



HAL
open science

Synthèse de dérivés de la Névirapine substitués au carbone 13 pour l'étude de l'activation métabolique de cet antirétroviral dans des épidermes humains reconstruits

Marion Greco

► To cite this version:

Marion Greco. Synthèse de dérivés de la Névirapine substitués au carbone 13 pour l'étude de l'activation métabolique de cet antirétroviral dans des épidermes humains reconstruits. Chimie organique. Université de Strasbourg, 2018. Français. NNT: 2018STRAF009 . tel-01943733

HAL Id: tel-01943733

<https://theses.hal.science/tel-01943733>

Submitted on 4 Dec 2018

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

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

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Institut de Chimie, UMR 7177

THÈSE présentée par :

Marion GRECO

Soutenue le : 24 mai 2018

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

Discipline / Spécialité : Chimie organique

**Synthèse de dérivés de la Névirapine
substitués au carbone 13 pour l'étude de
l'activation métabolique de cet antirétroviral
dans des épidermes humains reconstruits**

THÈSE dirigée par :

M. LEPOITTEVIN Jean-Pierre
Mme BERL-BAUDER Valérie

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

RAPPORTEURS :

Mme GILARD Véronique
M. MARSURA Alain

Professeur, Université Paul Sabatier, Toulouse
Professeur, Université de Lorraine

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme GROSDÉMANGE-BILLIARD Catherine Professeur, Université de Strasbourg
M. PALLARDY Marc Professeur, Université Paris-Sud

La chance aide parfois, le travail toujours.

Proverbe brahman

A ma Maman,

A Camille,

A Adeline,

A ma Mamie,

A toute ma famille,

A Long.

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit a été réalisé au sein du laboratoire de Dermatochimie sous la direction du Professeur Jean-Pierre Lepoittevin et du Docteur Valérie Berl. Au travers de ces quelques lignes, je souhaite remercier celles et ceux qui l'ont rendu possible.

Je vous remercie, Jean-Pierre. Je vous ai d'abord beaucoup admiré en licence et en master pour vos qualités d'enseignant, avant d'être frappée par votre savoir infini dans tous les domaines de la science et de la vie quotidienne. Merci de m'avoir accueillie au laboratoire et de m'avoir accordé votre confiance pour débiter le travail sur la Névirapine. Je retiens vos petites attentions laissées sur mon bureau lorsque vous sentiez que ça n'allait pas ! Je suis heureuse de continuer à bénéficier de votre enseignement l'an prochain. Valérie, merci pour vos précieux conseils dispensés au quotidien. Vous ne m'avez pas lâchée ! Nos réunions autour de mes cahiers de labo m'ont beaucoup aidée. J'ai pris énormément de plaisir à vous assister en salle de TP afin de « boucler la boucle » comme vous l'avez si bien dit lors de ma soutenance.

J'adresse également mes remerciements au Professeur Véronique Gilard, au Professeur Catherine Grosdemange-Billiard, au Professeur Alain Marsura, et au Professeur Marc Pallardy. Merci de m'avoir fait l'honneur de juger mon travail et de m'avoir fait profiter de votre expertise. Merci de m'avoir accordé le titre de Docteur de l'Université de Strasbourg.

Je remercie chaleureusement toute l'équipe de Dermatochimie. Elena, pour ta bonne humeur permanente et ton humour décapant. Je n'oublie pas mes amis doctorants, post-doctorants et stagiaires. Fatma, les goûters à la machine à café et ta présence tard le soir au labo m'ont aidée à garder la motivation devant d'innombrables colonnes. Et surtout : tu me fais tellement rire ! Salen, merci pour ces quatre ans passés ensemble au labo. Hassan, j'ai adoré partager mon bureau avec toi. Je retiens nos nombreuses discussions, et tes conseils resteront dans un coin de ma tête. Je t'admire également pour tes grandes qualités de chimiste et ta rigueur au travail. Minh, merci de m'avoir appris quelques mots en vietnamien. Marie, merci pour ton aide précieuse, je n'aurais pas pu rêver d'une meilleure voisine de paillasse !

Bien évidemment, j'exprime ma reconnaissance à François-Marie. Tu as réalisé les expériences de RMN HRMAS avec toute l'expertise qui te caractérise, en prenant à cœur chaque résultat... Un grand merci à toi ! Je souhaite également remercier tous les stagiaires rencontrés au fil des mois, avec une pensée particulière pour Emilie, Sarah et Aude, que j'ai eu la chance d'encadrer. Je remercie aussi Arnaud et Claire. Enfin, je remercie Eric de m'avoir accueillie au labo avant de me léguer sa paillasse et son impressionnante collection de ballons, erlens et verrerie en tout genre.

Je pense aussi à toutes les personnes qui ont contribué au bon déroulement de cette thèse. Merci au personnel du service commun de RMN de la Faculté de Chimie de Strasbourg : Lionel Allouche, Bruno Vincent et Maurice Coppe pour la RMN en phase liquide, et Jésus Raya pour la RMN HRMAS. Je n'oublie pas Lydia Tortroteau et George Schwarz qui m'ont toujours accueillie chaleureusement au magasin de chimie pour les courses hebdomadaires. Merci à Barbara Lamure, au regretté Patrick Werhung, à Delphine Garnier et à Estefanía Oliva pour les expériences de LC-MS au sein de la Plateforme d'Analyse Chimique de Strasbourg-Illkirch.

Merci à ma famille. Ma Maman d'abord, que j'ai toujours voulu rendre fière et qui a toujours cru en moi. Merci à mes deux petites sœurs, Camille et Adeline. Camille, merci de m'avoir supportée après mes longues journées au labo. Tu as le don de me redonner le sourire dans n'importe quelle situation ! Adeline, tu m'as beaucoup inspirée, toi qui es partie à l'autre bout du monde pour apprendre le métier de tes rêves. Je remercie également Didier qui a redonné le sourire à Maman. J'ai une pensée très émue pour ma Mamie, que j'adore, un petit bout de femme au cœur énorme et d'une énergie incroyable. J'adresse également mes remerciements à mon Papí qui m'a appris que le travail finit toujours par payer et que les blagues sont toujours plus drôles en Alsacien. Je pense aussi à mon tonton Sébastien, toujours prêt à me tendre la main, et à mon cousin Flavien dont l'éloquence m'impressionne. Enfin, je remercie ceux que je considère comme ma famille : Adel, Tutu, Bibi, et Huhu. Vous tenez une place à part dans mon cœur.

Je voudrais également adresser mes remerciements à mon amie Aurélia, avec qui j'ai appris à dessiner des benzènes il y a dix ans dans sa petite cuisine Strasbourgeoise.

Ces dernières lignes sont pour toi, Long. Le hasard a fait que la fin de cette thèse rime avec le début d'un nouveau chapitre de notre histoire. Tu m'as toujours dit que le plus important, c'était de faire de son mieux. Je crois que j'ai réussi. Merci de m'avoir choisie pour partager ta vie.

Table des matières

Abréviations, acronymes et unités	1
Avant-propos	4
Chapitre I – Introduction générale	6
Les toxidermies médicamenteuses : notions de base	
I. La peau, première barrière de protection de l'organisme	6
I.1. L'épiderme	7
I.2. Le derme	8
I.3. L'hypoderme	8
II. Métabolisme cutané	8
II.1. Métabolisme de phase I : phase de fonctionnalisation	9
II.2. Métabolisme de phase II : phase de conjugaison	11
III. Chimie et toxicité : les haptènes	12
III.1. Caractéristiques des haptènes	12
III.2. Formation d'un complexe antigénique par liaison de coordination	13
III.3. Formation d'un complexe antigénique par liaison covalente	14
III.4. Les pro-haptènes : implication du métabolisme dans la toxicité cutanée	15
III.5. L'allergie de contact	16
IV. Les toxidermies induites par les médicaments : mécanismes immunologiques	17
IV.1. Les évènements indésirables médicamenteux : vue d'ensemble et classification	17
IV.2. Les évènements indésirables de type B	19
IV.3. Mécanismes immunologiques des effets indésirables de type B	19
IV.3.a. L'hypothèse de l'haptène	20
IV.3.b. L'hypothèse de danger	22
IV.3.c. L'hypothèse de l'interaction pharmaceutique	24

V. La Névirapine	25
V.1. Métabolisme de la Névirapine	26
V.2. La Névirapine comme pro-haptène ?	28
V.2.a. Réactivité du groupement cyclopropylamine	28
V.2.b. Oxydation des métabolites phénoliques en quinones imines	29
V.2.c. Epoxydation des noyaux pyridines	31
V.2.d. Estérification de la 4-carboxy-Névirapine	32
V.2.e. Activation de la 12-hydroxy-Névirapine en dérivé sulfate	33
VI. Présentation du travail de thèse	37
VI.1. Hypothèse de travail	37
VI.2. Les épidermes humains reconstruits	38
VI.3. La RMN HRMAS, une technique d'analyse de choix	38
VI.4. Objectifs du travail de thèse	39
Chapitre II	41
La Névirapine : généralités et synthèse de la 12-(¹³ C)Névirapine	
I. Découverte et commercialisation de la Névirapine	42
I.1. Le VIH : un peu d'histoire	42
I.2. Cycle de replication du VIH	43
I.3. Recherche et développement d'un inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse	45
I.4. Synthèses industrielles de la Névirapine	46
II. Préparation du 4-(¹³C)CAPIC, intermédiaire clé de la synthèse de la 12-(¹³C)Névirapine	48
II.1. Synthèse d'un noyau pyridine à partir d'un β-cétoacétal	48
II.1.a. Choix de la position de la substitution et préparation de la 4,4-diméthoxy-2-butanone 17	49
II.1.b. Condensation de Knoevenagel avec le cyanoacétamide et cyclisation	52
II.2. Synthèse du 4-(¹³ C)CAPIC à partir du β-cétoester 4-(¹³ C) 27	57
II.2.a. Choix de la position de la substitution et préparation du 4-(¹³ C)acétoacétate d'éthyle	58
II.2.b. Formation de la pyridone 4-(¹³ C) 28 par la méthode de Guareschi-Thorpe	65

II.2.c. Halogénéation de la pyridone 4-(¹³ C) 28	69
II.2.d. Transformation du substituant nitrile en amine	72
II.2.e. Déshalogénéation réductive complète de la pyridine dichlorée 4-(¹³ C) 13	73
II.2.f. Préparation du 4-(¹³ C)CAPIC par substitution électrophile aromatique régiosélective	75
II.2.g. Synthèse du 4-(¹³ C)CAPIC : bilan	76
III. Préparation de la 12-(¹³C)Névirapine à partir du 4-(¹³C)CAPIC	77
III.1. Couplage du 4-(¹³ C)CAPIC avec le chlorure d'acide 7	78
III.2. Préparation de la molécule 4-(¹³ C) 9 par substitution nucléophile aromatique régiosélective	79
III.3. Fermeture du cycle diazépnone : formation de la 12-(¹³ C)Névirapine	81
III.4. Synthèse de la 12-(¹³ C)Névirapine : bilan	82
IV. Préparation de la Névirapine sans passage par le CAPIC	84
IV.1. Couplage de la pyridine 13 avec le chlorure d'acide 7	84
IV.2. Préparation de la molécule 35 par substitution nucléophile aromatique régiosélective	86
IV.3. Fermeture du cycle diazépnone : formation de la 2-chloro-Névirapine et hydrogénation catalytique en Névirapine	90
IV.4. Préparation de la Névirapine par une voie alternative au passage par le CAPIC : bilan	91
V. Conclusion	93
Chapitre III	94
Synthèse de métabolites de la 12-(¹³ C)Névirapine	

I. Préparation de la 12-OH-Névirapine par hydroxylation d'une pyridine <i>N</i>-oxyde	96
I.1. Généralités sur les pyridines <i>N</i> -oxydes en chimie hétérocyclique	96
I.2. Synthèse et réduction des pyridines <i>N</i> -oxydes : revue de la littérature	98
I.3. Réactions de substitutions nucléophiles aromatiques sur les pyridines <i>N</i> - oxydes	100
I.4. La réaction de Boekelheide : généralités	102
I.5. La réaction de Boekelheide pour la préparation de la 12-OH-Névirapine	103

I.6. Tentative d'hydroxylation d'un précurseur de la Névirapine	105
II. Préparation de la 12-(¹³C)OH-Névirapine à partir de la 12-(¹³C)Névirapine	107
II.1. Méthodes récentes de préparation de la 12-OH-Névirapine	107
II.2. Préparation de la 12-OH-Névirapine par hydroxylation d'un dianion de la Névirapine : travaux publiés dans la littérature	109
II.3. Hydroxylation de la Névirapine et de la 12-(¹³ C)Névirapine	113
II.3.a. Le MoOPH : généralités et synthèse	113
II.3.b. Hydroxylation de la Névirapine puis de la 12-(¹³ C)Névirapine par le MoOPH	115
II.3.c. Hydroxylation de la Névirapine par une oxaziridine de Davis	118
II.4. Synthèse de la 12-(¹³ C)OH-Névirapine : bilan	121
III. Préparation de la 12-(¹³C)OH-Névirapine sulfate et de son analogue mésyle	122
III.1. Synthèse de la 12-(¹³ C)OH-Névirapine sulfate	122
III.2. Synthèse de la 12-(¹³ C)mésyloxy-Névirapine	124
IV. Synthèse de métabolites de la 12-(¹³C)Névirapine : conclusion	125
Chapitre IV	127
Réactivité de la 12-(¹³ C)Névirapine et de ses dérivés dans des épidermes humains reconstruits	
<hr/>	
I. Les épidermes humains reconstruits	127
I.1. Modèles d'études des mécanismes d'interactions haptène-protéine : un peu d'histoire	128
I.2. Les principaux modèles d'épidermes humains reconstruits	129
I.3. Le modèle EpiSkin [®]	129
I.3.a. Présentation du modèle EpiSkin [®]	129
I.3.b. Applications	130
II. LA RMN HRMAS, une technique d'analyse de choix	131
II.1. Un peu d'histoire	131
II.2. Principes de base de la RMN HRMAS	132
II.3. Applications de la RMN HRMAS	133

II.3.a. La RMN HRMAS en chimie	133
II.3.b. La RMN HRMAS en biologie	133
II.3.c. La RMN HRMAS en agronomie et en agroalimentaire	134
III. Les épidermes humains reconstruits associés à la RMN HRMAS pour l'étude des interactions haptènes-protéines	135
III.1. Etude du modèle d'épiderme humain reconstruit SkinEthic® en RMN HRMAS	135
III.2. Etude de l'interaction entre des haptènes et les épidermes humains reconstruits en RMN HRMAS	137
III.3. Etude de l'activation métabolique et de la réactivité de pro-haptènes dans des épidermes humains reconstruits en RMN HRMAS	138
IV. Réactivité de la 12-(¹³C)mésyloxy-Névirapine en phase liquide	139
IV.1. Acides aminés sélectionnés et protocole expérimental	139
IV.2. Réactivité de la 12-(¹³ C)mésyloxy-Névirapine en milieu aqueux	141
IV.2.a. Comportement de la 12-mésyloxy-Névirapine en l'absence d'acide aminé (tube témoin)	141
IV.2.b. Réactivité de la 12-(¹³ C)mésyloxy-Névirapine avec des acides aminés en milieu aqueux	142
IV.3. Réactivité de la 12-(¹³ C)mésyloxy-Névirapine en milieu organique	156
IV.3.a. Comportement de la 12-mésyloxy-Névirapine dans le DMSO deutéré	157
IV.3.b. Réactivité de la 12-(¹³ C)mésyloxy-Névirapine avec la tyrosine dans le DMSO deutéré	160
IV.4. Conclusion	161
V. Etude par RMN HRMAS de la réactivité de la 12-(¹³C)Névirapine et de ses dérivés dans des épidermes humains reconstruits	164
V.1. Mode opératoire	164
V.1.a. Manipulation des épidermes humains reconstruits	164
V.1.b. Acquisitions RMN HRMAS	165
V.2. Comportement du modèle EpiSkin® en présence de DMSO	166
V.3. Application de la 12-(¹³ C)Névirapine et de ses dérivés sur les épidermes humains reconstruits	168
V.3.a. Etude par RMN HRMAS du comportement de la 12-(¹³ C)Névirapine dans les épidermes humains reconstruits	168

V.3.b. Etude par RMN HRMAS de l'interaction de la 12-(¹³ C)OH-Névirapine avec les épidermes humains reconstruits	173
V.3.c. Etude par RMN HRMAS de l'interaction de la 12-(¹³ C)OH-Névirapine sulfate avec les épidermes humains reconstruits	177
V.3.d. Etude par RMN HRMAS de l'interaction de la 12-(¹³ C)mésyloxy-Névirapine avec les épidermes humains reconstruits	181
VI. Conclusion	188
Conclusion générale et perspectives	188
<hr/>	
I. Problématique de thèse	188
II. Hypothèse de travail et objectifs	189
III. Chimie	190
IV. Résultats obtenus en RMN HRMAS	191
V. Discussion	193
Experimental section	195
<hr/>	
Chemistry	195
Reactivity studies in solution	225
Reactivity studies in EpiSkin [®] model	233
Formulaire des molécules caractérisées	241
<hr/>	
Références bibliographiques	245
<hr/>	

Abréviations, acronymes et unités

°C	Degré Celsius
µL	Microlitre
µM	Micromolaire (micromole par litre)
µs	Microseconde
12-OH-NVP	12-Hydroxy-Névirapine
12-OH-NVP sulfate	12-Hydroxy-Névirapine sulfate
12-OMs-NVP	12-Mésyloxy-Névirapine
1D	Une dimension
2-Cl-NVP	2-Chloro-Névirapine
2D	Deux dimensions
2-OH-NVP	2-Hydroxy-Névirapine
3-OH-NVP	3-Hydroxy-Névirapine
4-COOH-NVP	4-Carboxy-Névirapine
8-OH-NVP	8-Hydroxy-Névirapine
Å	Ångström
ABT	1-Aminobenzotriazole
ADH	Alcool déshydrogénase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AEM	Agence européenne des médicaments
ALDH	Aldéhyde déshydrogénase
aq.	Aqueux
ARN	Acide ribonucléique
atm	Atmosphère
AZT	Azidothymidine
br s	Singulet large (broad singlet)
CAPIC	2-Chloro-3-amino-4-picoline
cat.	Catalyseur (quantité catalytique)
CDI	Carbonyldiimidazole
CI50	Concentration inhibitrice médiane
CL	Cellules de Langerhans
cm ²	Centimètre carré
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CoA	Coenzyme A
CPA	Cellules présentatrices d'antigène
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
CYP	Cytochrome P-450
d	Doublet
DIPSI	Decoupling in the presence of scalar interactions
DMAP	Diméthylaminopyridine
DMDO	Diméthyl-dioxirane
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNVP	12-tridéutéro-Névirapine

EC1	Enzyme commission 1
EC2	Enzyme commission 2
EMIR	Effets indésirables des médicaments : incidence et risque
ESI/APCI	Electrospray ionization/Atmospheric pressure chemical ionization
<i>et al.</i>	Et autres
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FDA	Food and Drug Administration
FID	Free induction decay
FMO	Flavine mono-oxygénase
g	Gramme
g.mol⁻¹	Gramme par mole
GlcUA	Acide glucuronique
GSH	Glutathion
h	Heure
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HMPA	Hexaméthylphosphoramide
HOMO	Highest occupied molecular orbital
HPLC	High pressure liquid chromatography
HRMAS	High resolution magic angle spinning
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation
Hz	Hertz
INADEQUATE	Incredible natural abundance double quantum transfer experiment
J	Constante de couplage scalaire
kJ.mol⁻¹	Kilojoule par mole
LC-MS	Liquide chromatography-Mass spectrometry
LDA	Diisopropylamidure de lithium
LT	Lymphocyte T
m	Multiplet
M	Molaire (mole par litre)
m/z	Rapport masse sur charge
m/m	Rapport masse sur masse
m²	Mètre carré
MAO	Monoamine oxydase
m-CPBA	Acide métachloroperbenzoïque
mg	Milligramme
mg/kg/jour	Milligramme par kilogramme par jour
MHz	Mégahertz
min	Minute
mL	Millilitre
mm	Millimètre
MoOPH	Peroxyde de molybdène-pyridine-hexaméthylphosphoramide
MP	Melting point
ms	Milliseconde
MW	Molecular Weight

N-Ac-Arg-OMe	Ester méthylique de la <i>N</i> -acétylarginine
N-Ac-Cys-OH	<i>N</i> -Acétylcystéine
N-Ac-Cys-OMe	Ester méthylique de la <i>N</i> -acétylcystéine
N-Ac-His-OH	<i>N</i> -Acétylhistidine
N-Ac-Lys-OMe	Ester méthylique de la <i>N</i> -acétyllysine
N-Ac-Tyr-OEt	Ester éthylique de la <i>N</i> -acétyltyrosine
N-Ac-Tyr-OH	<i>N</i> -Acétyltyrosine
NAD⁺/NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxydée/forme réduite)
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
nm	Nanomètre
nM	Nanomolaire (nanomole par litre)
NVP	Névirapine
OMS	Organisation mondiale de la santé
PAPS	3'-Phosphoadénosine 5'-phosphosulfate
PBS	Phosphate buffer solution
PCR	Polymerase chain reaction
pH	Potentiel hydrogène
PMA	Acide phosphomolybdique
PNO	Pyridine- <i>N</i> -oxyde
ppm	Partie par million
q	Quadruplet
R_f	Rapport frontal
RHE	Reconstructed human epidermis
RMN	Résonance magnétique nucléaire
s	Singulet
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SMX	Sulfaméthoxazole
SNAr	Substitution nucléophile aromatique
SULT	Sulfotransférase
t	Triplet
t.a.	Température ambiante
THF	Tétrahydrofurane
TLC	Thin layer chromatography
UDP	Uridine phosphate
UGT	Uridine phosphate glucuronyltransférase
VIH-1	Virus de l'immunodéficience de type I
δ	Déplacement chimique
ω_r	Vitesse angulaire

Avant-propos

Avant-Propos

Au regard de sa surface et de sa masse, la peau est l'organe le plus important du corps humain. Plus qu'une simple enveloppe, la peau est un système complexe qui assure de nombreuses fonctions de protections de l'organisme. En contact permanent avec les molécules de l'environnement, elle est également exposée aux substances ingérées par voie orale comme les médicaments, qui peuvent diffuser à travers l'organisme jusqu'à l'épiderme.

De nombreux traitements médicamenteux ont été mis sur le marché ces cinquante dernières années. Cependant, les innovations thérapeutiques s'accompagnent d'un problème majeur de santé publique : les effets indésirables médicamenteux. En France, l'étude EMIR (Effets Indésirables des Médicaments : Incidence et Risque) estime à 3,6% la proportion d'hospitalisations liées à ces effets.^[1] Il existe plusieurs types d'effets indésirables médicamenteux. Parmi eux, les réactions idiosyncratiques, rares et imprévisibles, sont généralement constatées tardivement pendant la phase III des essais cliniques, parfois même après la mise sur le marché. Elles peuvent affecter tous les organes, avec le foie, la peau et la moelle osseuse comme cibles privilégiées.

La plupart des réactions de toxicité cutanée sont modérées, mais les patients atteints des formes les plus sévères (syndrome de Stevens-Johnson, syndrome de Lyell) souffrent d'une douloureuse et traumatisante nécrolyse de l'épiderme qui menace leur vie. A l'heure actuelle, aucune thérapie ne permet de soigner les toxidermies. Seuls les traitements symptomatiques peuvent soulager les patients qui gardent souvent des séquelles psychologiques importantes.^[2]

La chimie joue un rôle important dans l'étude des phénomènes qui induisent les toxidermies. Ces dernières seraient déclenchées par une réaction exagérée du système immunitaire face à une molécule non protéique de faible poids moléculaire, appelée haptène. Les mécanismes immunologiques des toxidermies ne sont pas totalement élucidés. Ils sont complexes et varient d'une molécule à l'autre, mais, selon la théorie de l'haptène, ils passeraient par la formation d'un complexe antigénique entre l'haptène et une protéine épidermique.^[3] La compréhension des phénomènes à l'origine des toxidermies passe donc par l'étude de cette étape clé.

Il existe peu de modèles permettant d'étudier à l'échelle moléculaire l'interaction des substances potentiellement toxiques avec l'épiderme. En ce qui concerne les toxidermies, les modèles animaux sont peu nombreux car les réactions idiosyncratiques sont aussi rares chez l'animal que chez l'homme.

Depuis de nombreuses années, le laboratoire de Dermatochimie cherche à élucider les mécanismes chimiques qui aboutissent à des pathologies dermatologiques telles que l'allergie de contact et la photosensibilité chronique. Ces travaux passent nécessairement par le développement de modèles se rapprochant le plus possible de la réalité des phénomènes se produisant chez l'Homme.

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit s'inscrit dans la suite des études précédentes. Il est basé sur l'utilisation des épidermes reconstruits, hautement comparables aux épidermes humains par leur structure et leur composition grâce aux progrès de l'ingénierie. Ce modèle a montré de bons résultats dans l'étude de l'allergie de contact déclenchée par plusieurs haptènes^[4,5] et a été étendu à l'analyse d'une autre catégorie d'allergènes, appelés pro-haptènes.^[6] Nous proposons d'élargir l'utilisation des épidermes humains reconstruits à l'étude d'un médicament à l'origine de graves toxidermies. A la différence des allergènes de contact précédemment étudiés, cette molécule n'entre pas en contact avec la surface de la peau. Elle est administrée par voie orale et subit des transformations métaboliques dans le foie avant de rejoindre l'épiderme.

Dans le premier chapitre qui suit seront introduites les toxidermies médicamenteuses, d'un point de vue immunologique et chimique. Une attention particulière sera accordée au métabolisme des xénobiotiques. Enfin, nous présenterons le sujet de ce travail de thèse.

Chapitre I

Introduction générale

Chapitre I : Introduction générale

Les toxidermies médicamenteuses : notions de base

Une toxidermie médicamenteuse est une réaction de toxicité cutanée déclenchée par la prise d'un ou plusieurs médicament(s). La plupart des réactions sont modérées et disparaissent après l'arrêt du traitement. Cependant, dans le cas des toxidermies bulleuses, l'épiderme nécrosé se décolle du derme. La peau, privée de son intégrité et incapable d'assurer sa fonction de barrière de protection, laisse l'organisme vulnérable aux agressions du monde extérieur (**Figure I-1**). Selon l'étendue des lésions, on parle de syndrome de Stevens-Johnson (moins de 10% de la surface corporelle touchée) ou de syndrome de Lyell dans les cas les plus extrêmes.



Figure I-1 : Patient atteint d'une toxidermie avec un détachement de l'épiderme au niveau des bras^[7]

Les nécrolyses épidermiques toxiques menacent la vie des patients, s'accompagnent de séquelles psychologiques graves, et sont très difficiles à prendre en charge par le personnel hospitalier. Les mécanismes à l'origine des toxidermies sont souvent méconnus. Il existe cependant plusieurs hypothèses impliquant pour chacune d'entre elles une réaction exagérée du système immunitaire déclenchée soit par une molécule entrant dans la composition du médicament, soit par un de ses métabolites.

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

La peau est un organe essentiel de l'organisme. Avec sa surface et sa masse (1,8 m² correspondant environ à 16% du poids du corps), la peau représente l'organe le plus important du corps humain.^[8] Ses fonctions sont nombreuses et toutes aussi indispensables les unes que les autres.^[9] Elle maintient l'intégrité de l'organisme en assurant la régulation de sa température et en limitant les pertes de fluides corporels. Elle protège les tissus des chocs, des toxines, des rayonnements ultraviolets et des agents pathogènes.

Constamment soumise aux agressions extérieures, la peau est la première barrière de défense de l'organisme. Cet organe complexe possède également de nombreuses terminaisons nerveuses à l'origine de notre sensibilité à la chaleur, à la pression et à la douleur. Enfin, la peau agit comme un organe immunitaire à part entière.

La peau est composée de trois couches principales ayant chacune leurs spécificités (**Figure I-2**) : l'épiderme, le derme et l'hypoderme.

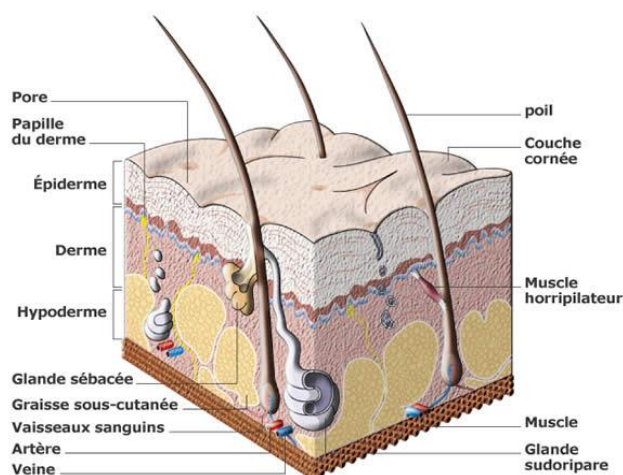


Figure I-2 : Coupe schématique de la peau (source : CNRS^[10])

I.1. L'épiderme

L'épiderme est la couche la plus externe de la peau. Epais de 0,1 à 1 mm, il est hautement organisé et se renouvelle en permanence. Il est constitué de plusieurs types de cellules : les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel.^[8,9,11]

Les kératinocytes représentent 80% des cellules épidermiques. Ces cellules produites à la jonction dermo-épidermique migrent vers la surface de l'épiderme en trois semaines environ pour y former une couche de cellules mortes appelée la couche cornée. L'épiderme est ainsi continuellement renouvelé.

Les mélanocytes sont chargés de la production de la mélanine qui donne sa couleur à la peau et la protège du rayonnement ultraviolet.

Les cellules de Langerhans (CL, 3 à 8% des cellules épidermiques) assurent la fonction de cellules présentatrices d'antigène (CPA) et participent à l'immunité cutanée. Ces cellules, dérivant de la moelle osseuse, sont réparties sur la totalité de l'épiderme et interagissent grâce à leurs prolongements cytoplasmiques (appelés dendrites) avec les kératinocytes en formant un véritable réseau. Elles ont un rôle crucial dans l'immunité cutanée.

Les cellules de Merkel interviennent dans la perception sensorielle.

L'épiderme ne renferme pas de vaisseau sanguin mais il est alimenté par diffusion depuis le derme.

I.2. Le derme

Le derme se situe en-dessous de l'épiderme. Il est très vascularisé et assure la nutrition de la peau. Riche en fibres de collagène et d'élastine, le derme confère à la peau sa résistance et son élasticité.^[11]

I.3. L'hypoderme

L'hypoderme est la couche la plus profonde de la peau. Véritable tissu nourricier, il est constitué de cellules adipeuses^[9] (cellules graisseuses) riches en énergie qui permettent notamment d'amortir les chocs et d'isoler l'organisme du froid.

II. Métabolisme cutané

L'organisme est constamment exposé à des molécules étrangères, appelées xénobiotiques. Les xénobiotiques peuvent provenir de l'environnement, de la nourriture, des cosmétiques ou encore des traitements médicamenteux. Le contact permanent avec des xénobiotiques peut conduire à des réactions de toxicité dues à l'accumulation de ces substances dans l'organisme.

Première interface moléculaire de l'organisme, la peau est particulièrement exposée à ces molécules, qu'elles soient appliquées à la surface de l'épiderme ou administrées par voie orale. Autrefois réduite à un simple rôle de barrière physique, la peau est aujourd'hui reconnue comme un organe métabolique à part entière au même titre que le foie. En effet, en plus d'un système immunitaire performant, la peau possède pour se défendre une machinerie enzymatique chargée de rendre les xénobiotiques plus faciles à éliminer. Ces systèmes enzymatiques constituent les systèmes métaboliques de détoxification et sont particulièrement développés dans la peau.^[12]

L'élimination des xénobiotiques se fait majoritairement par excrétion dans la bile ou dans les urines, qui sont composées à plus de 95% d'eau. Les systèmes métaboliques de détoxication ont donc pour objectif de transformer les xénobiotiques lipophiles en molécules hydrosolubles, plus faciles à excréter. Une molécule xénobiotique subit généralement plusieurs transformations classées en deux grandes étapes : le métabolisme de phase I et le métabolisme de phase II (**Figure I-3**).^[13]

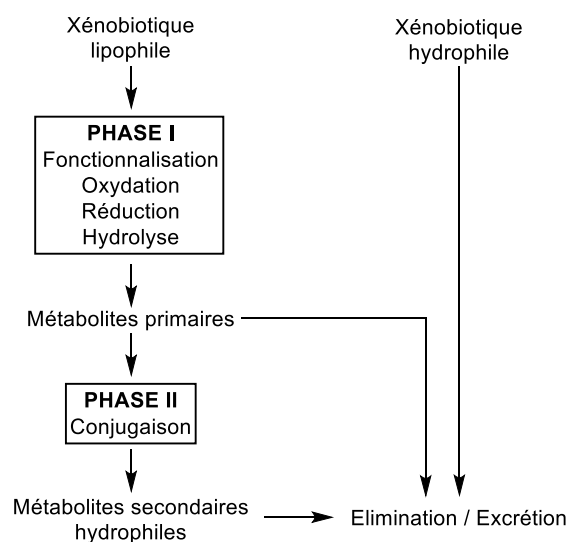


Figure I-3 : Processus de détoxication

II.1. Métabolisme de phase I : phase de fonctionnalisation

Le métabolisme de phase I a pour fonction soit de fonctionnaliser une molécule non réactive, soit de transformer une fonction existante pour la rendre plus réactive.

Les principaux systèmes enzymatiques de phase I sont des systèmes d'oxydoréduction (oxydoréductases, EC1). Parmi eux, on peut citer les mono-oxygénases à cytochrome P-450, les flavines mono-oxygénases, les alcools et les aldéhydes déshydrogénases, les monoamines oxydases ou encore les peroxydases.

Les mono-oxygénases à cytochrome P-450 (CYP) sont bien connues dans le foie et sont également présentes dans d'autres organes dont la peau,^[14,15] en particulier dans l'épiderme et les glandes sébacées.^[16] Les CYP peuvent prendre en charge des molécules très diverses, comprenant aussi bien des xénobiotiques auxquels la peau est exposée que des substances endogènes (hormones stéroïdiennes, acides gras, vitamine A, vitamine D...). Les cytochromes P-450 sont des hémoprotéines capables d'activer l'oxygène moléculaire pour réaliser de nombreuses transformations dont quelques-unes sont illustrées par la **figure I-4**.^[17]

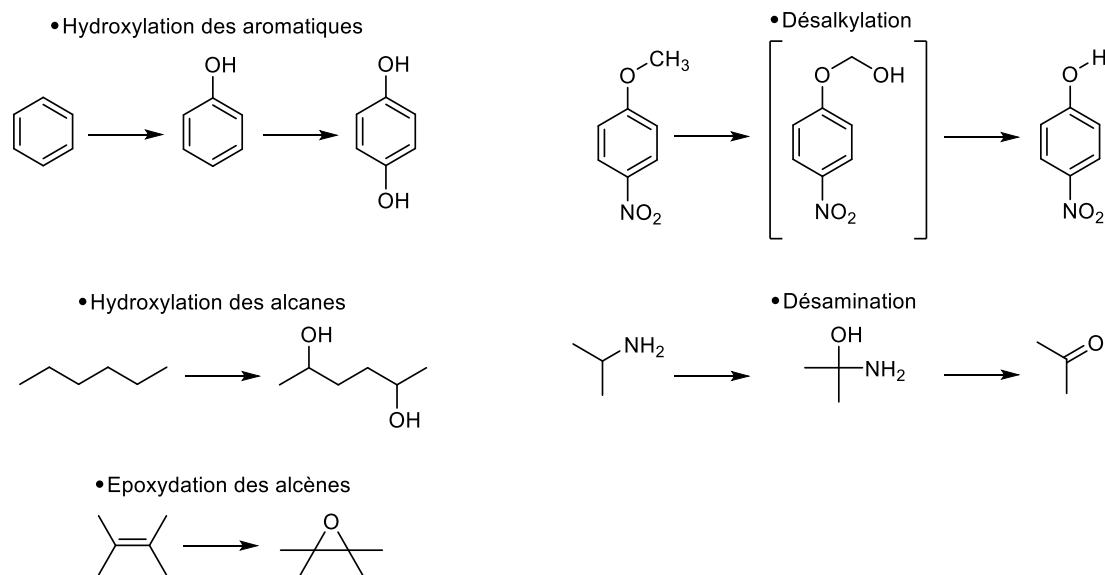


Figure I-4 : Exemples de réactions enzymatiques catalysées par les CYP^[12]

Certains cytochromes ont été mis en évidence par immunohistochimie et par PCR dans des kératinocytes humains en culture, d'autres n'ont été détectés que par l'expression de leurs ARNs messagers.^[18]

Les flavines mono-oxygénases (FMO)^[19] peuvent oxyder les hétéroatomes (N, S, P) présents dans les molécules azotées, soufrées, ou phosphorées. Elles utilisent également une molécule d'oxygène, un cofacteur (le NADPH) et la flavine adénine dinucléotide (FAD) comme groupement prosthétique. Les ARNs messagers de ces enzymes sont localisés dans l'épiderme, les glandes sébacées et les follicules pileux.^[15,20]

Les alcools et les aldéhydes déshydrogénases (ADH et ALDH),^[21] couplées à la réduction du cofacteur NAD⁺ en NADH, sont chargées de l'oxydation des fonctions alcools en aldéhydes, et des fonctions aldéhydes en acides carboxyliques.

