM d'Asc. $v = 100 \text{ mV.s}^{-1}$.

En présence d'électrode de carbone vitreux non modifiée, un potentiel de réduction est mesuré en présence de 2 mM d'Asc à $E = -1,12 \text{ V}$ (Figure 36a). Lors de l'ajout successif de 2 mM d'Asc dans la solution, ce potentiel varie jusqu'à atteindre une valeur de $E = -1,34 \text{ V}$ en présence de 28 mM d'Asc (Figure 36b). Ceci est habituel dans le cas d'un processus irréversible. On peut noter que le potentiel est beaucoup plus négatif que pour le Cum-OOH mesurés vers -0.56 V / ECS .

On peut également observer qu'à un potentiel de $E = -1,12 \text{ V}$, plus la concentration en Asc augmente, plus l'intensité du signal en réduction augmente (Figure 36c) ceci de manière linéaire jusqu'à 20 mM d'Asc. On delà de 20 mM d'Asc on observe la présence d'un palier montrant que l'on arrive plus à réduire tout l'Asc qui arrivent à l'électrode par diffusion arrivant à une « saturation ».

Enfin, lorsque la concentration est maintenue à 2 mM, l'intensité du courant de pic croit en fonction du nombre de cycle successif (Figure 36d) comme déjà observé dans le cas de Cum-OOH indiquant que les radicaux formés lors de la réduction attaquent l'électrode de carbone

et l'inhibe. En polissant l'électrode de travail, on note en effet que l'on retrouve le signal correspondant au premier balayage ce qui semble confirmer l'hypothèse.

Mesure indirecte du potentiel de l'Asc

En présence de $\text{Co}_2\text{Fe}_2\text{P}_4\text{W}_{30}\text{@rGO}$ 140 μL + Nafion® 5 μL , dès l'ajout de 2 mM d'Asc, un signal pour la réduction de l'Asc à -1,29 V (Figure 37a et Figure 37b). Cette valeur de potentiel augmente plus la concentration d'Asc augmente. À une concentration de 36 mM, une réponse à $E = -1,50$ V est obtenue (Figure 37c). Au potentiel de $E = -1,29$ V, l'intensité du courant de pic I_p diminue (augmente en valeur absolue) plus la concentration en Asc dans le milieu augmente (Figure 37d). De nouveau, lorsque l'on atteint des concentrations supérieures à 20 mM en Asc, on atteint un palier montrant de nouveau une « saturation » du signal. Une partie de l'Asc qui parvient par diffusion à l'électrode n'arrive plus à échanger des électrons et être réduit montrant de cette façon la limite cinétique à la vitesse de balayage $v = 100$ mVs^{-1} .

En modifiant l'électrode, un comportement similaire est observé par rapport à l'électrode non fonctionnalisée.

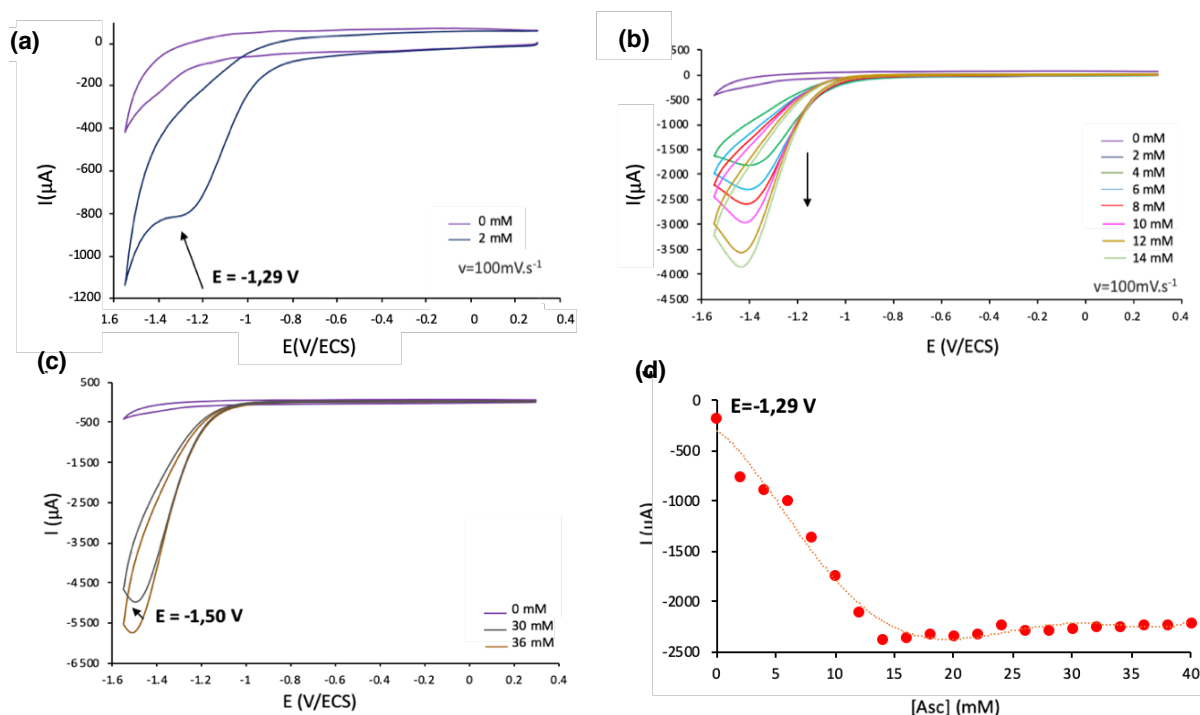


Figure 37 : (a) Voltamétrie cyclique de l'Asc, à 2 mM avec une électrode de carbone vitreux modifiée avec du $\text{Co}_2\text{Fe}_2\text{P}_4\text{W}_{30}\text{@rGO}$ 140 μL + Nafion® 5 μL ; (b) Voltamétrie cyclique après ajout successif de 2 mM d'Asc ; (c) Voltamétrie cyclique après un ajout de 36 mM d'Asc ; (d) Évolution du courant de pic I_p en fonction de la concentration en Asc contenu dans la cellule. $v = 100$ mV.s^{-1} .

4.2. Mesure du potentiel des hydroperoxydes dérivés du *R*-(+)-limonène

Mesure directe du potentiel du *Lim*-2-OOH

Lors de l'étude du **Lim-2-OOH** en présence de l'électrode de carbone vitreux non modifiée nous observons du nouveau un signal de réduction qui est détecté dès l'ajout de 2 mM de **Lim-2-OOH**. Ce signal disparaît au fur et à mesure de l'ajout consécutif de 2 mM de **Lim-2-OOH** et des mesures (*Figure 38a*, *Figure 38b* et *Figure 38c*). Ceci peut être expliqué par le fait que la surface de l'électrode subit une attaque virulente des radicaux issus de la réduction du **Lim-2-OOH**. L'électrode est ainsi inhibée après quelques mesures et balayages itératifs, lors des ajouts de **Lim-2-OOH**.

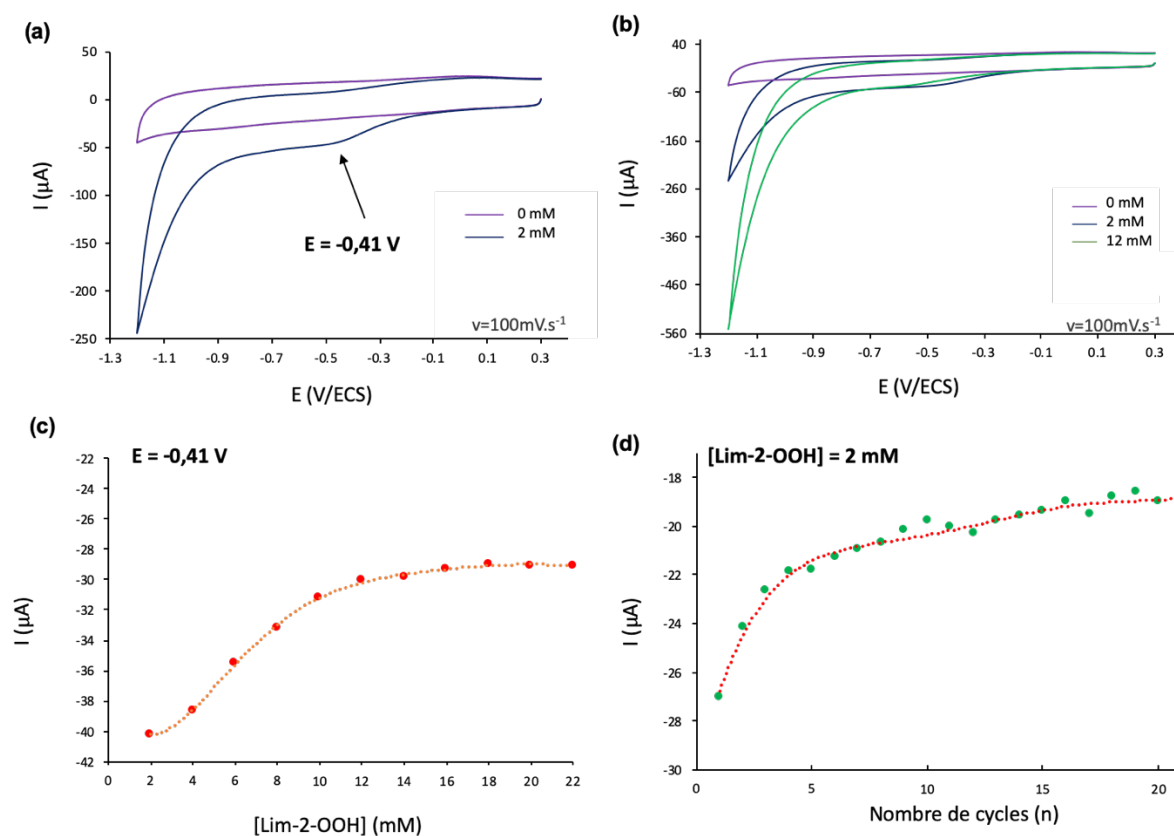


Figure 38 : (a) Voltamétrie cyclique du **Lim-2-OOH** à 2 mM avec une électrode de carbone vitreux ; (b) Voltamétrie cyclique du **Lim-2-OOH** à 12 mM ; (c) Effet de la concentration sur le courant à un potentiel de $E = 0,41\text{ V}$; (d) Évolution du courant I en fonction du nombre de cycle avec une concentration de 2 mM de **Lim-2-OOH**. $v = 100\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Dans le cas d'un polissage de l'électrode, on récupère le signal qui de nouveau diminue rapidement au bout de quelques balayages itératifs (*Figure 39*).

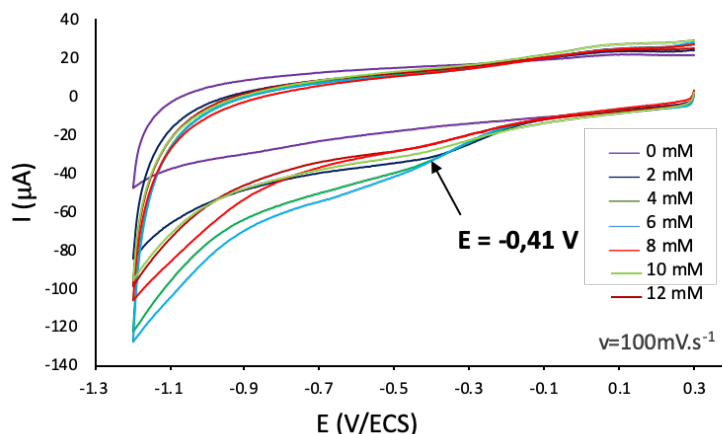


Figure 39 : Voltamétrie cyclique en présence de 2 mM de **Lim-2-OOH** avec une électrode de carbone vitreux en effectuant un polissage avant chaque mesure.

Mesure indirecte du potentiel du **Lim-2-OOH**

En présence de **Co₂Fe₂P₄W₃₀@rGO** 140 µL + Nafion® 5 µL, deux signaux successifs sont cette fois-ci mesurés à -0,36 V et -0,94 V dès l'ajout de 2 mM de **Lim-2-OOH** (Figure 40a). La première réduction correspond à la réduction des atomes de Fe(III) en Fe(II) du polyanion **Co₂Fe₂P₄W₃₀**. Le fait que le courant devient plus grand à l'addition du **Lim-2-OOH** semble montrer que le couple Fe(III)/Fe(II) catalyse la réduction du **Lim-2-OOH**. Le second signal à -0,94 V se rapproche de la mesure directe de la réduction du **Lim-2-OOH** mesuré à -1.12 V mais correspond aussi à une vague de réduction du polyanion. En présence de 12 mM de **Lim-2-OOH**, on continue d'observer ces deux signaux (Figure 40b). Cependant, l'ajout de 2 mM de manière successive montre que l'intensité de signal à E = -0,36 V augmente peu contrairement au signal observé à E = -0,94 V (Figure 40c). Néanmoins, l'intensité du courant de pic I_p décroît après les 5 premiers ajouts de **Lim-2-OOH** (à partir de 10 mM). Au-delà de 25 mM, on atteint cependant un plateau montrant un signal de réduction qui se stabilise (Figure 40d).