Les monoamines oxydases (MAO), dont la présence a été observée dans des fibroblastes en culture,^[22] sont responsables de la formation d'aldéhydes à partir d'amines par désamination oxydante. Elles utilisent la flavine adénine dinucléotide (FAD) comme groupement prosthétique.

Les peroxydases,^[23] lors de la réduction des hydroperoxydes, sont capables de former des intermédiaires électrophiles à partir de molécules riches en électrons.

Cette liste reste non exhaustive puisque d'autres systèmes enzymatiques participent au métabolisme de phase I. On peut notamment citer les estérases, très présentes dans la peau,^[20] qui métabolisent par exemple des prodrogues contenant la fonction ester,^[24,25] ou encore les azoréductases impliquées dans la détoxification de certains colorants azoïques.^[26]

Les molécules obtenues à l'issue du métabolisme de phase I sont appelées métabolites primaires. S'ils sont suffisamment hydrophiles, ils peuvent être excrétés. Sinon, ils entrent dans le métabolisme de phase II.

II.2. Métabolisme de phase II : phase de conjugaison

Les fonctions chimiques mises en place ou dévoilées lors du métabolisme de phase I sont mises à profit lors du métabolisme de phase II afin d'être conjuguées avec des groupements hydrosolubles.

Les systèmes enzymatiques de phase II appartiennent essentiellement à la famille des transférases (EC2). Comme leur nom l'indique, elles transfèrent des groupements hydrophiles sur les métabolites primaires. Tandis que les activités épidermiques des cytochromes P-450 dans la peau atteignent 1 à 5% de celles mesurées dans le foie, les activités des transférases dans la peau peuvent atteindre 10% des activités hépatiques.^[27] Ce ratio plus élevé montre que la peau possède une capacité importante de détoxification. Parmi les systèmes métaboliques appartenant à la famille des transférases, on peut citer les UDP-glucuronyl-transférases, les *N*-acétyltransférases et les sulfotransférases.

Les UDP-glucuronyltransférases (UGT)^[28] sont impliquées dans la conjugaison de métabolites primaires nucléophiles avec l'acide glucuronique. Elles transforment par exemple le triclosan, composé très utilisé pour ses propriétés antifongiques et antibactériennes dans des centaines de produits d'hygiène courants (dentifrices, savons, déodorants, gels hydro-alcooliques...), en son dérivé glucuronide.^[29]

Les *N*-acétyltransférases catalysent le transfert d'un groupement acétyle sur un atome d'azote. Il a par exemple été montré que la peau pouvait *N*-acétyler des amines aromatiques contenues dans les colorants capillaires tels que le *para*-aminophénol et la *para*-phénylènediamine.^[30]

Les sulfotransférases^[31] peuvent par exemple sulfater certains stéroïdes dans la peau.^[32] On peut également à nouveau citer le triclosan dont la conversion en sulfate dans la peau a été montrée (**Figure I-5**).^[29]

Il peut arriver que la présence des systèmes enzymatiques cutanés soit mise à profit dans le cadre d'un traitement local. Ainsi, le minoxidil, prescrit contre la chute de cheveux, est une prodrogue prise en charge dans les follicules pileux par une sulfotransférase (SULT1A1) pour être convertie en sa forme active, le sulfate de minoxidil (**Figure I-5**).^[33]

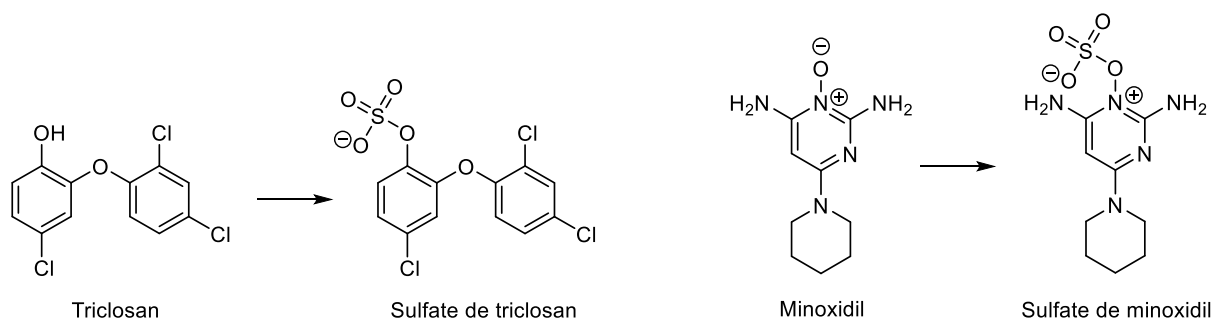


Figure I-5 : Sulfatations enzymatiques du triclosan et du minoxidil dans la peau

III. Chimie et toxicité cutanée : les haptènes

Le point de départ des réactions de toxicité est souvent la formation d'un complexe antigénique entre un haptène et une protéine cutanée, par création d'une liaison chimique covalente ou de coordination entre ces deux entités. La structure de la protéine ainsi modifiée n'est plus reconnue par le système immunitaire comme appartenant au soi. Le système immunitaire peut alors répondre de façon inappropriée, ce qui déclenche les symptômes cutanés (rougeurs, prurits, papules...).

III.1. Caractéristiques des haptènes

Pour modifier les protéines de la peau, les haptènes doivent posséder des propriétés physico-chimiques particulières.

Un haptène est une molécule de faible poids moléculaire (généralement inférieur à 1000 dalton) qui n'est pas immunogène en tant que telle mais qui le devient après liaison avec une molécule porteuse plus volumineuse telle qu'une protéine.^[34] Lorsque la sensibilisation est due à l'application de l'haptène à la surface de la peau, ce dernier doit être suffisamment lipophile et avoir des paramètres physico-chimiques (propriétés électroniques et facteurs stériques) lui permettant de traverser la couche cornée et de pénétrer dans la peau.^[35]

L'haptène doit également posséder dans sa structure moléculaire des groupements suffisamment réactifs pour former une liaison plus ou moins forte avec une macromolécule biologique. En chimie, on distingue les liaisons faibles, facilement réversibles, des liaisons fortes qui sont beaucoup plus stables (**Figure I-6**).

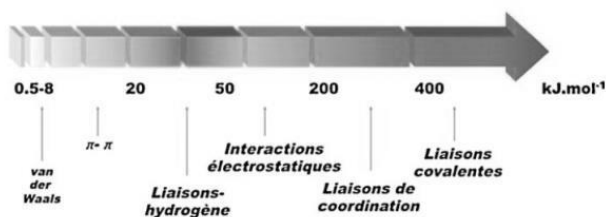


Figure I-6 : Niveaux d'énergies des différents types de liaisons chimiques^[34]

Les liaisons faibles (forces de Van der Waals, interactions hydrophobes, interactions électrostatiques...) ont une énergie de quelques joules à 50 kJ par mole et sont cruciales dans de nombreux mécanismes biologiques comme la reconnaissance moléculaire entre un récepteur et son substrat. La liaison entre un haptène et une macromolécule biologique est beaucoup plus stable et appartient à la catégorie des liaisons fortes avec des énergies supérieures à 200 kJ par mole. Les liaisons fortes sont généralement des liaisons covalentes ou des liaisons de coordination.

III.2. Formation d'un complexe antigénique par liaison de coordination

Un complexe antigénique peut être stabilisé par des liaisons de coordination. Ces liaisons sont relativement fortes en énergie (de 50 kJ à 100 kJ par mole pour une seule liaison de coordination dans un complexe en contenant plusieurs). Elles se forment lorsqu'un groupement chimique riche en électrons présent dans une protéine cutanée (oxygène, azote, soufre...) devient le ligand d'un métal ou d'un sel métallique pauvre en électrons (nickel, chrome, cobalt, mercure...) (**Figure I-7**). Les complexes de coordination ainsi formés sont caractérisés par le nombre des ligands et la géométrie qui dépend du métal et de son degré d'oxydation.^[34] Ils sont assez stables pour modifier la structure de la protéine cutanée qui n'est plus reconnue par le système immunitaire. L'allergie de contact au nickel II contenu dans les bijoux fantaisie est un exemple classique de réaction du système immunitaire face à un sel métallique.^[36]

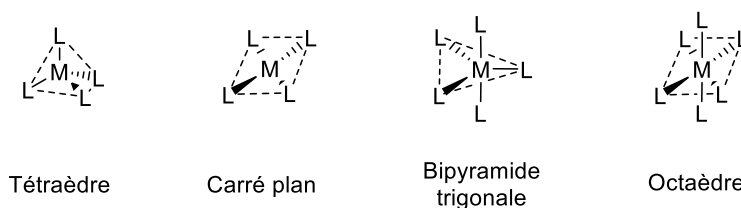


Figure I-7 : Exemples de géométries de complexes de coordination formés entre un métal M et des ligands L^[34]

III.3. Formation d'un complexe antigénique par liaison covalente

Le complexe antigénique peut également se construire par formation d'une liaison covalente entre l'haptène et la protéine cutanée.

Les liaisons covalentes, avec une énergie supérieure à 400 kJ par mole, sont plus fortes que les liaisons de coordination. Elles se forment habituellement par un mécanisme à deux électrons de type nucléophile - électrophile entre l'haptène et les protéines de la peau.

De manière générale, les haptènes électrophiles réagissent avec les chaînes latérales nucléophiles d'acides aminés constituant les protéines. Les acides aminés les plus souvent impliqués sont ceux qui possèdent un hétéroatome riche en électrons grâce à un ou plusieurs doublet(s) non liant(s) (soufre, azote, oxygène). Ainsi, le groupement thiol de la cystéine et l'amine primaire de la chaîne latérale de la lysine sont particulièrement nucléophiles.^[37] Les acides aminés comme l'histidine, la méthionine et la tyrosine sont également réactifs (**Figure I-8**).

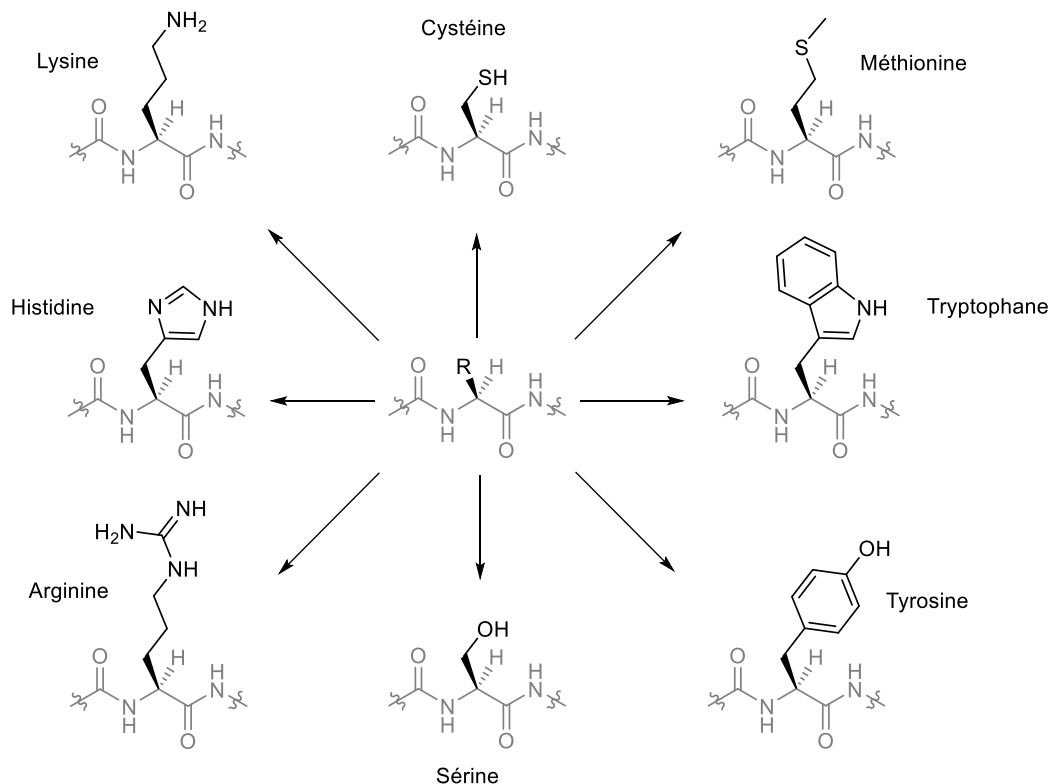


Figure I-8 : Principaux acides aminés nucléophiles

La liaison covalente peut aussi se former par un mécanisme radicalaire à un seul électron. C'est par exemple le cas des hydroperoxydes contenus dans le mélange d'autoxydation à l'air du d-limonène, utilisé comme parfum et comme solvant dans de nombreux produits d'usage courant (**Figure I-9**). Ces hydroperoxydes peuvent former des radicaux au sein de la peau. Cette étape pourrait être le point de départ de réactions radicalaires avec les protéines épidermiques.^[38] En 2006, le terme de pré-haptène a été introduit pour définir les substances non réactives devenant allergisantes après exposition à l'environnement, comme c'est le cas pour les terpènes odorants qui s'oxydent à l'air.^[39]

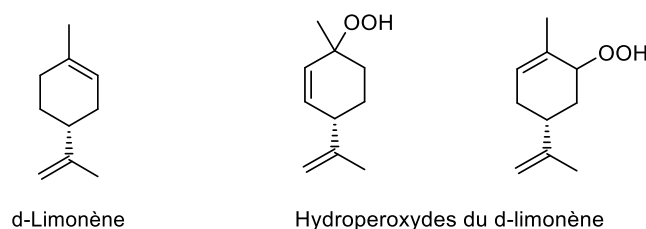


Figure I-9 : Le d-limonène, exemple de pré-haptène, et ses hydroperoxydes principaux

III.4. Les pro-haptènes : implication du métabolisme dans la toxicité cutanée

Il peut arriver que le métabolisme cutané soit impliqué dans la bioactivation d'une molécule non réactive en molécule toxique. En effet, plus d'un tiers des sensibilisants connus ne sont pas initialement réactifs vis-à-vis des protéines de la peau. Ces molécules, appelées pro-haptènes, acquièrent leurs propriétés électrophiles par voie métabolique.^[40] A l'issue des mécanismes de détoxication, les métabolites intermédiaires sont souvent plus électrophiles que la molécule initiale. Si la détoxication s'effectue dans de bonnes conditions et que l'élimination est efficace, les métabolites ne s'accumulent pas dans la peau. Malheureusement, il peut arriver que les intermédiaires réagissent avec les protéines et conduisent à des réactions de toxicité.^[12] Très souvent, le métabolisme précis des pro-haptènes n'est pas entièrement connu et les métabolites réactifs sont déduits d'études de métabolisme hépatique.

Pour illustrer le concept de pro-haptène, on peut évoquer le cas du sulfaméthoxazole (SMX), un agent anti-infectieux de la famille des sulfamides administré par voie orale. Sa détoxication passe par une réaction de *N*-acétylation. Il a été postulé que cette voie métabolique était en compétition avec la formation d'une hydroxylamine (SMX-OH) par oxydation enzymatique. L'hydroxylamine, oxydée dans un second temps en nitroso, pourrait se lier aux protéines de la peau et induire une toxidermie.^[41,42] Il a d'ailleurs été montré que les individus classés en acétyleurs «lents», dont la capacité à acétyler les xénobiotiques (et donc à détoxifier le sulfaméthoxazole) est plus faible que celle des acétyleurs «rapides», étaient prédisposés à cette réaction toxique (**Figure I-10**).^[43]

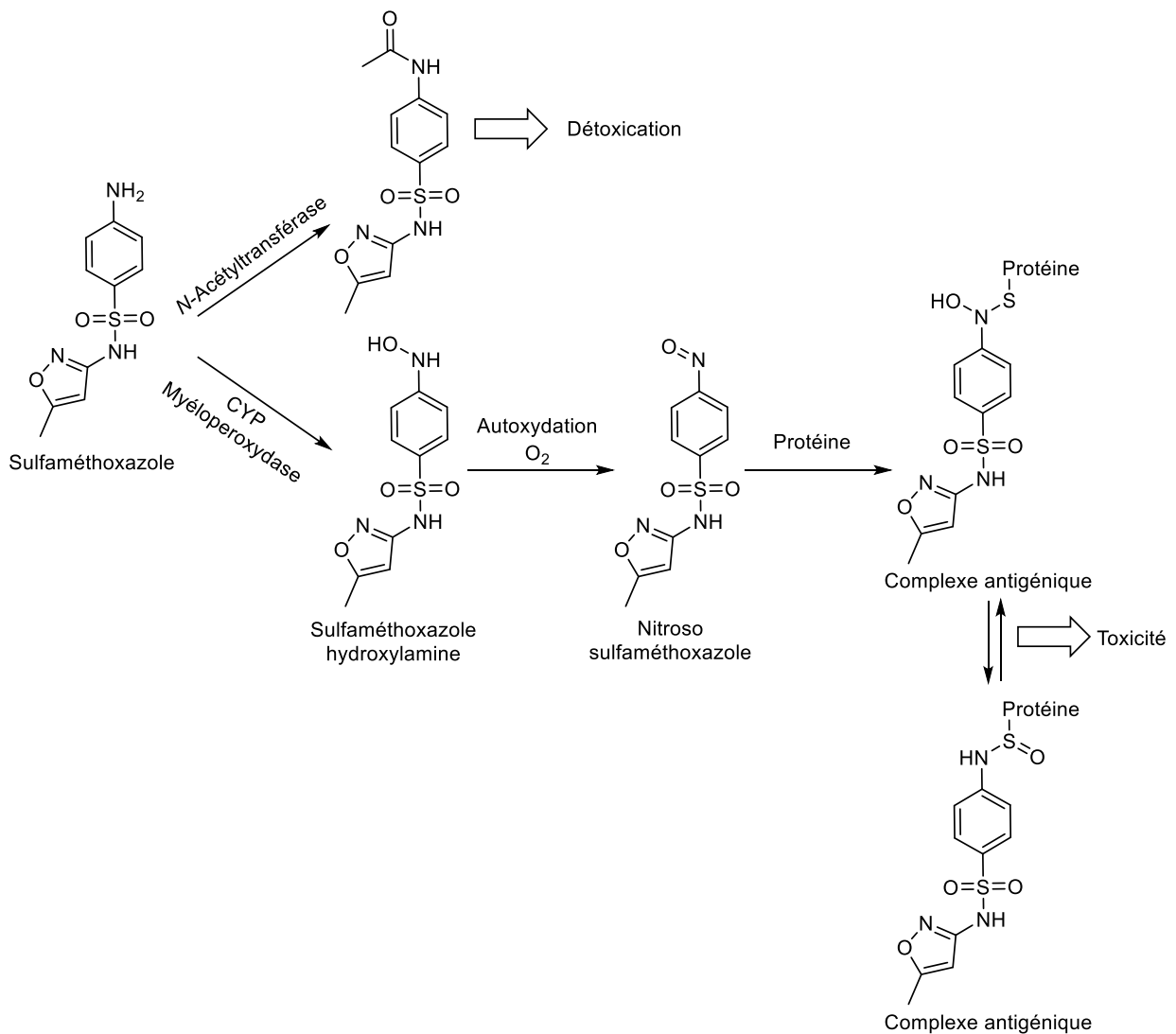


Figure I-10 : Bioactivation proposée du sulfaméthoxazole^[41]

III.5. L'allergie de contact

La conséquence la plus générale de la modification des protéines épidermiques est l'allergie de contact.

Classée dans la catégorie des hypersensibilités de type IV (ou retardées) selon Coombs et Gell,^[44] l'allergie de contact est une réaction inflammatoire inappropriée et exagérée du système immunitaire face à un xénobiotique. Elle se manifeste sous la forme d'eczéma, d'œdèmes (gonflements), d'érythèmes (rougeurs) et de prurits (démangeaisons) (**Figure I-11**). Elle touche près de 20% de la population des pays développés et est aujourd'hui considérée comme un problème de santé publique.^[45]

La liste des allergènes potentiels est longue et contient aussi bien des molécules naturelles que des produits de synthèse. Ces molécules sont de plus en plus présentes dans notre environnement. Vêtements, cosmétiques, bijoux, matières plastiques, médicaments administrés par voie topique, pesticides et plantes sont autant de sources d'allergènes de contact potentiels.



Figure I-11 : Patiente atteinte d'eczéma de contact causé par un déodorant contenant du Lyral^{®[46]}

IV. Les toxidermies induites par les médicaments : mécanismes immunologiques

Dans le cas de l'allergie de contact, l'haptène ou le pro-haptène est appliqué localement sur la peau. En ce qui concerne les toxidermies médicamenteuses, la molécule est le plus souvent administrée par voie orale. Elle passe donc par les étapes pharmacocinétiques d'absorption, de distribution, et de métabolisme avant d'arriver dans l'épiderme.

Les évènements immunitaires à l'origine de la nécrose de l'épiderme dans le syndrome de Stevens-Johnson et de Lyell ne sont pas complètement élucidés. Cependant, dans certains cas, on peut établir des similitudes avec le mécanisme de l'allergie de contact.

IV.1. Les évènements indésirables médicamenteux : vue d'ensemble et classification

De grands progrès ont été réalisés ces cinquante dernières années dans le traitement des maladies grâce au développement de nombreux médicaments. Malheureusement, l'augmentation du nombre de molécules disponibles sur le marché a une conséquence inévitable : les évènements indésirables médicamenteux, ou effets indésirables. L'organisation mondiale de la santé et la Communauté européenne définissent un effet indésirable comme «une réaction nocive et non voulue à un médicament, se produisant aux posologies normalement utilisées chez l'homme pour la prophylaxie, le diagnostic ou le traitement d'une maladie ou pour le rétablissement, la rectification ou la modification d'une fonction physiologique».

En 2008, l'étude EMIR (Effets indésirables des Médicaments : Incidence et Risque) menée par les centres régionaux de pharmacovigilance dans 63 services hospitaliers tirés au sort et incluant 2 692 malades, a évalué à 3,6% la proportion des hospitalisations dues à la survenue d'un effet indésirable médicamenteux.^[1] Leurs conséquences peuvent être graves, voire fatales pour les patients. De plus, ils représentent un coût important pour le système de santé. La survenue d'un effet indésirable signalée dans le cadre de la pharmacovigilance peut amener à modifier les conditions d'utilisation du médicament, à les restreindre, parfois à retirer la molécule du marché. Les conséquences du retrait d'un médicament sont importantes non seulement pour le laboratoire pharmaceutique qui a investi des sommes considérables dans son développement, mais également pour les patients qui ne sont pas affectés par l'effet indésirable et qui se voient interdire l'usage d'un traitement potentiellement bénéfique. Avec le développement des réseaux sociaux et des médias d'informations, le grand public est aujourd'hui rapidement informé de la dangerosité potentielle d'un médicament, ce qui peut déclencher des polémiques à grande échelle comme ce fut le cas pour la nouvelle formule du Lévothyrox mise sur le marché en mars 2017.

Le système de classification original des effets indésirables a été publié en 1977 par Rawlins et Thompson.^[47] Il fait la distinction entre un effet indésirable de type A et un effet de type B.

Un effet indésirable médicamenteux est de type A («*augmented*») lorsque la réponse de l'organisme au médicament est plus élevée que celle prévue par la même posologie. Par exemple, la survenue d'une hypotension due à la prise d'antihypertenseurs. Il est généralement prévisible par la courbe dose-réponse établie lors des études pharmacologiques effectuées pendant le développement du médicament. Il est facilement réversible par diminution de la dose.

Un effet indésirable médicamenteux est de type B («*bizarre*») ou «idiosyncratique» lorsqu'il est imprévisible à partir des propriétés pharmacologiques du médicament. Il est rare et donc très peu souvent identifié pendant les essais cliniques. Les réactions idiosyncratiques sont également difficiles à détecter chez l'animal, puisqu'elles y sont tout aussi inhabituelles que chez l'humain. Les toxidermies médicamenteuses font partie de cette catégorie.

En 2000, Edwards et Aronson ont publié une classification plus précise en ajoutant quatre types d'effets indésirables : la réaction chronique due à l'effet cumulatif («*chronic reaction*»), l'effet retardé («*delayed effect*»), l'effet survenant après l'arrêt du traitement («*end of use effect*»), et l'échec de la thérapie («*failure*»).^[48]

IV.2. Les évènements indésirables de type B

La majorité des effets indésirables (80%) sont de type A. Cependant, les effets de type B sont les plus alarmants par leur caractère imprévisible et souvent très sévère.

Les évènements indésirables de type B peuvent toucher de nombreux organes. Cependant, le foie, la peau et la moelle osseuse sont leurs cibles privilégiées.^[3] La raison la plus fréquente du retrait d'un médicament est sa toxicité hépatique. Les atteintes hépatiques peuvent aller de l'augmentation asymptomatique des enzymes du foie à une hépatite fulgurante et fatale. En ce qui concerne la peau, on lit par exemple sur la notice d'une boîte de comprimés d'ibuprofène 400 mg que des réactions allergiques cutanées telles que des «éruptions sur la peau, démangeaisons, œdèmes» peuvent survenir et que «très exceptionnellement» les lésions cutanées peuvent aller jusqu'à «des manifestations bulleuses de la peau ou des muqueuses (sensation de brûlures accompagnée de rougeurs avec bulles, cloques, ulcérations)». Cet avertissement apparaît dans les notices de nombreux autres médicaments courants (aspirine, paracétamol, antibiotiques...). Dans le pire des cas, les atteintes cutanées vont jusqu'à l'apparition d'un syndrome de Lyell, fatal chez 30% des patients touchés.^[49]

IV.3. Mécanismes immunologiques des effets indésirables de type B

Les effets indésirables de type B ont un mécanisme souvent méconnu. Plusieurs hypothèses basées sur une réaction exagérée du système immunitaire similaire à celle qui déclenche l'allergie de contact ont été étudiées.

L'organisme est en contact permanent avec de nombreux agresseurs de l'environnement. Pour se protéger et se défendre, il possède un système complexe et très organisé : le système immunitaire. Le système immunitaire est composé de l'immunité naturelle et de l'immunité adaptative, qui agissent de manière complémentaire.

L'immunité naturelle est une barrière anatomique (par l'intermédiaire de la peau et des muqueuses), chimique (par exemple grâce aux constituants des larmes et de la salive), et cellulaire (par l'action des phagocytes capables d'ingérer et d'éliminer les agents infectieux). Elle est indispensable à l'activation de l'immunité adaptative.

L'immunité adaptative permet quant à elle une réponse spécifique face à un agresseur, tout en amplifiant cette réponse et en créant une mémoire permettant une défense plus efficace contre le même agent infectieux lors d'une rencontre ultérieure.

Les mécanismes immunitaires précis des réactions idiosyncratiques aux médicaments sont méconnus. Il a cependant été montré que lors du contact cutané avec la molécule incriminée, des lymphocytes T sont activés. C'est donc le système immunitaire adaptatif qui est mis en jeu. Trois hypothèses différentes ont été émises : l'hypothèse de l'haptène, l'hypothèse de danger, et l'hypothèse de l'interaction pharmacologique.^[50]

IV.3.a. L'hypothèse de l'haptène

Cette hypothèse repose sur la formation d'un complexe antigénique stable entre un haptène et une protéine de la peau^[34] par création d'une liaison forte (covalente ou de coordination) difficilement réversible. Elle permet par exemple d'expliquer la survenue d'une allergie de contact. Son mécanisme est composé de deux phases distinctes : la phase de sensibilisation et la phase de révélation.

• La phase de sensibilisation

La phase de sensibilisation (**Figure I-12**) intervient lors d'un premier contact cutané avec le sensibilisant. Cette phase est asymptotique d'un point de vue clinique et permet de créer une mémoire immunologique.

Les cellules dendritiques de Langerhans (CL) jouent un rôle crucial dans la sensibilisation en occupant la fonction de cellules présentatrices d'antigène (CPA). Elles sont les seules dans l'épiderme à exprimer à leur surface les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II), capable de présenter un antigène aux acteurs de la réponse immunitaire.^[51,52]

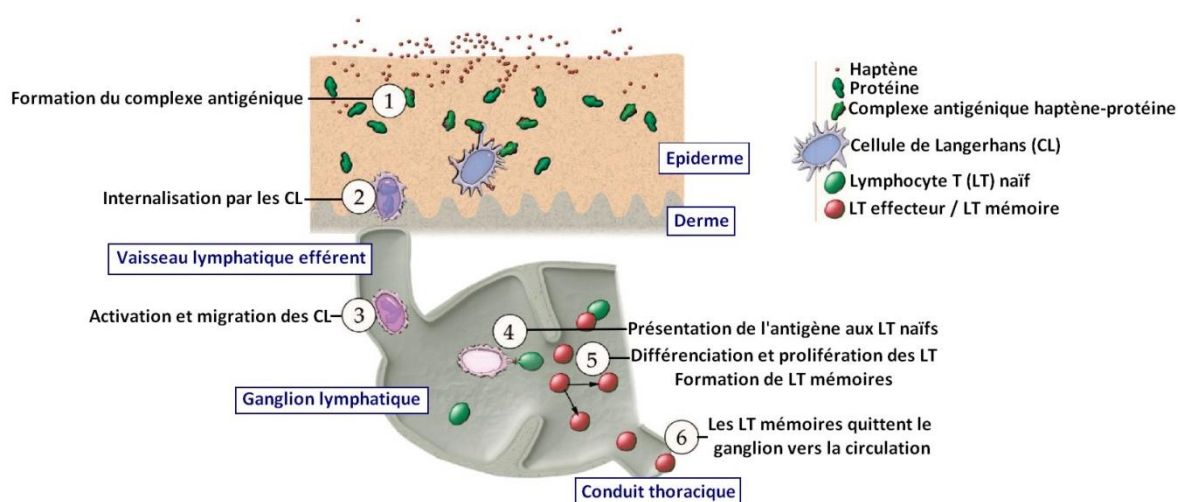


Figure I-12 : Phase de sensibilisation^[38]

Dans un premier temps, la molécule doit pénétrer dans l'épiderme. Dans l'allergie de contact, elle doit posséder pour cela des caractéristiques physico-chimiques indispensables au passage de la couche cornée.^[35] Dans les toxidermies où la molécule n'est pas appliquée à la surface de la peau, elle doit pouvoir diffuser à partir du derme jusqu'aux couches superficielles.

Le complexe haptène-protéine se forme ensuite dans l'épiderme par une réaction de type nucléophile-électrophile ou par une réaction radicalaire. Les cellules de Langerhans sont capables de capter le complexe antigénique grâce à leurs nombreuses dendrites et le reconnaissent comme faisant partie du non-soi.^[53] Le complexe est ensuite internalisé par les CL pour y être clivé en peptides.^[54] Cette prise en charge s'accompagne de la migration des CL à travers l'épiderme et le derme en direction du système lymphatique proximal. Au cours de la migration, les CL perdent leur caractère dendritique et donc leur capacité de capter les antigènes mais acquièrent la faculté de stimuler les lymphocytes T naïfs. La migration des CL n'est pas précisément comprise mais il semblerait que des substances épidermiques de signalisation cellulaire, appelées cytokines, jouent un rôle dans l'initiation et la régulation de ce mécanisme.^[55]

Arrivées dans les ganglions lymphatiques, les CPA présentent les peptides issus de la dégradation de l'antigène à des lymphocytes T (LT) naïfs. Les LT se différencient en deux populations : les LT effecteurs (capables de sécréter des substances cytotoxiques pour détruire l'antigène) et les LT mémoires.^[56] Les LT, spécifiques à l'antigène, prolifèrent et migrent vers la circulation générale par les canaux lymphatiques en direction des tissus et en particulier vers le derme et l'épiderme. L'individu est alors sensibilisé à l'haptène et son système immunitaire est prêt à déclencher une réponse inflammatoire lors des prochains contacts avec la substance chimique.

• La phase de révélation (Figure I-13)

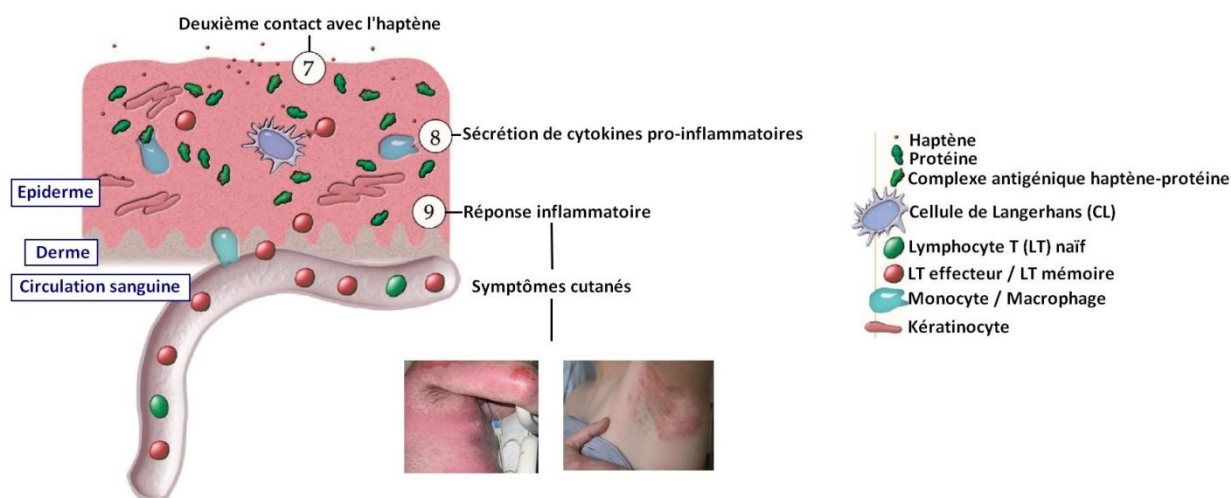


Figure I-13 : Phase de révélation^[38]

Lors d'un nouveau contact, l'haptène arrive dans l'épiderme et forme un complexe antigénique pris en charge par les cellules présentatrices d'antigène. Les CPA présentent le complexe aux LT spécifiques de ce dernier, présents dans l'épiderme et le derme depuis la phase de sensibilisation. Les LT reconnaissent immédiatement le complexe antigénique. Ils sécrètent des cytokines pro-inflammatoires permettant de recruter d'autres lymphocytes et d'autres acteurs de la réaction inflammatoire qui sécrètent également des cytokines. Les kératinocytes eux-mêmes finissent par sécréter des cytokines.^[57] L'inflammation et les symptômes cliniques deviennent visibles (rougeurs, œdèmes, prurits, décollement de l'épiderme dans le cas des nécrolyses épidermiques toxiques...).

IV.3.b. L'hypothèse de danger

L'hypothèse de danger est légèrement différente de celle de l'haptène. En 1994, Matzinger propose une théorie distincte du schéma classique basé sur l'opposition entre le soi et le non-soi.^[58] Elle émet l'hypothèse selon laquelle le système immunitaire ne se préoccupe pas de la reconnaissance du soi ou du non-soi, mais qu'il est programmé pour protéger l'organisme contre les dangers. Le système immunitaire n'est donc pas stimulé par la seule présence d'un xénobiotique mais par un signal d'alarme émis par les cellules de l'organisme.

D'un point de vue mécanistique, la théorie du danger démarre de la même façon que celle de l'haptène. Le complexe antigénique est pris en charge par les CPA, internalisé, dégradé et les peptides sont présentés dans le sillon du CMH II. Il s'agit d'un premier signal. En l'absence d'un second signal, les LT ne prolifèrent pas et le système immunitaire devient tolérant vis-à-vis de l'haptène (Figure I-14).

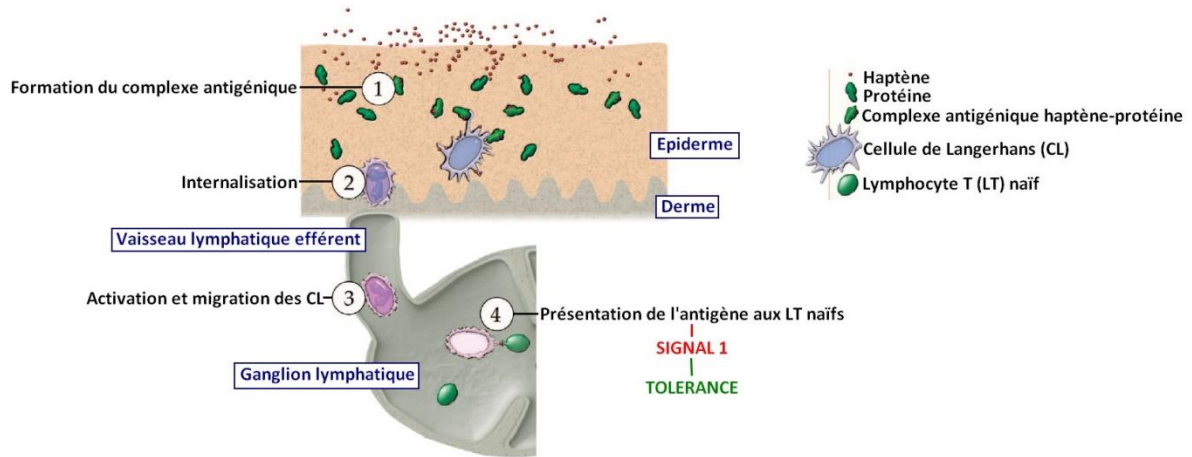


Figure I-14 : Tolérance vis-à-vis de l'haptène en l'absence d'un signal de danger^[38]

La différenciation et la prolifération des LT a lieu uniquement en présence d'un signal de co-stimulation ou «signal de danger» (Figure I-15).