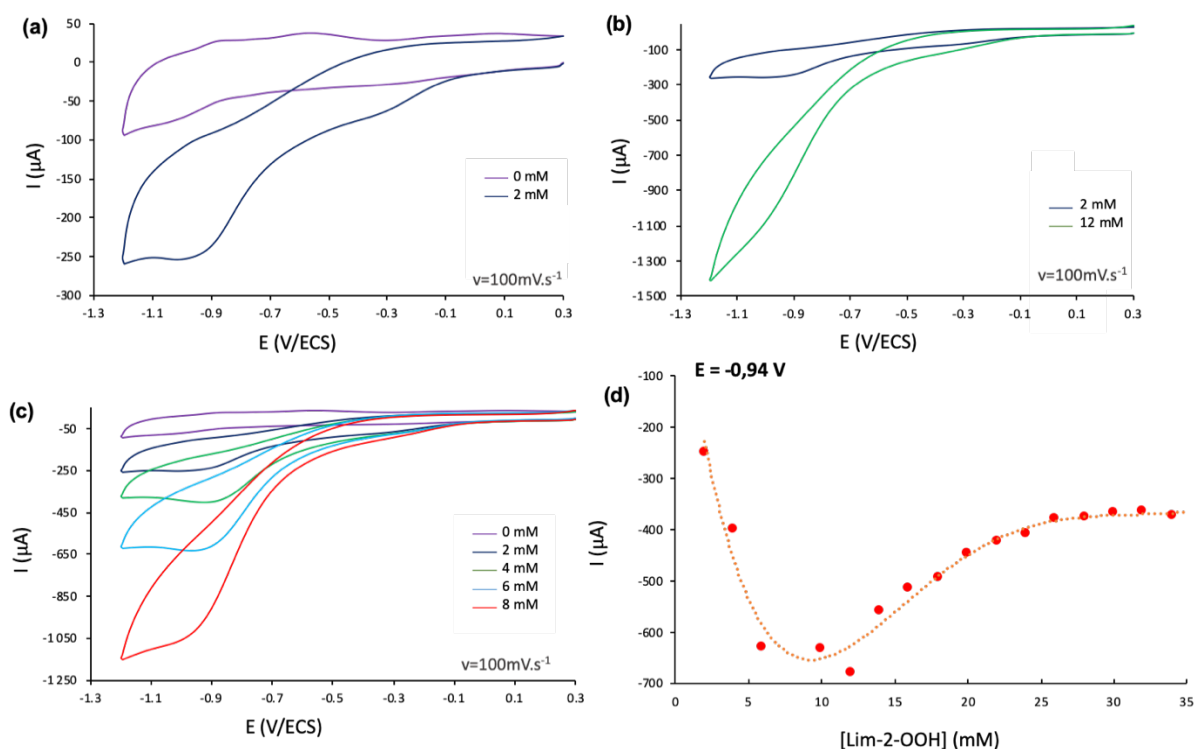


Figure 40 : (a) Voltamétrie cyclique du **Lim-2-OOH** à 2 mM avec une électrode de carbone vitreux modifiée avec du **Co₂Fe₂P₄W₃₀@rGO** 140 μ L + Nafion® 5 μ L; (b) Voltamétrie cyclique du **Lim-2-OOH** à 12 mM ; (c) Voltamétrie cyclique du **Lim-2-OOH** à 2 ; 4 ; 6 et 8 mM; (d) Évolution du courant I en fonction de la concentration en **Lim-2-OOH** contenu dans la cellule. $v = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Le profil semble être différent en comparant la mesure directe et la mesure indirecte en présence du médiateur rédox **Co₂Fe₂P₄W₃₀@rGO** 140 μ L + Nafion® 5 μ L. Contrairement à l'**Asc** qui présentait des profils similaires, cet hydroperoxyde s'avère être sensible à la présence du polyanion. Le signal détecté n'est pas identique, le polyanion interfère en effet avec le **Lim-2-OOH** d'où la mesure d'un signal à $E = -0,36 \text{ V}$ qui augmente très peu lors de l'ajout de **Lim-2-OOH**. Le second signal à $E = -0.94 \text{ V}$ semble de nouveau être associé au polyanion qui catalyse la réduction du **Lim-2-OOH**.

Mesure directe du potentiel du (1S, 4R)-Lim-1-OOH

En présence de (1S, 4R)-**Lim-1-OOH**, un signal en réduction est détecté à $E = -0,41 \text{ V}$ (Figure 41a). Ce potentiel est similaire à celui obtenu pour le **Lim-2-OOH** en présence d'une électrode non modifiée. En augmentant la concentration du (1S, 4R)-**Lim-1-OOH**, ce signal disparaît au cours des ajouts successifs. Le courant de pic I_p tend vers un plateau au-delà de 8 ajouts, c'est-à-dire au bout de 8 balayages (Figure 41b).

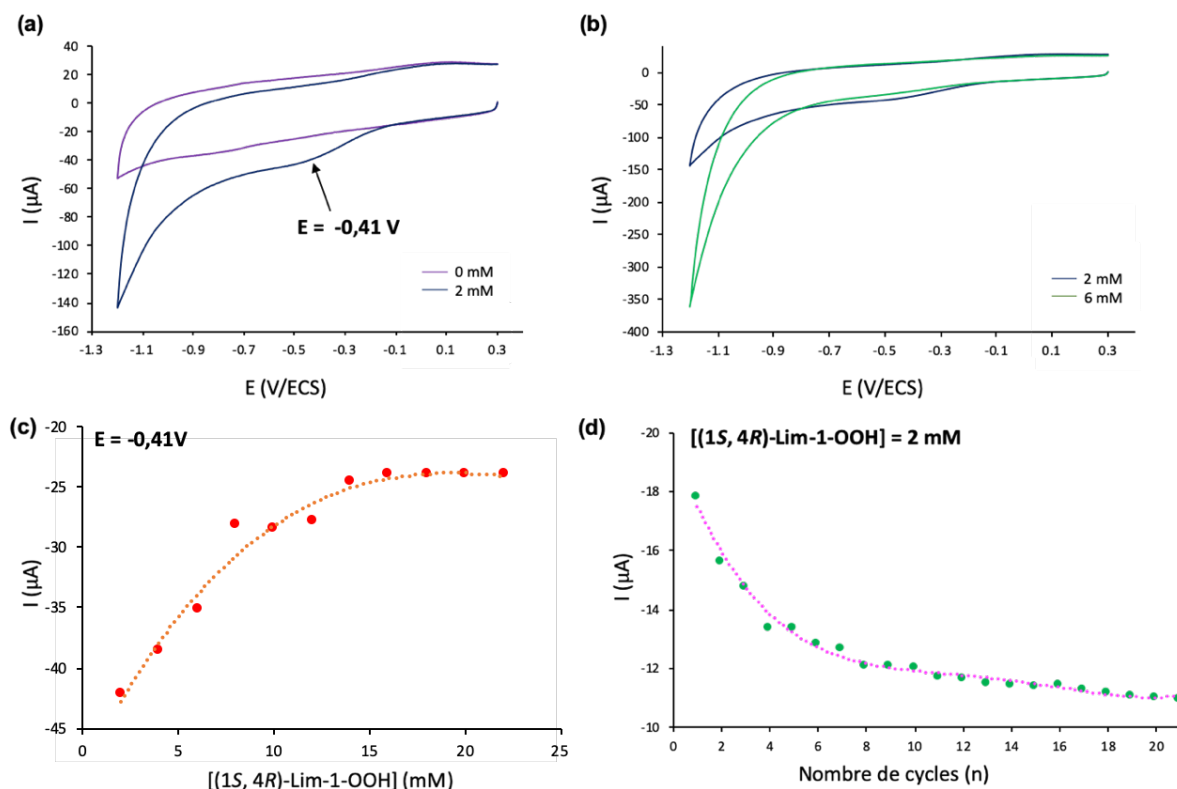


Figure 41 : (a) Voltamétrie cyclique du (1S, 4R)-Lim-1-OOH, à 2 mM avec une électrode de carbone vitreux ; (b) Voltamétrie cyclique du (1S, 4R)-Lim-1-OOH, à 6 mM en comparaison à l'instant en présence de 2 mM ; (c) Évolution du courant I en fonction de la concentration en (1S, 4R)-Lim-1-OOH contenu dans la cellule ; (d) Évolution du potentiel à une concentration de 2 mM de (1S, 4R)-Lim-1-OOH en fonction du nombre de cycles mesurés. $v = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Lors de balayage successif, on note de nouveau la diminution de l'intensité du signal de réduction avec le nombre de balayage n. Cela traduit de nouveau une inhibition rapide de l'électrode induite sans doute par l'attaque rapide des radicaux formés à la surface de l'électrode entraînant la perte du signal après quelques cycles (Figure 41d).

Mesure indirecte du potentiel du (1S, 4R)-Lim-1-OOH

En présence de $\text{Co}_2\text{Fe}_2\text{P}_4\text{W}_{30}\text{@rGO}$ 140 μL + Nafion® 5 μL , un signal en réduction est mesuré à E = -0.56 V dès 2 mM de (1S, 4R)-Lim-1-OOH (Figure 42a). Plus la concentration dans la cellule électrochimique croît, plus l'intensité du courant de pic augmente en intensité avec un potentiel de pic qui se décale vers des potentiels plus négatif jusqu'à atteindre E = -1,02 V à 10 mM de (1S, 4R)-Lim-1-OOH (Figure 42b). À cette concentration, l'intensité atteint

son maximum puis diminue avec la concentration au-delà de 10 mM de **(1S, 4R)-Lim-1-OOH** (Figure 42d).

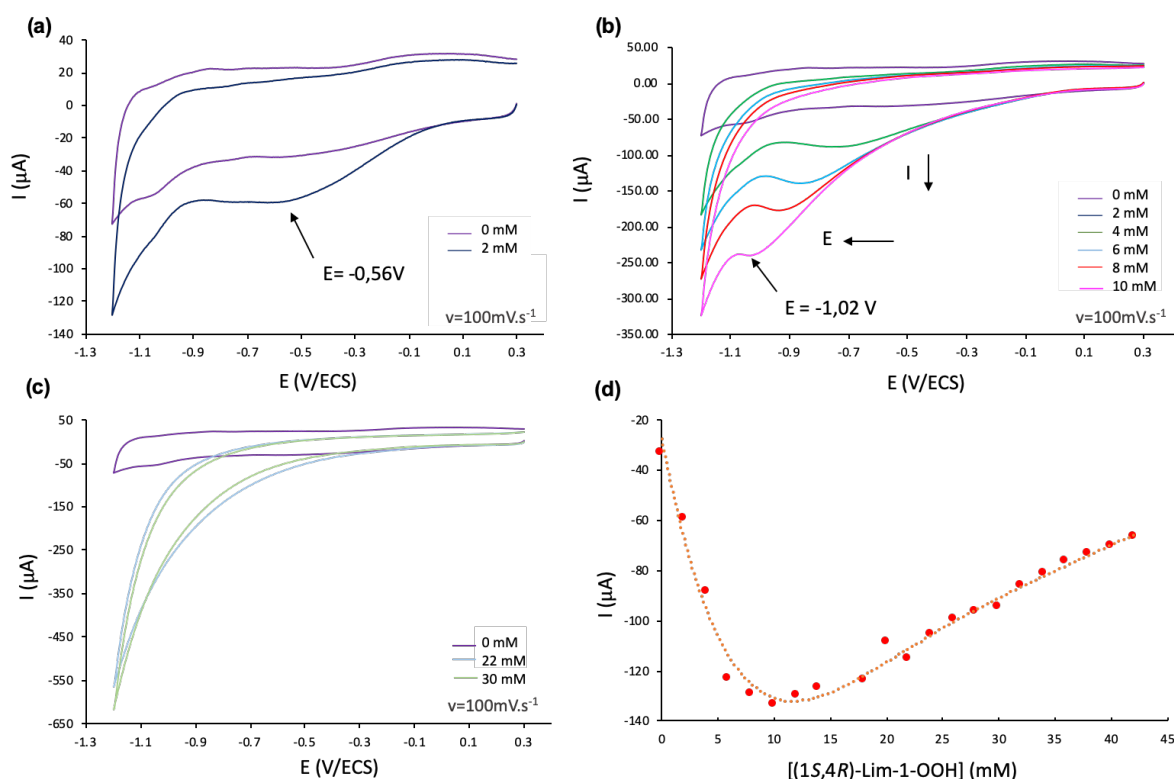


Figure 42 : (a) Voltamétrie cyclique du **(1S, 4R)-Lim-1-OOH**, à 2 mM avec une électrode de carbone vitreux modifiée avec du $\text{Co}_2\text{Fe}_2\text{P}_4\text{W}_{30}\text{@rGO}$ 140 μL + Nafion® 5 μL ; (b) Voltamétrie cyclique du **(1S, 4R)-Lim-1-OOH**, 4 mM, 6 mM, 8 mM et 10 mM ; (c) Voltamétrie cyclique du **(1S, 4R)-Lim-1-OOH** 22 mM et 30 mM ; (d) Évolution du courant I en fonction de la concentration en **(1S, 4R)-Lim-1-OOH** contenu dans la cellule. $v = 100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

De la même manière que précédemment, cet hydroperoxyde s'avère être sensible à la présence du polyanion. Le potentiel détecté n'est pas identique entre la mesure directe et indirecte ; le POM interfère avec le **(1S, 4R)-Lim-1-OOH** qui se traduit par détection de deux signaux à $E = -0,56\text{V}$ et $E = -1,02\text{V}$.

4.3. Mesure du potentiel du (\pm) -Citr-7-OOH

Mesure directe du potentiel du (\pm) -Citr-7-OOH

Avec l'électrode de carbone vitreux, un premier signal à un potentiel de $E = -0,99\text{V}$ est relevé pour 2 mM de (\pm) -Citr-7-OOH (Figure 43a). Néanmoins, dès l'ajout d'une nouvelle quantité de 20 μL de (\pm) -Citr-7-OOH, nous observons le début de l'apparition d'un nouveau

signal en réduction à $E = -0,63$ V. Ce second signal en réduction devient davantage visible à partir de 6 mM de (\pm) -Citr-7-OOH (Figure 43b). En présence de large excès, par exemple 40 mM de (\pm) -Citr-7-OOH dans le milieu, ce signal tend à disparaître (Figure 43c). Enfin, le courant de réduction I_{pc} mesuré à $E = -0,63$ V, diminue de manière assez rapide avec la concentration en (\pm) -Citr-7-OOH et la répétition des balayages lors des ajouts successif de (\pm) -Citr-7-OOH (Figure 43d). Cela traduit de nouveau une inhibition de l'électrode *via* l'attaque des radicaux formés lors de la réduction. Un polissage de l'électrode suffit pour retrouver le signal de la réduction de (\pm) -Citr-7-OOH.

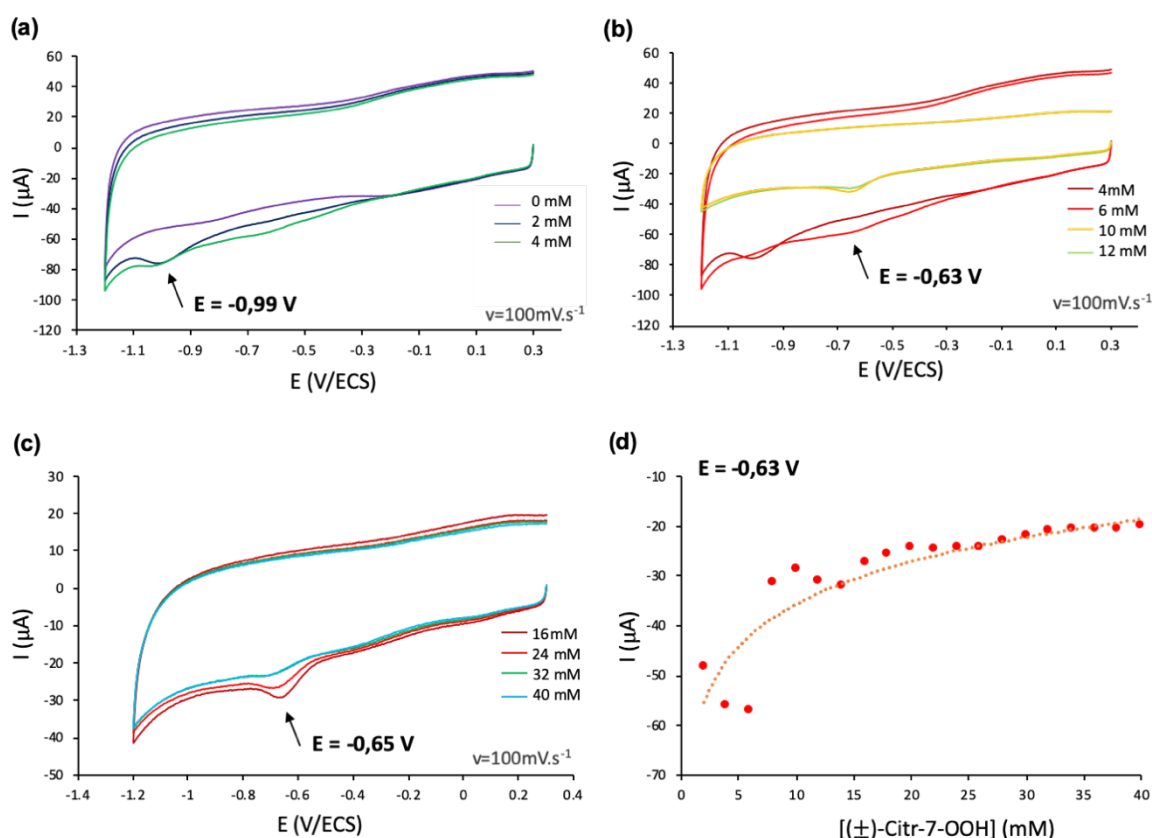


Figure 43 : (a) Voltamétrie cyclique du (\pm) -Citr-7-OOH à 2 mM et 4 mM avec une électrode de carbone vitreux ; (b) Voltamétrie cyclique du (\pm) -Citr-7-OOH, à 4 ; 6 ; 10 et 12 mM ; (c) Voltamétrie cyclique du (\pm) -Citr-7-OOH, à 16 ; 24 ; 32 et 40 mM ; (d) Évolution du courant I en fonction de la concentration de (\pm) -Citr-7-OOH à un potentiel de $E = -0,63$ V. $v = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

Ces valeurs de potentiels différentes pour le même composé nous indiquent que, dans le milieu, le (\pm) -Citr-7-OOH pourrait évoluer de manière à former des composés secondaires dont le potentiel est de $E = -0,63$ V pour une concentration de 10 mM alors qu'à une concentration de 2 mM le potentiel est de $E = -0,99$ V.

Mesure indirecte du potentiel du (\pm)-Citr-7-OOH

En présence de $\text{Co}_2\text{Fe}_2\text{P}_4\text{W}_{30}\text{@rGO}$ 140 μL + Nafion® 5 μL , une vague de réduction est obtenue avec un pic à $E = -1,28 \text{ V}$ dès 2 mM de (\pm)-Citr-7-OOH (Figure 44a). Plus la concentration dans la cellule électrochimique croît, plus l'intensité du courant de pic augmente en intensité sans variation du potentiel de réduction. Ainsi, avec 28 mM de (\pm)-Citr-7-OOH le potentiel est toujours mesuré à $E = -1,28 \text{ V}$ (Figure 44b). Pour une concentration de 20 mM de (\pm)-Citr-7-OOH, l'intensité atteint son maximum d'intensité à $I_p = -96,9 \mu\text{A}$ puis diminue entre 18 et 25 mM de (\pm)-Citr-7-OOH (Figure 44c). Au-delà de 25 mM, on observe un plateau.

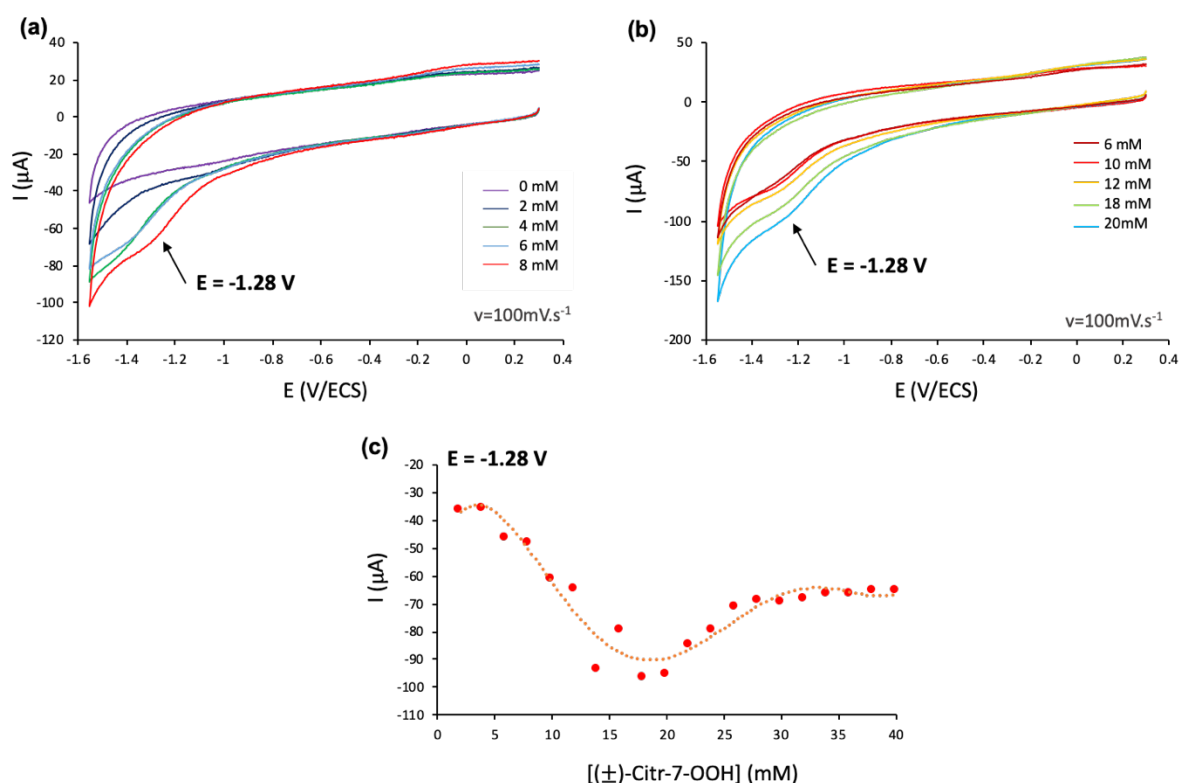


Figure 44 : (a) Voltamétrie cyclique du (\pm)-Citr-7-OOH à 2 mM et 4 mM avec une électrode de carbone vitreux modifiée par $\text{Co}_2\text{Fe}_2\text{P}_4\text{W}_{30}\text{@rGO}$ 140 μL + Nafion® 5 μL ; (b) Voltamétrie cyclique du (\pm)-Citr-7-OOH, à 6 ; 10 ; 12 ; 18 et 20 mM ; (c) Évolution du courant I en fonction de la concentration de (\pm)-Citr-7-OOH à un potentiel de $E = -1,28 \text{ V}$. $v = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Les valeurs de potentiels obtenues, suivant les deux types d'électrodes (mesures directe et indirecte), sont différentes pour le même composé. Ceci pourrait s'expliquer par exemple, par le fait que le potentiel mesuré correspond en réalité aux produits issus lors de la dégradation radicalaire du (\pm)-Citr-7-OOH ou qui serait plus ou moins apte à réagir avec le $\text{Co}_2\text{Fe}_2\text{P}_4\text{W}_{30}\text{@rGO}$.

5. Discussion

Après divers essais avec différents types d'électrode de carbone en raison de l'importance de la qualité du carbone, il nous a semblé judicieux d'approfondir les études de potentiel en présence d'une électrode de carbone vitreux de Lorraine de meilleure conductivité.

Au cours des mesures directes du signal de réduction de **Cum-OOH** en présence de différentes électrodes de carbone, nous observons la nature du carbone influence sur la réponse électrochimique. Comme nous l'avons vu, on note une différence nette entre les deux types d'électrodes pyrolytique avec une réponse plus précise avec la BPPG. Dans le cas des électrodes au carbone vitreux, deux types d'électrodes ont été utilisés : une électrode tournante achetée chez Radiometer et une électrode de carbone vitreux de Lorraine montée directement au laboratoire. Un potentiel de $E = -0,56 \text{ V}$ a été obtenu pour le **Cum-OOH** pour l'électrode au carbone vitreux (carbone de Lorraine) avec une bonne réponse électrochimique. Ceci est expliqué par le fait que l'électrode de carbone vitreux (carbone de Lorraine) est un carbone de peut être de meilleure qualité que le carbone vitreux présent sur l'électrode de tournante de marque Radiometer. On peut aussi prendre le résonnement inverse : le carbone vitreux acheté à Carbone Lorraine peut en effet présenter des impuretés, par exemple du type fer qui peuvent aider aux transferts d'électrons. Dans ce cas, cela serait le carbone vitreux vendu par Radiometer qui serait de meilleure qualité. Ainsi, le carbone vitreux de Lorraine a été utilisé pour une grande partie des études.

Dans un second temps, pour catalyser le transfert des électrons lors de la mesure de signal en réduction, la présence de **Co₂Fe₂P₄W₃₀@rGO** avec du Nafion® a permis de fonctionnaliser l'électrode. Une valeur de potentiel de $E = -0,56 \text{ V}$ pour le signal de réduction est obtenue de manière identique en présence d'une électrode de carbone vitreux non modifiée.

L'étude du potentiel de réduction des molécules cibles ont été réalisés de la même manière qu'avec le **Cum-OOH**.

L'**Asc**, présente des potentiels différents lors de la mesure avec l'électrode modifiée et non modifiée. Le profil des voltammogramme reste tout de même identique et ce potentiel se trouve entre $E = -1,29 \text{ V}$ et $E = -1,50 \text{ V}$. Toutefois, la cinétique de disparition des signaux de réduction mesurés prouve qu'il s'agit d'un composé conduisant à la formation de radicaux thermodynamiquement plus stable. Il a été prouvé qu'en présence de faibles concentrations (62,5 μM et moins en **Asc**) la régulation à la hausse du CD54 est observée après exposition pendant 24 h et 48 h.⁵⁴ Ce qui confirme le processus lent qui peut être expliqué par le fait que les radicaux générés ne soit pas suffisamment actif pour inhiber l'électrode rapidement.

Les hydroperoxydes du type **Lim-2-OOH** et **(1S, 4R)-Lim-1-OOH** présentent des potentiels identiques de $E = -0,41$ V lorsque l'électrode utilisée n'est pas modifiée et est fraîchement polie. La concentration nécessaire pour observer la disparition complète du signal de réduction est plus importante (12 mM) pour le **Lim-2-OOH** par rapport au **(1S, 4R)-Lim-1-OOH**. Ceci peut être expliqué par le fait que la réactivité est bien plus élevée pour le **(1S, 4R)-Lim-1-OOH** dont les radicaux issus de la réduction inhibent très rapidement l'électrode. Il semble raisonnable de supposer que la différence observée provienne de la différence de réactivité des radicaux générés lors de la réduction. Enfin, il avait été montré que le **Lim-1-OOH** a un impact plus important sur l'effet allergène par rapport au **Lim-2-OOH**. Lors de test réalisé sur les patients, seulement trois des sept patients ont réagi au **Lim-2-OOH**, alors que tous ont réagi au **Lim-1-OOH**. Chez les patients réagissant aux deux hydroperoxydes, il a été observé des réactions au **Lim-1-OOH** à des concentrations inférieures à celles de **Lim-2-OOH**.⁵⁵ Cela semble montrer que les mesures électrochimiques et la vitesse d'inhibition de l'électrode semble être corrélée à la virulence des radicaux et à la réaction allergique de la molécule induit sur les patients. En présence de **Co₂Fe₂P₄W₃₀@rGO** avec du Nafion®, les signaux en réduction sont détectés pour ces deux molécules à $E = -0,94$ V pour le **Lim-2-OOH** et un potentiel variant de $E = -0,56$ à $E = -1,02$ V pour le **(1S, 4R)-Lim-1-OOH** en fonction de sa concentration dans le milieu.