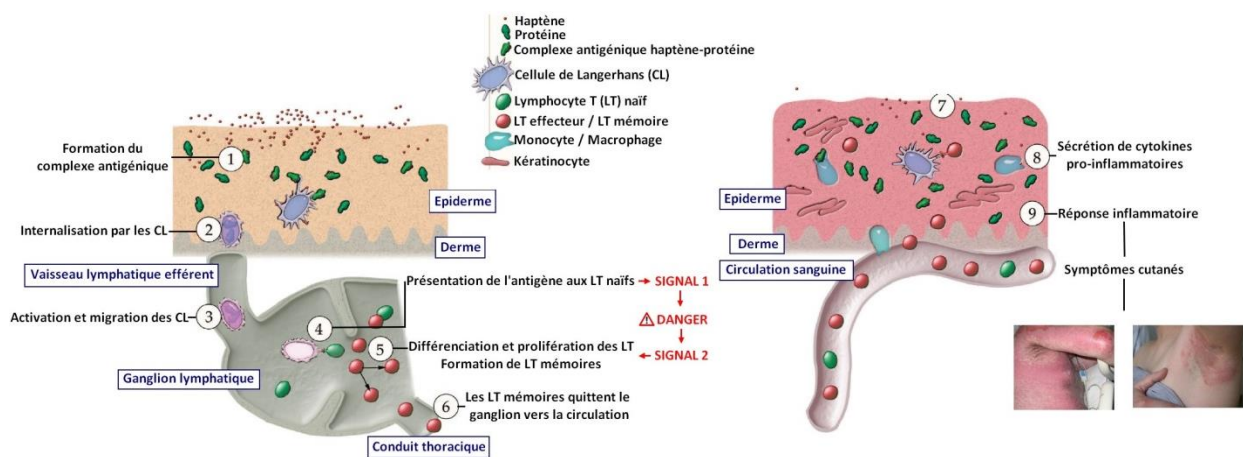


Figure I-15 : Réponse inflammatoire à un signal de danger^[38]

Les signaux de danger ne sont pas complètement connus, mais il est probable qu'ils soient endogènes et différents pour chaque type cellulaire.^[50]

Selon Matzinger, des composés endogènes peuvent par exemple activer le système immunitaire s'ils déclenchent un signal de danger tandis que des xénobiotiques peuvent être parfaitement tolérés si ce signal n'est pas émis.

D'après cette théorie, la réponse immunitaire dépend donc du tissu affecté. Ceci pourrait expliquer pourquoi certains effets indésirables de type B ne s'expriment que dans un seul tissu tandis que les haptènes peuvent se lier aux protéines dans d'autres organes.

IV.3.c. L'hypothèse de l'interaction pharmacologique

L'hypothèse de l'interaction pharmacologique va à l'encontre de la formation d'un complexe antigénique haptène-protéine. En 1998, Pichler et son équipe découvrent que des lymphocytes T isolés et issus de patients ayant souffert d'une réaction idiosyncratique prolifèrent *in vitro* en présence du pro-haptène incriminé mais en l'absence de métabolisme.^[59] Il en déduit que la molécule est capable de former des liaisons faibles et réversibles à la fois avec le CMH d'une cellule présentatrice d'antigène, et avec un récepteur particulier situé sur un lymphocyte T, formant un «super antigène» (**Figure I-16**). Cette structure serait capable de déclencher la réponse immunitaire. Ainsi, un «haptène» n'a pas besoin de former un complexe antigénique covalent ou de coordination avec une protéine pour stimuler le système immunitaire.^[60] Par conséquent, selon cette théorie dite de l'interaction pharmacologique, un «pro-haptène» non réactif vis-à-vis des résidus nucléophiles des protéines de la peau peut se passer de métabolisme pour induire une toxidermie.

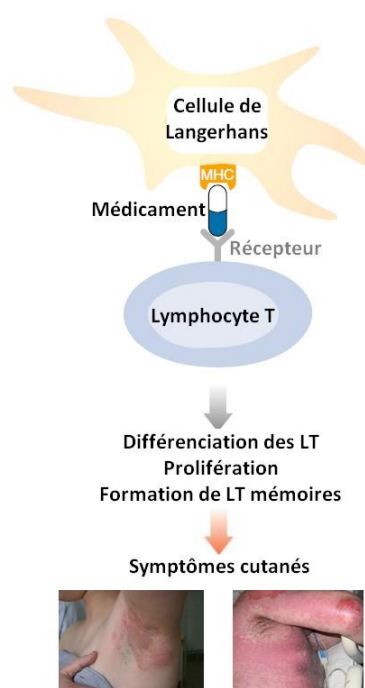


Figure I-16 : Formation d'un super antigène à l'origine de la réponse immunitaire^[50]

Même si l'hypothèse de la formation d'un complexe antigénique haptène-protéine est la plus développée, l'existence de théories différentes montre que l'étude des réactions idiosyncratiques reste complexe. De plus, ces hypothèses peuvent s'associer : il n'est pas impossible qu'un métabolite puisse agir à la fois comme un haptène et provoquer par lui-même l'émission d'un signal de danger.

V. La Névirapine

Les travaux présentés dans cette thèse de doctorat portent sur la toxicité cutanée induite par la Névirapine **1** (**Figure I-17**).



Névirapine **1**

Figure I-17 : Structure de la Névirapine et numérotation officielle

La Névirapine (NVP) est une molécule antirétrovirale qui inhibe la transcriptase inverse du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1). Elle a été mise sur le marché en juin 1996.^[61] Entre les mois de novembre 1997 et d'avril 1999, un essai clinique nommé HIVNET 012 réalisé en Ouganda a montré l'efficacité de la Névirapine dans la prévention de la transmission du virus de la mère à l'enfant, lorsqu'une première dose était administrée à la mère pendant l'accouchement et une seconde dose au nouveau-né.^[62] Depuis, la Névirapine est l'inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse le plus prescrit au monde, en particulier dans les pays en voie de développement. Elle est non seulement très utile en dose unique pour empêcher la transmission du virus de la mère à l'enfant, mais également en association avec d'autres types d'antirétroviraux dans le cadre de polythérapies antirétrovirales.

Malheureusement, elle peut déclencher de graves effets secondaires hépatiques et surtout cutanés. Une étude menée en 1998 sur 906 patients traités par la NVP a montré que 19,8% des patients souffrent d'effets secondaires cutanés et que 20,1% d'entre eux présentent des formes sévères de toxidermies (syndrome de Stevens-Johnson, syndrome de Lyell) provoquant une apoptose massive des kératinocytes.^[63]

L'épiderme nécrosé se décolle du derme pour former des bulles et peut se détacher complètement du corps sous forme de lambeaux. Les nécrolyses épidermiques toxiques s'accompagnent d'une défaillance de nombreux organes et d'infections, la peau n'étant plus capable d'assurer ses fonctions de protection.

En 2000, la *Food and Drug Administration* américaine (FDA) ainsi que son équivalent européen, l'Agence Européenne des Médicaments (AEM), ont ordonné l'ajout d'un avertissement («*black box warning*») bien visible dans la notice des médicaments contenant la Névirapine.^[64,65]

V.1. Métabolisme de la Névirapine

En 1999, le devenir de la Névirapine dans l'organisme a été analysé chez l'animal^[66] puis l'homme.^[67] Plusieurs voies métaboliques ont été identifiées. La plus importante est l'hydroxylation de la molécule en position 12 dans le foie par un cytochrome P450. Les oxydations des positions aromatiques 2, 3 et 8 conduisent quant à elles à des métabolites assez stables pour être détectés. Les isoformes des cytochromes P450 impliqués dans ces réactions ont ensuite été identifiées.^[68] Ces biotransformations métaboliques de phase I sont suivies d'une conjugaison à l'acide glucuronique en phase II, ce qui permet de rendre la Névirapine suffisamment hydrosoluble en vue de son excrétion. Les auteurs ont également montré la formation de 4-carboxynévirapine, produit d'oxydation de la 12-OH-Névirapine (**Figure I-18**).

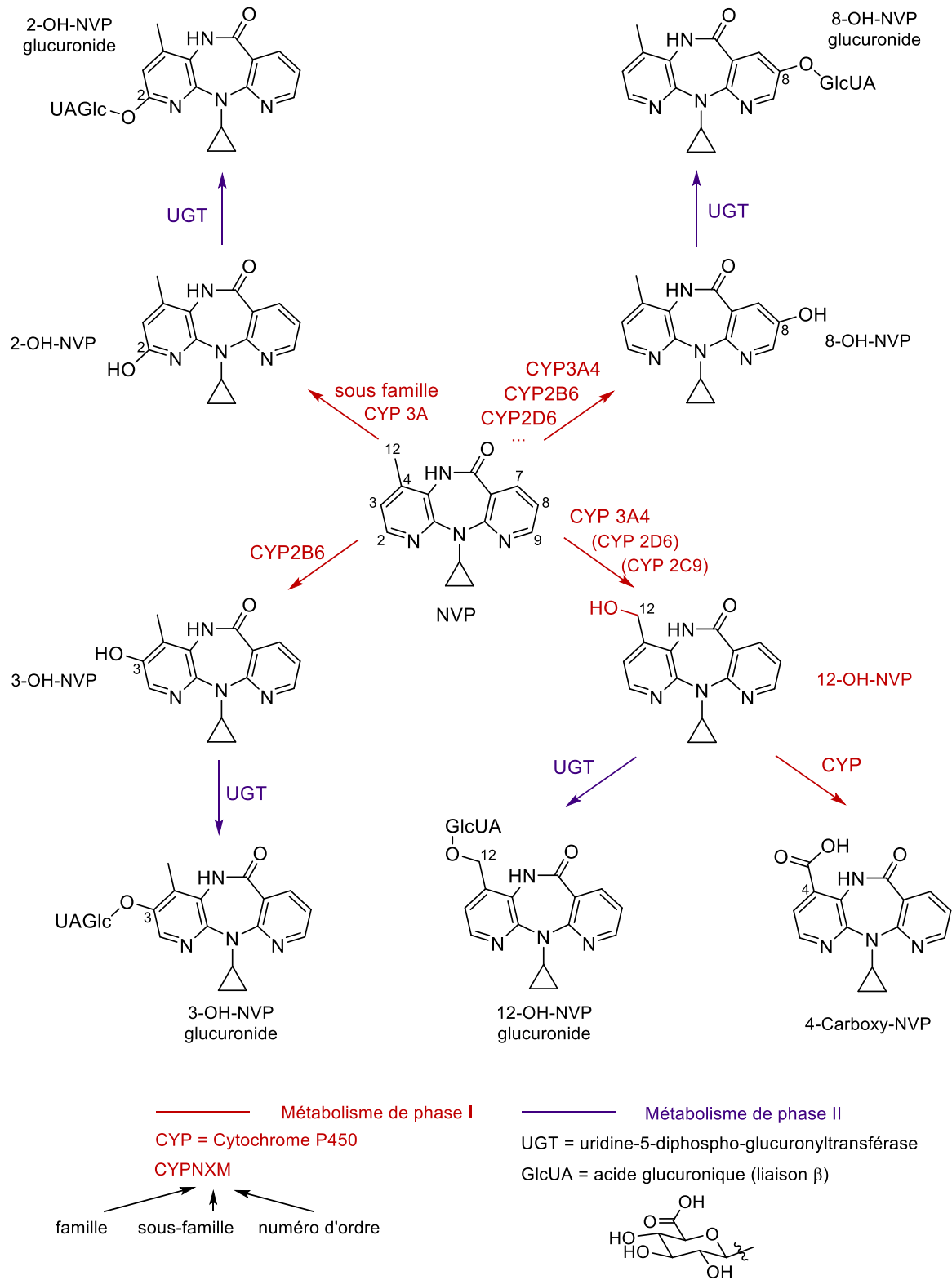


Figure I-18 : Métabolisme hépatique de la Névirapine

V.2. La Névirapine comme pro-haptène ?

L'origine de la toxicité cutanée et hépatique de la Névirapine n'est pas encore complètement élucidée. Cependant, les études publiées depuis les années 2010 classent la Névirapine dans la catégorie des pro-haptènes.

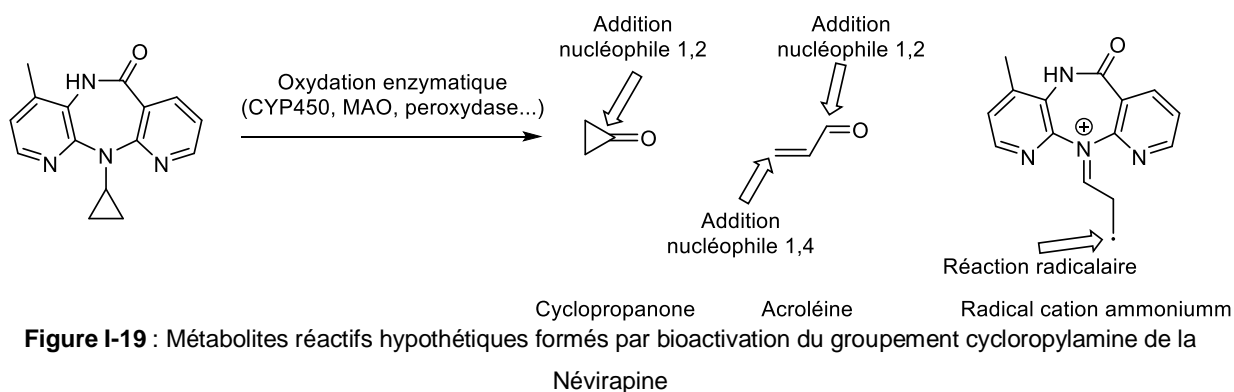
En effet, la plupart des réactions idiosyncratiques aux médicaments sont dues à des métabolites réactifs générés par le métabolisme des xénobiotiques.^[69] De plus, d'un point de vue chimique, la Névirapine n'est pas une molécule réactive. Pourtant, il a été montré dès 2008 par un groupe japonais qu'elle pouvait modifier *in vitro* des microsomes hépatiques humains par liaison covalente.^[70] Plus tard, des adduits entre la Névirapine (en position 12 et en position 3) et la *N*-acétylcystéine ont été découverts et quantifiés par résonance magnétique nucléaire (RMN) et spectrométrie de masse dans les urines de patients traités à la NVP.^[71] De la même façon, des adduits entre l'hémoglobine et la position 12 de la NVP ont été identifiés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse dans le sang de patients sous traitement.^[72] Or, d'un point de vue chimique, la NVP n'est pas assez réactive pour former de tels adduits sans avoir été bioactivée par le métabolisme.

Enfin, en 2004, un patient a été guéri rapidement d'un syndrome de Lyell induit par la Névirapine grâce à des injections d'immunoglobuline et de *N*-acétylcystéine à haute dose (300 mg par jour).^[73] Il a été postulé qu'il s'agissait d'une preuve clinique indirecte que la Névirapine était transformée en un ou plusieurs métabolite(s) toxique(s) hautement électrophile(s), piégé(s) par la nucléophilie de la *N*-acétylcystéine.

Plusieurs voies de bioactivation de la NVP ont été proposées. Ces réactions concernent différentes positions de la NVP comme le groupement cyclopropylamine qui est connu pour sa réactivité radicalaire ainsi que les noyaux pyridines et le méthyle benzylique qui peuvent être oxydés.

V.2.a. Réactivité du groupement cyclopropylamine

En 2008, la modification covalente des microsomes hépatiques humains, détectée au Japon, a été attribuée à la formation d'un radical cation ammonium à partir du groupement cyclopropylamine.^[70,74] L'intermédiaire radicalaire ainsi que l'acroléine et/ou la cyclopropanone libérés pourraient réagir avec les acides aminés des protéines épidermiques (**Figure I-19**).



Ce type d'activation sur un cycle tendu à trois chaînons peut être catalysé par plusieurs types d'enzymes d'oxydation. La *N*-déalkylation de la *N*-cyclopropyl-*N*-méthylaniline par un cytochrome P450 a par exemple déjà été étudiée.^[75] Les peroxydases sont également capables de catalyser cette réaction^[76] et il a été montré que l'oxydation de la *N*-cyclopropylbenzylamine par une monoamine oxydase menait à la formation d'acroléine.^[77,78]

Cependant, toujours en 2008, le groupe canadien de Jack Utrecht a réfuté l'implication du groupement cyclopropylamine dans la toxicité cutanée induite par la NVP. En effet, il a montré que le remplacement de ce groupement par une éthylamine non réactive n'avait aucun effet sur la toxicité cutanée de la Névirapine chez le rat.^[79]

V.2.b. Oxydation des métabolites phénoliques en quinones imines

Les métabolites phénoliques possédant un groupement OH en *para* d'un azote pourraient former des dérivés réactifs de type quinone imine.

Afin de tester cette hypothèse, Alexandra Antunes et son équipe sont parvenus en 2011 à oxyder le métabolite 2-OH-NVP en quinone imine.^[80] Cette réaction a été réalisée par voie chimique grâce à l'utilisation du sel de Frémy ou du periodate de sodium, puis par voie enzymatique grâce à la lactoperoxydase. En 2015, le même groupe a poursuivi ses études par l'oxydation de la 3-OH-NVP.^[81]

Les quinones imines obtenues sont suffisamment réactives pour former des adduits covalents avec le valinate d'éthyle (qui mime la partie *N*-terminale de l'hémoglobine), mais pas avec la *N*-acétylcystéine (**Figure I-20**).

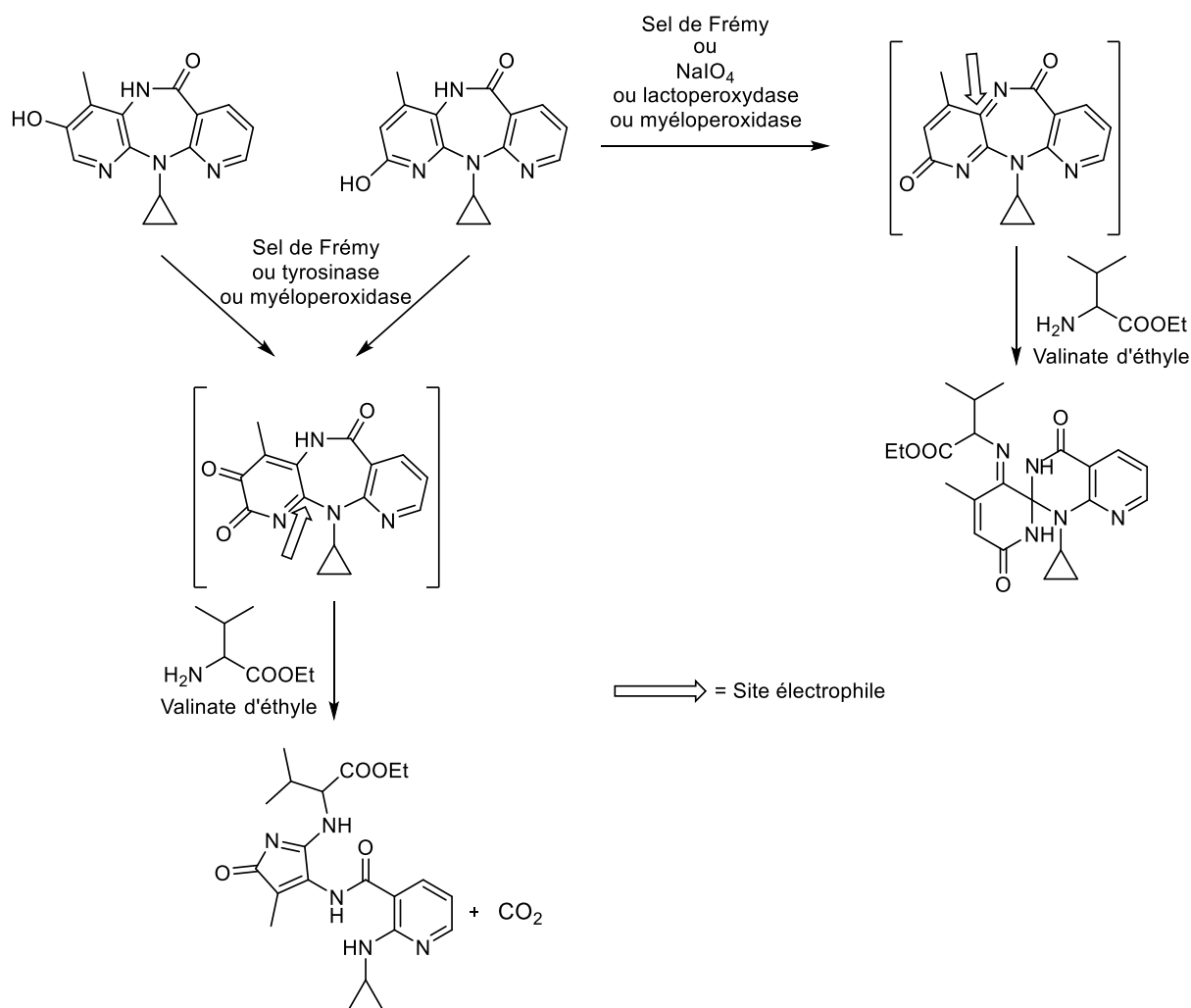


Figure I-20 : Activation de la Névirapine en quinones imines et formation d'adduits avec le valinate d'éthyle comme nucléophile modèle^[80,81]

A l'heure actuelle, ces réactions ont uniquement été testées par voie chimique. La formation de quinones imines toxiques à partir des métabolites phénoliques de la NVP n'a pas été montrée *in vivo* mais reste biologiquement plausible.

En 2008, le groupe de Jack Utrecht a réussi à inhiber chez le rat la formation de 2-OH-NVP, de 3-OH-NVP et de 4-carboxy-NVP en utilisant un inhibiteur non spécifique des cytochromes P450, le 1-aminobenzotriazole.^[79] Cependant, l'incidence de la toxidermie induite par la Névirapine n'a pas diminué. D'après eux, la voie métabolique responsable de la formation de molécules électrophiles réagissant avec les protéines de la peau ne semble donc pas être celle de l'hydroxylation des positions aromatiques, même si les phénols formés pourraient être des précurseurs de quinones imines réactives.

V.2.c. Epoxydation des noyaux pyridines

La NVP pourrait être sujette à des réactions d'époxydation réalisées par des mono-oxygénases à cytochromes P-450 sur les noyaux pyridines.

Cette voie métabolique a été proposée en 2009 pour expliquer la présence d'adduits entre la NVP en position 3 et la cystéine dans les urines de patients sous traitement^[71] (**Figure I-21**). Les deux époxydes électrophiles proposés peuvent être piégés par le glutathion, en présence ou non de glutathion-S-transférase. Les adduits avec le glutathion peuvent ensuite se dégrader en perdant les résidus glutamate et glycine, pour donner un dérivé d'acide mercapturique après acétylation de la cystéine. Si les époxydes n'étaient pas piégés, ils garderaient leurs propriétés électrophiles et pourraient être capables de former des adduits covalents avec des protéines.

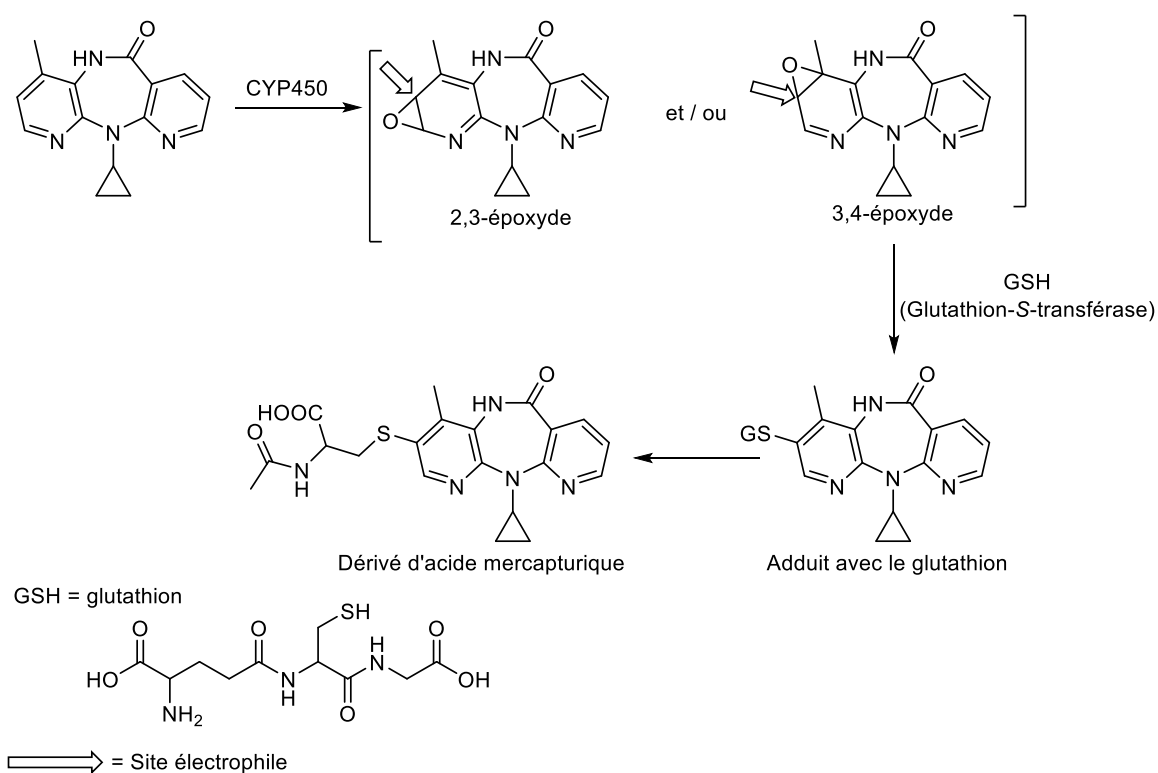


Figure I-21 : Formation d'époxydes piégés par le glutathion

Cette hypothèse n'a pour le moment pas été évoquée dans les études de la toxidermie induite par la Névirapine.

V.2.d. Estérification de la 4-carboxy-NVP

La 4-carboxy-NVP, estérifiée par un bon groupe partant tel que l'acide glucuronique ou le coenzyme A lors du métabolisme de phase II, serait une bonne candidate pour une réaction de type addition-élimination avec les protéines (**Figure I-22**).^[82]

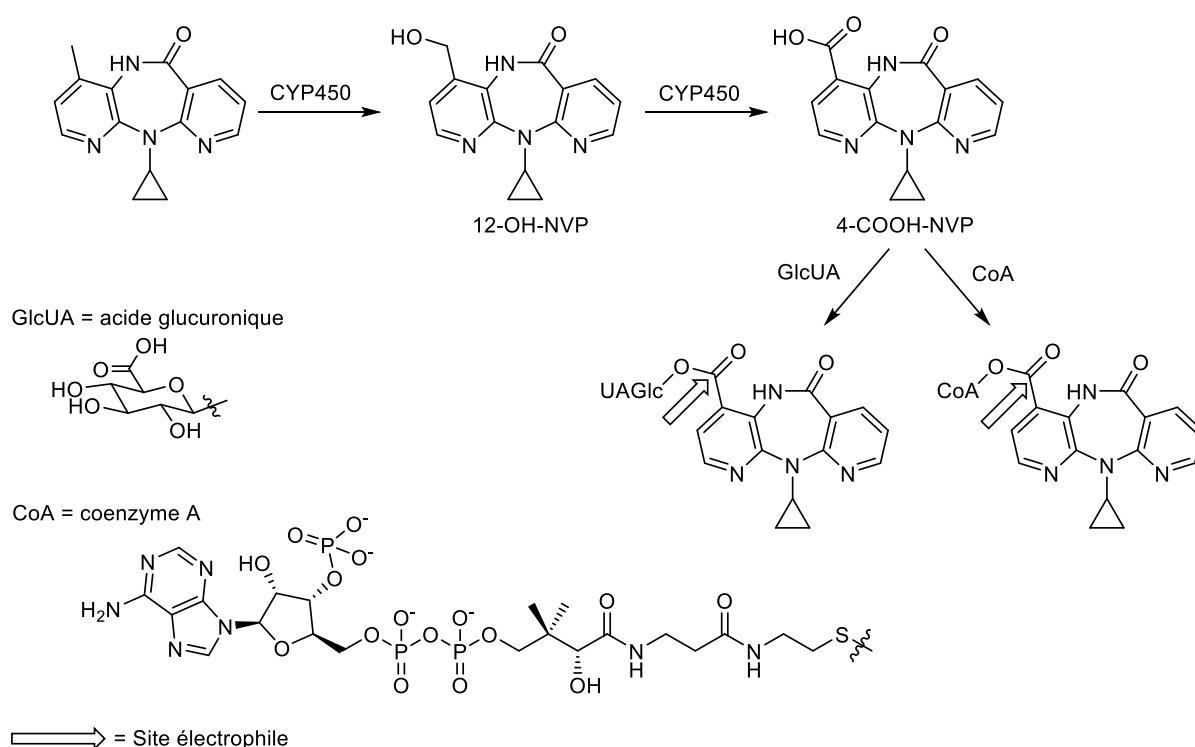


Figure I-22 : Estérification du métabolite 4-carboxy-NVP

Cette hypothèse a néanmoins été réfutée dans le cas de la toxidermie induite par la Névirapine. En effet, lorsqu'on administre à des rats de la NVP tout en diminuant la formation de 4-carboxy-NVP par l'utilisation de 1-aminobenzotriazole, inhibiteur non spécifique de cytochromes P-450, l'équipe de Jack Utrecht n'a pas observé de diminution des symptômes cutanés.^[79]

V.2.e. Activation de la 12-OH-NVP en dérivé sulfate

Le groupe de Jack Uetrecht a montré que la 12-OH-NVP, métabolite hépatique primaire majeur, pouvait être sulfatée pendant la phase II du métabolisme chez le rat pour former un sulfate benzylique électrophile (**Figure I-23**).^[79] L'hypothèse de la bioactivation de la Névirapine en un métabolite 12-OH-Névirapine sulfate toxique a alors été émise.

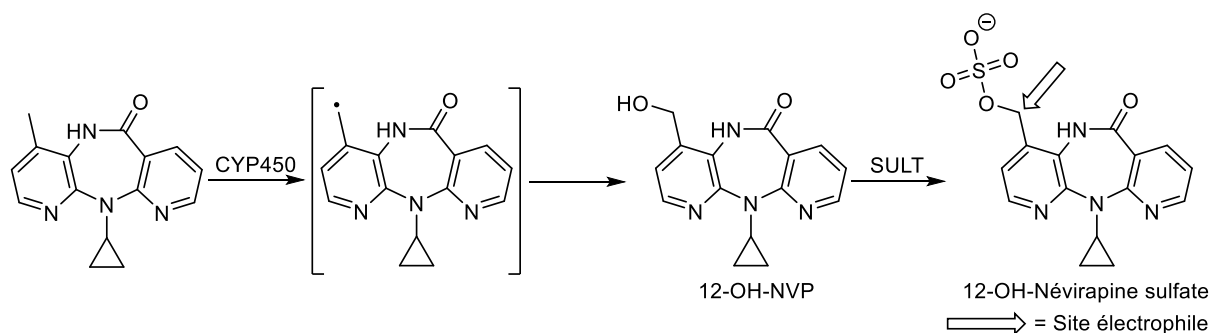


Figure I-23 : Bioactivation de la NVP en 12-OH-NVP sulfate

Dans un premier temps, Jack Uetrecht et ses collaborateurs ont montré que la position 12 de la Névirapine avait un rôle majeur dans l'induction de la toxidermie en comparant l'effet de l'administration de 12-OH-NVP avec l'effet de l'administration de NVP.^[79] Quatre rattes ont reçu une injection sous cutanée de 12-OH-NVP en utilisant plusieurs dosages (25, 50, ou 75 mg/kg/jour). Quatre autres animaux ont reçu des injections de NVP (50 ou 75 mg/kg/jour). Les symptômes cutanés déclenchés par ces traitements ont été comparés. Les résultats de cette étude sont illustrés dans la **figure I-24**.

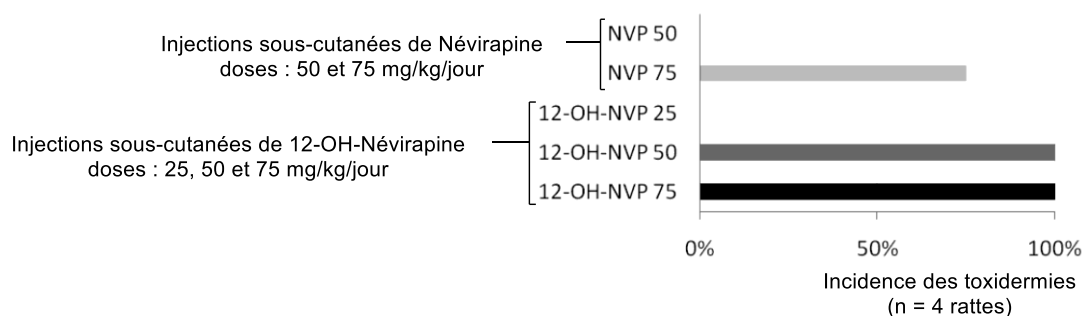


Figure I-24 : Résultats obtenus par l'équipe de Jack Uetrecht en 2008^[79] sur l'effet de l'administration de 12-OH-NVP chez 4 rattes *Brown Norway*. Traitements administrés : 12-OH-NVP injectée par voie sous-cutanée à des doses de 25, 50, ou 75 mg/kg/jour. NVP injectée à des doses de 50 ou 75 mg/kg/jour.

Cette étude montre que la 12-OH-NVP provoque une toxidermie chez les quatre animaux traités à une dose de 50 mg/kg/jour (incidence de 100%). La NVP, quant à elle, provoque une toxidermie chez seulement trois animaux sur quatre (75%) alors qu'elle est administrée à une dose plus élevée (75 mg/kg/jour). La toxidermie induite par la Névirapine serait donc liée à la formation de la 12-OH-NVP.

Dans une autre expérience, les auteurs ont injecté à des rats un analogue deutéré de la Névirapine, la 12-trideutéro-NVP (DNVP). Le remplacement des atomes d'hydrogène par des atomes de deutérium diminue la formation de 12-OH-NVP par effet isotopique. Comme il a été montré que la Névirapine était un inhibiteur des CYP, les animaux ont également reçu une dose d'inhibiteur non spécifique de cytochrome P-450, le 1-aminobenzotriazole. Cette propriété inhibitrice de la NVP n'affecte donc pas les résultats. Les auteurs ont montré que le 1-aminobenzotriazole diminue la formation des autres métabolites (2-OH-NVP, 3-OH-NVP et 4-COOH-NVP) et augmente celle de la 12-OH-NVP (**Tableau I-1**).

	Traitements administrés		
	NVP	NVP + ABT*	DNVP* + ABT*
Niveaux sanguins des métabolites 2-OH-NVP, 3-OH-NVP et 4-COOH-NVP	++	--	Non étudié
Niveau sanguin de 12-OH-NVP	++	+++	--
Incidence des symptômes cutanés	++ 75% 3 rattes sur 4 traitées par la NVP (75 mg / kg / jour)	+++ 100% 5 rattes sur 5 co-traitées par la NVP (60 mg / kg / jour) et par l'ABT (50 mg / kg / jour)	-- 20% 1 ratte sur 5 co-traitées par la NVP (60 mg / kg / jour) et par l'ABT (50 mg / kg / jour)

ABT* = 1-aminobenzotriazole, inhibiteur non spécifique des CYP450

DNVP* = 12-trideutéro-NVP

Tableau I-1 : Résultats obtenus par l'équipe de Jack Uetrecht en 2008 sur l'effet de l'administration de 12-trideutéro-NVP chez le rat

Cette étude montre que l'incidence des symptômes cutanés diminue lorsque le niveau sanguin de 12-OH-NVP diminue par l'administration de l'analogue deutéré de la NVP.

Ces premiers résultats constituent une preuve indirecte de l'importance d'un métabolite primaire majeur de la NVP, la 12-OH-NVP, dans la toxicité cutanée. On peut noter que c'est dans cette même étude que la 12-OH-NVP sulfate a été détectée pour la première fois dans la bile et les urines des rats sous traitement.

En 2013, le même groupe a poursuivi ses investigations afin de démontrer le rôle de la 12-OH-NVP sulfate, métabolite secondaire issu de cet alcool.^[83] En particulier, leurs études ont apporté un début de réponse à deux questions essentielles :

-La 12-OH-NVP sulfate est-elle le métabolite toxique responsable des symptômes cutanés ?

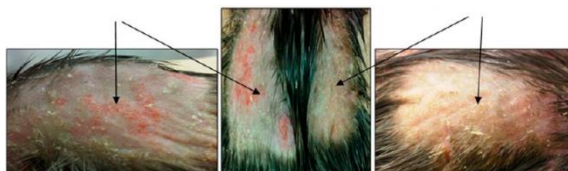
-Le foie et la peau contiennent tous les deux des sulfotransférases capables de sulfater les alcools benzyliques. La 12-OH-NVP sulfate toxique se forme-t-elle dans le foie ou dans la peau ?

Au préalable, la capacité de la 12-OH-NVP sulfate à se lier *in vitro* de façon covalente aux protéines contenues dans des homogénats de peau humaine a été vérifiée et validée.^[84]

Des études d'inhibition de la sulfatation ont été réalisées chez le rat. Les animaux ont reçu une dose de NVP associée à un inhibiteur de la sulfatation. Deux inhibiteurs différents ont été utilisés : le salicylamide, qui diminue la formation du sulfate dans le foie, et le 1-phényl-1-hexanol, qui a été appliqué localement pour inhiber la sulfatation uniquement dans la peau. La 12-OH-NVP sulfate a ensuite été dosée dans le sang des animaux soumis à ces traitements et leurs symptômes cutanés ont été observés. Les niveaux sanguins de 12-OH-NVP sulfate et l'incidence du rash ont été comparés avec les résultats obtenus avec la NVP seule. Enfin, l'épiderme isolé des rats après sacrifice a été analysé pour vérifier la présence d'une modification des protéines épidermiques due à la liaison covalente de la 12-OH-NVP sulfate.