Dans le cas du **(±)-Citr-7-OOH**, nous avons observé la présence de deux potentiels de réduction en fonction de la concentration de ce composé en solution. Ceci indique que ce dernier entraîne la formation de composés secondaires présentant un second pic de réduction.

Ainsi, ces études électrochimiques nous ont permis d'avoir une référence en terme de potentiel de réduction. Cependant, il serait tout de même intéressant de coupler la cellule électrochimique à un appareillage de spectrométrie de masse (DEMS, Differential Electrochemical Mass Spectroscopy) permettant de mesurer en direct la masse des composés présent en solution. Ce qui pourrait nous permettre d'avoir une idée beaucoup plus précise quant à l'association des potentiels aux espèces détectées. Ce montage vient d'être installé au Laboratoire d'Électrochimie et de Chimie Physique du Corps Solide.

Références bibliographiques

Chapitre 4

1. Pierson, H. O. Handbook of carbon, graphite, diamonds and fullerenes: processing, properties and applications: William Andrew; **2012**.
2. Van Orden, A.; Saykally, R. J. Small carbon clusters: spectroscopy, structure, and energetics. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2313-2358.
3. Shvartsburg, A. A.; Hudgins, R. R.; Gutierrez, R.; Gutierrez, R.; Jungnickel, G.; Frauenheim, T.; Jackson, K. A. Jarrold, M. F. Ball-and-chain dimers from a hot fullerene plasma. *J. Phys. Chem. A.* **1999**, *103*, 5275-5284.
4. Nierengarten, J.-F.; Bonifazi, D. Fullerenes and Other Carbon-Rich Nanostructures: Springer; **2014**.
5. Kroto, H. W.; Petrukhina, M. A.; Scott, L. T. Fragments of fullerenes and carbon nanotubes: designed synthesis, unusual reactions, and coordination chemistry. John Wiley & Sons; **2011**.
6. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1996/press-release/>
7. Lijima, S.; Ichihashi, T. Single-shell carbon nanotubes of 1nm diameter. *Nature.* **1993**, *363*, 603-605.
8. Lijima, S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature.* **1991**, *354*, 56-58.
9. Lazzeri, M.; Barreiro, A. Carbon-Based Nanoscience. *Elements* **2014**, *10*, 447-452.
10. Thorogood, C. A.; Wildgoose, G. G.; Jones, J. H.; Compton, R. G. Identifying quinone-like species on the surface of graphitic carbon and multi-walled carbon nanotubes using reactions with 2,4-dinitrophenylhydrazine to provide a voltammetric fingerprint. *New J. Chem.* **2007**, *31*, 958-965.
11. Xiao, L.; Dickinson, E. J. F.; Wildgoose, G. G.; Compton, R. G. A comparison of electron transfer kinetics of three common carbon electrode surfaces in acetonitrile and in room temperature ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate: correlation to surface structure and the limit of the diffusion domain approximation. *Electroanalysis* **2010**, *22*, 269-276.
12. McCreery, R. L. Carbon electrodes: structural effects on electron transfer kinetics. Dans *Electrochemical chemistry*, Bard, A.J. Ed., Marcel Dekker, Inc.: New York, **1991**, *17*, 221-374.
13. Banks, C. E. Davies, T. J.; Wildgoose, G. G.; Compton, R. G. Electrocatalysis at graphite and carbon nanotube modified electrodes: edge-plane sites and tube ends are the reactive sites. *Chem. Commun.* **2005**, 829-841.
14. McCreery, R. L.; Kneten, K. R. Effects of redox system structure on electron-transfer kinetics at ordered graphite and glassy carbon electrodes. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 2518-2524.
15. Kim, J.; Song, X.; Kinoshita, K.; Madou, M.; Whiteb, R. Electrochemical studies of carbon films from pyrolyzed photoresist. *J. Electrochem. Soc.* **1998**, *145*, 2314-2319.
16. Wierse, D. G.; Lohrengel, M. M.; Schultze, J. W. Electrochemical properties of sulfur adsorbed on gold electrodes. *J. Electroanal. Chem.* **1978**, *92*, 121-131.

17. Xu, F.; Leclerc, S.; Lottin, O.; Canet, D. Impact of chemical treatments on the behavior of water in Nafion® NRE-212 by ^1H NMR: Self-diffusion measurements and proton quantization. *J. Membr. Sci.* **2011**, *371*, 148-154.
18. Cukierman, S. Et tu, Grotthus! and other unfinished stories. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1757*, 876-885.
19. Müller, A.; Peters, F.; Pope, M.T.; Gatteschi, D. Polyoxometalates: very large clusters-nanoscale magnets. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 239-271.
20. Jeannin, Y. P. The nomenclature of polyoxometalates: how to connect a name and a structure. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 51-76.
21. Schaming, D. Assemblages hybrides porphyrines-polyoxométallates : étude électrochimique, photochimique et photocatalytique. Doctorat de l'université Paris Sud, France, **2010**.
22. Berzelius, J. Beitrag zur näheren Kenntniss des Molybdäns. *Pogg. Ann.* **1826**, *6*, 369-392.
23. Baker, L.C.W.; Figgis, J. S. New fundamental type of inorganic complex: hybrid between heteropoly and conventional coordination complexes. Possibilities for geometrical isomerisms in 11-, 12-, 17-, and 18-heteropoly derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 3794-3797.
24. Dawson, B. The structure of the 9(18)-heteropoly anion in potassium 9(18)-tungstophosphate, $\text{K}_6(\text{P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62}) \cdot 14\text{H}_2\text{O}$. *Acta Cryst.* **1953**, *6*, 113-126.
25. Contant, R.; Thouvenot, R., A reinvestigation of isomerism in the Dawson structure: syntheses and ^{183}W NMR structural characterization of three new polyoxotungstates $[\text{X}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62}]^{6-}$ ($\text{X}=\text{P}^{\text{V}}, \text{As}^{\text{V}}$). *Inorg. Chim. Acta* **1993**, *212*, 41-50.
26. Finke, R. G.; Rapko, B.; Saxton, R. J.; Domaille, P. J. Trisubstituted heteropolytungstates as soluble metal oxide analogues. 3. Synthesis, characterization, ^{31}P , ^{29}Si , ^{51}V , and 1- and 2-D ^{183}W NMR, deprotonation, and H^+ mobility studies of organic solvent soluble forms of $\text{H}_x\text{SiW}_9\text{V}_3\text{O}_{40}^{x-7}$ and $\text{H}_x\text{P}_2\text{W}_{16}\text{V}_3\text{O}_{62}^{x-9}$. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2947-2960.
27. Finke, R. G.; Droege, M. W. Trivalent heteropolytungstate derivatives. 2. Synthesis, characterization, and ^{183}W NMR of $\text{P}_4\text{W}_{30}\text{M}_4(\text{H}_2\text{O})_2\text{O}_{112}^{16-}$ ($\text{M} = \text{Co}, \text{Cu}, \text{Zn}$). *Inorg. Chem.* **1983**, *22*, 1006-1008.
28. Keita, B.; Mbomekalle, I. M.; Nadjo, L.; Anderson, T. M.; Hill, C. L. Multi-iron wells-Dawson heteropolytungstates. Electrochemical probing of siderophoric behavior in sandwich-type complexes. *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 3257-3263.
29. Anderson, T. M.; Zhang, X.; Hardcastle, K. I.; Hill, C. L. Reactions of trivalent Wells-Dawson heteropolytungstates. Ionic strength and Jahn-Teller effects on formation in multi-iron complexes. *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 2477-2488.
30. Anderson, J. S. Constitution of the polyacids. *Nature* **1937**, *140*, 850.
31. Lindqvist, I., *Arkiv Kemi* **1952**, *5*, 247.
32. Ruhlmann, L.; Nadjo, L.; Canny, J.; Contant, R.; Thouvenot, R., Di- and tetranuclear Dawson-derived sandwich complexes: synthesis, spectroscopic characterization, and electrochemical behavior. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2002**, 975-986.

33. Hasenknopf, B. Polyoxometalates: introduction to a class of inorganic compounds and their biomedical applications. *Front. Biosci.* **2005**, *10*, 275-287.
34. Mukherjee, H. N. Treatment of cancer of the intestinal tract with a complex compound of phosphotungstic phosphomolybdic acids and caffeine. *J. Indian Med. Assoc.* **1965**, *44*, 477-479.
35. Yamase, T., Polyoxometalates for molecular devices: antitumor activity and luminescence. *Mol. Eng.* **1993**, *3*, 241-262.
36. Herve, M.; Sinoussi-Barre, F.; Chermann, J. C.; Herve, G.; Jasmin, C., Correlation between structure of polyoxotungstates and their inhibitory activity on polymerases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, *116*, 222-229.
37. Texier, I.; Giannotti, C.; Malato, S.; Richter, C.; Delaire, J. Solar photodegradation of pesticides in water by sodium decatungstate. *Catal. Today* **1999**, *54*, 297-307.
38. Androulaki, E.; Hiskia, A.; Dimotikali, D.; Minero, C.; Calza, P.; Pelizzetti, E.; Papaconstantinou, E. Light induced elimination of mono- and polychlorinated phenols from aqueous solutions by $PW_{12}O_{40}^{3-}$. The case of 2,4,6-trichlorophenol. *Environ. Sci. Technol.*, **2000**, *34*, 2024-2028.
39. Gkika, E.; Troupis, A.; Hiskia, A.; Papaconstantinou, E. Photocatalytic reduction and recovery of mercury by polyoxometalates. *Environ. Sci. Technol.*, **2005**, *39*, 4242-4248.
40. Gkika E., Troupis A., Hiskia A., Papaconstantinou E., Photocatalytic reduction of chromium and oxidation of organics by polyoxometalates. *Appl. Catal. B: Environ.* **2006**, *62*, 28-34.
41. Keita, B.; Nadjo, L. New oxometalate-based materials for catalysis and electrocatalysis. *Mater. Chem. Phys.* **1989**, *22*, 77-103.
42. Keita, B.; Nadjo, L.; Parsons, R. Surface modifications with heteropoly and isopoly oxometalates: Part IV. Further details and kinetic aspects of the h.e.r. on the modified electrodes. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1989**, *258*, 207-218.
43. Costa-Coquelard, C.; Schaming, D.; Lampre I.; Ruhlmann, L. Photocatalytic reduction of Ag_2SO_4 by the Dawson anion $\alpha-[P_2W_{18}O_{62}]^{6-}$ and tetracobalt sandwich complexes. *Appl. Catal. B: Environ.* **2008**, *84*, 835-842.
44. Ruhlmann, L.; Canny, J.; Vaissermann, J.; Thouvenot, R., Mixed-metal sandwich complexes $[M^{II}_2(H_2O)Fe^{III}_2(P_2W_{15}O_{56})]^{14-}$ (M = Co, Mn): synthesis and stability. The molecular structure of $[M^{II}_2(H_2O)Fe^{III}_2(P_2W_{15}O_{56})_2]^{14-}$. *Dalton Trans.* **2004**, 794-800.
45. Zhang, X.; Anderson, T. M.; Chen, Q.; Hill, C. L. A Baker-Figgis isomer of conventional sandwich polyoxometalates. $H_2Na_{14}[Fe^{III}_2(NaOH_2)_2(P_2W_{15}O_{56})_2]$, a diiron catalyst for catalytic H_2O_2 -based epoxidation. *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 418-419.
46. Anderson, T. M.; Hardcastle, K. I.; Okun, N.; Hill, C. L. Asymmetric Sandwich-Type Polyoxoanions. Synthesis, Characterization, and X-ray Crystal Structures of Diferric Complexes $[TM^{II}Fe^{III}_2(P_2W_{15}O_{56})(P_2TM^{II}W_{13}O_{52})]^{16-}$, TM = Cu or Co. *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 6418-6425.

47. Papaconstantinou, E.; Pope, M. T. Heteropoly blues. V. Electronic spectra of one- to six-electron blues of 18-metallodiphosphate anions. *Inorg. Chem.* **1970**, *9*, 667-669.
48. Papaconstantinou, E. Photochemistry of polyoxometallates of molybdenum and tungsten and/or vanadium. *Chem. Soc. Rev.* **1989**, *18*, 1-31.
49. Castro Neto, A.H.; Guinea, F.; Peres, N.M.R.; Novoselov, K.S.; Geim, A.K. The electronic properties of graphene. *Rev. Mod. Phys.* **2009**, *81*, 109-162.
50. Loh, K.P.; Bao, Q.; Eda, G.; Chhowalla, M.; Graphene oxide as a chemically tunable platform for optical applications. *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 1015-1024.
51. Li, H.; Pang, S.; Feng, X.; Müllen, K.; Bubeck, C. Polyoxometalate assisted photoreduction of graphene oxide and its nanocomposite formation. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6243-6245.
52. Hiskia, A.; Mylonas, A.; Papaconstantinou, E. Comparison of the photoredox properties of polyoxometallates and semiconducting particles. *Chem. Soc. Rev.* **2001**, *30*, 62-69.
53. Kim, Y.; Sangaraju, S. Polyoxometalate-reduced graphene oxide hybrid catalyst: synthesis, structure, and electrochemical properties. *Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5*, 12197-12204.
54. Sahli, F.; Silva e Sousa, M.; Vileno, B.; Lichter, J.; Lepoittevin, J.-P.; Blömeke, B.; Giménez-Arnau, E. Understanding the skin sensitization capacity of ascaridole: a combined study of chemical reactivity and activation of the innate immune system (dendritic cells) in the epidermal environment. *Arch. Toxicol.* **2019**, *93*, 1337-1347.
55. Bråred Christensson, J.; Matura, M.; Bäcktorp, C.; Börje, A.; Nilsson, J. L.; Karlberg, A.-T. Hydroperoxides form specific antigens in contact allergy. *Contact Dermatitis* **2006**, *55*, 230-237.