Les résultats sont résumés dans le **tableau I-2**.

	Traitements administrés	
	NVP + Salicylamide	NVP + 1-phényl-1-hexanol
Mécanisme d'inhibition	Déplétion du PAPS*	Inhibiteur de sulfotransférase
Administration	NVP : Orale Inhibiteur : Orale	NVP : Orale Inhibiteur : Topique
Diminution de la sulfatation	Seulement dans le foie	Localement dans la peau
Niveau sanguin de 12-OH-NVP sulfate	Diminution	Pas d'effet
Liaison covalente dans la peau	Toujours présente	Absente sur la zone d'application
Symptômes cutanés	Toujours présents	Moins importants sur la zone d'application



PAPS* : 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate, coenzyme de la sulfotransférase

Tableau I-2 : Résultats des études d'inhibition réalisés par Sharma *et al.*^[83] mettant en évidence la formation du métabolite sulfate toxique dans la peau

Lorsqu'on administre aux rats de la NVP associée à un inhibiteur de la sulfatation, deux résultats différents sont obtenus :

-Si l'inhibition de la sulfatation s'effectue dans le foie, les symptômes cutanés sont toujours présents alors que le niveau sanguin de 12-OH-NVP sulfate est plus faible que celui mesuré lorsque la NVP est administrée seule.

-Si l'inhibition de la sulfatation s'effectue dans la peau, les symptômes cutanés diminuent alors que le niveau sanguin de 12-OH-NVP sulfate est similaire à celui mesuré lorsque la NVP est administrée seule.

Ces résultats montrent, de façon indirecte, que la 12-OH-NVP sulfate serait à l'origine de la toxidermie médicamenteuse induite par la Névirapine en se formant dans la peau.

Toutefois, il convient de préciser que les activités des sulfotransférases dans la peau pourraient varier d'une espèce à une autre. A l'heure actuelle, il existe très peu d'études quantitatives comparant l'activité des sulfotransférases épidermiques humaines à celles des rats vis-à-vis d'un même substrat.^[16]

VI. Présentation du travail de thèse

Comme nous l'avons vu, l'implication de la 12-OH-NVP sulfate formée dans la peau dans la toxicité cutanée a été indirectement montrée, essentiellement par des études d'inhibition. Cependant, le mécanisme chimique qui mène à la formation du complexe antigénique doit encore être élucidé à l'échelle moléculaire.

Dans ces travaux de thèse, nous proposons d'aller plus loin en essayant d'observer *in situ* l'activation de la Névirapine en métabolites de phase I et / ou de phase II. Cette molécule constitue un modèle particulièrement intéressant pour refléter le métabolisme cutané. Notre objectif est dans un second temps d'identifier la nature des adduits formés, afin de comprendre les interactions entre les métabolites réactifs et les protéines épidermiques.

Pour cela, nous avons décidé de combiner deux outils :

- un modèle d'épiderme humain reconstruit ;
- une technique d'analyse adaptée : la résonance magnétique nucléaire HRMAS (High-Resolution Magic Angle Spinning).

VI.1. Hypothèse de travail

Notre hypothèse de travail s'appuie sur l'activation hépatique de la Névirapine en 12-OH-NVP par un cytochrome P450. Cette molécule pourrait alors diffuser dans l'organisme jusqu'à l'épiderme pour y être sélectivement transformée en 12-OH-NVP sulfate par une sulfotransférase épidermique. Le sulfate benzylique réactif pourrait alors alkyler les protéines épidermiques pour former un complexe antigénique à l'origine des toxidermies (**Figure I-25**).

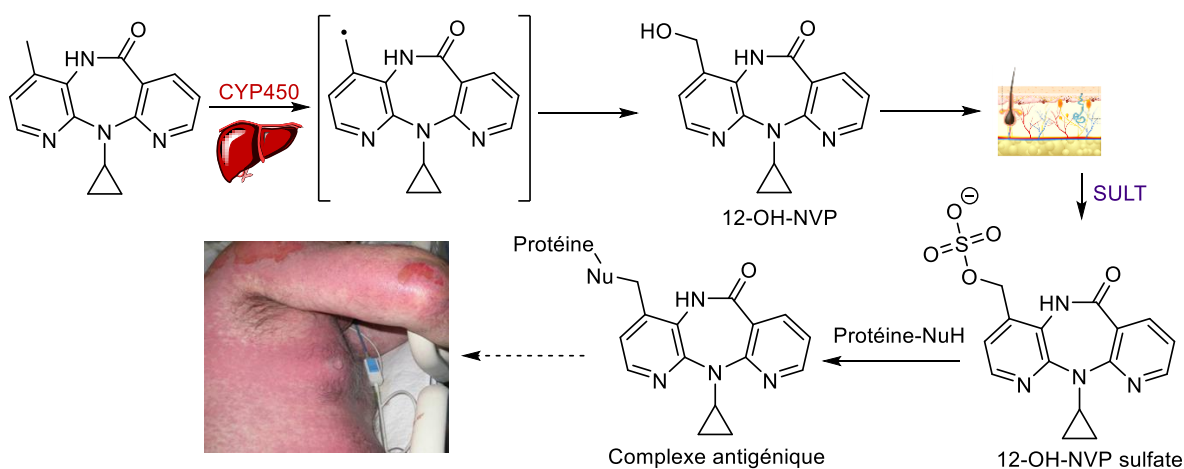


Figure I-25 : Hypothèse de travail

VI.2. Les épidermes humains reconstruits

Les recherches sur la reconstruction d'épidermes humains ont débuté dans les années 1970, avec pour objectif d'obtenir un tissu structuré et fonctionnalisé à partir de cultures cellulaires. En 1975, le premier modèle d'épiderme humain reconstruit à partir de kératinocytes a été obtenu sous forme de lambeaux par Rheinwald et Green.^[85] Depuis, de nombreux modèles d'épidermes humains reconstruits ont été développés, avec leurs spécificités et leurs domaines d'application. Les modèles EpiDerm® (MarTek Corporation-Ashland, USA), SkinEthic® et EpiSkin® (Episkin, filiale de L'Oréal, France) sont aujourd'hui disponibles dans le commerce.

Nous avons choisi de travailler avec le modèle d'épiderme humain reconstruit EpiSkin®. Episkin est le leader mondial de l'ingénierie des peaux humaines reconstruites. L'épiderme que nous utilisons est reconstitué au contact de l'air pendant 13 jours par culture de kératinocytes humains normaux à partir de cellules provenant de surplus opératoires de chirurgie esthétique ou réparatrice. Sa structure est hautement similaire à celle d'un épiderme humain (**Figure I-26**).

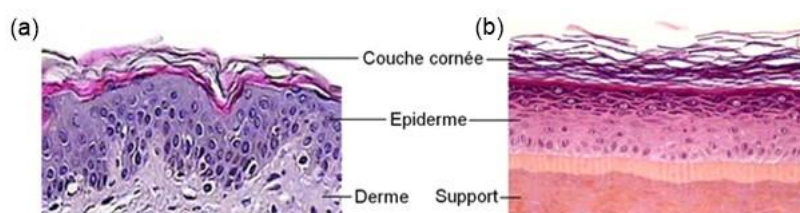


Figure I-26 : Coupes histologiques d'un épiderme humain (a) et du modèle EpiSkin® (b)

VI.3. La RMN HRMAS, une technique d'analyse de choix

La technique que nous utilisons au laboratoire pour analyser les épidermes humains reconstruits est la RMN HRMAS (High-Resolution Magic Angle Spinning). Cette technique découle de la RMN du solide et permet d'étudier des composés mobiles présents dans un milieu hétérogène. Pour cela, l'échantillon tourne à une fréquence de rotation élevée en formant un angle de $54,7^\circ$ avec le champ magnétique principal (**Figure I-27**). Cet angle est appelé angle «magique».^[86]

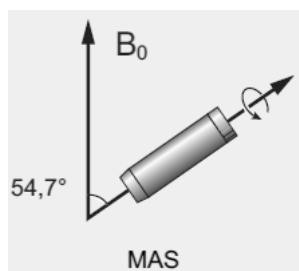


Figure I-27 : Echantillon en rotation à l'angle magique par rapport au champ magnétique principal B_0 [86]

La rotation rapide à l'angle magique permet de supprimer les différences de susceptibilités magnétiques dans un milieu non homogène (mélange solide-liquide). La qualité des spectres est proche de celle obtenue par RMN en phase liquide homogène. Cette technique est donc particulièrement adaptée à l'étude des solides mous comme la peau. Nous l'étudierons plus en détail dans le quatrième chapitre de ce manuscrit.

VI.4. Objectifs du travail de thèse

Dans ce travail de thèse, nous souhaitons mettre à profit l'association entre les épidermes humains reconstruits et la RMN HRMAS pour comprendre les événements moléculaires déclenchant la toxidermie médicamenteuse induite par la Névirapine.

Une des conditions nécessaires à l'observation des complexes antigéniques et des métabolites en RMN HRMAS est la substitution isotopique au carbone 13 au niveau de la position supposée réactive de la molécule étudiée. La visibilité et la résolution des signaux que l'on souhaite suivre sont ainsi amplement augmentées, rendant les carbones non substitués « muets ».

Notre premier objectif a donc été de mettre en place une synthèse efficace de la Névirapine substituée au carbone 13 en position 12. Dans un second temps, nous avons travaillé sur la préparation de deux de ses métabolites, la 12-(^{13}C)OH-Névirapine et son dérivé sulfate supposé réactif (**Figure I-28**). La 12-(^{13}C)méthoxy-Névirapine servant d'électrophile modèle a également été synthétisée.

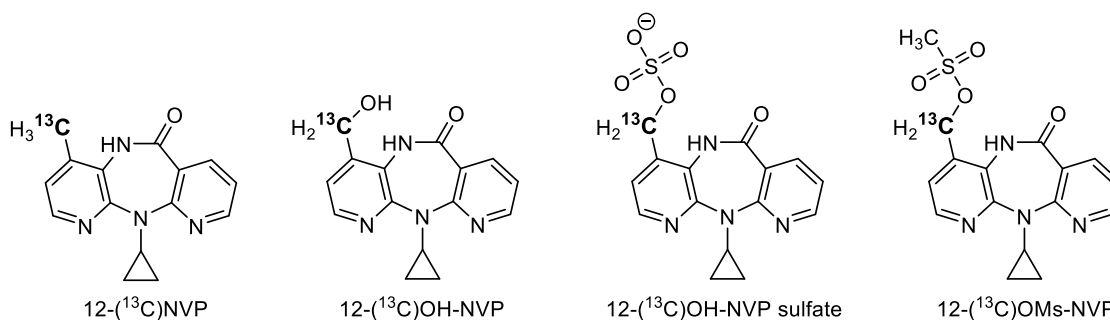


Figure I-28 : Molécules synthétisées dans ce travail de thèse

Nous avons réalisé des tests de réactivité vis-à-vis des acides aminés en solution puis les molécules ont été appliquées sur le modèle d'épiderme humain reconstruit EpiSkin® afin d'étudier par RMN HRMAS la bioactivation de la Névirapine dans la peau et l'éventuelle modification covalente des protéines épidermiques.

Ce manuscrit de thèse s'articule donc en trois parties. Nous expliciterons dans le chapitre qui suit la méthode de synthèse développée pour la 12-(¹³C)Névirapine. Le troisième chapitre sera consacré à la préparation de la 12-(¹³C)OH-Névirapine et de son dérivé sulfate, métabolites supposés toxiques, ainsi que de la 12-(¹³C)OMs-Névirapine. Enfin, nous analyserons dans le quatrième chapitre les résultats obtenus par RMN et chromatographie couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) en phase liquide et par RMN HRMAS associée aux épidermes humains reconstruits.

Chapitre II

La Névirapine : généralités et synthèse de la 12-(¹³C)Névirapine

Chapitre II

La Névirapine :

généralités et synthèse de la 12-(¹³C)Névirapine

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la 12-OH-Névirapine et son dérivé sulfate sont soupçonnés d'être impliqués dans la toxicité cutanée. Cependant, la formation du sulfate dans la peau et le mécanisme chimique qui mène à la formation du complexe antigénique doivent encore être élucidés.

Pour observer par RMN HRMAS les éventuels complexes antigéniques et métabolites générés par la Névirapine dans les épidermes humains reconstruits, la première étape du travail de thèse a été de préparer la Névirapine substituée au carbone 13. En effet, il a été montré par de nombreuses études réalisées au laboratoire de Dermatochimie que cette substitution isotopique était indispensable à l'étude par RMN du devenir des sensibilisants cutanés dans la peau^[87] car les épidermes humains reconstruits génèrent un très grand nombre de signaux issus du métabolome. La substitution permet d'augmenter fortement l'intensité des signaux associés à la molécule observée au travers de séquences hétéro-nucléaires (HSQC) en favorisant les signaux des protons associés à des carbones 13 dont l'abondance naturelle est faible (1,108%).

La substitution au carbone 13 impose certaines contraintes lors de la synthèse. Premièrement, la position de la substitution doit être judicieusement choisie. Elle doit idéalement correspondre au site supposé réactif, c'est pourquoi nous avons synthétisé la 12-(¹³C)Névirapine. Parfois, la substitution sur le site réactif est difficile et il est nécessaire de sélectionner une ou plusieurs position(s) voisine(s).^[88] Deuxièmement, la stratégie de synthèse doit en grande partie être basée sur le synthon commercial permettant d'introduire le carbone 13. Les possibilités sont limitées par le nombre de précurseurs substitués disponibles ainsi que par leur coût. Il est d'ailleurs préférable d'engager ce précurseur le plus tard possible. Troisièmement, il est nécessaire de mettre au point et de maîtriser la synthèse en version non substituée avant de l'appliquer en série substituée.

Notre premier objectif a donc été de mettre en place une synthèse efficace de la Névirapine qui a ensuite été appliquée à la préparation de la 12-(¹³C)Névirapine. Trois voies de synthèse ont été étudiées. Elles ont toutes été pensées pour répondre à la contrainte de l'utilisation d'un petit précurseur substitué au carbone 13. La plus intéressante a été optimisée puis appliquée en série substituée pour donner une quantité suffisante de 12-(¹³C)Névirapine pour la préparation des métabolites et les tests biologiques.

Dans ce deuxième chapitre, nous évoquons d'abord la découverte et la commercialisation de la Névirapine en tant qu'inhibiteur de la transcriptase inverse du VIH de type 1. Les deux premières voies de synthèse sur lesquelles nous avons travaillé sont ensuite détaillées, avec une attention particulière accordée à la préparation d'un intermédiaire clé que nous appelons le CAPIC. L'une de ces voies a été appliquée en série substituée pour préparer la 12-⁽¹³C)Névirapine. En fin de chapitre nous explicitons une troisième méthode légèrement différente ne passant pas par le CAPIC. Elle n'a pas été sélectionnée pour le passage en série substituée mais a également abouti à la Névirapine.

I. Découverte et commercialisation de la Névirapine

Depuis la commercialisation du premier antirétroviral anti-VIH en 1987, de nombreux laboratoires de recherches se mobilisent pour développer de nouvelles molécules combinées dans des polythérapies antirétrovirales. Parmi ces molécules, la Névirapine, premier inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse du VIH-1, est très utilisée notamment pour sa capacité à limiter la transmission du virus d'une mère à l'enfant. La Névirapine a été découverte au début des années 1990 par des techniques de criblage, et sa synthèse a été régulièrement améliorée et protégée par de nombreux brevets.

Dans cette première partie du chapitre, nous rappelons quelques généralités sur l'émergence du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), conséquence de la destruction de cellules du système immunitaire par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) dont le cycle de réplication sera brièvement expliqué. Nous évoquons ensuite la découverte du potentiel de la Névirapine comme inhibiteur de la transcriptase inverse, enzyme cruciale de ce cycle, avant de passer aux méthodes de synthèses industrielles dont nous nous sommes inspirés pour commencer le travail de thèse.

I.1. Le VIH : un peu d'histoire

En juin 1981, le Centre pour le contrôle et la prévention des maladies (*Center for Disease Control and Prevention*, CDC) d'Atlanta fait état d'une fréquence élevée de sarcomes de Kaposi, forme de cancer liée à un herpesvirus humain qui touche le plus souvent des patients immunodéprimés. Un mois plus tard, le *New York Times* publie un article décrivant pour la première fois les symptômes d'une maladie inconnue se transmettant par voie sexuelle, qui sera ensuite appelée le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA).^[89]

Atteints d'affections pulmonaires, d'infections buccales graves, parfois de leucémie et très amaigris, les patients souffrent surtout d'une diminution dramatique de leur immunité

naturelle. Très vite, un premier cas est signalé en France et on parlera d'épidémie qui atteint tous les continents. Dès 1982, on découvre que le virus, baptisé plus tard virus de l'immunodéficience humaine (VIH), peut également se transmettre par le sang. Le VIH a causé plus de 35 millions de décès à ce jour (chiffres de l'OMS actualisés en novembre 2017) tandis que 36,7 millions de personnes vivent actuellement avec le virus.

Il existe deux types de VIH : le VIH-1, qui concerne plus de 98% des infections en France, et le VIH-2 qui a été isolé en 1985 en Afrique de l'Ouest chez des patients malades du SIDA séronégatifs au VIH-1. Le VIH-2 est moins transmissible que le VIH-1.

Depuis que l'OMS a fait de la lutte contre le SIDA une priorité en 1987, de nombreux laboratoires de recherche tentent de mieux caractériser le virus et de comprendre la maladie afin de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques. Aujourd'hui, les traitements sont composés d'une association de molécules qui agissent généralement à plusieurs niveaux du cycle de réplication du virus.

I.2. Cycle de réplication du VIH

Les polythérapies antirétrovirales actuelles sont basées sur la compréhension de la structure et du cycle de vie du VIH (**Figure II-1**).^[90]

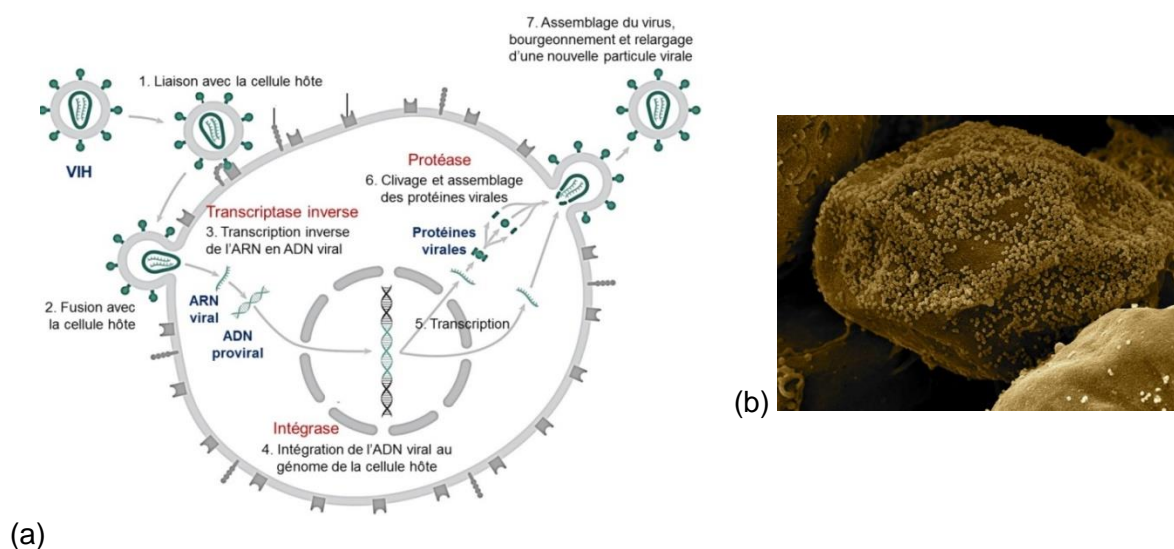


Figure II-1 : Représentation simplifiée du cycle de réplication du VIH (a) et bourgeonnement des particules virales sur toute la surface cellulaire vue en microscopie électronique à balayage (b) (Source : INSERM^[91])

Le virus est constitué d'une coque de glycoprotéines entourant une matrice à l'intérieur de laquelle se situe un noyau protégé par une capsid protéique. Le noyau du virus du SIDA contient son matériel génétique, composé de deux brins d'ARN. Ce génôme doit être rétro-transcrit en ADN pour être intégré par la suite dans l'information génétique de la cellule hôte.

Le VIH a donc toutes les caractéristiques d'un rétrovirus. Le noyau abrite également trois enzymes indispensables à la réplication : la transcriptase inverse, l'intégrase et la protéase. La cellule cible principale du VIH est le lymphocyte CD4. Dans un premier temps, le VIH se fixe et fusionne avec la membrane de sa cellule hôte. La capsidie pénètre alors dans la cellule et se désagrège pour libérer son ARN ainsi que les trois enzymes virales. L'une d'entre elles, la transcriptase inverse, traduit le brin d'ARN viral en ADN. Elle est également capable de dupliquer ce brin d'ADN pour former de l'ADN proviral double brin. L'intégrase permet d'intégrer le double brin d'ARN proviral à l'ADN du noyau de la cellule hôte. Celui-ci peut alors être transcrit par la machinerie cellulaire du lymphocyte en un nouvel ARN viral, permettant la traduction des protéines indispensables à la réplication et à la structure du virus. La protéase intervient ensuite dans le clivage des longues chaînes d'acides aminés à l'origine des différentes protéines composant le VIH. Une nouvelle capsidie s'assemble en une structure globulaire qui bourgeonne de la cellule infectée. Après maturation, les particules virales infectent de nouvelles cellules hôtes. Une même cellule peut être infectée par de nombreuses particules virales.

La transcriptase inverse du VIH est une cible thérapeutique très intéressante. En effet, cette enzyme est spécifique des rétrovirus et aucune activité de transcription inverse n'a été identifiée chez l'Homme.

Le premier médicament antirétroviral commercialisé pour le traitement du SIDA est un inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse, appelé la Zidovudine (AZT), mise sur le marché en 1987 (**Figure II-2**).^[92]

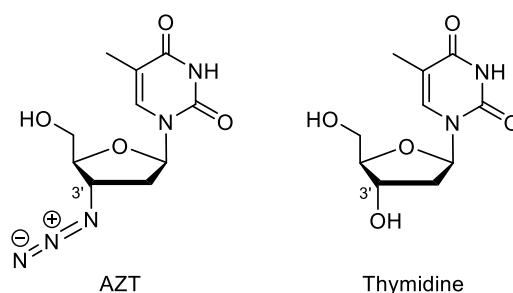


Figure II-2 : Structure de l'AZT, analogue de la thymidine

Après phosphorylation, cet analogue de désoxynucléoside entre en compétition avec le triphosphate de thymidine, substrat naturel de la transcriptase inverse. Ne possédant pas de groupement hydroxyle en position 3', l'AZT bloque la réaction de polymérisation des nucléosides en empêchant la formation de la liaison phosphodiester. Il bloque donc la transcription de l'ARN viral en ADN proviral.

Toutefois, en mimant un nucléoside naturel, les inhibiteurs nucléosidiques comme l'AZT manquent de sélectivité car ils peuvent interférer avec l'activité d'enzymes humaines endogènes comme l'ADN polymérase. Dès les années 1990, il a donc été nécessaire de rechercher d'autres molécules aux modes d'actions différents.

I.3. Recherche et développement d'un inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse

Dans les années 1990, Hargrave *et al.* de la compagnie pharmaceutique *Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals* ont cherché à mettre au point un inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse du VIH-1.^[93] Après avoir criblé seulement 600 composés, un dérivé de pyridobenzodiazépinone **2** (**Figure II-3**) a montré une faible activité inhibitrice de la transcriptase inverse du VIH-1 (CI50 = 6 µM). Cette molécule est un analogue d'un antagoniste sélectif des récepteurs muscariniques M1 de l'acétylcholine appelé la Pirenzépine qui était déjà présent dans la chimiothèque de la compagnie. De nombreuses pyridobenzodiazépinones telles que **2** et **3** et quelques dipyridodiazépinones comme **4** ont ainsi pu être testées. La molécule **3a**, plus facile à synthétiser, a été choisie comme chef de file avec une CI50 de 350 nM. Un chef de file **4a** a également été choisi dans la série des dipyridodiazépinones (CI50 = 125 nM). Ces structures sont illustrées dans la **figure II-3**.

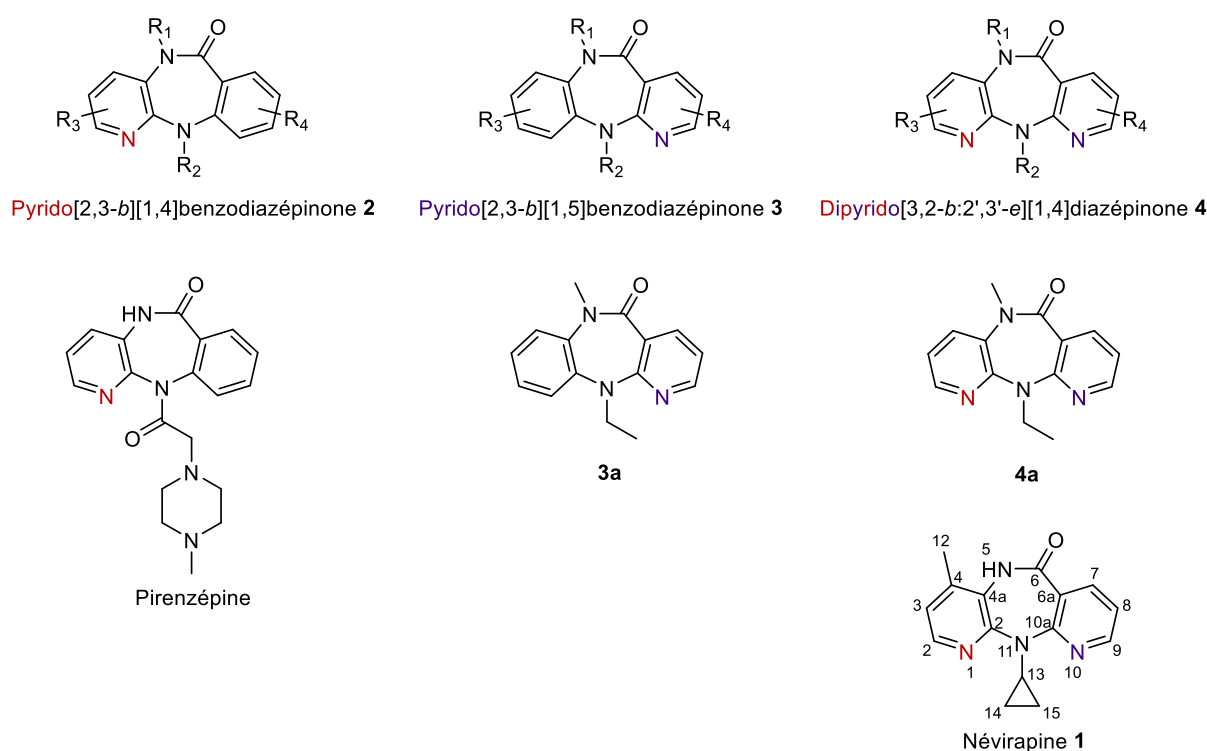


Figure II-3 : Structures des analogues testés lors de la recherche d'un inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse du VIH-1

Les auteurs ont constaté une activité plus importante pour les molécules possédant deux noyaux pyridines. Ils se sont également aperçu que ces dérivés, plus stables vis-à-vis du métabolisme, avaient une demie-vie bien plus intéressante. L'ajout d'un groupement méthyle en position 4 a encore augmenté l'activité de la molécule. Enfin, l'introduction d'un groupement cyclopropyle sur cet atome d'azote a permis d'augmenter la biodisponibilité orale de la molécule. La Névirapine **1** a donc été sélectionnée pour l'évaluation clinique et sa synthèse à grande échelle a été mise au point.

I.4. Synthèses industrielles de la Névirapine

La synthèse de la Névirapine a été publiée pour la première fois en 1991 par Hargrave *et al.* (**Figure II-4**).^[93] Cette méthode nécessite de réduire la 2-chloro-3-nitro-4-méthylpyridine **5** en aminopyridine **6**, intermédiaire clé que nous appellerons CAPIC (abréviation de 2-chloro-3-amino-4-picoline) tout au long de ce chapitre. Le CAPIC est condensé avec le chlorure de l'acide 2-chloronicotinique **7** pour donner l'intermédiaire dipyrido **8**. Un traitement avec quatre équivalents de cyclopropylamine sous pression dans le xylène donne la molécule **9**. Enfin, la fermeture du cycle diazépino en milieu basique aboutit à la Névirapine **1**.

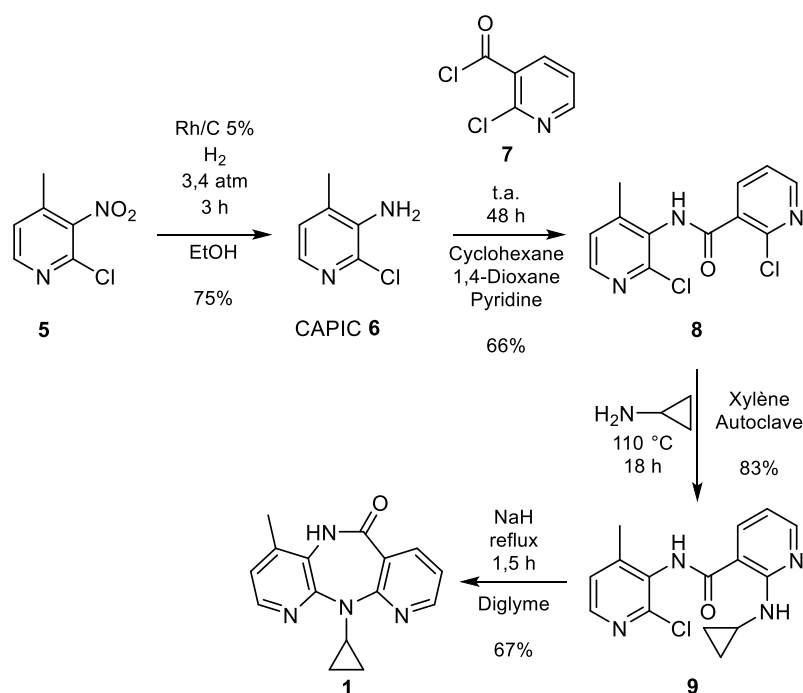


Figure II-4 : Première synthèse de la Névirapine décrite en 1991^[93]

Malheureusement, l'obtention du produit de départ **5** pose problème. En effet, sa préparation passe par la nitration de la 4-méthyl-2(1H)-pyridinone **10** en 4-méthyl-3-nitro-2(1H)-pyridinone **11** (**Figure II-5**). Cette réaction a été décrite vingt ans plus tôt avec un rendement de 82% après purification.^[94]

Cependant, elle donne un mélange de régioisomères **11** et **12** dont la séparation par recristallisation n'est pas envisageable à l'échelle industrielle.^[95] Le dérivé nitré **5** n'a donc pas été utilisé pour la synthèse industrielle de la Névirapine.

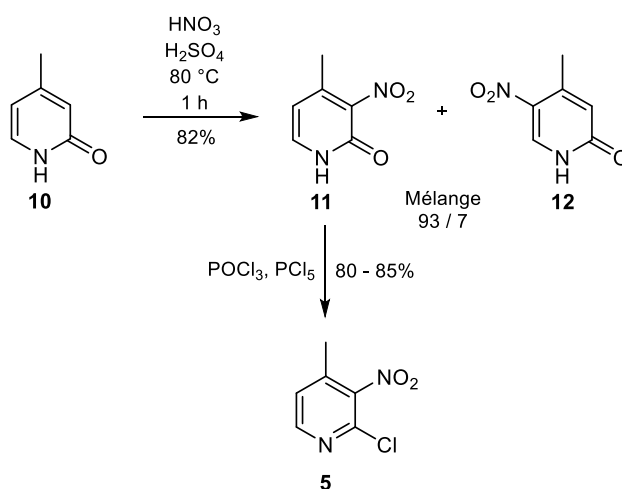


Figure II-5 : Préparation du composé **5**

Depuis, deux méthodes principales de préparation de la Névirapine ont été utilisées dans l'industrie pharmaceutique.

La première date de la mise sur le marché du médicament en 1996.^[96] Elle met en réaction les mêmes intermédiaires que dans la méthode publiée en 1991 illustrée dans la **figure II-4**.^[93] Toutefois, le CAPIC **6** y est préparé différemment à partir de l'analogue dichloré **13** correspondant, qui est déshalogéné pour donner **14** puis chloré régiosélectivement pour aboutir au CAPIC (**Figure II-6**).^[97]

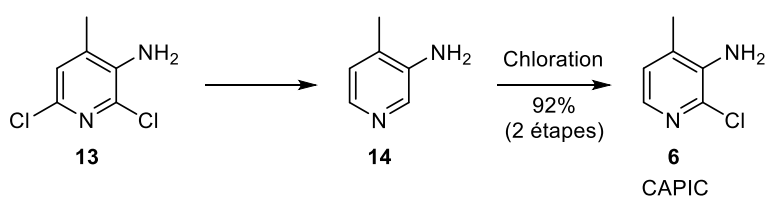


Figure II-6 : Méthode de préparation du CAPIC utilisée pour la mise sur le marché de la Névirapine^[97]

La seconde voie de synthèse est plus récente.^[98] Elle diffère de la méthode historique mise au point par Hargrave *et al.*^[93] par le mode d'introduction de la cyclopropylamine (**Figure II-7**). Elle est additionnée avant le couplage du CAPIC **6** avec le second noyau pyridine **15**, donnant le dérivé **9** sans passer par la molécule dichlorée **8**.

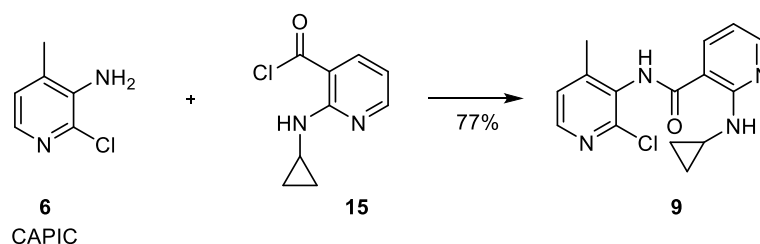


Figure II-7 : Voie de synthèse alternative de la Névirapine

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes inspirés de ces méthodes brevetées avec la contrainte d'introduire la substitution au carbone 13.

II. Préparation du 4-(¹³C)CAPIC, intermédiaire clé de la synthèse de la 12-(¹³C)Névirapine

Dans la plupart des méthodes de préparation de la Névirapine, le CAPIC **6** est un intermédiaire clé. Il est généralement couplé avec un acide nicotinique activé pour donner un précurseur de la Névirapine (**Figure II-8**). Pour obtenir la 12-(¹³C)Névirapine, nous avons donc cherché, dans un premier temps, à préparer le CAPIC à partir d'une petite molécule disponible dans le commerce en version substituée au carbone 13.

Le choix des précurseurs substitués au carbone 13 est limité et leur coût est important. La mise au point d'une synthèse la plus efficace possible a donc été réalisée en série non substituée au carbone 13.

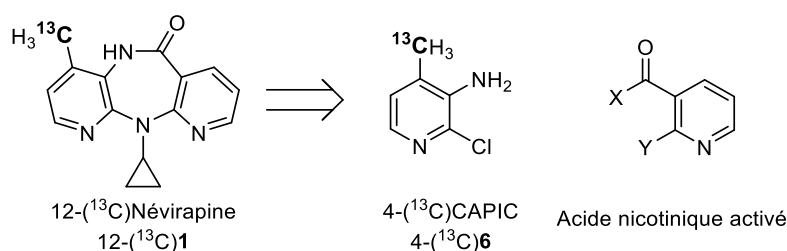


Figure II-8 : Analyse rétrosynthétique de la préparation de la 12-(¹³C)Névirapine à partir du 4-(¹³C)CAPIC

II.1. Synthèse d'un noyau pyridine à partir d'un β-cétoacétal

Dans un premier temps, nous avons essayé de construire directement une pyridine monochlorée, précurseur du CAPIC **6**. Nous souhaitons ainsi éviter le passage par le dérivé dichloré **13** qui est illustré dans la **figure II-6** afin de ne pas avoir à réaliser les étapes de déshalogénéation complète puis d'halogénéation régiosélective.