Activation de la réponse immunitaire

Il est important de rappeler que la dermatite ou eczéma de contact est la manifestation clinique de la sensibilisation cutanée. Il s'agit de l'altération de l'état immunitaire d'un individu causée par une substance sensibilisante, à savoir un allergène de contact. Après pénétration dans l'épiderme, l'allergène forme un antigène par liaison avec des protéines épidermiques. Ce complexe haptène-protéine va être capturé par les cellules dendritiques (CDs) présentatrices d'antigènes qui transmettent les informations au système immunitaire inné de la peau. Par ailleurs, les kératinocytes interviennent en fournissant des signaux inflammatoires et de danger nécessaires à l'activation des CDs, puis génèrent aussi des enzymes capables d'activer les pro-haptènes mais également susceptibles de détoxifier les molécules. Il en résulte l'induction d'un ensemble de signaux de danger et la sécrétion de cytokines telles que les interleukines (IL) IL-1 α/β , IL-6, IL-18 et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF)- α .^{1,2} Cet environnement induit la maturation des CDs par régulation à la hausse de molécules co-stimulatrices telles que CD86 ainsi que des molécules d'adhésion telles que CD54.³ Les CDs activent à ce stade certaines cellules T naïves, provoquant ainsi une expansion des cellules T spécifiques de l'allergène.

Après ce processus, une personne est immunologiquement sensibilisée. Ce n'est qu'en cas de réexposition au même allergène ou à un allergène de contact à réaction croisée que la phase d'élicitation est déclenchée, entraînant une activation des lymphocytes T spécifiques suivie des symptômes cliniques.

Cet ensemble de données indique clairement la valeur de l'étude de la régulation à la hausse des CD86/CD54 et de l'inclusion nécessaire des kératinocytes dans la conception d'approches basées sur les cellules pour élucider le mode d'action des allergènes chimiques.

En collaboration avec l'équipe du Pr. Brunhilde Blomeke (Department of Environmental Toxicology, University of Trier, Germany) nous avons au cours de ces trois années étudié les différences d'expression des protéines co-stimulatrices CD86 et CD54, jouant un rôle dans l'activation des lymphocytes T, en présence d'hydroperoxydes et de peroxydes allergisants afin de tester leur pouvoir sensibilisant. Pour ce faire, un test d'activation en co-culture cellulaire (le COCAT) a été mis au point par l'équipe du Pr. Brunhilde Blomeke dans le but d'identifier le degré de danger des composés chimiques en tant que sensibilisants et de déterminer *in vitro* leur potentiel de sensibilisation.^{4,5} Le COCAT repose sur l'utilisation de cultures de cellules HaCaT (lignée cellulaire kératinocytaire humaine) et d'une lignée cellulaire de myéloïde humaine monocyttaire THP-1 (en tant que substitut des CDs). Individuellement, ces deux lignées cellulaires sont utilisées pour la compréhension de différentes étapes de la sensibilisation, à savoir l'activation des kératinocytes et l'activation et la maturation des CDs.⁶ Une exposition en co-culture de ces deux types cellulaires permet d'accroître leur réponse aux sensibilisants, permettant en plus la détection des pro-haptènes et appuyant ainsi les

méthodes alternatives aux tests sur l'animal existantes pour l'identification du potentiel sensibilisant des composés.^{7,8}

Pour ce faire, des cellules THP-1 (plaque de 8 × 96 puits) ont été placées sur des kératinocytes HaCaT confluents. La concentration maximale d'essai (jusqu'à 4000 µM) pour chaque produit chimique d'essai a été déterminée en fonction de sa solubilité dans le milieu de culture et/ou de la viabilité cellulaire. Les cellules cultivées en co-culture ont été exposées à des concentrations croissantes des composés cibles (*Figure 1*).⁹

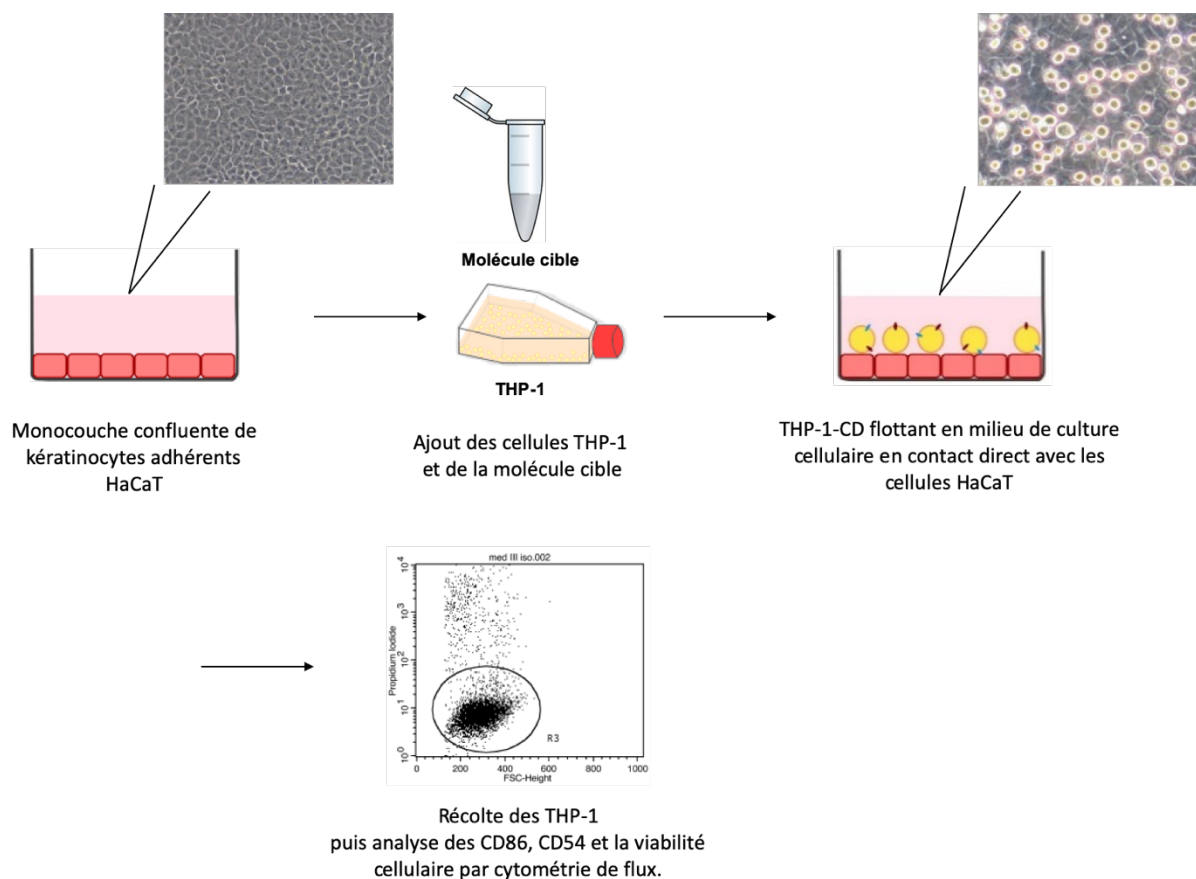


Figure 1 : Procédure générale du COCAT

Lors des études en présence de l'**Asc**, l'activation des cellules THP-1 cultivées avec HaCaT et basée sur l'expression à la surface cellulaire de la molécule co-stimulatrice CD86 et la molécule CD54 a été significativement régulée à la hausse après traitement avec de faibles concentrations.⁹

Nous avons évalué l'activation des cellules THP-1 co-cultivées avec des kératinocytes HaCaT et exposées avec une gamme de concentrations d'**Asc**, sans ajouter de fer comme amorceur radicalaire, et pendant une gamme de temps variant de t = 30 min à un temps t = 48 h. Une concentration faible (non toxique), une moyenne et élevée (toxique) ont été choisies

pour comprendre comment la mort cellulaire a un impact sur le phénotype des CD₈.⁹ Les résultats sont résumés dans la *Figure 2*. Le traitement des cellules avec un témoin positif, le dinitrochlorobenzène (**DNCB**, 20 μ M), a favorisé la régulation à la hausse des CD86 et CD54 après 1 h. Pour l'**Asc**, de faibles concentrations (inférieures à 62,5 μ M) ont favorisé la régulation à la hausse des CD54 après exposition de 24 h et de 48 h.⁹ Cette tendance ne pouvait être surmontée avec des concentrations élevées (jusqu'à 1000 μ M) et des temps d'exposition réduits. L'expression des CD86 et CD54 à la surface des cellules THP-1 a été calculée en tant que différence d'intensité moyenne de fluorescence entre les cellules traitées chimiquement et les cellules témoins.

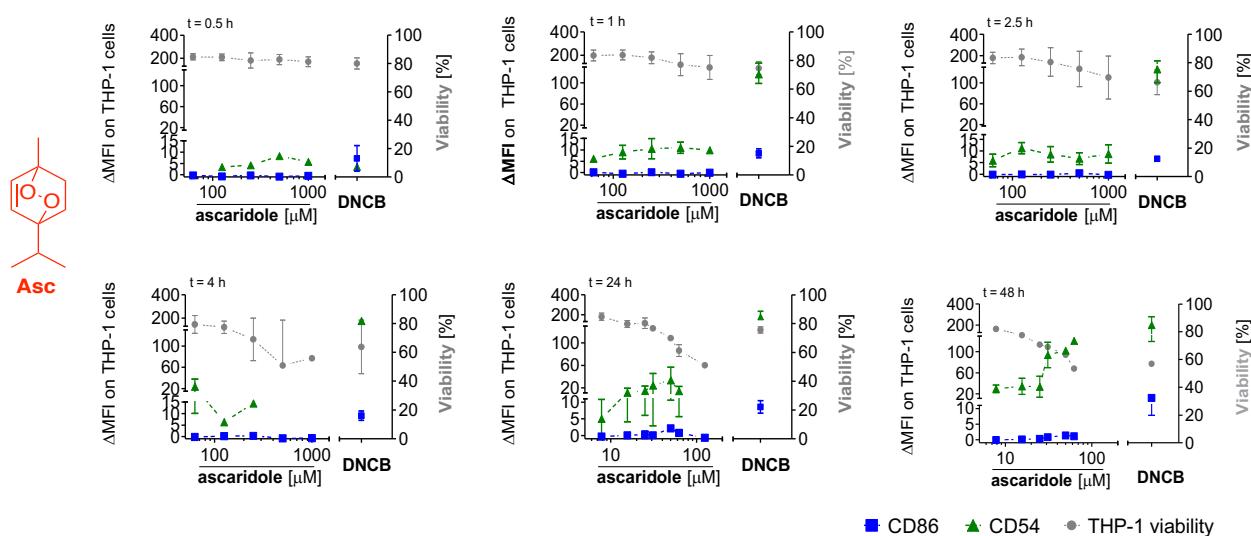


Figure 2 : Impact de la concentration et du temps d'exposition sur l'expression des CD86 et CD54 sur les cellules THP-1 en co-culture avec HaCaT exposées à l'**Asc** et au **DNCB**. L'expression de CD86 (carrés), CD54 (triangles) sur les cellules THP-1 collectées (viabilité cellulaire, points gris) a été analysée par cytométrie de flux Δ MFI (intensité de fluorescence) = MFI – MFI (contrôle) à des temps $t=0,5$ h, 1 h, 2,5h, 4h, 24 h et 48h⁹

En utilisant la méthode COCAT, les potentiels de sensibilisation des hydroperoxydes **Lim-2-OOH**, (**1S, 4R**)-**Lim-1-OOH**, (\pm)-**Citr-7-OOH** et le mélange (\pm)-**Citr-7-OOH** et (\pm)-**Citr-6-OOH** ont été étudiés (*Figure 3*).

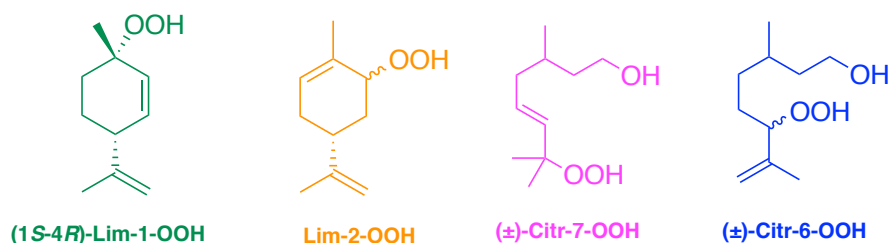


Figure 3 : Rappel des structures chimiques des hydroperoxydes cibles

Les cellules HaCaT et THP-1 ont donc été cultivées en co-culture et exposées au **(1S, 4R)-Lim-1-OOH**, au **Lim-2-OOH**, au **(±)-Citr-7-OOH** et au mélange de **(±)-Citr-6-OOH** et **(±)-Citr-7-OOH** pendant 24 h. L'expression des CD86 et CD54 a été analysée sur des cellules THP-1 prélevées à l'aide de la cytométrie en flux et présentée sous forme de différences induites chimiquement dans les niveaux de surface cellulaire des CD86 ou CD54. Nous avons observé que tous les hydroperoxydes étudiés ont régulé à la hausse les deux marqueurs CD86 et CD54 d'activation des CD sur des cellules THP-1 co-cultivées. Les courbes correspondantes pour CD86 et CD54 sont illustrées dans la *Figure 4*.

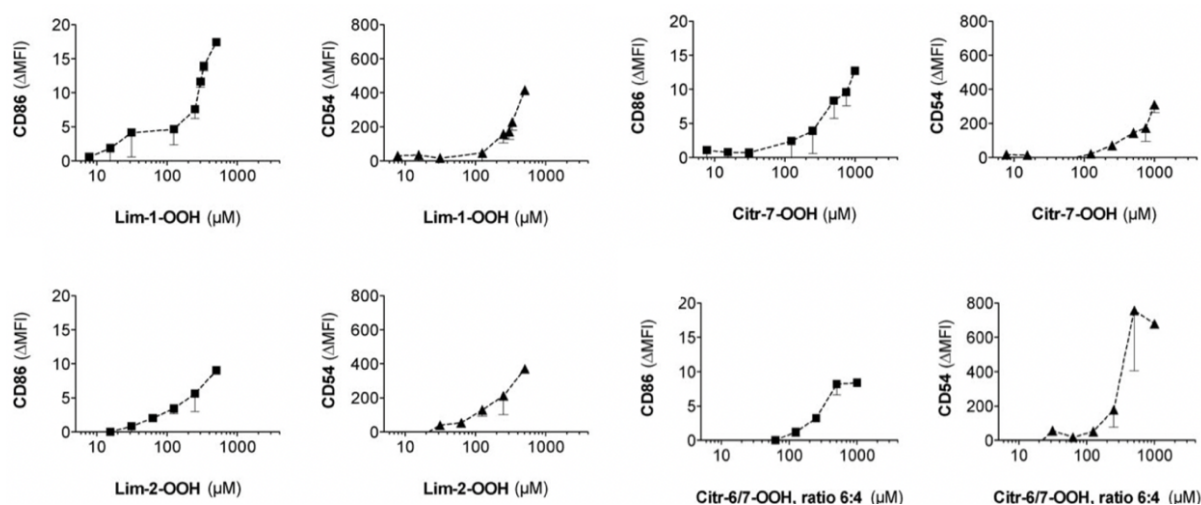


Figure 4 : Régulation à la hausse des CD86 et CD54 en fonction de la concentration des hydroperoxydes.

Tous les hydroperoxydes ont été correctement classés en tant que sensibilisants cutanés sur la base de l'analyse de l'activation des CD dans leur environnement naturel, les kératinocytes. Une régulation à la hausse de CD86 et de CD54 en fonction de la concentration des hydroperoxydes a été observée. Les concentrations nécessaires pour ces hausses sont comprises entre 0,29 et 0,65 mM.

Suite à ces résultats, un classement d'activité comparable aux données *in vivo* rapportées par l'essai prédictif du LLNA a été réalisé (*Tableau 1*). La plus faible concentration nécessaire pour atteindre un seuil de positivité (EC_3) a été utilisée pour estimer la puissance de la molécule.⁵ Ici, nous avons constaté que les hydroperoxydes testés avaient besoin de concentrations similaires pour atteindre la positivité, les valeurs varient entre 0,29 et 0,65 mM. En revanche, pour le **DNCB**, qui est classé comme un sensibilisant extrême dans le LLNA, une concentration au moins 10 fois plus faible était suffisante pour atteindre la positivité. Dans le cas des hydroperoxydes de limonène, nous avons constaté que le **(1S, 4R)-Lim-1-OOH** était plus puissant que le **Lim-2-OOH**, comme l'ont montré les données du LLNA.

Le **(±)-Citr-7-OOH** seul était moins puissant que le mélange d'hydroperoxydes **(±)-Citr-6-OOH** et **(±)-Citr-7-OOH**. Il a été démontré que le **(±)-Citr-6-OOH** avec le **(±)-Citr-7-OOH** contribuent le plus à l'activité sensibilisatrice du (\pm) - β -citronellol autoxydé dans le LLNA. La comparaison de nos résultats pour le **(±)-Citr-7-OOH** seul avec ceux du mélange d'hydroperoxydes **(±)-Citr-6-OOH** et **(±)-Citr-7-OOH** indique que le **(±)-Citr-7-OOH** a pu influencer les résultats obtenus pour ce mélange.

Tableau 1 : Comparaison des potentiels de sensibilisation des hydroperoxydes étudiés et du DNCB *in vitro* (COCAT) et *in vivo* (LLNA)

Composés	COCAT	LLNA EC ₃
(1S, 4R)-Lim-1-OOH	0,29 ± 0,01	0,33 ¹⁰
Lim-2-OOH	0,35 ± 0,08	0,83 ¹⁰
(±)-Citr-6/7-OOH	0,29 ± 0,07	2,3 ¹¹
(±)-Citr-7-OOH	0,65 ± 0,17	NA
DNCB	0,014 ± 0,0037	0,06 ¹²

La corrélation des concentrations des composés a montré que nous avons besoin de concentrations beaucoup plus faibles en présence de kératinocytes. Cela suggère que les kératinocytes soutiennent l'activation des cellules THP-1. Une réponse différente entre la mono-culture et la co-culture des cellules THP-1 a déjà été observée. Avec un ensemble différent de produits chimiques par rapport à l'exposition des cellules THP-1 seules, la co-culture a entraîné une régulation maximale de CD86 et/ou de CD54 jusqu'à 3 fois supérieure sur les cellules THP-1.⁵

À l'heure actuelle, il n'est pas possible de comparer nos données sur les hydroperoxydes avec les résultats d'autres méthodes alternatives évaluant explicitement l'activité de ces composés en raison du manque de données. De plus, en l'absence de données expérimentales appropriées, aucun résultat significatif concernant la puissance ne peut être obtenu à partir d'approches définies capables de prédire la puissance.

En conclusion, cette étude est la première à évaluer le potentiel de sensibilisation humaine et la puissance des hydroperoxydes dérivés de terpènes, suivant la méthode *in vitro* du COCAT. Les résultats obtenus corréleront avec ceux de la littérature obtenus par des méthodes *in vivo*.

Références bibliographiques

Activation de la réponse immunitaire

1. Barker, J. N.; Mitra, R. S.; Griffiths, C. E.; Dixit, V. M.; Nickoloff, B. J. Keratinocytes as initiators of inflammation. *Lancet* **1991**, 337, 211-214.
2. Gaspari, A. A.; Sempowski, G. D.; Chess, P.; Gish, J.; Phipps, R. P. Human epidermal keratinocytes are induced to secrete interleukin-6 and co-stimulate T lymphocyte proliferation by a CD40-dependent mechanism. *Eur. J. Immunol.* **1996**, 26, 1371-1377.
3. Banchereau, J.; Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **1998**, 392, 245-252.
4. Hennen, J.; Aeby, P.; Goebel, C.; Schettgen, T.; Oberli, A.; Kalmes, M. Cross talk between keratinocytes and dendritic cells: impact on the prediction of sensitization. *Toxicol. Sci.* **2011**, 123, 501-510.
5. Hennen, J.; Blömeke, B. Keratinocytes improve prediction of sensitization potential and potency of chemicals with THP-1 cells. *ALTEX* **2017**, 34, 279-288.
6. OCDE. *Test No 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins*. Section Testing and Assessment. OECD publishing, 2014.
7. Hennen, J.; Blömeke, B. Assessment of skin sensitization potency of hair dye molecules *in vitro*. *Contact Dermatitis* **2017**, 77, 179-180.
8. Hennen, J.; Blömeke, B. Ranking skin-sensitizing hair dye molecules according to their potency by the use of human cells. *Contact Dermatitis* **2018**, 79, 391-393.
9. Hennen, J.; Silva e Sousa, M.; Sahli, F.; Lichter, J.; Lepoittevin, J.-P.; Giménez-Arnau, E.; Blömeke, B. Sensitization potential and potency of terpene hydroperoxides in the COCAT method. *Contact Dermatitis* **2019**, 81, 97-103.
10. Johansson, S.; Giménez-Arnau, E.; Grotli, M.; Karlberg, A.-T.; Börje, A. Carbon- and oxygen-centered radicals are equally important haptens of allylic hydroperoxides in allergic contact dermatitis. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, 21, 1536-1547.
11. Rudbäck, J.; Hagvall, L.; Börje, A.; Nilsson, U.; Karlberg, A.-T. Characterization of skin sensitizers from autoxidized citronellol-impact of the terpene structure on the autoxidation process. *Contact Dermatitis* **2014**, 70, 329-339.
12. Hoffmann, S.; Kleinstreuer, N.; Alepee, N. et al. Non-animal methods to predict skin sensitization (I): the Cosmetics Europe database. *Crit. Rev. Toxicol.* **2018**, 48, 344-358.

Discussion et conclusion générale

L'allergie cutanée, ou allergie de contact, représente un problème majeur de santé publique et est considérée comme la réaction immunotoxique la plus importante chez l'homme. Selon la classification de Gell et Coombs (1963), c'est une hypersensibilité retardée de type IV provoquée par contact répété de la peau avec une gamme de produits chimiques, naturels ou synthétiques.¹ En raison de l'augmentation de la prévalence, il devient aujourd'hui indispensable de prédire le potentiel sensibilisant de tous les produits chimiques avant utilisation dans les produits de consommation. Ainsi, la compréhension de tous les mécanismes conduisant à des réactions allergiques est primordiale afin d'évaluer les molécules à risques.

Une série complexe d'évènements est à l'origine de la sensibilisation cutanée à un composé chimique et subséquente allergie. La première étape clé est de nature chimique. L'allergène, ou haptène, réagit avec les protéines de la peau formant des complexes antigéniques stables qui seront reconnus et présentés au système immunitaire. Le mécanisme général de l'interaction haptène-protéine est la formation d'une liaison covalente par l'intermédiaire d'une voie nucléophile-électrophile. Cependant, certains allergènes ne répondent pas à ce modèle.² Mon travail de thèse s'est donc centré sur la compréhension d'un autre mode d'action pour ces allergènes, au travers de mécanismes impliquant la formation d'intermédiaires radicalaires pouvant altérer les protéines de la peau. Ces modifications de l'environnement cellulaire fournissent certainement des informations aux cellules immunitaires qui activeront ensuite la réponse immunotoxique induisant la maladie.

Durant ce travail de thèse concernant les mécanismes de type radicalaires liés à la sensibilisation cutanée, nous nous sommes intéressés à l'endoperoxyde ascaridol (**Asc**), mais également aux hydroperoxydes allyliques dérivés de l'autoxydation du *R*-(+)-limonène, le (**Lim-2-OOH**) et le ((**1S, 4R**)-**Lim-1-OOH**) et dérivés de l'autoxydation du (±)-β-citronellol, le (±)-**Citr-6-OOH** et (±)-**Citr-7-OOH**. En effet, des données cliniques multiples montrent que ces composés présentent un potentiel de sensibilisation important.

Nous avons, dans un premier temps, mis en place les voies de synthèse de toutes ces molécules cibles. A vrai dire, la production des hydroperoxydes et peroxydes sensibilisants par autoxydation des terpènes naturels correspondants n'est pas toujours reproductible, incluant notamment de faibles rendements ainsi qu'une séparation difficile des molécules souhaitées à partir des mélanges d'oxydation. De ce fait, des voies de synthèse courtes et reproductibles ont été développés.

Dans une deuxième étape, nous avons étudié le comportement de ces molécules cibles envers des acides aminés prompts à réagir par voie radicalaire, en présence de systèmes de

fer jouant le rôle d'initiateur radicalaire. A l'issue de ces études, les mélanges réactionnels bruts ont été analysés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem *via* une source électrospray. Aussi, lorsqu'une purification par chromatographie sur gel de silice était possible, les fractions récoltées étaient soumises à une analyse de RMN à deux dimensions. Ces caractérisations de produits nous ont permis d'identifier le type de mécanismes à l'origine de la formation d'un adduit entre l'acide aminé et le composé cible.

La troisième partie de ce travail a été consacrée à l'évaluation et à la caractérisation des radicaux libres oxygénés et carbonés générés par les composés cibles à l'issue d'un clivage des liaisons O-O de la fonction peroxyde. Pour ce faire, la spectroscopie de RPE en combinaison avec la technique de piégeage de spin a été utilisée en présence de piègeurs de spin de type nitrone tels que le **DMPO**, le **DEPMPO** et le **DIPPMPO**. Pour ce faire, un initiateur radicalaire, le système Fe(II)/Fe(III), a été utilisé lors des études effectuées en solution en raison de son possible lien avec la dégradation des peroxydes *in vivo*. Puis, par la suite, nous avons transféré cette méthodologie sur un modèle 3D d'épidermes humains reconstitués (RHE-EpiSkin™). Dans ce cas, aucun initiateur radicalaire n'a été utilisé dans le but de se rapprocher le plus possible d'un scénario réel de sensibilisation cutanée.

Parallèlement, comme ces allergènes peuvent également être de puissants oxydants capables d'interférer avec l'équilibre redox cellulaire, leur potentiel redox a été mesuré par voltampérométrie cyclique. Le travail a consisté à appliquer un potentiel à une solution contenant un allergène et à mesurer le courant résultant de la réaction de réduction. Pour ce faire, un travail préliminaire est effectué sur l'électrode en carbone. L'électrode en carbone a été modifiée avec un catalyseur : l'oxyde de graphène avec le polyoxométalate Dawson qui a permis un transfert d'électrons beaucoup plus rapide.