En 2011, Ge *et al.*^[99] ont publié la préparation du CAPIC **6** en trois étapes après avoir formé un noyau pyridine **16** à partir d'un β -cétoacétal, la 4,4-diméthoxy-2-butanone **17**, et de cyanoacétamide **18** (**Figure II-9**). La pyridine **16** est ensuite chlorée puis hydrolysée directement en amide **19**. Le CAPIC **6** est obtenu par réarrangement de Hofmann à partir de **19** en présence d'hypochlorite de sodium. Le même groupe a repris cette méthode deux ans plus tard en améliorant les conditions de condensation de **17** et **18**.^[100]

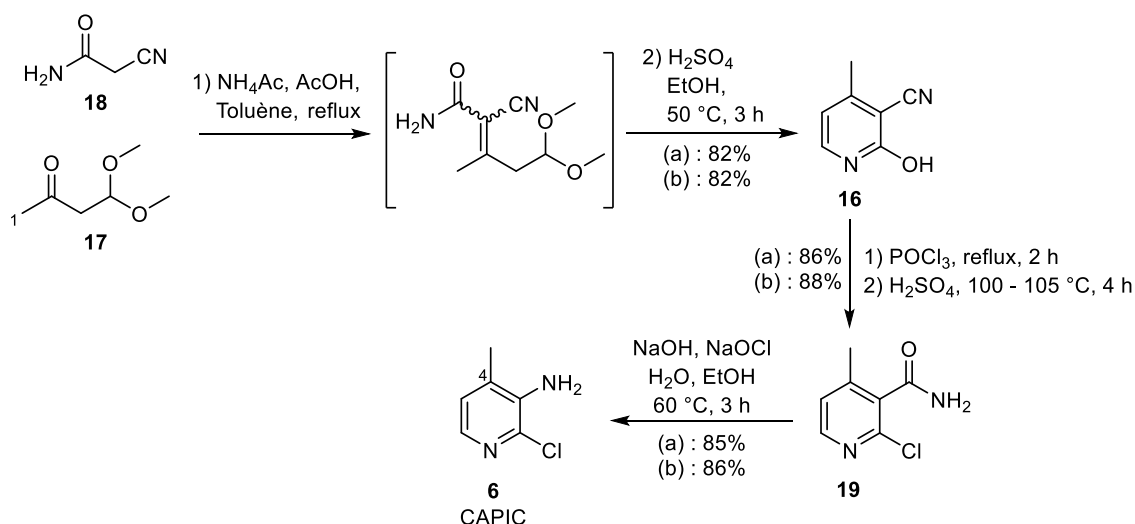


Figure II-9 : Préparation du CAPIC **6** publiée en 2011^[99] (a) et en 2013^[100] (b)

Nous avons essayé de reproduire cette synthèse en ajoutant les étapes nécessaires pour préparer la 1-(¹³C)4,4-diméthoxy-2-butanone 1-(¹³C)**17**, indispensable à l'introduction d'un méthyle substitué en position 4 du CAPIC.

II.1.a. Choix de la position de la substitution et préparation de la 4,4-diméthoxy-2-butanone **17**

Le β -cétoacétal **17** est commercial, mais pas en série substituée au carbone 13. Notre objectif étant de préparer le 4-(¹³C)CAPIC, nous avons vérifié s'il était possible de préparer la 1-(¹³C)4,4-diméthoxy-2-butanone 1-(¹³C)**17** à partir d'un petit précurseur substitué. Les essais ont été réalisés en série non substituée pour des raisons de coût.

Nous avons synthétisé **17** à partir de l'ester commercial correspondant **20** en utilisant la méthode de Nahm et Weinreb.^[101] La 4,4-diméthoxy-2-butanone **17** a donc été préparée à partir du 3,3-diméthoxypropanoate d'éthyle **20**, transformé en amide de Weinreb **21**, puis traité par l'organomagnésien CH₃MgI. Cette voie de synthèse, si elle avait été appliquée en série substituée, aurait nécessité l'utilisation de (¹³C)iodométhane qui est un précurseur substitué classiquement utilisé au laboratoire (**Figure II-10**).

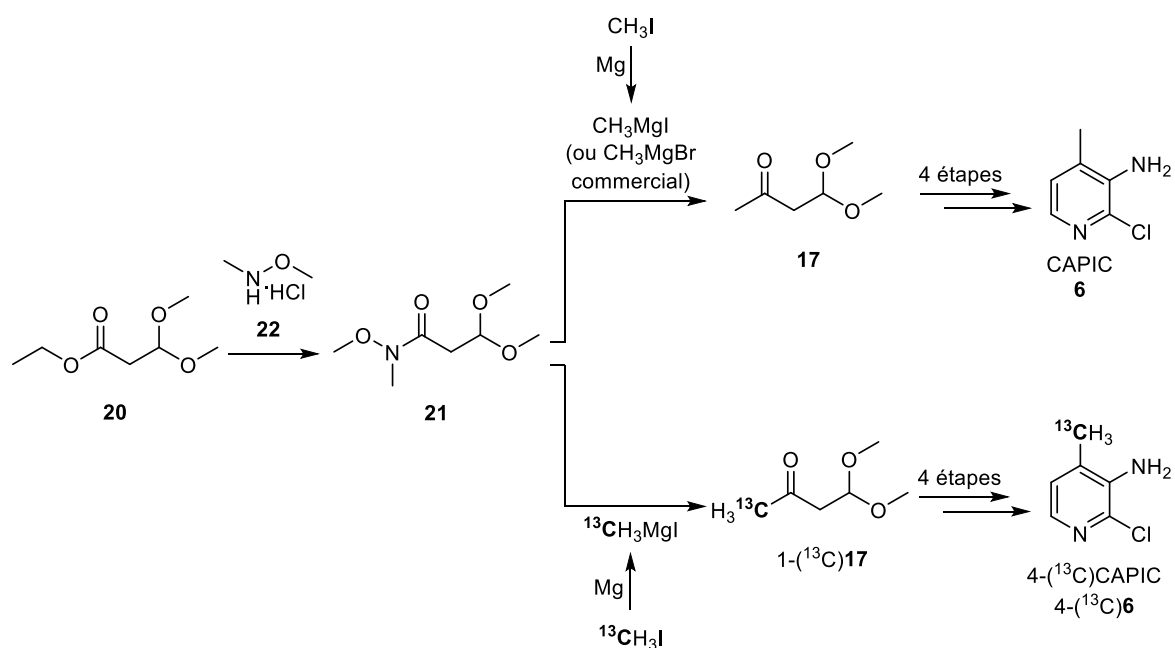
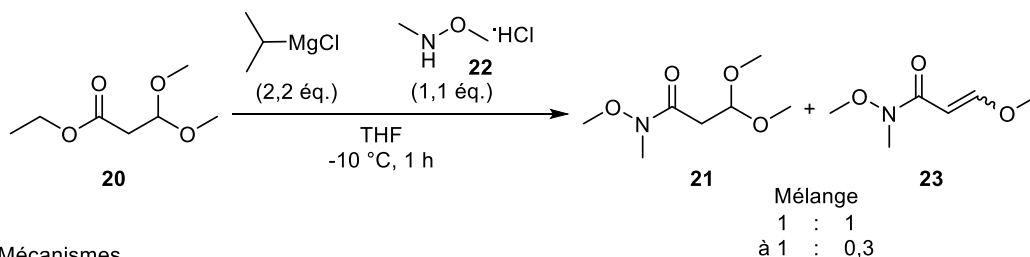


Figure II-10 : Voie de synthèse envisagée pour la préparation de la 4,4-diméthoxy-2-butanone **17** à partir de l'ester **20** par la méthode de Nahm et Weinreb, permettant l'introduction de la substitution au carbone 13 sur le CAPIC **6** par l'utilisation de (^{13}C)iodométhane

Dans un premier temps, l'addition nucléophile de l'amine de Weinreb **22** sur l'ester **20** menant à l'amide de Weinreb **21** a été réalisée en présence de chlorure d'isopropylmagnésium.^[102] L'utilisation de cet organomagnésien encombré en tant que base forte permet de déprotoner le chlorhydrate de la *N,O*-diméthylhydroxylamine **22** à deux reprises afin de former l'amidure nucléophile correspondant. L'amidure s'ajoute ensuite sur l'ester **20**. Malheureusement, nous avons rencontré des difficultés dues au milieu très basique. En effet, les bruts réactionnels contenaient systématiquement un mélange d'ester de départ **20**, de produit attendu **21**, et de l'amide α,β -insaturé **23** issu de l'élimination de méthanolate par un mécanisme E2 ou E1cB (**Figure II-11**).

Produits obtenus



M\u00e9canismes

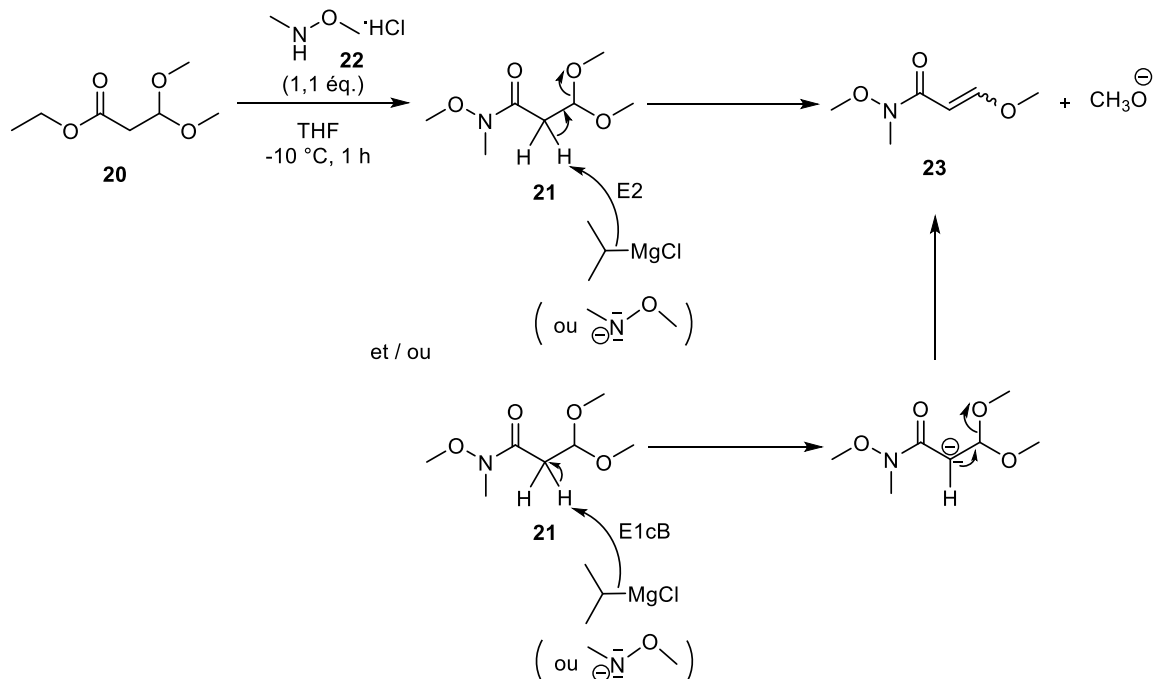


Figure II-11 : Formation du produit secondaire d\u2019\u00e9limination **23** en milieu basique \u00e0 partir de l\u2019amide de Weinreb **21**

Le travail \u00e0 plus basse temp\u00e9rature (-20 \u00b0C) ne permet pas d\u2019\u00e9viter la formation de **23**. Nous avons \u00e9galement d\u00e9proton\u00e9 l\u2019amine de Weinreb **22** avant de l\u2019introduire dans la solution d\u2019ester **20**. Nous souhaitions ainsi travailler directement avec l\u2019amidure de **22** et r\u00e9duire le temps de r\u00e9action, mais nous n\u2019avons pas rencontr\u00e9 plus de succ\u00e8s.

Nous avons donc chang\u00e9 les conditions op\u00e9ratoires pour travailler en milieu acide. L\u2019utilisation du trim\u00e9thylaluminium comme acide de Lewis permet d\u2019activer l\u2019ester **20**, le rendant plus \u00e9lectrophile.

L\u2019amine de Weinreb **22** peut donc \u00eatre utilis\u00e9e directement en solution. Ainsi, nous avons obtenu un rendement de 86% sans aucune trace du produit secondaire **23** (**Figure II-12**).^[103]

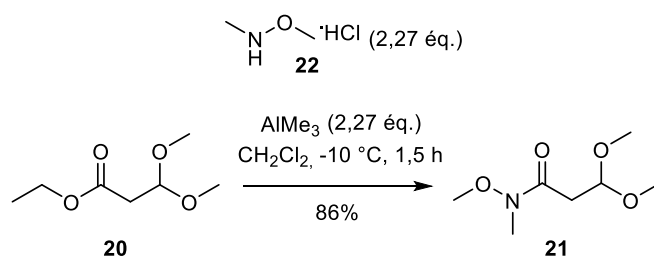


Figure II-12 : Préparation de l'amide de Weinreb **21** en milieu acide de Lewis

A partir de l'amide de Weinreb **21**, la 4,4-diméthoxy-2-butanone **17** a été préparée par addition nucléophile de l'organomagnésien suivie d'une hydrolyse acide avec un rendement de 59% (**Figure II-13**). Cette réaction passe par un intermédiaire cyclique très stable chélaté par le magnésium. La cétone se forme seulement lors de l'étape d'hydrolyse de cette espèce. La méthode de Nahm et Weinreb évite ainsi la formation d'un alcool diméthylé qui serait issu de l'addition d'un second équivalent d'organomagnésien sur la cétone **17**.^[101]

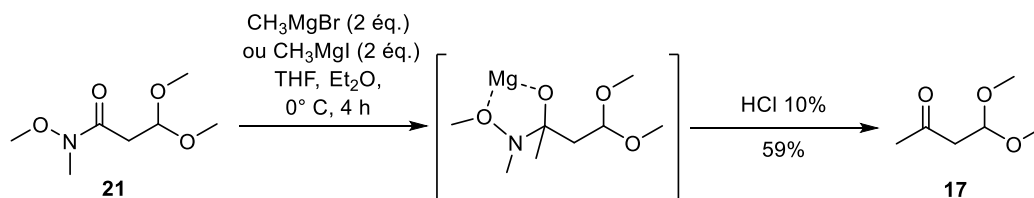


Figure II-13 : Formation de la cétone **17** par la méthode de Nahm et Weinreb^[101]

Comme nous l'avons précisé précédemment, si cette méthode avait été appliquée en série substituée au carbone 13, il nous aurait suffi de remplacer l'iodométhane CH_3I par du (^{13}C)iodométhane $^{13}\text{CH}_3\text{I}$ pour obtenir 1- (^{13}C) **17**.

A partir de la cétone **17**, nous avons ensuite essayé de former la pyridine **16**, précurseur du CAPIC **6**.

II.1.b. Condensation de Knoevenagel avec le cyanoacétamide et cyclisation

La 4,4-diméthoxy-2-butanone **17** a été mise en réaction avec du cyanoacétamide **18** dans les conditions décrites par Ge *et al.* en 2011^[99] et Zhao *et al.* en 2013^[100] pour préparer la 2-hydroxy-3-cyano-4-méthylpyridine **16** par une condensation de Knoevenagel.

Décrite par Emil Knoevenagel dans les années 1890, cette variante de la condensation aldolique est une réaction classique de chimie organique permettant d'obtenir un composé α,β -insaturé en présence d'un catalyseur basique. Dans notre cas, l'intermédiaire obtenu par condensation de Knoevenagel est dans un second temps déprotégé en aldéhyde **24** par traitement en milieu acide. La molécule **24** peut ensuite être cyclisée pour former un noyau pyridine après déshydratation (**Figure II-14**). La condensation de Knoevenagel est

habituellement catalysée par des bases faibles comme les amines ou les urées. Dans les publications de 2011^[99] et 2013,^[100] les auteurs montrent qu'un mélange d'acétate d'ammonium (4% m/m) et d'acide acétique (30% m/m) dans le toluène donne un meilleur rendement (82%).

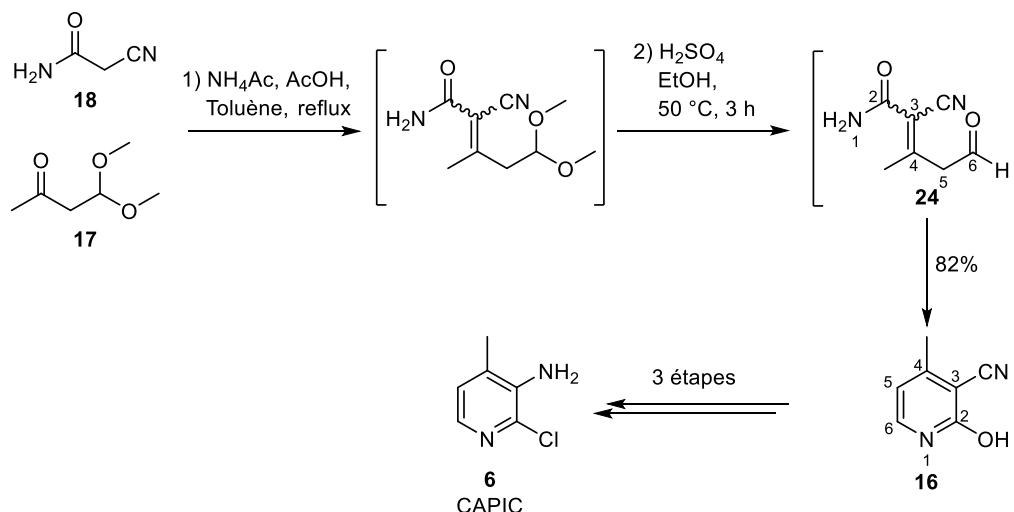


Figure II-14 : Résultats publiés en 2011^[99] et 2013^[100] pour la condensation de Knoevenagel de la 4,4-diméthoxy-2-butanone **17** et du cyanoacétamide **18** suivie par la formation d'un noyau pyridine **16**

Nous avons dans un premier temps suivi rigoureusement cette méthode qui n'a donné que 6% de pyridine. D'autres conditions opératoires ont donc été mises en place afin d'améliorer ce rendement (**Tableau II-1**).

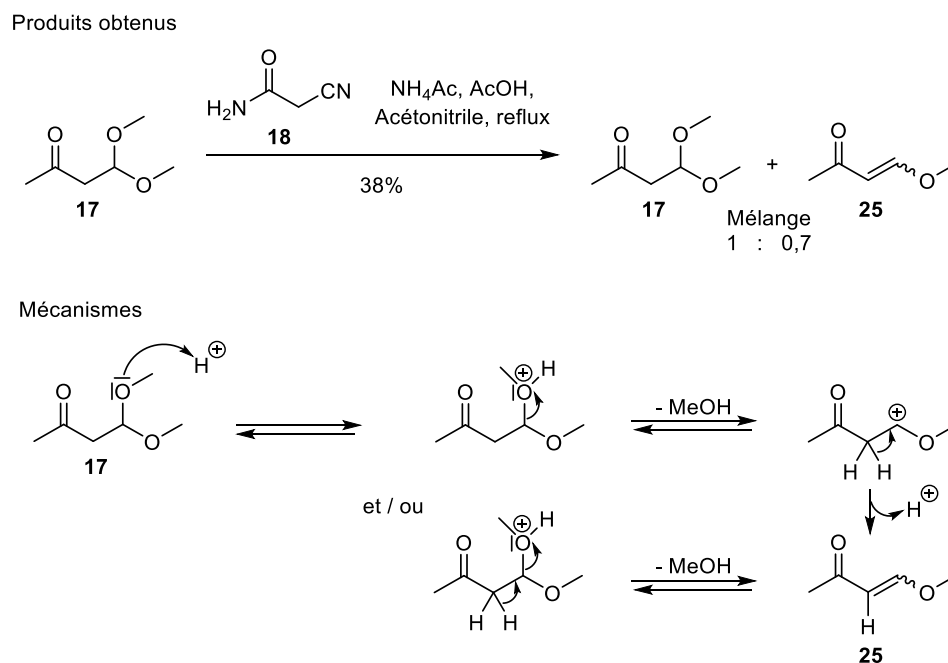
Entrée	Solvant	NH_4OAc	AcOH	NHEt_2	Température	Temps de réaction	Rendement
1	Toluène	0,07 éq.	0,65 éq.	\	$110\text{ }^\circ\text{C}$	8 h	6%
2	Toluène	0,07 éq.	0,41 éq.	\	$110\text{ }^\circ\text{C}$	12 h	11%
3	EtOH	\	\	0,42 éq.	$79\text{ }^\circ\text{C}$	20 h	7%
4	EtOH	\	\	0,42 éq.	$79\text{ }^\circ\text{C}$	48 h	26%
5	CH_3CN	0,07 éq.	0,65 éq.	\	$82\text{ }^\circ\text{C}$	43 h	Mélange 17 : 25 1 : 0,7 (38%)

Tableau II-1 : Conditions opératoires testées pour l'obtention de la pyridine **16**

La quantité d'acide acétique a été diminuée par rapport à celle d'acétate d'ammonium afin d'augmenter le pH (**entrée 2**). Cela n'a pas fonctionné mais nous nous sommes aperçus que le toluène ne solubilisait pas correctement les réactifs. Le catalyseur et le solvant ont donc été changés pour de la diéthylamine dans l'éthanol à reflux, sans succès (**entrée 3**). Même en agitant le milieu réactionnel pendant deux jours dans ces conditions (**entrée 4**), on atteint

un rendement de 26% seulement. L'acétonitrile permet d'utiliser l'acide acétique et l'acétate d'ammonium dans les mêmes proportions que celles publiées tout en solubilisant bien tous les réactifs mais aucune cyclisation n'a lieu (**entrée 5**).

La réaction dans l'acétonitrile (**entrée 5**) donne néanmoins un résultat intéressant puisqu'un produit α,β -insaturé **25** a pu être identifié, en mélange avec le β -cétacétal de départ **17** (**Figure II-15**). Comme le montre la **figure II-15**, nous expliquons la formation de **25** à partir de **17** par une réaction d'élimination de méthanol sous catalyse acide.



Dans la littérature, des préparations de noyaux pyridines en milieux basiques ont été décrites à partir de dérivés α,β -insaturés tels que **25** (**Figure II-16**). En particulier, Fischer et ses collaborateurs ont préparé une 6-méthylpyridine **26**, régioisomère de la 4-méthylpyridine **16**, en chauffant à reflux la molécule α,β -insaturé **25** avec le cyanoacétamide **18** en présence d'acétate de pipéridine.^[104] Plus tard, Kim *et al.* ont publié la synthèse d'une molécule potentiellement analgésique possédant dans sa structure un noyau pyridine dont le précurseur est la 2-hydroxy-3-cyano-6-trifluorométhylpyridine.^[105] Dans des conditions basiques similaires à celles de Fischer,^[104] Kim *et al.* ont préparé cette pyridine 6-substituée par condensation d'un produit α,β -insaturé avec le cyanoacétamide.

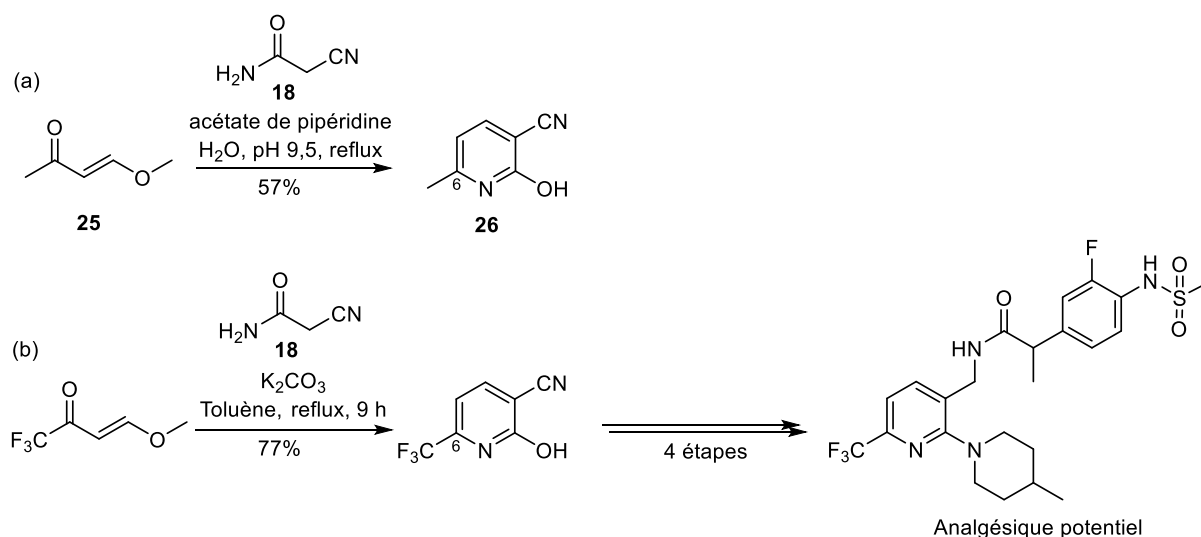


Figure II-16 : Synthèses de pyridines 6-substituées par condensation de cétones α,β -insaturées avec le cyanoacétamide en milieu basique, publiées en 2004 et 2012 par (a) Fischer *et al.*^[104] et (b) Kim *et al.*^[105]

Nous avons donc soupçonné la formation du régioisomère **26** au lieu du produit **16** attendu. La formation de **26** s'expliquerait par une réaction d'élimination de méthanol donnant le produit α,β -insaturé **25** identique à celui utilisé par Fischer,^[104] sujet à une addition de Mickael du cyanoacétamide **18** (**Figure II-17**). On obtient la 6-méthylpyridine **26** au lieu de la 4-méthylpyridine **16** souhaitée.

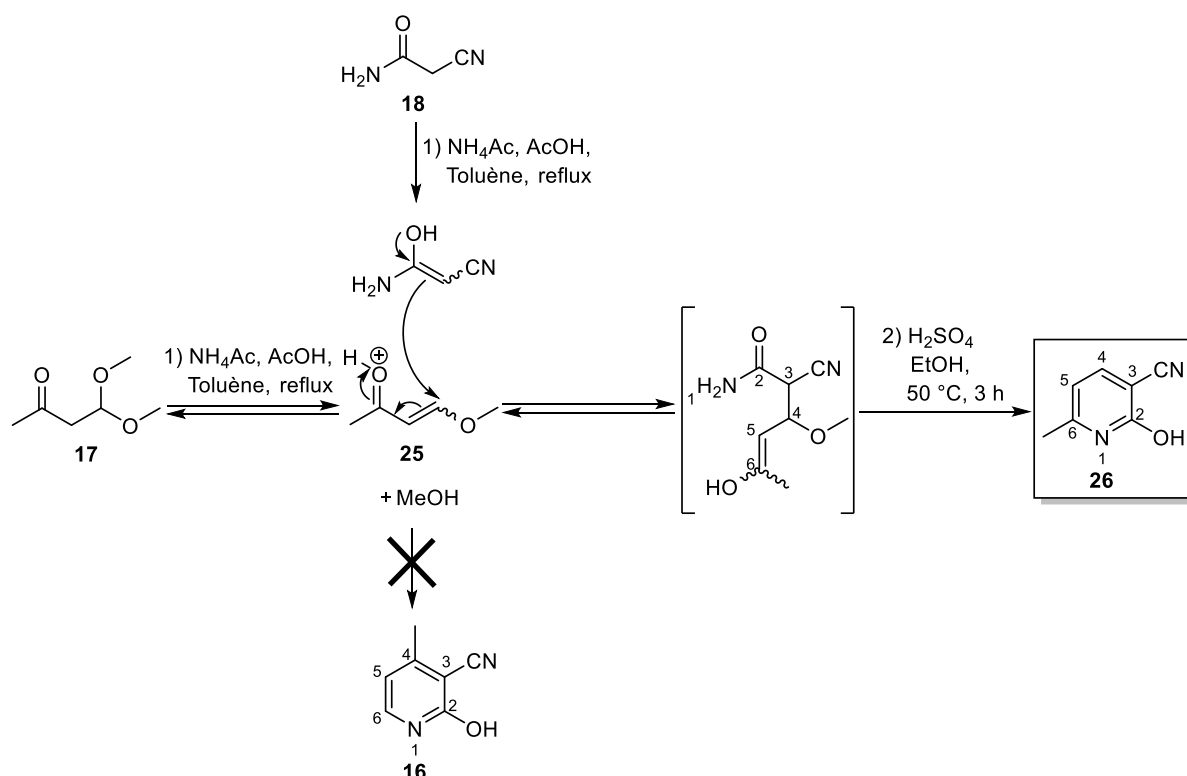


Figure II-17 : Mécanisme proposé pour l'obtention de **26**, régioisomère de la pyridine souhaitée **16**

Des analyses structurales ont été réalisées sur la pyridine obtenue afin de déterminer si nous avons obtenu le produit souhaité **16** ou bien son régioisomère **26**. Les analyses par RMN du proton et du carbone du produit que nous avons obtenu sont plus proches de celles décrites par Fischer pour le produit **26**.^[104]

Cependant, pour la pyridine souhaitée **16**, nous ne disposons pas d'autres références de RMN que celles publiées en 2011 par Ge *et al.*^[99] et en 2013 par Zhao et ses collaborateurs.^[100]

Une analyse par RMN INADEQUATE (Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfert Experiment) a donc été réalisée. Cette méthode utilise les couplages directs ^{13}C - ^{13}C et permet de reconstruire le squelette carboné d'une molécule. La RMN INADEQUATE a donc un potentiel important en termes d'analyse structurale. Toutefois, en raison de l'abondance naturelle du carbone 13 (1,108%), il faut souligner que sa sensibilité est 200 fois inférieure à celle d'une acquisition ^{13}C classique. Nous nous sommes concentrés sur le signal d'un carbone tertiaire à 148,9 ppm (**Figure II-18**). Ce signal aurait pu être attribué soit à la position 6 du produit **16**, soit à la position 4 du produit **26**. Or, nous observons une corrélation directe entre ce carbone tertiaire et le carbone portant le nitrile à 99,5 ppm. Cette corrélation est impossible dans le produit **16**. Nous avons donc tranché en faveur de la pyridine **26**.

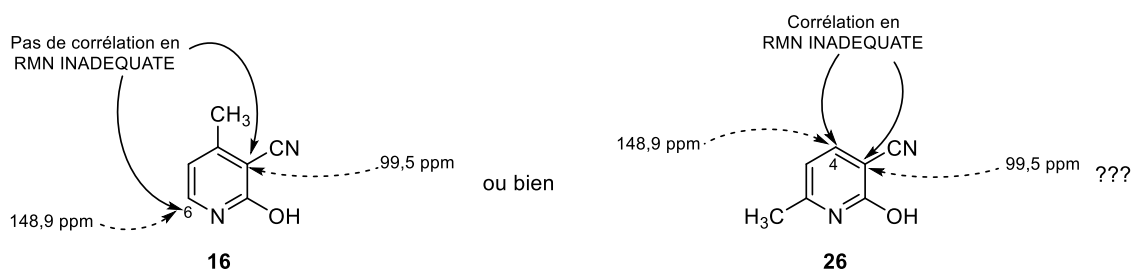


Figure II-18 : Distinction entre les produits **16** et **26** en RMN INADEQUATE

Le spectre obtenu montre bien cette corrélation et est présenté ci-dessous (**Figure II-19**)

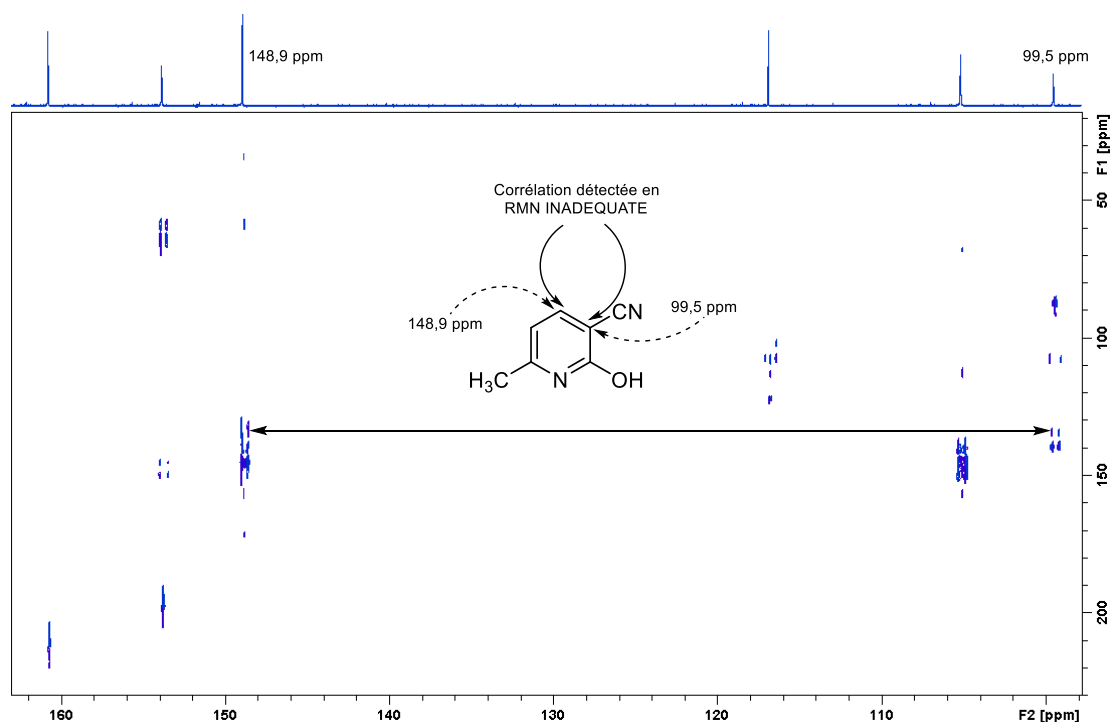


Figure II-19 : Spectre RMN INADEQUATE permettant de montrer la formation du produit **26**

Comme nous le soupçonnions, les conditions opératoires ont bien abouti au produit **26** et non à la molécule **16** souhaitée comme précurseur du CAPIC **6**.

Nous avons donc changé la méthode de préparation du CAPIC en nous inspirant de celle utilisée lors de la mise sur le marché de la Névirapine en 1996.^[97]

II.2. Synthèse du 4-(¹³C)CAPIC à partir du β-cétoester 4-(¹³C)27

Comme décrit précédemment, nous avons dans un premier temps cherché à éviter le passage par le dérivé dichloré **13** illustré dans la **figure II-6** en utilisant une méthode décrite dans la littérature et permettant d'obtenir directement la pyridine 2,3,4 substituée **16**. Malheureusement, nos essais sont restés infructueux car nous avons obtenu l'isomère de position **26** portant un groupement méthyle en position 6. Ce résultat est d'autant plus embarrassant qu'il s'agit là du groupement que nous envisageons de substituer au carbone 13.

Nous avons donc pris le parti d'ajouter deux étapes de synthèse pour l'obtention du CAPIC **6**, en préparant la molécule 2,6-dichlorée **13** en quatre étapes à partir du β-cétoester **27**. Le produit **13** a ensuite été réduit pour donner **14** et chloré régiosélectivement pour donner le CAPIC **6** (**Figure II-20**).^[95]

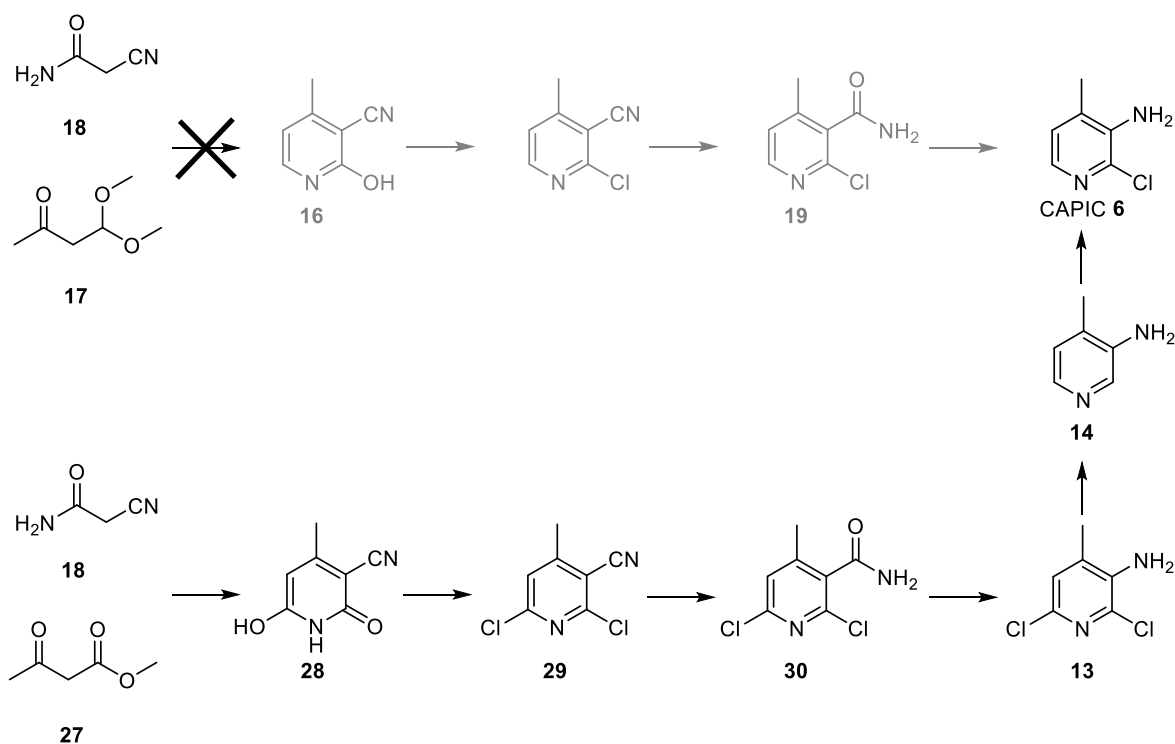


Figure II-20 : Ajout de deux étapes de synthèse pour obtenir le CAPIC en passant par un dérivé dichloré 13

II.2.a. Choix de la position de la substitution et préparation du 4-(¹³C)acétoacétate d'éthyle

L'acétoacétate d'éthyle **27** est un produit abordable et facilement accessible dans le commerce. Toutefois, il n'est pas commercialisé en série substitué au carbone 13. Notre objectif étant de préparer le 4-(¹³C)CAPIC, nous avons vérifié s'il était possible de préparer le 4-(¹³C)acétoacétate d'éthyle à partir d'un précurseur substituée au carbone 13. Nous avons pensé à plusieurs réactions classiques de chimie organique permettant de préparer des β-cétoesters : la condensation de Claisen, la réaction de Blaise, et une variante de la synthèse malonique. Les avantages et les inconvénients de chacune de ces méthodes dans le cadre de notre objectif de substitution au carbone 13 seront explicités dans les paragraphes suivants.