Les résultats présentés dans le premier chapitre de ce manuscrit comportent les stratégies de synthèse qui ont été développées pour former les cinq molécules cibles. Celles-ci reposent essentiellement sur la réaction de Schenck « ène » impliquant l'oxygène moléculaire à l'état singulet ou bien sur des substitutions nucléophiles SN₁ / SN₂ à partir d'alcools correspondants. Par exemple, l'ascaridol a été engendré en une seule étape avec un rendement de 45 % par traitement de l' α -terpinène avec du peroxyde d'hydrogène en présence d'une quantité catalytique de molybdate de sodium dans une microémulsion.³

La réaction de Schenck sur le *R*-(+)-limonène et le (\pm)- β -citronellol fournissant des mélanges d'hydroperoxydes allyliques de purification très difficile, nous avons donc décidé de synthétiser les différents hydroperoxydes cibles dérivés de ces terpènes de façon indépendante. Les hydroperoxydes allyliques secondaires peuvent être synthétisés par

substitution nucléophile S_N1 à partir de l'alcool correspondant. Pour ce faire, du peroxyde d'hydrogène en présence d'une quantité catalytique d'acide sulfurique a été utilisé. Ainsi, le **Lim-2-OOH** a été obtenu à partir du (-)-carvéol avec un rendement de 48 %. Le **(1S, 4R)-Lim-1-OOH** quant à lui a été obtenu directement à partir du *R*-(+)-limonène. Après avoir obtenu par oxydation le limonène-1,2-époxyde (mélange d'isomères), l'alcool précurseur a été obtenu grâce à un β -aminoalcool intermédiaire résultant d'une ouverture sélective de l'un des époxydes avec de la morpholine, suivie d'élimination oxydante. L'intermédiaire alcool a été enfin converti en **(1S, 4R)-Lim 1-OOH** par une S_N1 .⁴

Le **(\pm)-Citr-7-OOH** a été synthétisé en 4 étapes en adoptant la même stratégie de synthèse, c'est à dire en passant par l'intermédiaire alcool correspondant. Après diverses tentatives dans le but d'obtenir le **(\pm)-Citr-6-OOH**, ce dernier n'a malheureusement pas pu être obtenu, la difficulté majeure étant de le purifier des différents mélanges d'oxydation obtenus par action du peroxyde d'hydrogène. En conséquence, pour la suite des études, nous avons décidé de travailler avec le mélange d'hydroperoxydes **(\pm)-Citr-6-OOH** et **(\pm)-Citr-7-OOH** obtenus à partir de la réaction de Schenck sur le (\pm)- β -citronellol.

Les études décrites dans le deuxième chapitre ont permis d'observer des différences dans les comportements des molécules cibles vis-à-vis de la chaîne latérale des acides aminés étudiés. Les réactions initiées par le sulfate de fer (II) envers les acides aminés sélectionnés ont conduit à la formation d'adduits potentiels. Toutefois, les réactions catalysées par du sulfate de fer (II) entre les composés cibles et l'ester méthylique de la *N*-acétyl-cystéine, les esters éthyliques de la *N*-acétyl-tyrosine et du *N*-acétyl-tryptophane, ont conduit à des produits d'oxydation des acides aminés.

Les composés cibles ont été capables de se lier de manière covalente à certains acides aminés. Lors de l'expérience de réactivité entre le **Lim-2-OOH** et la *N*-acétyl-cystéine méthyl ester, les structures chimiques supposées pour les adduits **34**, **35**, **36**, **37** n'ont pu se former que par un mécanisme de type radicalaire. De manière identique pour le composé **43**, issu de la réactivité de la *N*-acétyl-cystéine méthyl ester avec le **(\pm)-Citr-7-OOH**.

Bien qu'un réarrangement radicalaire puisse avoir lieu, des mécanismes à deux électrons de type nucléophile-électrophile ne sont pas exclus. Nous avons pu le constater lors de l'activation de l'**Asc** grâce au sulfate de fer (II) avec la formation de la cétone α,β -insaturée **29**, par fragmentation et perte d'un radical isopropyle, qui peut subir une addition de Michael avec le groupe nucléophile thiol de la cystéine.⁵

Outre les produits d'addition, le *N*-acétyl-tryptophane éthyl ester et la *N*-acétyl-tyrosine éthyl ester sont capables de subir une oxydation formant des dérivés oxydés indiquant la force oxydante du milieu réactionnel.

En raison de la formation d'adduits potentiels avec certains acides aminés, nous nous attendions à ce que les molécules se fixent également sur la protéine modèle HSA. D'après les résultats de Maldi-Tof, des modifications chimiques semblent avoir eu lieu sur la HSA. Cette analyse s'avérant peu précise, des analyses complémentaires de digestion trypsique des échantillons pourraient nous fournir des informations quant à la séquence peptidique présentant la modification chimique. Cependant, cette étape de digestion ne nous a pas fournis les données attendues. A l'heure actuelle, des nouvelles tentatives de digestion trypsique sont en cours.

L'utilisation de molécules contenant une substitution au ^{13}C sur des sites susceptibles de correspondre à des positions radicalaires carbonés réactives permettrait de suivre de manière plus précise la réactivité avec les acides aminés. Cela permettrait également de distinguer la réactivité des diverses positions notamment dans le cadre des études avec la HSA, le suivit par RMN du ^{13}C nous favoriserait la lecture des résultats.⁶

Bien que l'on sache maintenant que les acides aminés peuvent être modifiés par voie radicalaire par ces composés, la vraie question était de savoir si ces radicaux libres réactifs se forment réellement dans l'épiderme une fois que l'allergène a traversé le *stratum corneum*. Depuis plusieurs années, l'équipe de Dermatochimie s'intéresse à l'identification et à la caractérisation des espèces radicalaires issues d'hydroperoxydes allergisants. La technique de piégeage de spin associée à la résonance paramagnétique électronique (RPE) a pour cela été utilisée pour l'identification des radicaux transitoires $\text{RO}\cdot/\text{ROO}\cdot/\text{R}\cdot$ dans les systèmes chimiques et biologiques et permet une identification des radicaux réactifs issus de ces composés.⁷

Ainsi, des radicaux oxygénés et carbonés dérivés des composés d'études ont été piégés avec succès par le **DMPO**, le **DEPMPO** et le **DIPPMPO**. L'identification des espèces radicalaires a été possible grâce aux déterminations des constantes de couplages hyperfines obtenues au moyen de simulations informatiques à l'aide de programmes créés avec la boîte à outils EasySpin dans un environnement Matlab.⁸

Nous avons observé des adduits de spin correspondant au piégeage de radicaux centrés sur l'oxygène ($\text{RO}\cdot / \text{HO}\cdot$) mais également de radicaux centrés sur le carbone ($\text{R}\cdot$) dérivés des processus de réarrangement radicalaire des composés cibles lors des études en solution. Le **DEPMPO**, le **DIPPMPO** et le **DMPO** se sont avérés être des piègeurs de spin intéressants

étant donné qu'une vue d'ensemble de tous les types de radicaux dérivés des composés était observée en même temps avec des concentrations catalytiques de sulfate de fer (II) aussi faibles que 0,1 mM.

L'objectif principal de ces études était le transfert de la méthodologie en solution sur un modèle 3D d'épidermes humain reconstitués (RHE). Pour cette étude, aucun initiateur radicalaire Fe (II) n'a été utilisé afin de se rapprocher d'un scénario réel d'exposition de la peau. Le **DEPMPO** s'est avéré être le piègeur de spin fournissant des résultats avec un S/N meilleur par rapport au **DIPPMPO**, probablement en raison de leur différence du coefficient de partage K_p . Des radicaux centrés sur le carbone et des radicaux hydroxyles, dérivés des composés d'études ont été identifiés dans cet environnement RHE.

Dans les deux systèmes d'études, en solution et sur les RHE, des radicaux centrés sur l'oxygène et sur le carbone ont été observés, ce qui prouve le rôle fondamental des mécanismes radicalaires dans l'épiderme. Les expériences de contrôle dans le RHE suggèrent que les radicaux observés sont dérivés des allergènes de contact étudiés eux-mêmes et non de la dégradation radicalaire de biomolécules présentes dans les RHE. Cependant, des investigations complémentaires sont nécessaires pour le confirmer. De ce fait, une substitution au ^{13}C au niveau des groupements méthyles de l'hydroperoxyde de cumène (**Cum-OOH**) nous a permis d'identifier la provenance du radical méthyle observé par RPE. Pour cela, la synthèse a été mise au point dans un premier temps sans substitution au ^{13}C . De cette manière, à l'issue de trois étapes de synthèse le **Cum-OOH** a pu être obtenu avec un rendement global de 15 %. Cette méthodologie a été suivie pour obtenir le $^{13}\text{C-MeCum-OOH}$ et le $(^{13}\text{C-Me})_2\text{Cum-OOH}$ avec 13% et 12% de rendements globaux respectivement.⁹

Ces trois molécules synthétisées ont ensuite été utilisées pour des études par RPE en solution puis sur des épidermes humains reconstitués. L'analyse des spectres de RPE en solution a permis d'identifier le piégeage de quatre types de radicaux différents avec le **DEPMPO**. L'attribution de ces derniers a été possible grâce aux références présentes dans la littérature.¹⁰ Toutefois, pour le radical méthyle substitué au ^{13}C , la *hfcc* relative du ^{13}C a été pour la première fois identifiée avec une valeur étant d'environ 6 Gauss. Les conclusions qui ont été tirées des résultats en solution ont été aussi observées lors des études avec les RHE.

Ainsi, avec l'ensemble des informations recueillies par RPE, l'efficacité de la substitution au ^{13}C a été mise en avant puisque celle-ci a permis de justifier l'origine du radical méthyle $\cdot\text{CH}_3$ piégé issu de la β -scission du $^{13}\text{C-MeCum-OO}\cdot$.

Il serait maintenant intéressant d'utiliser la substitution au ^{13}C ou au deutérium pour identifier la structure précise des radicaux impliqués dans la sensibilisation aux autres

composés allergènes tels que les hydroperoxydes du *R*-(+)- limonène et du (\pm)- β -citronellol par exemple lors des études avec les RHE.

En conclusion, des radicaux carbonés et des radicaux hydroxyles issus des allergènes étudiés ont pu être identifiés à la fois lors des études en solution mais également dans le modèle RHE. Des radicaux hydroxyles et carbonés ont été observés dans le système RHE bien que ces radicaux soient piégés dans un environnement de matrice assez complexe démontrant de cette façon le rôle fondamental des mécanismes radicalaires lors d'une sensibilisation de la peau.

Dans le but d'approfondir ces études, il serait intéressant d'identifier les protéines épidermiques dans ce modèle de RHE interagissant avec les allergènes de contact étudiés et d'étudier comment cela pourrait activer de manière différenciée le système immunitaire. En effet, la réponse immunitaire pourrait être liée à la modification de certaines protéines épidermiques. Pour cela, des extractions des protéines d'épidermes humains reconstitués incubés en présence de ces allergènes peuvent être une alternative à prendre en compte. Une analyse protéomique de ces échantillons et la caractérisation des modifications chimiques des protéines se ferait alors par spectrométrie de masse.

Une question importante reste tout de même en suspens, à savoir, le lieu de la production de l'initiation radicalaire. Pour en percer le mystère, il serait possible d'envisager l'utilisation d'un piègeur de spin plus volumineux tel que le CD-DIPPMPO décrit par Abbas et al.¹¹ En raison de l'encombrement de ses substituants, il semblerait que sa pénétration dans les cellules soit ralentie voir bloquée contrairement au **DEPMPO**. Cela conduirait à avoir une idée plus précise quant à la localisation de la génération de radicaux induite par l'hydroperoxyde. Par ailleurs, Hardy et al.¹² ont décrit un piègeur de spin le Mito-DEPMPO, ciblant potentiellement les mitochondries, qui pourrait être testé pour suivre la génération de radicaux issus des hydroperoxydes dans les cellules.

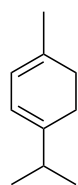
Au vu de l'activation des CDs en présence de ces allergènes, il nous a semblé judicieux d'étudier leur pouvoir oxydant. Jamais décrit auparavant à notre connaissance, nous avons mis en place un protocole expérimental nous permettant de mesurer par voltampérométrie cyclique le courant résultant de la réaction de réduction. Les réponses obtenues lors de ces études prouvent que ces composés peuvent jouer le rôle d'oxydant et permettent de compléter les données caractérisant ces allergènes. Ainsi, l'électrode de carbone mimerait la surface de la peau qui serait le siège des réactions radicalaires.