• La condensation de Claisen

La méthode historique de préparation des β-cétoesters tels que l'acétoacétate d'éthyle est la condensation de Claisen,^[106] qui permet de former une liaison carbone-carbone en utilisant deux esters dont l'un au moins est énolisable. Pour former l'acétoacétate d'éthyle, il faut condenser deux molécules d'acétate d'éthyle en milieu basique. Cette synthèse a été décrite dès les années 1920.^[107,108] Elle peut être mise en œuvre très simplement en chauffant par exemple à 100 °C pendant 30 minutes de l'acétate d'éthyle avec 0,7 équivalents de

tertiobutanolate de potassium, pour donner **27** avec un rendement de 75% comme l'ont décrit Yoshizawa *et al.* en 2001.^[109] Pour obtenir le 4-(¹³C)acétoacétate d'éthyle 4-(¹³C)**27** par cette méthode, il faudrait condenser une molécule de 2-(¹³C)acétate d'éthyle avec une molécule d'acétate d'éthyle non substituée au carbone 13.

Comme l'illustre la **figure II-21**, il est impossible d'éviter la condensation de molécules non substituées ou celle de deux molécules de 2-(¹³C)acétate d'éthyle. La condensation de Claisen est une méthode très intéressante mais elle est incompatible avec notre objectif de substitution au carbone 13.

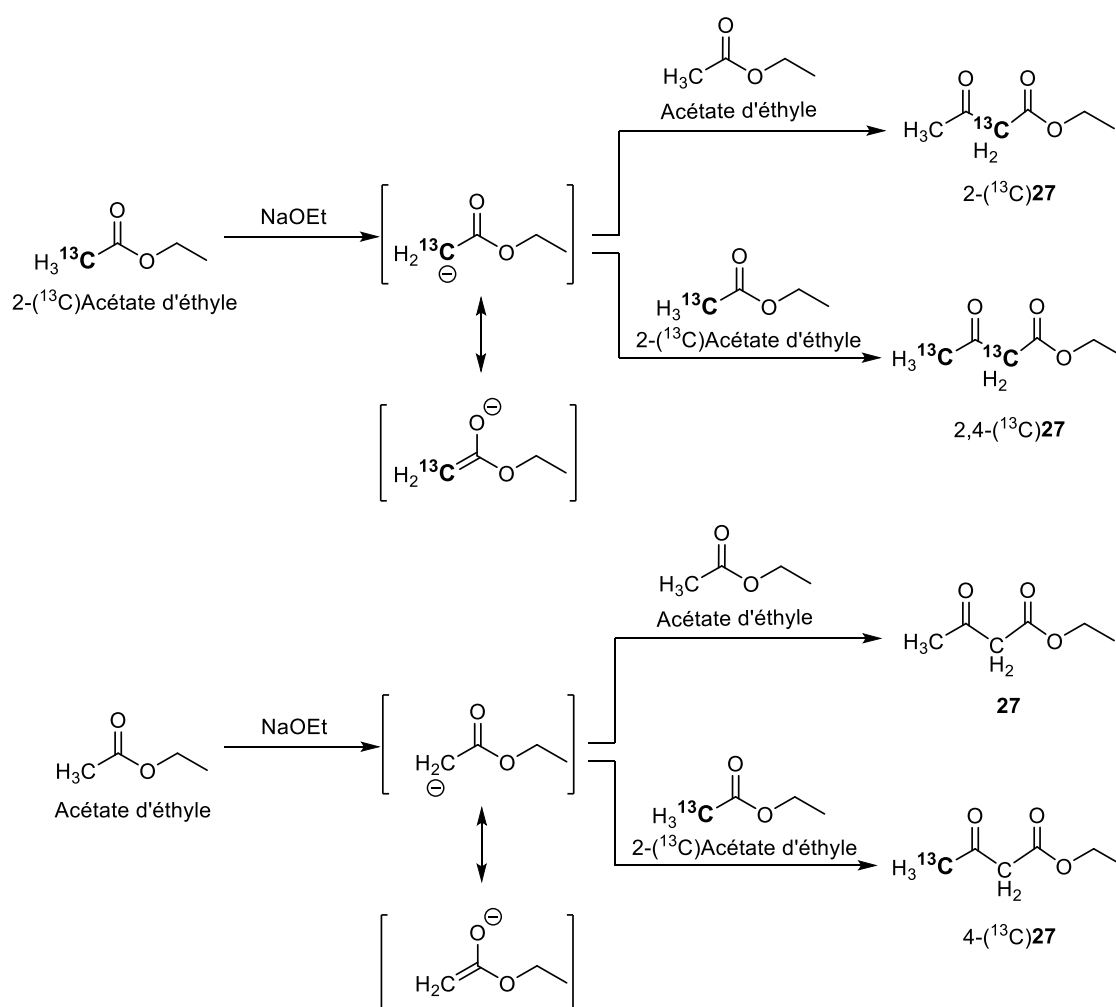


Figure II-21 : Formation de quatre produits différents substitués au carbone 13 par condensation du Claisen de l'acétate d'éthyle et du 2-(¹³C)acétate d'éthyle

• La réaction de Blaise

La réaction de Blaise est une variante de la réaction de Réformatsky. La réaction de Réformatsky donne un β -hydroxyester à partir d'un α -halogénoester et d'un aldéhyde ou d'une cétone. Dans la réaction de Blaise, l' α -halogénoester est transformé en organozincique qui s'additionne sur un nitrile pour former une imine, en équilibre avec l'énamine correspondante. Le β -cétoester est obtenu après une étape d'hydrolyse. Le mécanisme de la réaction de Blaise est explicité dans la **figure II-22**.

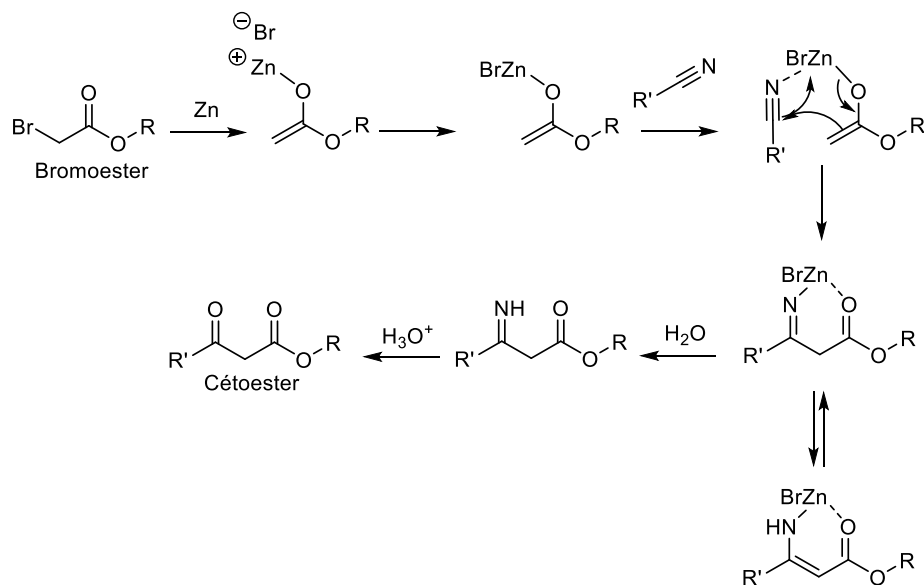


Figure II-22 : Mécanisme de la réaction de Blaise

La réaction de Blaise a été utilisée récemment pour la synthèse de nombreux β -cétoesters. En particulier, Shin et ses collaborateurs ont utilisé en 2004 une quantité catalytique d'acide methanesulfonique pour activer le zinc *in situ* et additionner des bromoesters sur huit nitriles différents. Cette catalyse leur a permis de réduire la quantité de zinc nécessaire à la préparation du *tert*-butyl (*S*)-6-chloro-5-hydroxy-3-oxohexanoate, intermédiaire clé dans la synthèse de statines.^[110] En 2009, Rao *et al.* ont publié la préparation de plusieurs méthylcétones à partir de β -cétoesters préparés par la réaction de Blaise.^[111] Ces travaux sont illustrés dans la **figure II-23**.

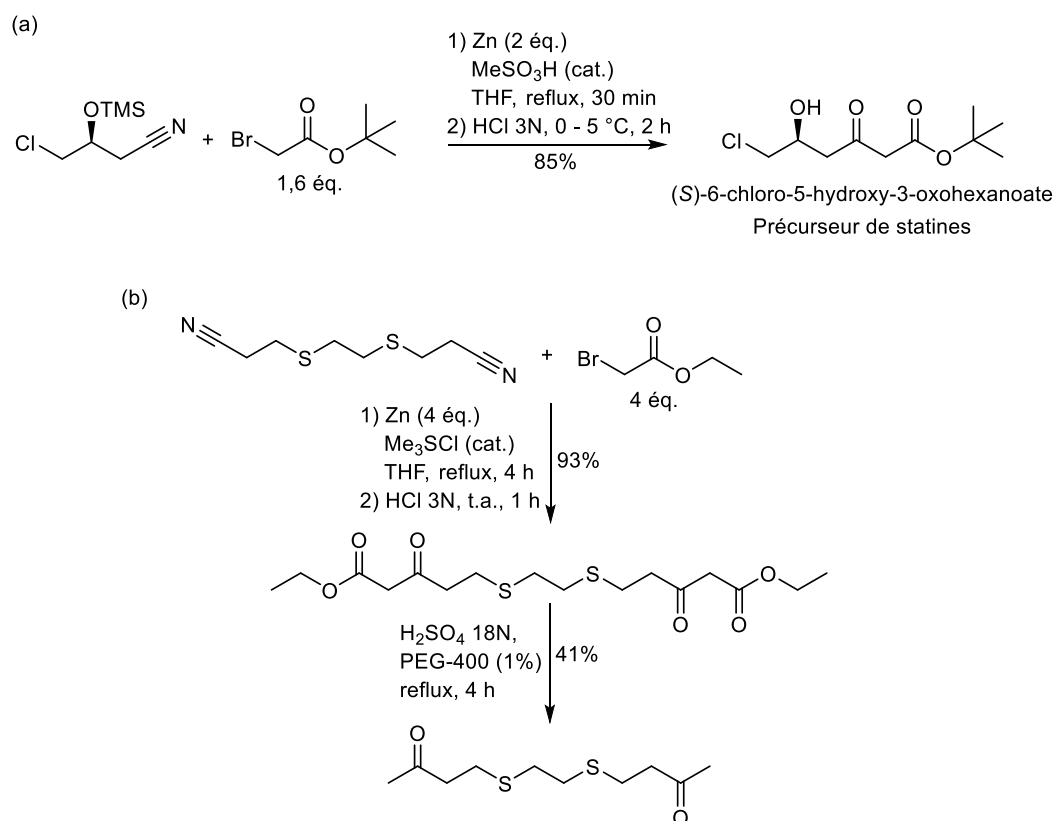


Figure II-23 : Exemples d'utilisation de la réaction de Blaise pour la préparation d'un précurseur de statine par Shin *et al.*^[110] (a) et pour la formation d'une dicétone par Rao *et al.*^[111] (b)

Pour préparer le 4-(¹³C)acétoacétate d'éthyle 4-(¹³C)**27** par la méthode de Blaise, il faudrait que nous utilisions du 2-(¹³C)acétonitrile. Or, ce réactif est plutôt coûteux (980 € pour un gramme). La synthèse de la 12-(¹³C)Névirapine nécessitant sans doute une dizaine d'étapes, et probablement l'achat de plusieurs grammes de précurseur substitué, nous avons décidé de poursuivre nos investigations afin d'introduire la substitution au carbone 13 avec un précurseur plus abordable.

• La synthèse malonique

Une autre méthode de préparation des β -cétocétiers est une variante de la synthèse malonique. Dans la version originale de la synthèse malonique, un ester malonique est mis en réaction avec un agent alkylant (par exemple un halogénure d'alkyle) en milieu basique pour donner l'ester malonique alkylé qui est ensuite décarboxylé pour former un monoester. En remplaçant l'halogénure d'alkyle par un agent acylant (par exemple un acide carboxylique activé), l'ester malonique s'additionne sur le carbonyle et donne un β -cétocétier après décarboxylation (**Figure II-24a**).^[112] Il est également possible d'acyler un dérivé monoacide d'ester malonique et d'utiliser un cation métallique comme le magnésium en tant qu'agent chélatant afin d'activer cette molécule (**Figure II-24b**).^[113]

Variantes de la synthèse malonique

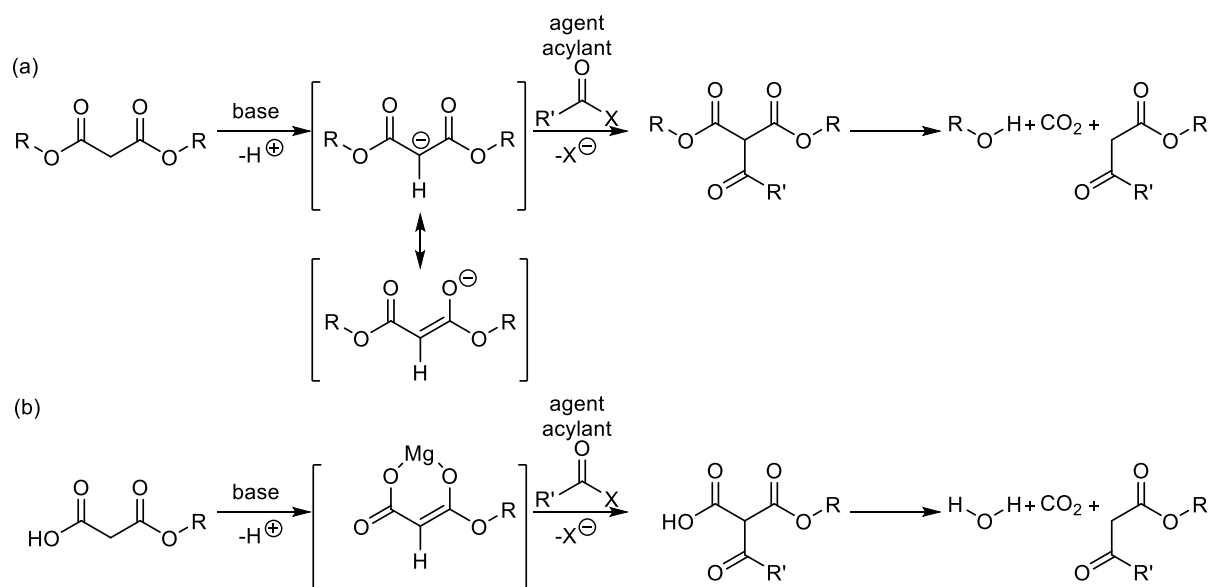


Figure II-24 : Variantes de la synthèse malonique permettant de préparer des β -cétocétiers

En ce qui concerne l'agent acylant, plusieurs types d'acides activés peuvent être utilisés comme les chlorures d'acides, les anhydrides d'acides, les acétylimidazoles,^[114] etc. Par exemple, en 1980, Matsuo et ses collaborateurs ont utilisé une variante de la synthèse malonique pour préparer des précurseurs d'acides tétramériques potentiellement antibactériens.^[115] En particulier, le chlorure de l'acide caprique a été condensé avec un monoacide d'ester malonique activé par le magnésium pour donner le décanoylacétate d'éthyle. Dans une publication plus récente, Wirtz *et al.* ont couplé des coumarines avec des β -cétocétiers dans le but de préparer des sondes fluorescentes.^[116] Afin de tester les conditions de ce couplage, les auteurs ont au préalable préparé une variété de β -cétocétiers à partir du potassium ethylmalonate et de plusieurs acides carboxyliques activés par le carbonyldiimidazole (CDI). Ces exemples sont illustrés dans la **figure II-25**.

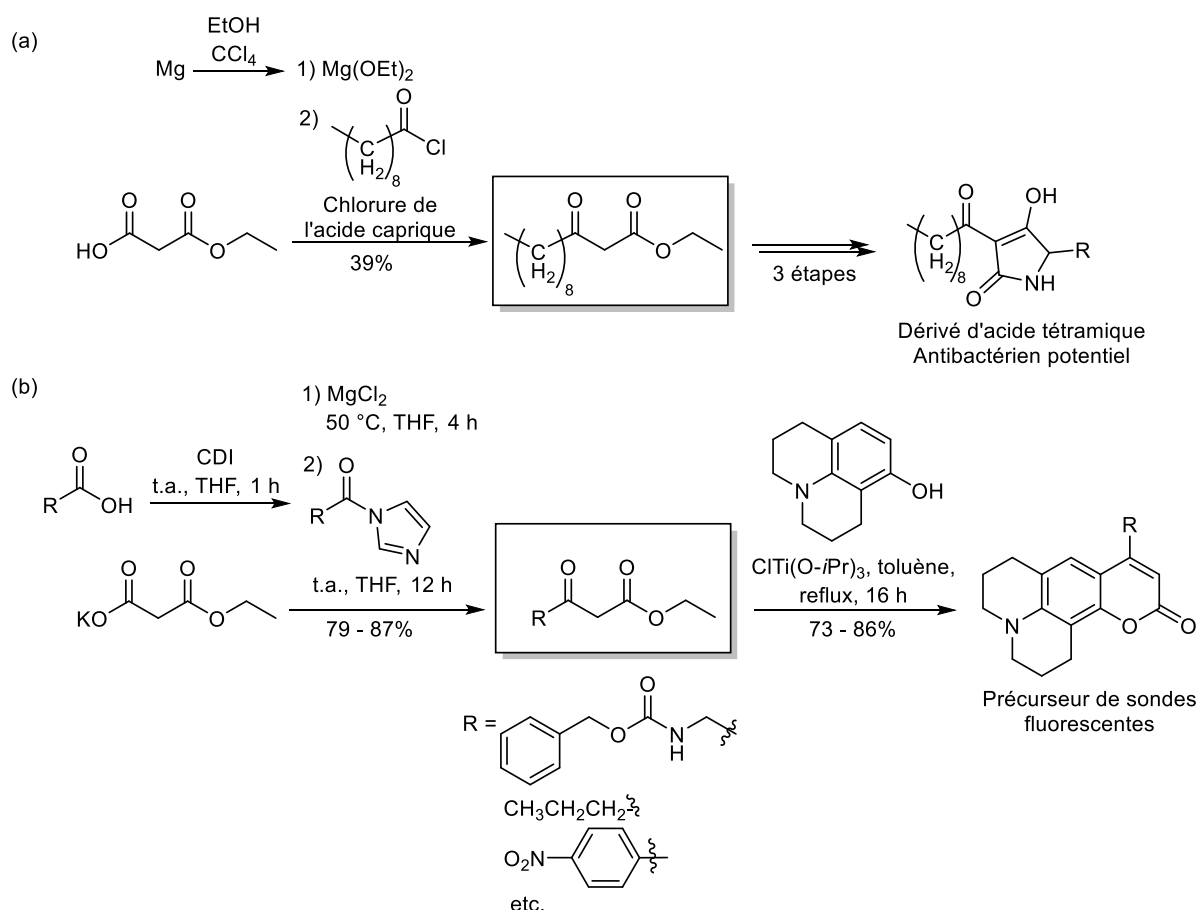
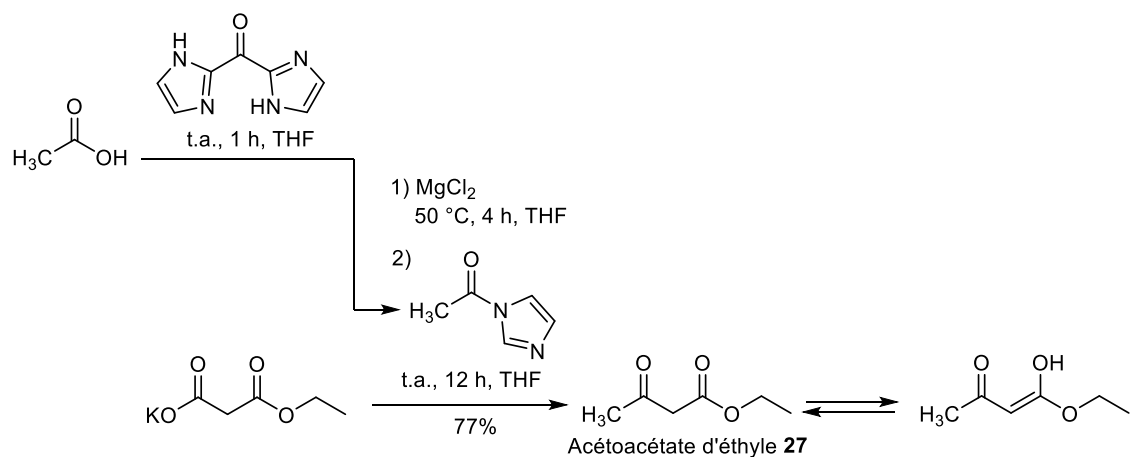


Figure II-25 : Exemples d'acylations d'un malonate par un acide carboxylique activé pour la préparation de β -cétoesters, intermédiaires de synthèse d'acides tétramiques^[115] (a) ou de sondes fluorescentes à base de coumarines^[116] (b)

Nous avons utilisé la méthode de Wirtz *et al.*^[116] pour préparer l'acétoacétate d'éthyle **27**. En effet, elle permet d'introduire la substitution au carbone 13 à partir d'acide 2-⁽¹³C)acétique, précurseur régulièrement utilisé au laboratoire et qui fait partie des moins coûteux (271,60 € pour un gramme). Les tests ont à nouveau été réalisés à partir d'acide acétique non substitué au carbone 13. L'activation de l'acide acétique par le carbonyldiimidazole (CDI) et le magnésium comme agent chélatant du malonate nous ont permis d'atteindre un rendement satisfaisant de 77%. Le produit **27** se présente sous la forme d'un mélange de deux tautomères cétone et énol dans le solvant deutéré utilisé en RMN (CDCl₃). La méthode a été reproduite à l'identique pour la préparation du produit substitué correspondant 4-⁽¹³C)**27** avec un rendement de 80% (**Figure II-26**).



Application de la méthode en série substituée

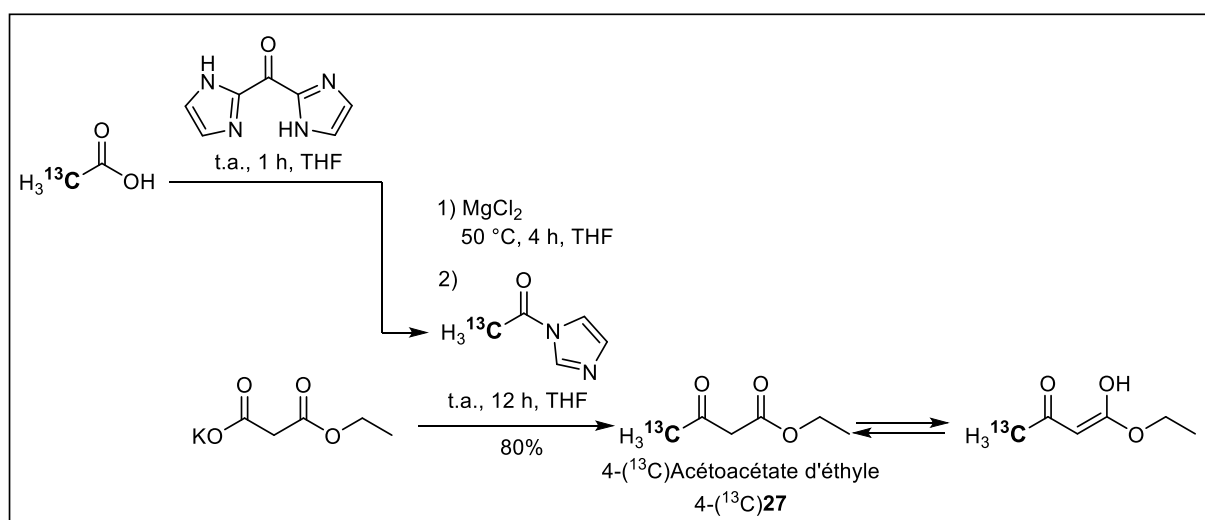


Figure II-26 : Préparation de l'acétoacétate d'éthyle **27** et de son analogue substitué $4-(^{13}\text{C})\mathbf{27}$ à partir d'acide acétique par une variante de la synthèse malonique

II.2.b. Formation de la pyridone 4-(¹³C)28 par la méthode de Guareschi-Thorpe

Les hétérocycles azotés, et plus particulièrement les dérivés de pyridines, sont présents dans de nombreux produits naturels et pharmaceutiques (**Figure II-27**).^[117]

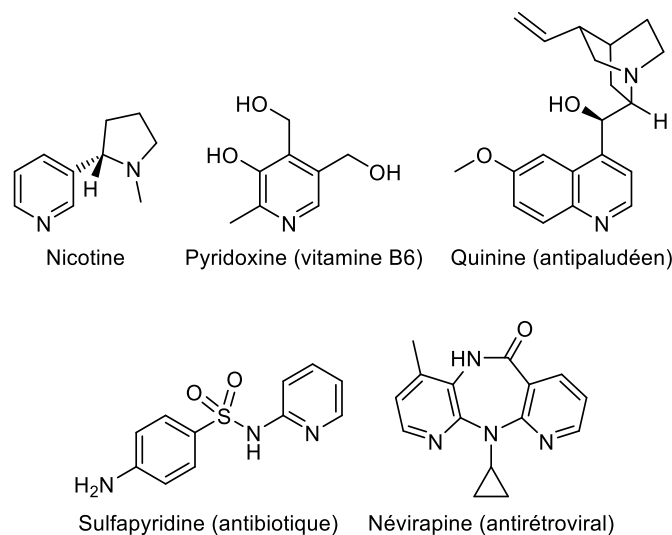


Figure II-27 : Exemples de produits actifs naturels et pharmaceutiques contenant des noyaux pyridines

Leurs méthodes de préparation ont donc été particulièrement étudiées. Il existe plusieurs manières de préparer un noyau pyridine à partir d'un β -cétoester, mais nous nous attarderons sur deux des stratégies les plus connues de construction de ces hétérocycles azotés : la synthèse de Hantzsch et la méthode de Guareschi-Thorpe.

• La synthèse de Hantzsch

La synthèse de Hantzsch est une ancienne méthode utilisée pour construire des dihydropyridines généralement symétriques à partir de deux β -cétoesters, d'un aldéhyde et d'ammoniac. Ces dihydropyridines, parfois appelées esters de Hantzsch, possèdent deux groupements électroattracteurs en positions 3 et 5.^[118]

Il est possible d'obtenir des dihydropyridines non symétriques en formant deux intermédiaires séparément (**Figure II-28**). D'un côté, l'aldéhyde réagit avec un β -cétoester pour donner un accepteur de Michael par une condensation de Knoevenagel. De l'autre, un β -cétoester différent donne une énamine par addition nucléophile d'ammoniac. Ces intermédiaires pré-formés peuvent être condensés pour aboutir à la dihydropyridine de Hantzsch. Il est important de préciser que cette méthode donne une dihydropyridine qu'il est nécessaire d'oxyder pour aromatiser l'hétérocycle.

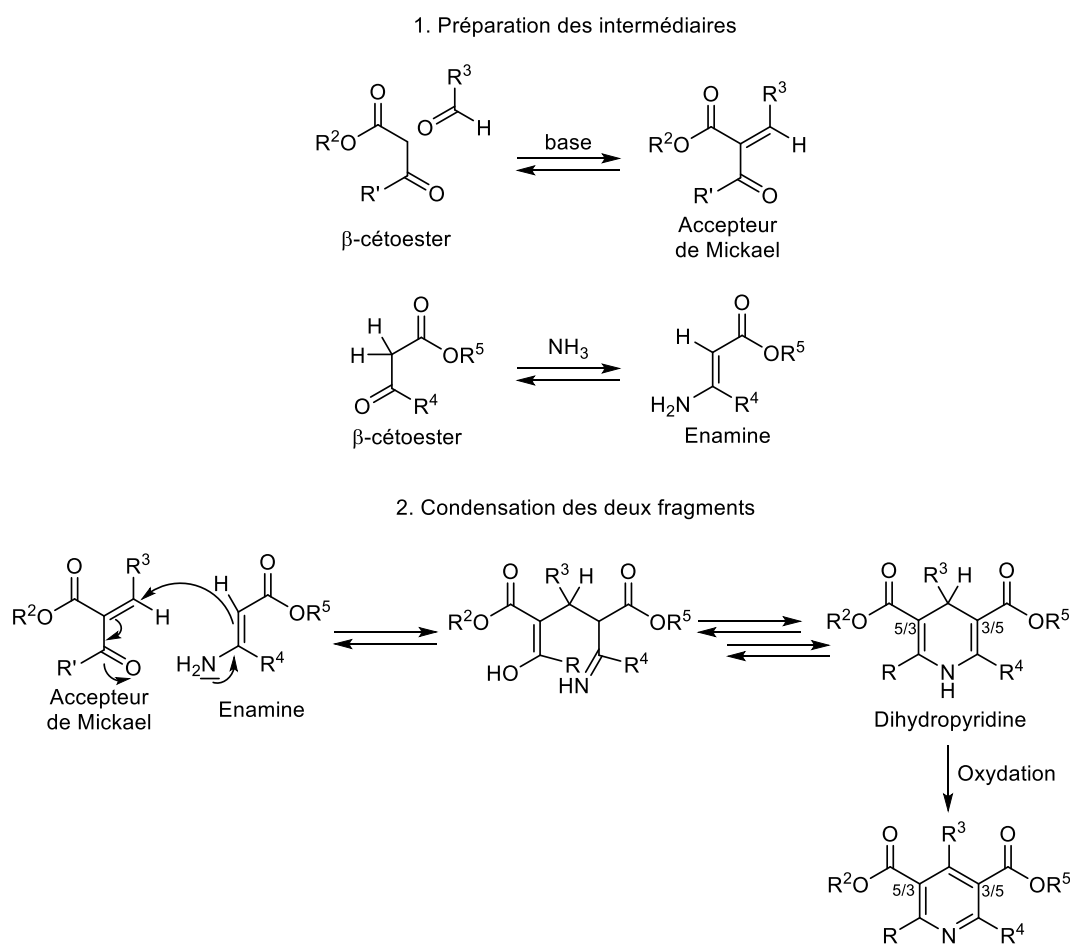


Figure II-28 : Formation d'une pyridine non symétrique par la méthode de Hantzsch

La synthèse de Hantzsch est toujours très utilisée. Elle a par exemple été employée pour la synthèse de 1,4-dihydropyridines modulatrices de canaux calciques développées pour leurs effets sur le système cardiovasculaire et leurs propriétés antihypertensives.^[119-121] Quelques structures sont proposées dans la **figure II-29**.

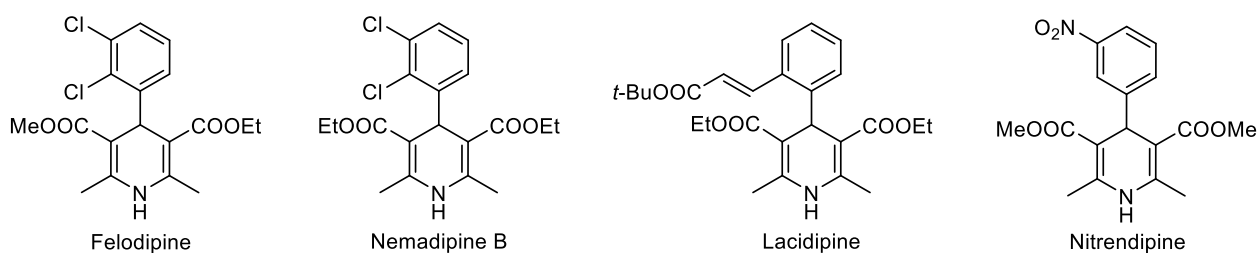


Figure II-29 : Structures de quelques dihydropyridines modulatrices des canaux calciques préparées par la synthèse de Hantzsch

Les dihydropyridines obtenues par la méthode de Hantzsch sont également très intéressantes pour leurs pouvoirs réducteurs, proches de celles d'un réducteur naturel, le NADH. Par analogie avec le NADH, les esters de Hantzsch sont capables de catalyser l'hydrogénation stéréosélective de certains substrats insaturés (carbonyles α,β -insaturés, imines, alcènes activés, etc.).^[122]

La stratégie de Hantzsch permet donc de préparer de nombreuses pyridines et dihydropyridines hautement substituées par une grande variété de groupements esters et alkyles. Notre cas est différent car nous souhaitons laisser libre la position 5 du noyau pyridine. La méthode que nous avons adoptée est connue sous le nom de synthèse de Guareschi.

• La synthèse de Guareschi

La méthode de Guareschi permet d'obtenir des pyridones. Le mécanisme de cette synthèse, parfois appelée Guareschi-Thorpe, est explicité dans la **figure II-30**. Cette méthode débute par la condensation de Knoevenagel d'un β -cétoester avec du cyanoacétamide en milieu basique avant de procéder à une cyclisation intramoléculaire qui donne une pyridine après aromatisation.

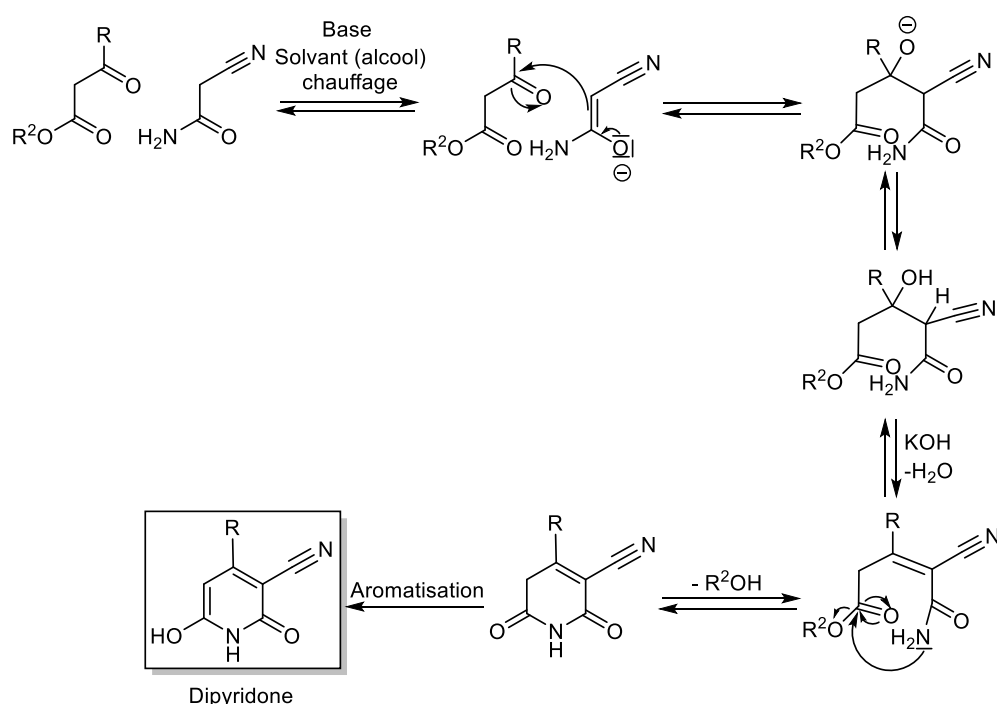


Figure II-30 : Mécanisme de la synthèse de Guareschi-Thorpe

Comme nous l'avons développé précédemment, une variante de cette synthèse avait déjà été utilisée au laboratoire pour tenter de préparer la pyridine **16**. Nous avons alors mis en réaction un β -cétacétal avec du cyanoacétamide mais nous avons obtenu un régioisomère **26**. Cette seconde tentative a abouti au produit **28** souhaité avec le groupement méthyle bien positionné et un rendement très satisfaisant de 82% en partant de l'acétoacétate d'éthyle **27** (**Figure II-31**).^[123]

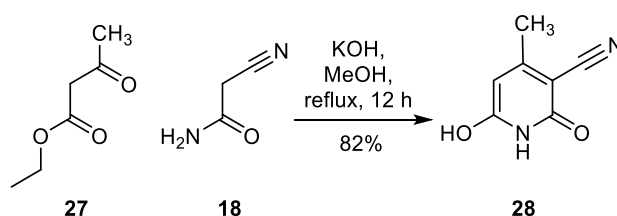


Figure II-31 : Réaction de Guareschi réalisée au laboratoire pour la préparation de la pyridone **28**

Il convient de préciser que cette réaction est encore plus efficace à grande échelle. En engageant 20 à 40 grammes d'acétoacétate d'éthyle **27**, elle donne des rendements quantitatifs qui permettent de préparer de grandes quantités de pyridone **28**.

Lors du passage en série substituée au carbone 13, nous utilisons des quantités beaucoup moins importantes. Nous avons donc essayé d'améliorer encore le rendement de 82% que nous avons obtenu sur plus petite quantité (25 mmoles d'acétoacétate d'éthyle **27**). Plusieurs conditions de réaction ont été testées sous activation micro-ondes. Leurs résultats sont résumés dans le tableau **II-2**.