Références bibliographiques

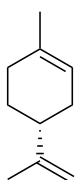
Discussion et conclusion générale

1. Rajan, T.V. The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions. *TRENDS Immunol.* **2003**, *24*, 376-379.
2. Lepoittevin, J.-P. Molecular aspects in allergic and irritant contact dermatitis. Dans : *Contact Dermatitis 5th Ed.* Frosch, P. J.; Menné, T.; Lepoittevin, J.-P. Eds., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Allemagne, **2011**, 91-110.
3. Aubry, J.-M.; Adam, W.; Alsters, P. L.; Borde, C.; Queste, S.; Marko, J.; Nardello, V. Dark singlet oxygenation of organic substrates in single-phase and multiphase microemulsion systems. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 10753-10761.
4. Calandra, M.J.; Impellizzeri, J.; Wang, Y. An HPLC method for hydroperoxides derived from limonene and linalool in citrus oils, using post-column luminol-mediated chemiluminescence detection. *Flavour Fragr. J.* **2015**, *30*, 121-130.
5. Sahli, F.; Silva e Sousa, M.; Vileno, B.; Lichter, J.; Lepoittevin, J.-P.; Blömeke, B.; Giménez-Arnau, E. Understanding the skin sensitization capacity of ascaridole: a combined study of chemical reactivity and activation of the innate immune system (dendritic cells) in the epidermal environment. *Arch. Toxicol.* **2019**, *93*, 1337-1347.
6. Alvarez-Sánchez, R.; Divkovic, M.; Basketter, D.; Pease, C.; Panico, M.; Dell, A.; Morris, H.; Lepoittevin, J. -P. Effect of glutathione on the covalent binding of the ¹³C-labeled skin sensitizer 5-chloro-2-methylisothiazol-3-one (MCI) to human serum albumin: identification of adducts by NMR, MALDI-MS, and nano-ES MS/MS. *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, *17*, 1280-1288.
7. Lauricella, R.; Tuccio, B. Détection et caractérisation de radicaux libres après piégeage de spins. Dans : *La spectroscopie de résonance paramagnétique électronique.* Bornarel, J.; Bertrand, P. Eds. Edp sciences, Grenoble, France, **2014**, 49-78.
8. Stoll, S.; Schweiger, A. EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. *J. Magn. Res.* **2006**, *178*, 42-55.
9. Sahli, F.; Godard, A.; Vileno, B.; Lepoittevin, J.-P.; Giménez-Arnau, E. Formation of methyl radicals derived from cumene hydroperoxide in reconstructed human epidermis: an EPR spin trapping confirmation by using ¹³C-substitution. *Free. Radic. Res.* **2019**, *53*, 737-747.
10. Kuresepi, S.; Vileno, B.; Turek, P.; Lepoittevin, J.-P.; Giménez-Arnau, E. Potential of EPR spin-trapping to investigate in situ free radicals generation from skin allergens in reconstructed human epidermis: cumene hydroperoxide as proof of concept. *Free Radic. Res.* **2018**, *52*, 171-179.
11. Abbas, K.; Babić, N.; Peyrot, F. Use of spin traps to detect superoxide production in living cells by Electron Paramagnetic Resonance (EPR) spectroscopy. *Methods* **2016**, *109*, 31-43.
12. Hardy, M.; Poulhés, F.; Rizzato, E.; Rockenbauer, A.; Banaszak, K.; Karoui, H.; Lopez, M.; Zielonka, J.; Vasquez-Vivar, J.; Sethumadhavan, S.; et al. Mitochondria-targeted spin traps: synthesis, superoxide spin trapping, and mitochondrial uptake. *Chem. Res. Toxicol.* **2014**, *27*, 1155-1165.

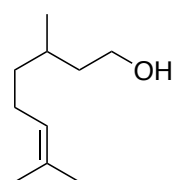
Formulaire



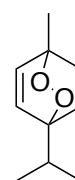
α -terpinène



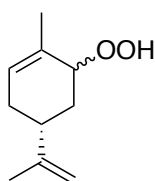
R-(+)-limonène



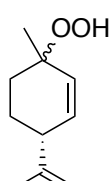
(±)- β -citronellol



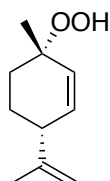
Asc



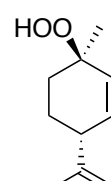
Lim-2-OOH



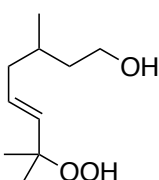
Lim-1-OOH



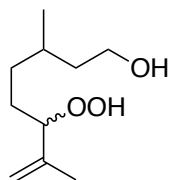
(1*S*,4*R*)-Lim-10OH



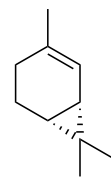
(1*R*,4*R*)-Lim-1-OOH



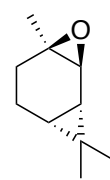
(±)-Citr-7-OOH



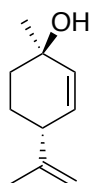
(±)-Citr-6-OOH



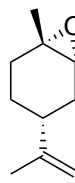
(+)-2-carene



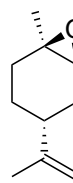
1



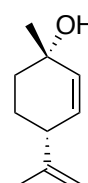
2



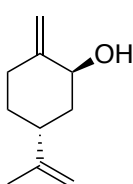
3



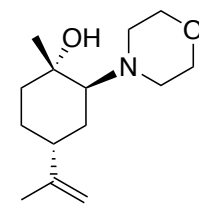
4



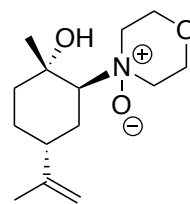
5



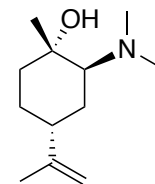
6



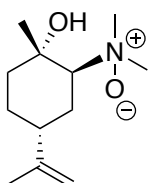
7



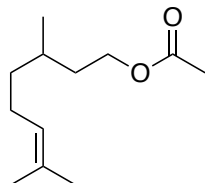
8



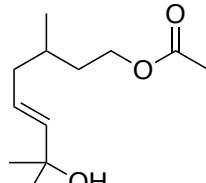
9



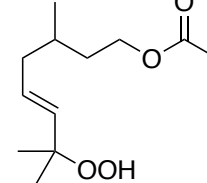
10



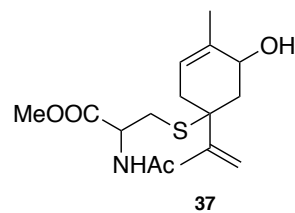
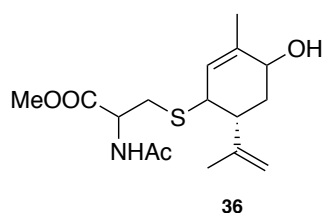
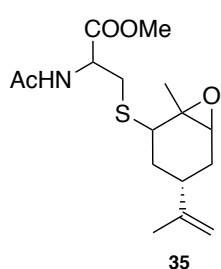
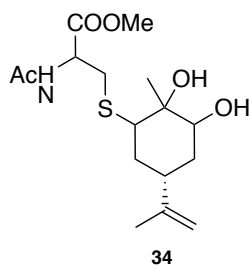
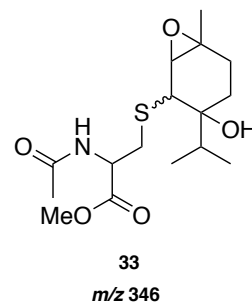
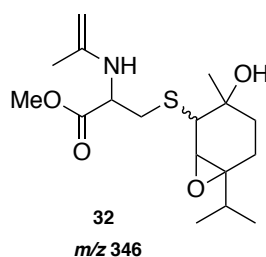
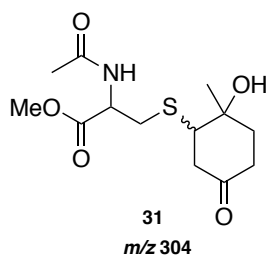
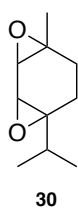
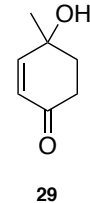
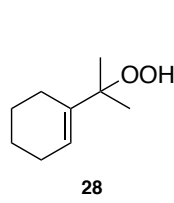
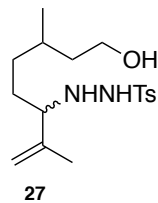
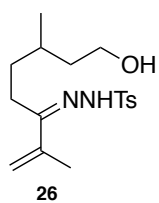
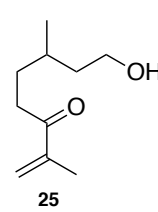
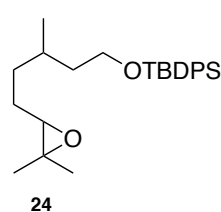
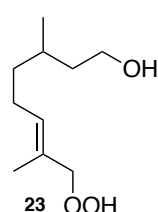
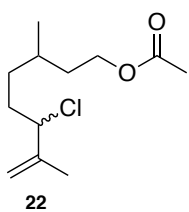
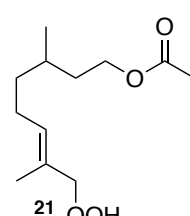
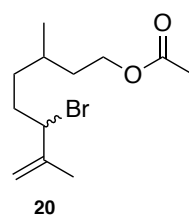
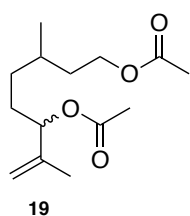
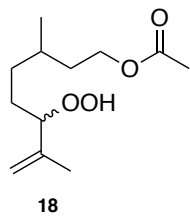
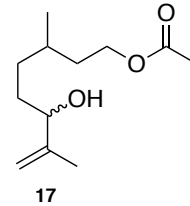
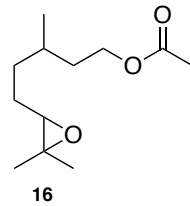
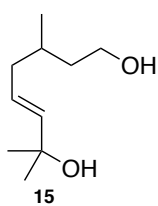
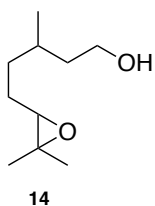
11

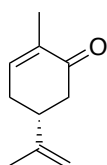


12

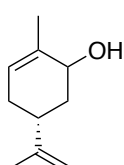


13

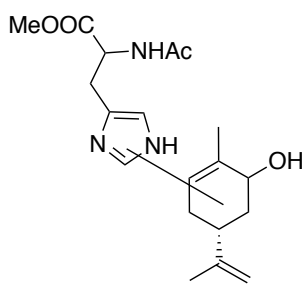




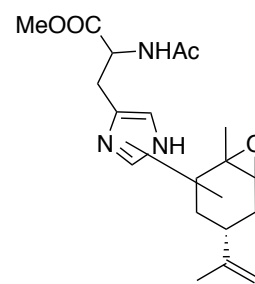
38



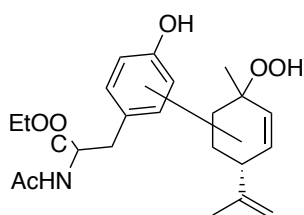
39



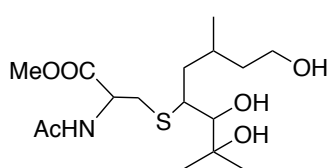
40
m/z 362



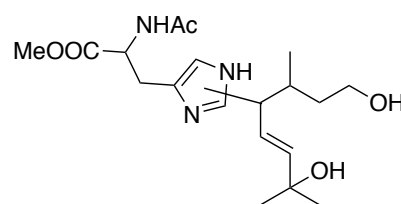
41
m/z 362



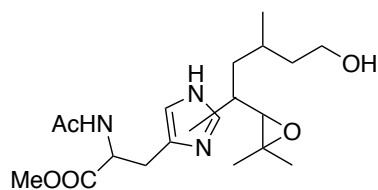
42
m/z 440



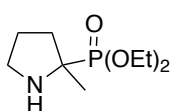
43
m/z 366



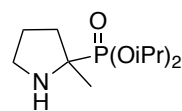
44
m/z 382



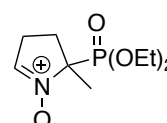
45
m/z 382



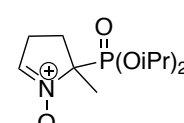
46



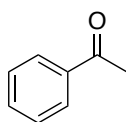
47



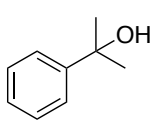
DEPMPPO



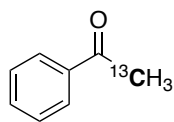
DIPPMPPO



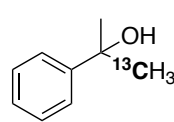
48



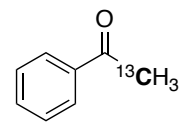
49



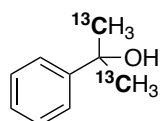
50



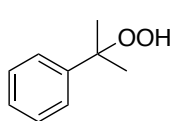
51



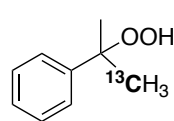
50



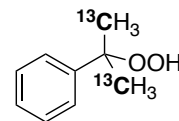
52



Cum-OOH



¹³C-MeCum-OOH



(¹³C-Me)₂Cum-OOH

Les allergènes cutanés réagissant au travers de processus radicalaires : compréhension de la molécule au tissu

L'allergie cutanée représente un problème majeur de santé publique. La compréhension de tous les mécanismes conduisant à des réactions allergiques est capitale afin d'évaluer le potentiel de sensibilisation des molécules à risques. Les hydroperoxydes dérivés de l'autoxydation de terpènes utilisés dans les produits cosmétiques sont à l'origine de sensibilisations cutanées. L'objectif a été d'étudier l'intervention de mécanismes radicalaires dans la formation d'entités antigéniques de ces composés. Une approche intégrée de trois actions a été proposée :

- *in chemico* : études de réactivité vis-à-vis des acides aminés afin d'établir un profil de réactivité complet suscitant des réactions radicalaires
- *in situ* : étude de la formation et comportement des intermédiaires radicalaires formés dans un modèle 3D d'épiderme humain reconstitué
- *in cellulo* : étude de leur capacité à activer le système immunitaire inné, à savoir les cellules dendritiques dans leur contexte naturel kératinocytaire

Mots-clés : Allergie de contact, Hydro-/peroxydes, interaction haptène-protéine, intermédiaires radicalaires, réactivité, RPE, piégeage de spin, épiderme humain reconstitué, voltampérométrie cyclique, potentiel d'oxydo-réduction

Skin allergy is a major public health problem. It is the most important immunotoxic reaction in humans. Understanding all mechanisms leading to allergic-inflammatory reactions is essential in order to evaluate the sensitization potential of molecules for risk assessment purposes. Hydroperoxides derived from autoxidation of odorant terpenes used in cosmetics cause skin sensitization. The objective was to study the involvement of radical mechanisms in the formation of the antigenic entities of these compounds. An integrated approach of three actions was proposed:

- *in chemico*: reactivity studies with amino acids to establish a complete reactivity profile *via* radical reactions
- *in situ*: formation and behavior of radical intermediates in a reconstructed human epidermis 3D model
- *in cellulo*: ability to activate the innate immune system, namely dendritic cells in their natural keratinocyte context

Keywords: allergic contact dermatitis, hydro-/peroxydes, hapten protein interaction, radical intermediates, reactivity, EPR, spin-trapping, reconstructed human epidermis, cyclic voltamperometry, redox potential