Entrée	27 (éq.)	18 (éq.)	KOH (éq.)	Pipéridine (éq.)	Solvant	Température	Temps de réaction	28*
1	1	1	1,17	/	MeOH	100 °C	2 x 15 min	44%
2	1	1	1,17	/	MeOH	100 °C	1 h	15%
3	1	1	1,17	/	MeOH	100 °C	1 h 30	18%
4	1	1	1,17	/	MeOH	80 °C	2 x 15 min	49%
5	1	1	1,17	/	MeOH	80 °C	30 min puis 15 min	21%
6	1	1	1,17	/	MeOH	80 °C	30 min puis 2 x 15 min	29%
7	1	1	1,17	/	MeOH	80 °C	45 min	12%
8	1	1	/	1,02	/	80 °C	15 min	57%

Paramètres pour tous les essais sous activation micro-ondes : pression maximale 17 Bar, puissance 300 W, PowerMAX activé (système de refroidissement rapide en fin de session)

*Rendements après purification

Tableau II-2 : Formation de la pyridone **28** au micro-onde

Nous avons surtout modifié les températures ainsi que les temps de réactions. Nous nous sommes aperçus qu'à 100 °C, l'utilisation des micro-ondes génère des produits de dégradation même sur de courtes sessions de 15 minutes (**entrée 1**), faisant beaucoup chuter le rendement. La température a donc été réduite de 20 °C (**entrées 4-7**). Malheureusement, il n'a pas été possible d'éviter la dégradation des produits et les rendements sont restés très insuffisants. Nous observons que dans le méthanol à 80 °C, plusieurs courtes sessions sous micro-onde donnent un meilleur rendement qu'une session plus longue (**entrées 4-7**). Le meilleur rendement (57%) a été obtenu en remplaçant la potasse par de la pipéridine, base moins forte mais qui peut servir également de solvant (**entrée 8**), évitant ainsi l'utilisation de méthanol.^[124]

En raison des résultats insatisfaisants des essais réalisés sous activation micro-ondes, nous avons décidé de nous contenter du rendement de 82% obtenu par la méthode classique. La pyridone substituée au carbone 13 correspondante 4-(¹³C)**28** a été préparée par cette méthode avec un rendement de 66% (**Figure II-32**).

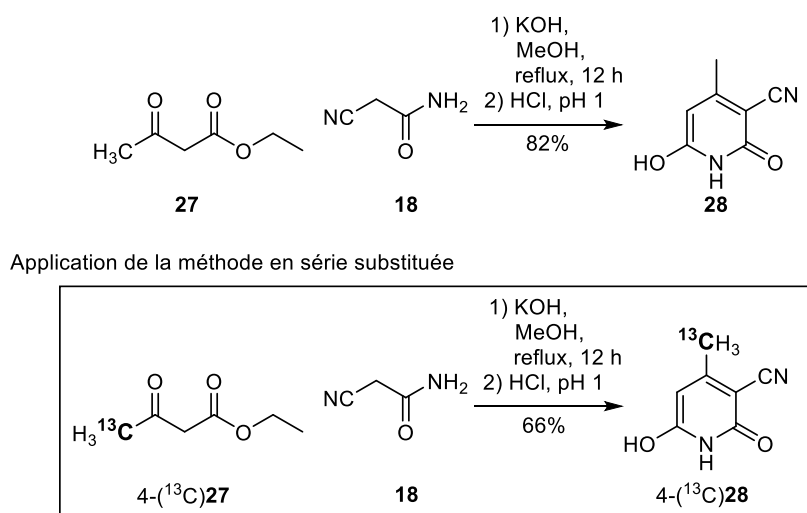


Figure II-32 : Méthode sélectionnée pour la synthèse de la pyridone 4-(¹³C)**28**

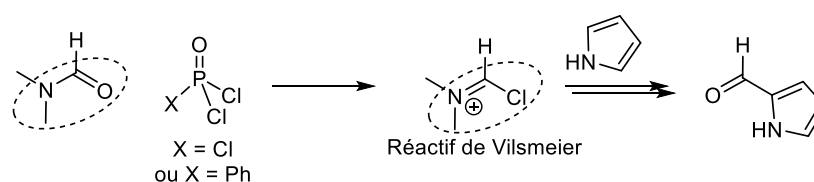
II.2.c. Halogénéation de la pyridone 4-(¹³C)**28**

Les pyridones telles que **28** sont des précurseurs très intéressants pour la formation d'halopyridines à partir desquelles il est possible de réaliser des substitutions nucléophiles aromatiques, à l'inverse du noyau pyridine «nu» peu réactif. Ainsi, il est possible de substituer une halopyridine par une grande variété de nucléophiles (amines,^[125] alcoolates,^[126] thiolates,^[127] etc.). Les halopyridines sont également très intéressantes pour former des liaisons carbone-carbone ou carbone-hétéroatome, en utilisant par exemple des réactions pallado-catalysées (couplage de Suzuki,^[128] réaction de Heck,^[129] de Stille,^[130] de Negishi,^[131] de Sonogashira,^[132] etc.).

Ces molécules sont donc d'excellents «*building blocks*» pour la synthèse de composés hétérocycliques. Dans notre cas, l'halogénéation de la pyridone **28** a été utilisée pour pouvoir réaliser plus tard une hydrogénation catalysée au palladium et ainsi «libérer» les positions 2 et 6 du noyau pyridine.

Deux agents de chloration à base de phosphore ont été utilisés : le trichlorure de phosphoryle (POCl_3)^[123] et le dichlorure de l'acide phénylphosphonique (PhPOCl_2)^[133,134]. Le mécanisme de l'halogénéation par ces réactifs est identique à celui qui permet de préparer le réactif de Vilsmeier, classiquement utilisé pour substituer des molécules aromatiques par un groupement formyle (**Figure II-33**).

Réaction de Vilsmeier-Haack



Chloration de la pyridone **28**

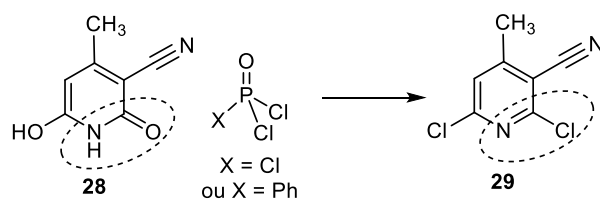
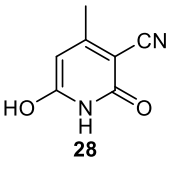
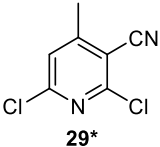


Figure II-33 : Chloration de la pyridone **28**, analogie avec la réaction de Vilsmeier-Haack

Les résultats des essais de chloration de **28** sont résumés dans le tableau II-3.

Entrée	 28 (éq.)	Agent de chloration (éq.)	Température	Temps de réaction	 29*
1	1	POCl ₃ (5,16)	90 °C	12 h	61%
2	1	POCl ₃ (10,5)	90 °C	12 h	55% - 66%
3	1	POCl ₃ (10,5)	90 °C	40 h	63%
4	1	PhPOCl ₂ (5)	180 °C	4 h	64%
5	1	PhPOCl ₂ (5)	180 °C	12 h	70 - 84%
6	1	POCl ₃ (4)	130 °C micro-ondes	1 h	69% Conversion incomplète (reste 30% de 28)
7	1	POCl ₃ (4)	130 °C micro-ondes	2 h	81%
8	1	POCl ₃ (4)	150 °C micro-ondes	1 h	55% Conversion incomplète (reste 10% de 28)
9	1	POCl ₃ (4)	150 °C micro-ondes	1 h 30	67%

Paramètres pour tous les essais sous activation micro-ondes : pression maximale 17 Bar, puissance 300 W, PowerMAX activé (système de refroidissement rapide en fin de session)

*Rendements après purification

Tableau II-3 : Résultats des essais de chloration de la pyridone **28**

L'utilisation du trichlorure de phosphoryle (POCl₃), réactif classique, ne nous a pas donné de rendements satisfaisants (**entrées 1-3**). Même en augmentant les quantités de POCl₃ (**entrées 1-2**) et le temps de réaction (**entrée 3**), nous n'avons pas réussi à obtenir un rendement de plus de 66%. De meilleurs rendements ont été obtenus grâce à l'utilisation du dichlorure de l'acide phénylphosphonique (PhPOCl₂). En raison de son point d'ébullition élevé (258 °C), il est possible de chauffer le milieu à 180 °C (**entrées 4-5**), contrairement au trichlorure de phosphoryle dont le point d'ébullition est de 106 °C. Au bout de 4 h de chauffage à 180 °C avec 5 équivalents de PhPOCl₂ (**entrée 4**), le rendement (64%) est comparable à celui obtenu au bout de 40 h de chauffage à 80 °C avec plus de 10 équivalents de POCl₃ (63%, **entrée 3**). En chauffant pendant 12 h, on peut atteindre un rendement de 84% (**entrée 5**). La réaction de chloration de **28** semble donc nécessiter une température élevée. Nous avons repris la réaction avec le trichlorure de phosphoryle au micro-ondes dans un tube fermé afin de pouvoir chauffer à 130 °C. Au bout d'1 h 30 sous activation micro-ondes à 130 °C, nous ne sommes pas parvenus à convertir complètement **28** en **29** (**entrée 6**).

Un rendement similaire à celui obtenu par l'utilisation de PhPOCl_2 (81%) est atteint au bout de 2 h à 130 °C avec 4 équivalents de POCl_3 (**entrée 7**). En chauffant plus fort toujours sous activation micro-onde (150 °C, **entrées 8-9**), un rendement maximal de 67% est obtenu au bout de 1 h 30 (**entrée 9**). L'aspect noir et « goudronneux » du milieu en fin de réaction nous laisse penser que cette chute de rendement est due à des phénomènes de dégradation.

Pour le passage en série substituée, nous avons d'abord réalisé la réaction au four à micro-ondes dans les conditions expérimentales décrites par l'**entrée 7** du **tableau II-3**. Nous avons obtenu la molécule 4- (^{13}C) **29** avec un rendement de 87%. Toutefois, en démarrant une nouvelle session de micro-ondes, nous nous sommes aperçus que le dégagement d'acide chlorhydrique soumettait l'appareil à une pression plus élevée qu'à l'accoutumée. Pour des raisons de sécurité, nous avons converti le reste de pyridone 4- (^{13}C) **28** en halopyridine 4- (^{13}C) **29** par l'utilisation de PhPOCl_2 dans les conditions décrites par l'**entrée 5** du **tableau II-3**, avec un rendement de 82% (**Figure II-34**).

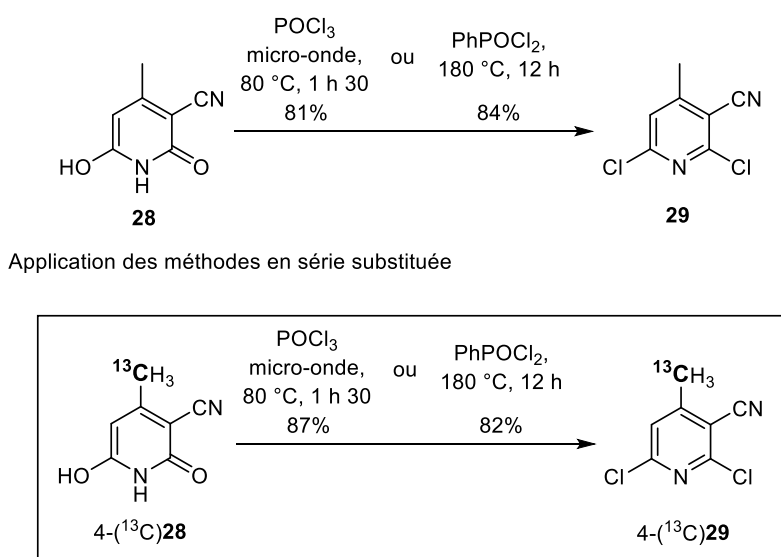
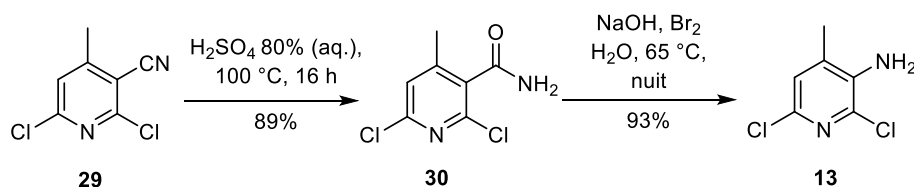


Figure II-34 : Méthodes sélectionnées pour la chloration de la pyridone 4- (^{13}C) **28** en halopyridine 4- (^{13}C) **29**

II.2.d. Transformation du substituant nitrile en amine

Après avoir chloré la pyridine **28** en positions 2 et 6 pour donner l'halopyridine **29**, nous nous sommes intéressés à la transformation du groupe nitrile en amine. Cette transformation s'effectue en deux étapes en passant par un amide **30** qui subit ensuite un réarrangement de Hofmann. L'hydrolyse du nitrile **29** en amide **30** s'effectue en chauffant **29** dans un milieu fortement acide (acide sulfurique concentré à 80%). Le rendement de cette hydrolyse s'élève à 89%. La molécule **30** a ensuite été traitée par de l'hypobromite de sodium, généré *in situ* par réaction entre du dibrome et de la soude, pour donner l'amine **13** avec un rendement de 93% après une nuit de chauffage à 65 °C (**Figure II-35**).

Ces deux étapes n'ont pas présenté de difficulté particulière. Nous nous sommes simplement aperçus qu'il ne fallait pas dépasser la température de 65 °C durant le réarrangement de Hofmann, sous peine de dégrader la molécule **13**. Les modes opératoires ont été reproduits à l'identiques pour préparer les molécules substituées 4-¹³C**30** et 4-¹³C**13** avec de bons rendements (88% et 92% respectivement).



Application de la méthode en série substituée

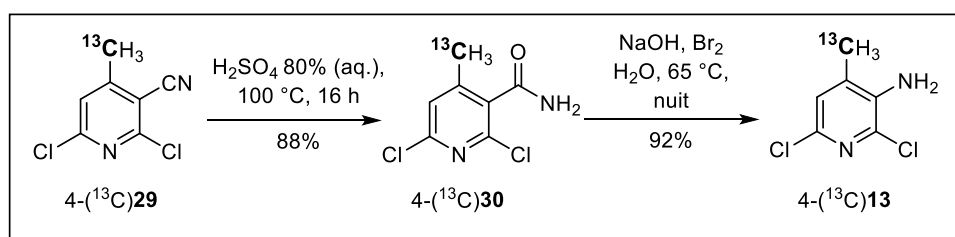


Figure II-35 : Préparation des molécules 4-¹³C**30** et 4-¹³C**13**

II.2.e. Déshalogénéation réductive complète de la pyridine dichlorée 4-¹³C**13**

Après avoir obtenu la 3-amino-2,6-dichloro-4-méthylpyridine **13**, l'étape suivante consiste à préparer le CAPIC **6**, intermédiaire clé de la synthèse de la Névirapine.

L'hydrogénation régiosélective pallado-catalysée en présence de formiate d'ammonium d'un analogue de **13** non méthylié en position 4 a été décrite en 2012 avec un rendement de 87% (Figure II-36).^[135] L'utilisation du formiate d'ammonium comme source d'hydrogène permet en effet de s'affranchir de l'utilisation de dihydrogène et avait déjà été décrite dans les années 1980 pour réduire des phénols polychlorés avec une certaine sélectivité.^[136]

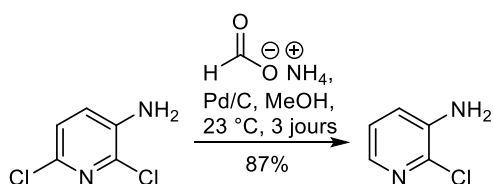


Figure II-36 : Hydrogénation régiosélective d'un analogue de **13**^[135]

Nous avons essayé de reproduire le mode opératoire publié^[135] à partir de **13** mais aucune réaction n'a été observée (**Figure II-37**).

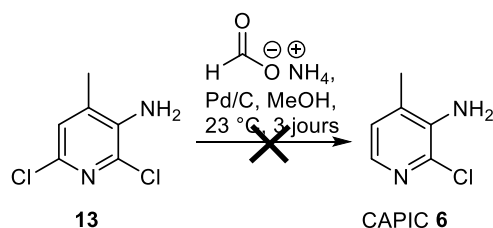


Figure II-37 : Tentative d'hydrogénation régiosélective de **13** pour la préparation du CAPIC

La molécule **13** a donc été complètement déshalogénée par l'utilisation de dihydrogène gazeux en présence de palladium sur charbon,^[97] et chlorée régiosélectivement pour donner le CAPIC **6**. Comme nous l'avons évoqué précédemment, les halopyridines telles que **13** sont d'excellents substrats pour des réactions pallado-catalysées. Un cycle catalytique de l'hydrogénation de **13** est proposé dans la **figure II-38**.^[137] Le cycle débute par l'addition oxydante de **13** sur du palladium au degré d'oxydation 0, suivie d'une coordination d'hydrogène sur le métal. La troisième étape du cycle est une β -élimination d'acide chlorhydrique. Le CAPIC **6** est ensuite formé par élimination réductrice. Il est engagé dans un second cycle catalytique composé des mêmes étapes pour donner la molécule déshalogénée **14**.

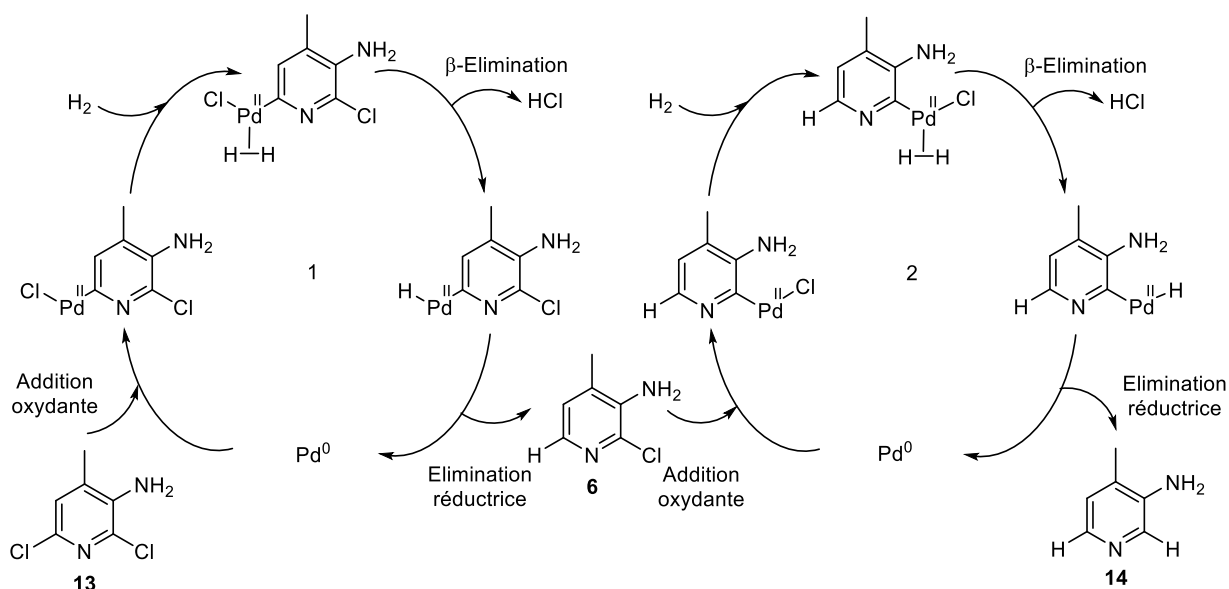


Figure II-38 : Cycle catalytique proposé pour la déshalogénéation de la pyridine **13**^[137]

L'optimisation de cette réaction n'a pas présenté de difficulté particulière. A 80 °C dans un mélange de méthanol et d'eau sous atmosphère d'hydrogène, la molécule **13** donne **14** en présence de palladium sur charbon en 24 h avec un rendement de 74%. En série substituée au carbone 13, nous avons obtenu un rendement de 96% (**Figure II-39**).

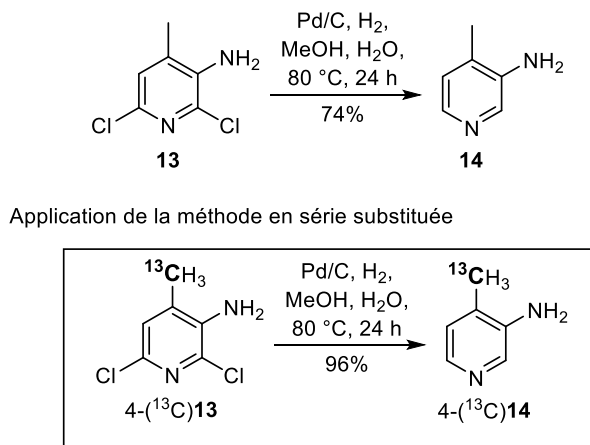


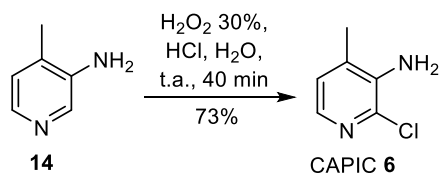
Figure II-39 : Déshalogénéation réductive de la pyridine dichlorée **13** et application de la méthode en série substituée au carbone 13

II.2.f. Préparation du CAPIC 4-(¹³C)6 par substitution électrophile aromatique régiosélective

Après être passés par la déshalogénéation complète de la molécule **13** pour obtenir la 3-amino-4-méthylpyridine **14**, nous avons dû chlorer à nouveau la position 2 de **14** de façon régiosélective pour obtenir le CAPIC **6**.

La mise en œuvre de la réaction nécessite un contrôle rigoureux de la vitesse d'addition et de la température lors de l'addition de l'électrophile afin d'éviter une seconde substitution électrophile aromatique en position 6 et le retour au produit **13**. Cette transformation a été décrite en présence de dichlore gazeux.^[95] Toutefois, afin d'avoir un meilleur contrôle de la quantité de dichlore ajouté et de la vitesse d'addition ainsi que pour des raisons de sécurité, nous avons préféré générer le dichlore *in situ* par oxydation d'acide chlorhydrique.^[97,129] La réaction a été suivie rigoureusement par chromatographie sur couche mince et a été arrêtée dès l'apparition de produit dichloré **13**. Il n'a malheureusement pas été possible de convertir complètement la 3-amino-4-méthylpyridine **14** avant de former le produit dichloré **13** correspondant. Un bon rendement (73%) a toutefois été obtenu en utilisant 1,09 équivalents de peroxyde d'hydrogène à 30% dans l'eau avec de l'acide chlorhydrique comme solvant. Le milieu réactionnel doit être agité pendant 40 minutes à température ambiante pour obtenir un mélange **6** : **14** : **13** dans des proportions **1** : **0,03** : **0,1**. Le CAPIC **6** majoritaire est ensuite facilement séparé des produits **13** et **14** par colonne chromatographique.

Ce mode opératoire a été reproduit à l'identique pour la préparation du 4-(¹³C)CAPIC avec un rendement de 71% (**Figure II-40**).



Application de la méthode en série substituée

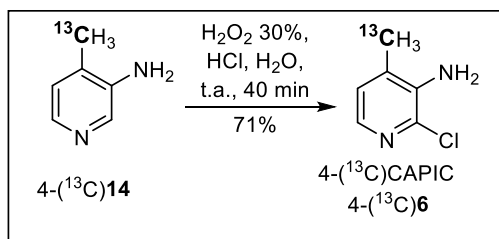


Figure II-40 : Halogénéation régiosélective de la pyridine **14** et application de la méthode en série substituée au carbone 13

II.2.g. Synthèse du 4-(¹³C)CAPIC : bilan

Le CAPIC **6**, intermédiaire clé de la synthèse de la Névirapine **1**, a été obtenu avec un rendement global de 24% en sept étapes à partir d'acide acétique. Le 4-(¹³C)CAPIC a pu être préparé à partir d'acide 2-(¹³C)acétique par application des méthodes préalablement optimisées en série non substituée avec un rendement global similaire (25%). La synthèse complète du 4-(¹³C)CAPIC est résumée dans la **figure II-41**.

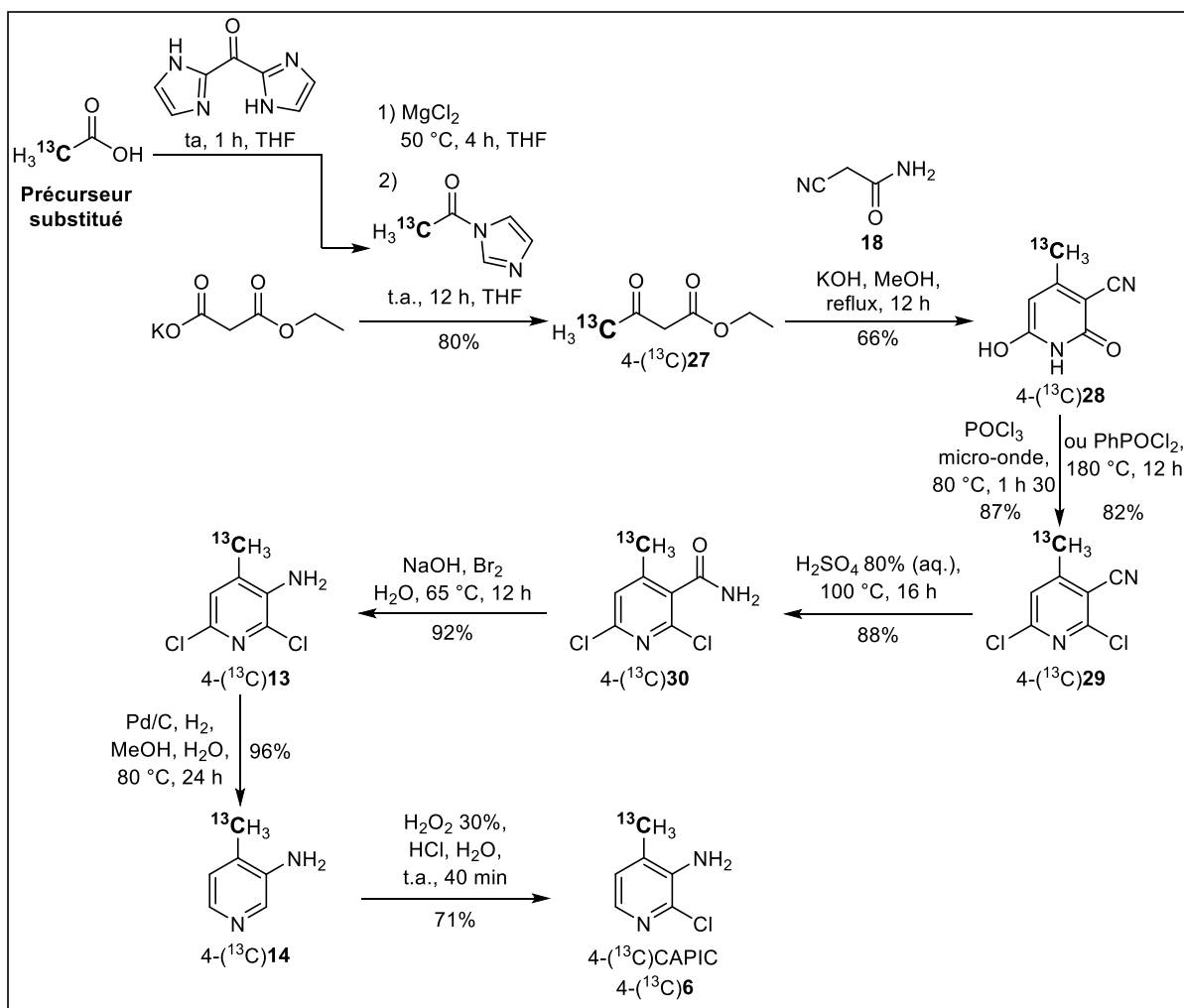


Figure II-41 : Schéma général de la préparation optimisée au laboratoire du 4-(^{13}C)CAPIC, intermédiaire clé de la synthèse de la Névirapine

A partir du CAPIC **6**, la Névirapine **1** a été préparée en trois étapes.

III. Préparation de la 12-(^{13}C)Névirapine à partir du 4-(^{13}C)CAPIC

Après avoir préparé le CAPIC **6** avec de bons rendements, nous nous sommes intéressés à la formation de la Névirapine **1**.

La littérature propose de coupler l'amine du CAPIC **6** avec le chlorure de l'acide 2-chloronicotinique puis d'ajouter la cyclopropylamine sur le produit de couplage avant de refermer le cycle diazépnone (**Figure II-42**).^[93,138–142]

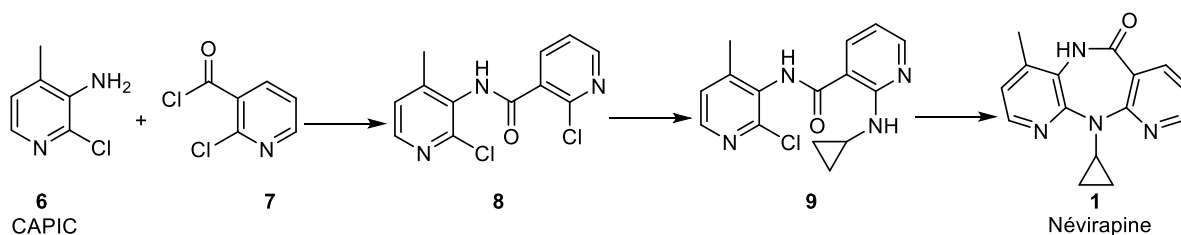


Figure II-42 : Préparation de la Névirapine **1** en trois étapes à partir du CAPIC **6**

III.1. Couplage du 4-(¹³C)CAPIC avec le chlorure d'acide **7**

Afin d'obtenir la molécule **8** contenant les deux noyaux pyridines de la Névirapine **1**, nous avons couplé l'amine du CAPIC **6** avec un chlorure d'acide **7** dérivé de l'acide nicotinique.

Le chlorure de l'acide 2-chloronicotinique **7** est disponible dans le commerce. Toutefois, nous avons préféré le synthétiser à partir de l'acide correspondant **31**, moins coûteux, afin de disposer d'une quantité suffisante pour nos essais (Figure II-43). La réaction de l'acide **31** avec un large excès de chlorure de thionyle et une quantité catalytique de diméthylformamide a donné **7** avec un rendement de 97% sans difficulté particulière à condition de travailler en milieu rigoureusement anhydre.^[143]

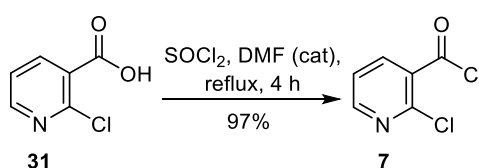


Figure II-43 : Préparation du chlorure de l'acide 2-chloronicotinique **7**^[143]

La réaction de couplage de **7** avec le CAPIC **6** a été décrite plusieurs fois dans différents types de solvants. Dans la première publication de synthèse de la Névirapine parue en 1991,^[93] les auteurs travaillent dans un mélange composé de cyclohexane, de 1,4-dioxane et de pyridine. Cette méthode a été reprise dans des brevets plus récents^[139,140] tandis qu'un brevet de 2007 propose plusieurs mélanges de solvants^[139] (mélange d'acétate d'éthyle et de toluène, toluène uniquement et mélange identique à celui de 1991). Ces efforts de recherche du solvant idéal ont confirmé nos observations depuis le début du travail de synthèse des intermédiaires menant à la Névirapine. En effet, nous nous sommes rapidement aperçus que ces pyridines présentaient des solubilités particulièrement faibles dans la plupart des solvants organiques. Cette propriété a été mise à profit pour isoler aisément les molécules des bruts réactionnels, mais les rend également difficiles à mettre en réaction.

Au laboratoire, quelques essais ont été effectués sur un analogue dichloré de **6** afin d'optimiser cette réaction. Les conditions testées seront explicitées dans la suite du manuscrit. Nous avons finalement choisi de réaliser la réaction de couplage de **6** et **7** dans l'acétonitrile^[142] avec un rendement de 83% pour le produit **8** et de 85% pour son analogue substitué 4-(¹³C)**8** (**Figure II-44**). Il est toutefois important de préciser que le milieu réactionnel a dû être agité pendant 3,5 jours à température ambiante pour une conversion complète de **6**.

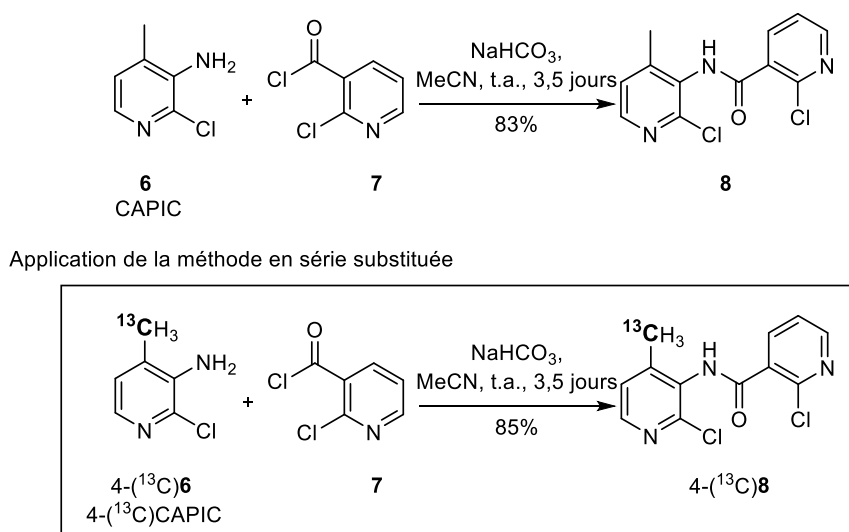


Figure II-44 : Synthèse de l'amide **8** par couplage entre l'amine du CAPIC **6** et le chlorure de l'acide 2-chloronicotinique **7**

III.2. Préparation de la molécule 4-(¹³C)**9** par substitution nucléophile aromatique régiosélective

La stabilité des intermédiaires réactionnels générés par les substitutions nucléophiles en positions 2 et 4 sur une pyridine non substituée explique la régiosélectivité de cette transformation. A cela s'ajoute le rôle crucial des effets électroniques des substituants dans le cas des pyridines substituées.

La molécule **8** est constituée de deux pyridines. Chacune possède un atome de chlore susceptible d'être substitué par la cyclopropylamine. Nous allons expliquer la régiosélectivité de la substitution nucléophile aromatique de la cyclopropylamine sur **8** en analysant les substituants présents sur chaque noyau pyridine. Ce raisonnement est explicité dans la **figure II-45**.

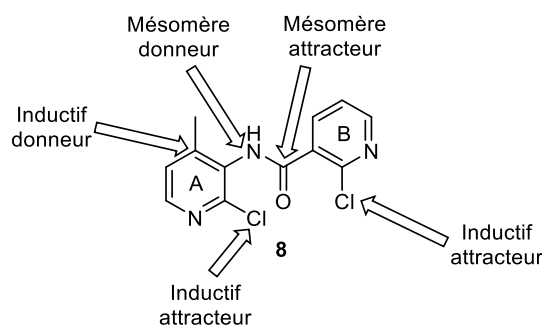


Figure II-45 : Régiosélectivité de la substitution nucléophile aromatique de la cyclopropylamine sur **8** expliquée par les effets électroniques des substituants

Le noyau A est substitué par deux groupements donneurs (inductif donneur pour le méthyle et mésomère donneur pour l'amide attaché par l'azote) qui enrichissent le cycle et défavorisent donc la réaction avec un nucléophile. Au contraire, le noyau B est substitué par un groupement mésomère attracteur (amide attaché par le carbonyle) qui appauvrit le cycle et favorise la réaction avec un nucléophile. De plus, l'intermédiaire anionique généré par la S_NAr sur le noyau B est plus stable que celui issu d'une réaction sur le noyau A. La formation de **9** est donc favorisée.

D'un point de vue pratique, cette réaction est toujours réalisée dans de la verrerie scellée ou dans un autoclave.^[93,139,144] En chauffant **8** sous pression avec un excès de cyclopropylamine pendant plusieurs jours, on obtient le produit **9** quantitativement sans aucune trace de son régioisomère ou d'un produit de double substitution. Le mode opératoire a été reproduit pour la préparation du produit substitué 4-(¹³C)**9** (**Figure II-46**). Le produit brut a été engagé sans purification dans l'étape suivante pour former la Névirapine.

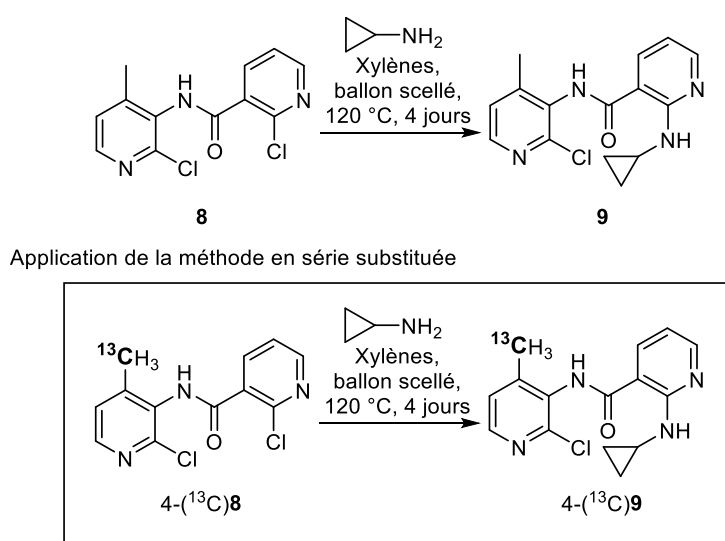


Figure II-46 : Préparation de la molécule **9** et de son analogue substitué 4-(¹³C)**9** par substitution nucléophile aromatique

III.3. Fermeture du cycle diazépino : formation de la 12-(¹³C)Névirapine

La dernière étape de synthèse de la Névirapine s'effectue en déprotonant la cyclopropylamine de **8** afin d'obtenir un amidure qui réalise une substitution nucléophile aromatique intramoléculaire sur la position chlorée de l'autre noyau pyridine.^[93] Cette réaction ne présente pas de difficulté particulière. Toutefois, nous avons été particulièrement vigilants quant à la nature et à la quantité de base utilisée. En effet, la formation inattendue d'une oxazolopyridine **32** a été décrite dans les années 1990.^[145] Récemment, en 2012, cette molécule a d'ailleurs été détectée par HPLC en faible quantité dans des échantillons de Névirapine sous forme de suspension buvable.^[146] Cette oxazolopyridine se forme par substitution nucléophile aromatique réalisée par l'azote du groupement amide au lieu de celui qui porte le cyclopropyle. Le mécanisme de formation du produit **32** est comparé à celui qui génère la Névirapine dans la **figure II-47**.

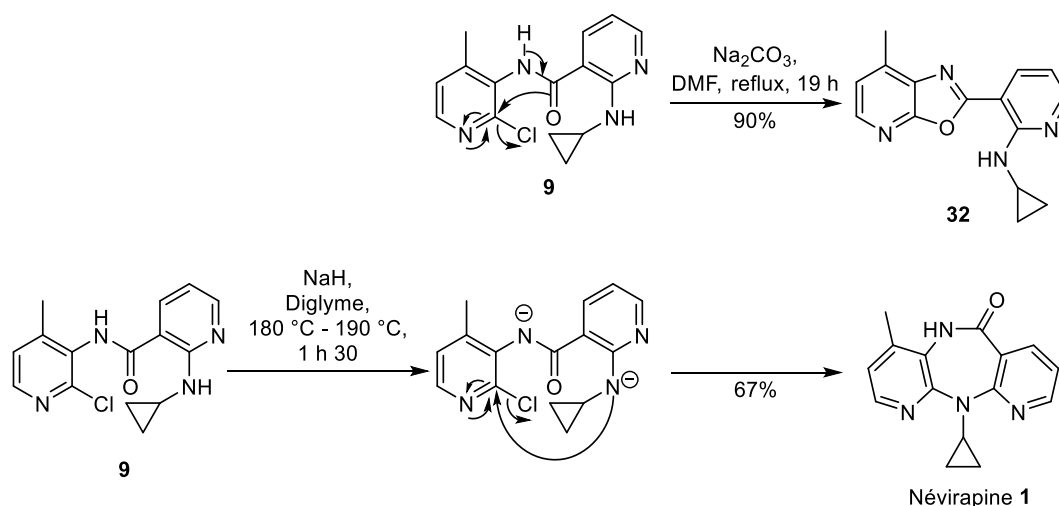
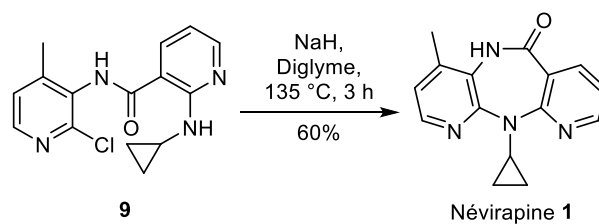


Figure II-47 : Mécanisme de formation d'un produit de cyclisation alternatif décrit dans les années 1990^[145]

La substitution nucléophile qui mène à **32** a lieu lorsque la base est faible (par exemple en utilisant du carbonate de sodium) ou que la quantité d'hydrure de sodium employée n'est pas assez élevée. L'utilisation de diméthylformamide en tant que solvant semble également favoriser la formation de **32**. Un minimum de trois équivalents de NaH dans le diglyme est nécessaire pour obtenir uniquement la Névirapine **1**. Par cette méthode, nous avons préparé la Névirapine **1** avec un rendement de 60% et la 12-(¹³C)Névirapine avec un rendement de 52% (**Figure II-48**).



Application de la méthode en série substituée

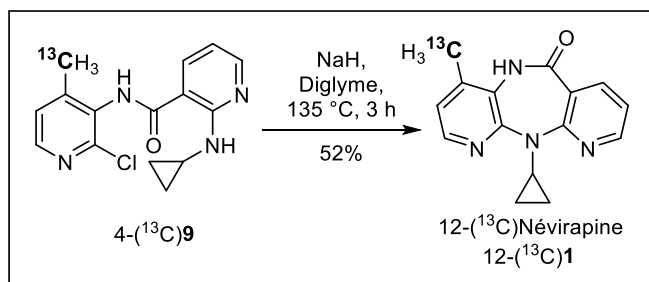


Figure II-48 : Formation de la Névirapine **1** et de son analogue substitué 12-(¹³C)Névirapine par substitution nucléophile aromatique intramoléculaire

III.4. Synthèse de la 12-(¹³C)Névirapine : bilan

Une méthode de synthèse de la Névirapine à partir d'acide acétique a été optimisée et nous a donné la Névirapine avec un rendement global de 12%. La 12-(¹³C)Névirapine a été obtenue en reproduisant cette procédure à partir de l'acide 2-(¹³C)acétique, avec un rendement global similaire de 11% et dans des quantités suffisantes pour la préparation des métabolites toxiques de la Névirapine. Un schéma bilan est proposé dans la **figure II-49**.

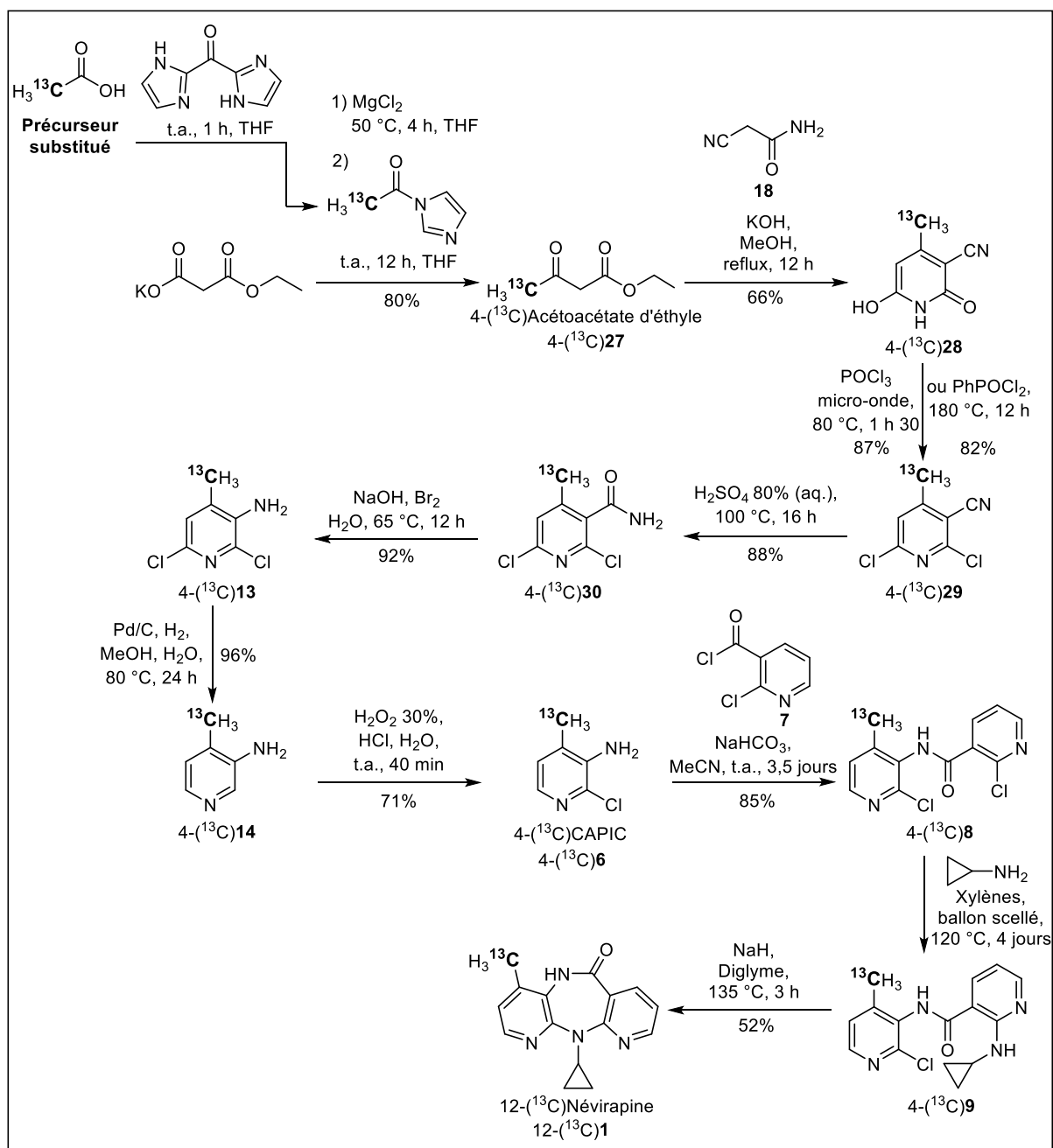


Figure II-49 : Schéma bilan de la synthèse optimisée au laboratoire de la 12-(¹³C)Névirapine en 10 étapes à partir de l'acide 2-(¹³C)acétique

IV. Préparation de la Névirapine 1 sans passage par le CAPIC 6

Le CAPIC 6 est un intermédiaire récurrent dans la littérature concernant la synthèse de la Névirapine 1. Néanmoins, certaines méthodes proposent de conserver les pyridines 2,6-dichlorées jusqu'à la fin de la synthèse et d'hydrogéner la 2-chloro-Névirapine 33 pour obtenir la Névirapine 1 (Figure II-50).^[95,96,142]

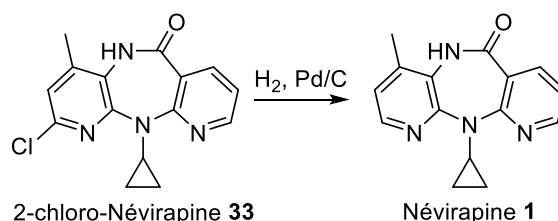


Figure II-50 : Préparation de la Névirapine par hydrogénation catalytique de la 2-chloro-Névirapine 33

Cela permet de supprimer les étapes de transformation de 13 en 14 et de 14 en 6. De plus, la 2-chloro-Névirapine 33 pourrait être utile à la synthèse d'un autre métabolite de la Névirapine, la 2-hydroxy-Névirapine.^[147] Parallèlement à l'optimisation de la synthèse de la Névirapine passant par le CAPIC 6, nous avons travaillé à la préparation et à l'hydrogénation pallado-catalysée de la 2-chloro-Névirapine 33.

IV.1. Couplage de la pyridine 13 avec le chlorure d'acide 7

La synthèse de la 2-chloro-Névirapine diffère de la méthode exposée précédemment à partir du couplage avec le chlorure de l'acide chloronicotinique 7. En effet, au lieu d'hydrogéner la 3-amino-2,6-dichloro-4-méthylpyridine 13 avant de la chlorer régiosélectivement en 6 par substitution électrophile aromatique, 13 a été directement couplée avec le chlorure d'acide 7 pour donner 34 (Figure II-51).

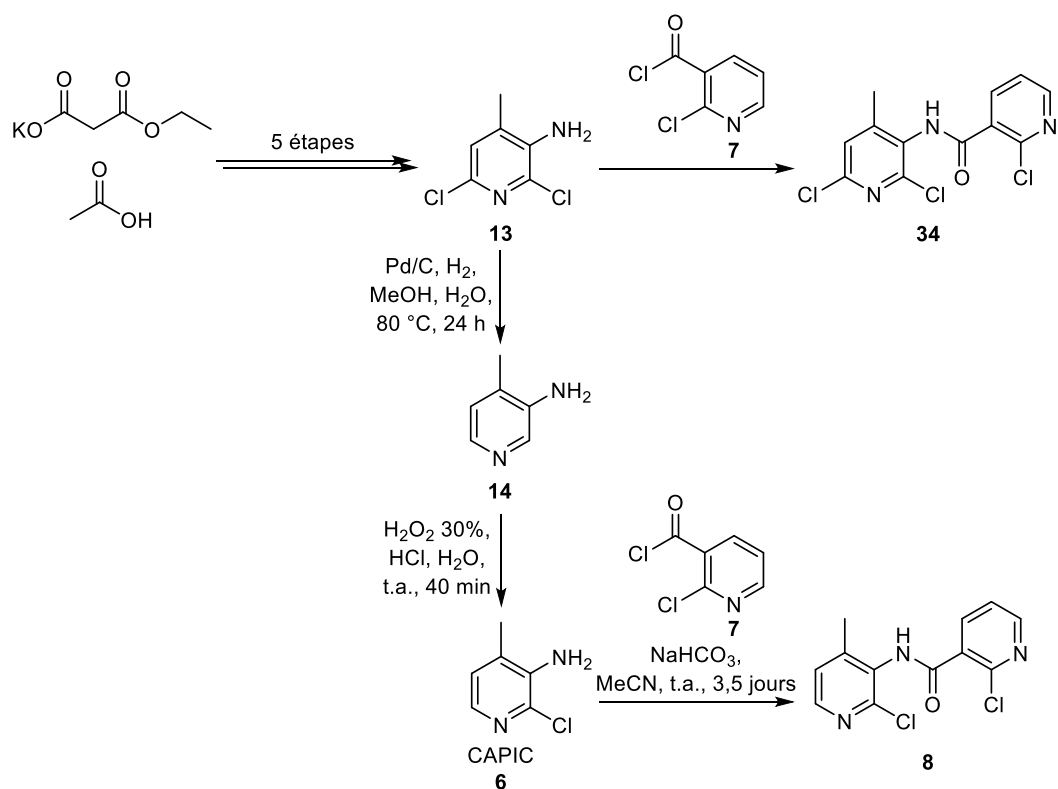


Figure II-51 : Préparation de **34**, précurseur de la 2-chloro-Névirapine **33**, comparée à la synthèse de **8**

La préparation de **34** nous a permis de mettre au point les conditions de la réaction de couplage. Comme nous l'avons vu précédemment, plusieurs solvants sont proposés dans la littérature. Un mélange composé de cyclohexane, de 1,4-dioxane et de pyridine^[93,139,140] est fréquemment utilisé. Un brevet de 2007 propose également plusieurs mélanges de solvants^[139] (acétate d'éthyle et toluène, toluène uniquement). Les essais qui nous ont menés à sélectionner l'acétonitrile sont résumés dans le **tableau II-4**.

Entrée	Solvant pour 7	Solubilité de 7	Solvant pour 13	Base	Temps de réaction	34
1	Toluène	Insoluble	Toluène	Pyridine	30 min	45% ^a
2	Toluène + 1,4-dioxane	Faible	Toluène	Pyridine	1 h 30	28% ^a
3	Toluène + 1,4-dioxane	Faible	Toluène	Pyridine	12 h	25% ^a
4	Toluène + 1,4-dioxane	Faible	Toluène	Pyridine	27 h	56% ^a
5	Acétonitrile	Moyenne	Acétonitrile	NaHCO ₃	3,5 jours	96% ^b

^a : Conversions de 30 en 35 calculé à partir des analyses RMN des bruts réactionnels

^b : Rendements après purification

Tableau II-4 : Essais de couplages de la molécule **13** avec le chlorure d'acide **7**

Dans un premier temps, nous avons utilisé du toluène pour la molécule **13** ainsi que pour le chlorure d'acide **7** avant d'ajouter la suspension de **7** à la solution de **13**. En respectant les concentrations publiées^[95] nous n'avons pas réussi à solubiliser le chlorure d'acide convenablement. Cela explique probablement le mauvais résultat obtenu dans ces conditions (**entrée 1**). En ajoutant du 1,4-dioxane, la solubilité est meilleure (**entrées 2-4**) mais nous ne sommes pas parvenus à obtenir une conversion supérieure à 56% (**entrée 4**). A cela s'ajoute de nombreuses difficultés pour isoler le produit. L'utilisation d'acétonitrile pour solubiliser chacun des réactifs a fortement amélioré les résultats de ce couplage puisqu'un rendement de 96% a pu être obtenu (**entrée 5**). De plus, la séparation de **34** du reste du milieu réactionnel s'effectue très simplement en ajoutant de l'eau en fin de réaction afin de faire précipiter **34** tout en solubilisant les autres constituants du milieu (**Figure II-52**). Ces essais nous ont également servi à mettre en place les conditions de préparation de **8** et de son analogue substitué au carbone 13 (**Figure II-44**).

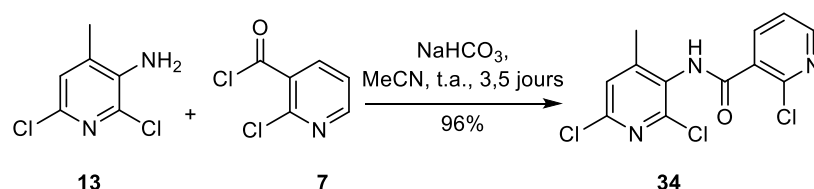


Figure II-52 : Préparation de **34**

IV.2. Préparation de la molécule **35** par substitution nucléophile aromatique régiosélective

Après avoir préparé le produit **34** avec un excellent rendement, nous avons essayé de réaliser une substitution nucléophile aromatique régiosélective de la cyclopropylamine sur le noyau pyridine B afin d'obtenir le produit **35** (**Figure II-53**).

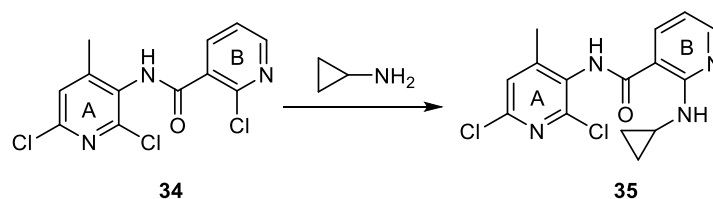


Figure II-53 : Substitution nucléophile aromatique régiosélective de la cyclopropylamine sur la molécule **34**

Comme décrit précédemment, la molécule **8** donne **9** par substitution nucléophile aromatique de la cyclopropylamine exclusivement sur le noyau B. Le produit **34** possède quant à lui une position chlorée supplémentaire sur le noyau A susceptible de réagir avec la cyclopropylamine. La réactivité de **34** est explicitée dans la **figure II-54** par un raisonnement similaire à celui expliquant la régiosélectivité lors de la préparation de **9** (**Figure II-45**).

Pour commencer, il est important d'analyser les groupements présents sur chacune des pyridines de **34**. Le noyau A présente deux groupements donneurs (inductif donneur pour le méthyle et mésomère donneur pour l'amide attaché par l'azote), enrichissant le cycle en électrons et défavorisant la réaction avec un nucléophile. La présence de deux atomes de chlore inductifs attracteurs pourrait toutefois apporter une légère compensation à cela. Le noyau B est substitué par un groupement mésomère attracteur (amide attaché par le carbonyle) et un par un chlore inductif attracteur, appauvrissant le cycle et favorisant la réaction avec un nucléophile. Comme précédemment, l'intermédiaire anionique généré par la S_NAr sur le noyau B est plus stable et nous nous attendons à former le produit **35**.

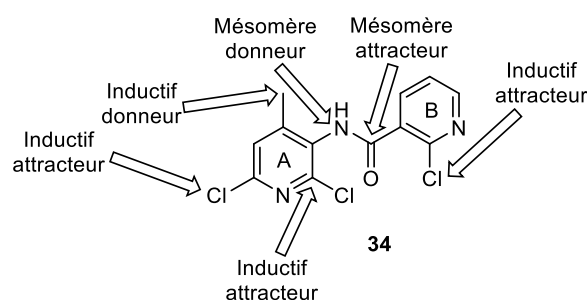


Figure II-54 : Régiosélectivité de la substitution nucléophile aromatique de cyclopropylamine sur **34** expliquée par les effets électroniques des substituants

Cependant, en faisant réagir **34** avec 4 équivalents de cyclopropylamine dans le xylène à 110 °C dans un tube scellé comme cela a été décrit dans la littérature, nous avons constaté qu'il était difficile de le consommer entièrement. De plus, un produit inattendu **36** a été obtenu. Une analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse a confirmé que ce produit **36** était issu de deux substitutions nucléophiles aromatiques de la cyclopropylamine sur **34**. Nous avons identifié par RMN le produit **36** illustré dans la **figure II-55**. En effet, comme nous l'avons mentionné précédemment, la présence de deux atomes de chlore inductifs attracteurs sur le noyau A pourrait avoir pour effet d'activer cette pyridine vis-à-vis d'un nucléophile.

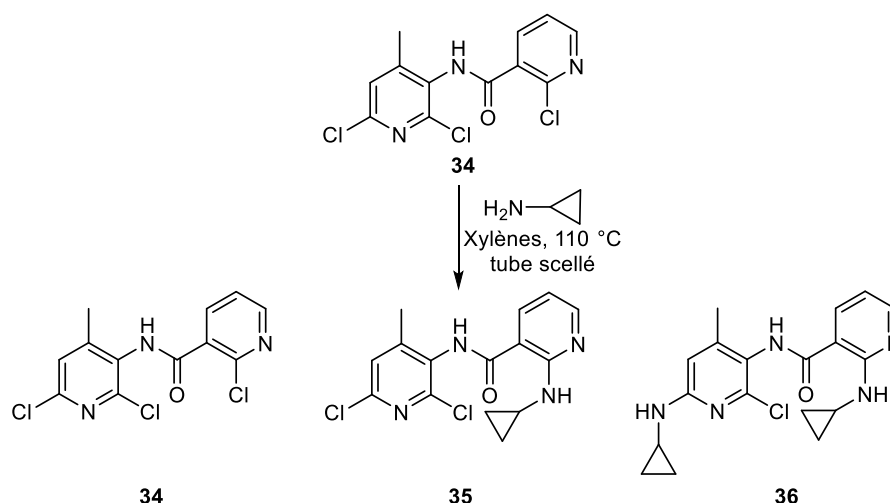


Figure II-55 : Mélange obtenu par substitution nucléophile de la cyclopropylamine sur **34**

Il n'a malheureusement pas été possible de séparer **34**, **35** et **36**. Le mode opératoire a donc été modifié pour transformer le maximum de **34** en **35** en formant le minimum de produit secondaire **36**. Les conditions testées ainsi que les compositions des mélanges obtenus calculées par RMN sont résumées dans le **tableau II-5**.

Entrée	34 (éq.)	CPA* (éq.)	Solvant	Matériel	Température	Temps de réaction	Composition du mélange (%)		
							34	35	36
1	1	4	Xylène	Tube scellé	110 °C	24 h	18	73	9
2	1	4	Xylène	Tube scellé	110 °C	36 h	14	74	12
3	1	4	Xylène	Tube scellé	120 °C	24 h	17	75	8
4	1	4	Xylène	Ballon scellé	110 °C	24 h	19	74	7
5	1	4	Xylène	Micro-ondes	100 °C	30 min + 30 min + 2 h	83	17	0
6	1	4	Xylène	Micro-ondes	110 °C	5 h	50	50	0
7	1	4	Xylène	Micro-ondes	110 °C	10 h	8	78	14
8	1	4	Xylène	Micro-ondes	110 °C	10 h + 10 h	0	78	22

*CPA = cyclopropylamine

Tableau II-5 : Conditions opératoires testées pour optimiser la formation du produit **35**

Dans tous les cas, nous avons utilisé 4 équivalents de cyclopropylamine comme cela a été décrit dans la littérature. Les résultats obtenus à l'issue des réactions dans un tube scellé sont similaires à 110 °C (**entrées 1 et 2**) ou 120 °C (**entrée 3**), même en agitant 36 h (**entrée 2**) au lieu de 24 h (**entrées 1 et 3**). Il semble que l'allongement de la durée de réaction contribue à la formation du produit secondaire **36** et que l'augmentation de température favorise la formation du produit souhaité. Néanmoins, les compositions des mélanges dans

les conditions décrites dans les **entrées 1 à 3** restent très similaires et il est difficile de conclure quant à l'influence de la température et de la durée de réaction sur la formation du produit secondaire **36**. Afin de vérifier si les difficultés rencontrées pour consommer **34** n'étaient pas dues à un problème d'agitation au fond du tube scellé, nous nous sommes procurés un ballon scellé (**entrée 4**) et avons réalisé la réaction dans les mêmes conditions que pour l'**entrée 1**, avec des résultats similaires. Les effets de l'activation micro-ondes ont ensuite été mis à profit pour essayer de consommer totalement **34** (**entrée 5 - 8**). De courtes sessions à 100 °C sont très insuffisantes pour consommer **34** (**entrée 5**). Il semble que 5 h de réaction à 110 °C soient nécessaires pour convertir la moitié du produit **34** en **35**. Cette durée est considérable pour une manipulation au micro-onde. Pour aller plus loin, nous avons tenté de doubler ce temps de réaction. Le mélange ne contient plus que 8% de produit de départ **34** mais la proportion de produit secondaire atteint 14% (**entrée 7**). Pour consommer complètement **34**, nous avons dû réaliser deux sessions successives de 10 h au micro-onde (**entrée 8**). La proportion de produit souhaité **35** est identique à celle obtenue avec une seule session mais le pourcentage de produit secondaire augmente considérablement (22%). Finalement, il semble que l'utilisation de l'activation micro-ondes ne présente aucun intérêt pour la préparation de **35**. Nous avons donc choisi d'utiliser un ballon scellé dans les conditions de l'entrée **4** afin de pouvoir préparer de plus grandes quantités de produit avec une agitation convenable (**Figure II-56**).

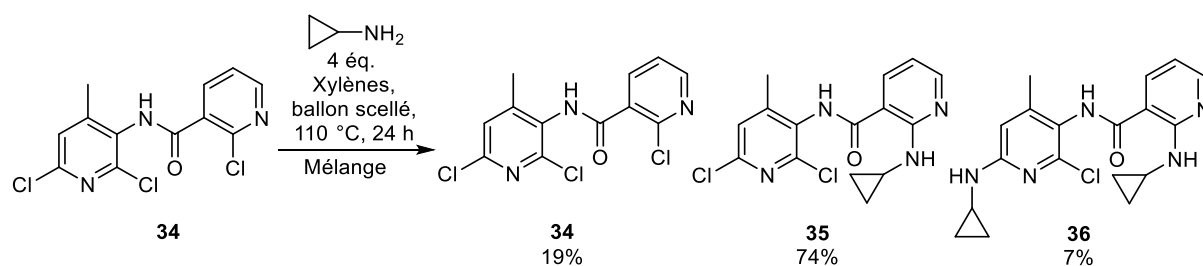


Figure II-56 : Conditions opératoires choisies pour la préparation de **35**

Comme nous l'avons décrit précédemment, la même réaction à partir de **8** ne présente aucune difficulté et donne **9** quantitativement sans produit secondaire (**Figure II-46**). Il est d'ailleurs possible d'agiter le milieu réactionnel pendant 4 jours et d'ajouter plus de cyclopropylamine. Les difficultés rencontrées pour la préparation de **35** expliquent en partie notre décision de passer par le 4-¹³C)CAPIC pour la préparation de la Névirapine substituée au carbone 13.

Même si le passage par **34** n'a pas été sélectionné pour la préparation de la 12-¹³C)Névirapine, les essais ont été poursuivis afin de vérifier si cette voie de synthèse alternative pouvait mener à la Névirapine.

IV.3. Fermeture du cycle diazépino : formation de la 2-chloro-Névirapine et hydrogénation catalytique en Névirapine

Les molécules **34**, **35** et **36** n'ont pas pu être séparées par colonne chromatographique. Le mélange a donc été engagé dans l'étape de fermeture du cycle diazépino en milieu fortement basique afin de former la 2-chloro-Névirapine **33**. Le mode opératoire mis au point précédemment pour former la Névirapine **1** à partir de la molécule **9** a été reproduit à l'identique. Toutefois la réaction fonctionne beaucoup moins bien puisqu'un rendement décevant de 39% a été obtenu, alors qu'on peut atteindre 60% de rendement pour la Névirapine (**Figure II-57**). Ce mauvais rendement s'explique en partie par l'utilisation d'un mélange contenant **34**, **35** et **36**, rendant la purification de la 2-chloro-Névirapine plus délicate. Ce résultat a conforté notre choix de passer par une voie de synthèse différente pour le passage en série substituée au carbone 13.

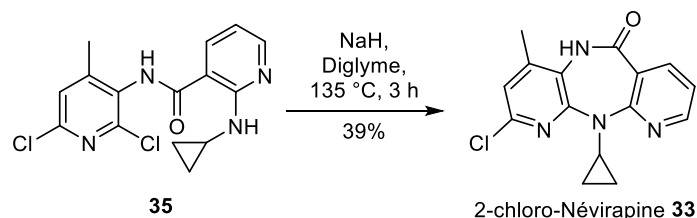


Figure II-57 : Préparation de la 2-chloro-Névirapine

Pour finir, la 2-chloro-Névirapine a été mise en réaction dans du diglyme avec du palladium sur charbon actif sous atmosphère d'hydrogène (1,2 bar) pendant 18 h à 100 °C. Ces conditions n'ont pas suffi à hydrogéner la totalité de la 2-chloro-Névirapine en Névirapine. La pression a été augmentée à 3,5 bar sans amélioration.

Nous avons modifié la procédure d'hydrogénation de la 2-chloro-Névirapine **33** en nous inspirant d'une méthode publiée en 2014^[148] permettant de réaliser cette réaction au micro-onde sans dihydrogène gazeux mais en utilisant de l'hydrazine, qui se décompose en présence des certains métaux de transition en diazote et dihydrogène. Les auteurs de ces travaux sont parvenus à hydrogéner efficacement une série d'halogénonitroarènes, et en particulier deux dérivés de pyridine comme le montre la **figure II-58**.

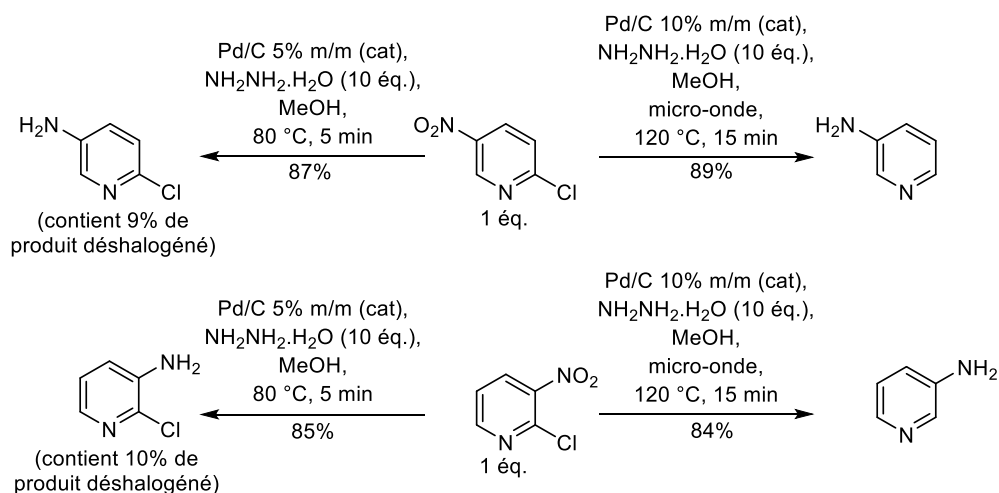


Figure II-58 : Hydrogénation pallado-catalysée de deux halonitropyridines en présence d'hydrazine comme source de dihydrogène^[148]

Cette procédure a été appliquée avec succès à la 2-chloro-Névirapine **33** et a abouti à la Névirapine **1** avec un rendement de 74% après purification (**Figure II-59**).

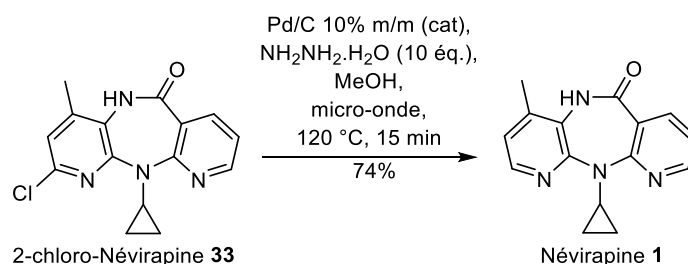


Figure II-59 : Hydrogénation pallado-catalysée de la 2-chloro-Névirapine en présence d'hydrazine comme source de dihydrogène

Il est donc possible d'aboutir à la Névirapine **1** par une voie alternative au passage par le CAPIC **6**.

IV.4. Préparation de la Névirapine par une voie alternative au passage par le CAPIC : bilan

La préparation du CAPIC **6** n'est donc pas indispensable à la formation de la Névirapine **1**. Cela permet d'économiser une étape de synthèse et de préparer la Névirapine avec un rendement global de 12% sur neuf étapes comme le montre la **figure II-60**.

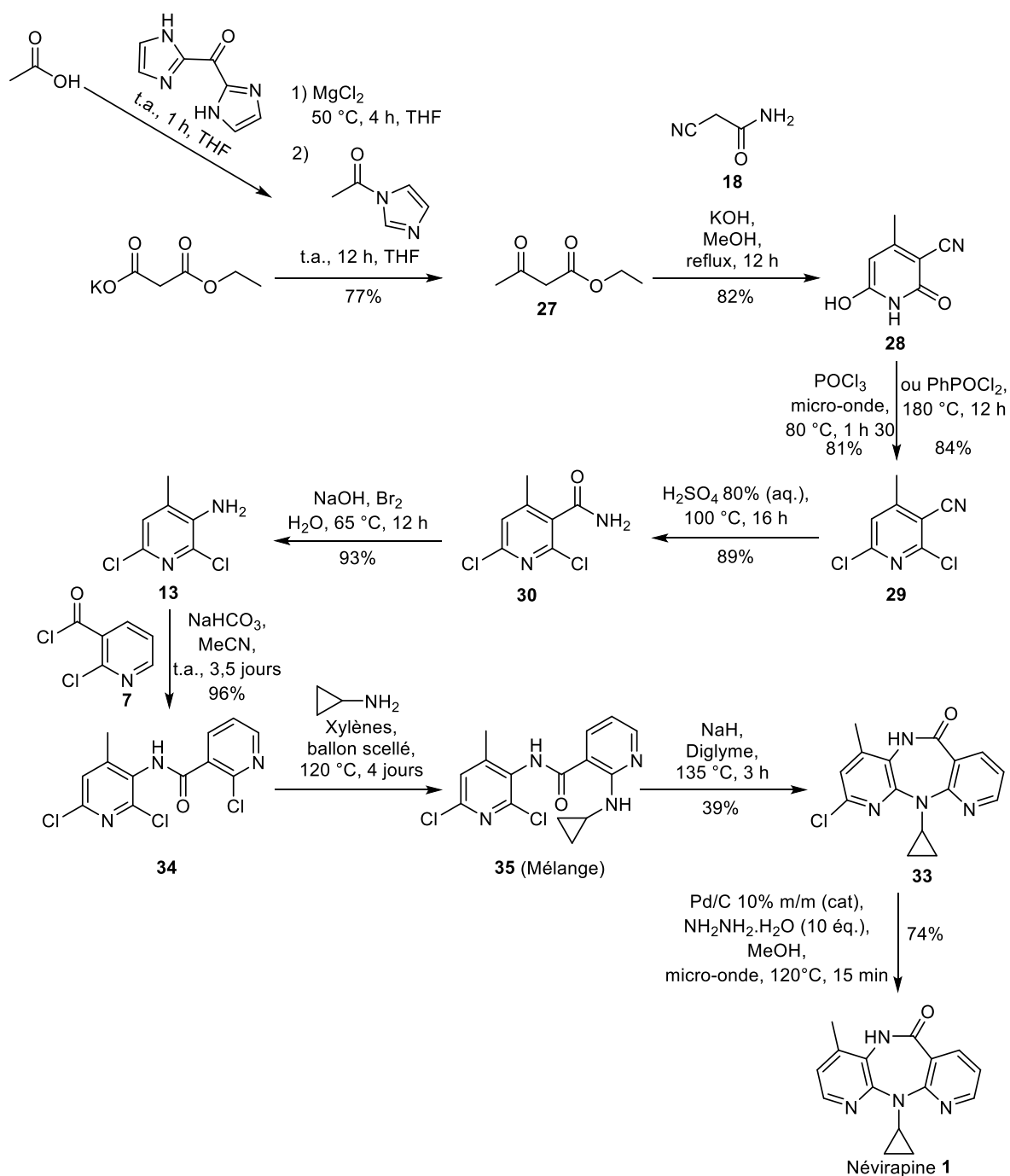


Figure II-60 : Préparation de la Névirapine sans passage par le CAPIC 6

Cette méthode alternative, bien que plus rapide, présente un rendement identique à celui obtenu par la méthode qui passe par le CAPIC 6 car l'étape de substitution nucléophile de la cyclopropylamine sur la molécule 34 fait chuter le rendement. En outre, elle n'est pas totalement régiosélective et il est difficile de consommer complètement 34 sans former le produit secondaire de double substitution 36.

La procédure illustrée par la **figure II-60** n'a donc pas été sélectionnée pour la préparation de la 12-⁽¹³C)Névirapine. Elle reste néanmoins intéressante puisque la 2-chloro-Névirapine **33** pourrait être un précurseur de la 2-OH-Névirapine, qui est un métabolite hépatique important de la Névirapine.^[147]

V. Conclusion

Deux méthodes aboutissant au CAPIC ont été testées. La préparation d'un β-cétoacétal **17** condensé ensuite avec le cyanoacétamide n'a pas été concluante puisqu'elle a produit un régioisomère de la pyridine souhaitée. Le remplacement de **17** par un β-cétoester **27** a résolu ce problème et a donné le CAPIC puis le 4-⁽¹³C)CAPIC en sept étapes avec un rendement de 24%. A partir du CAPIC, la Névirapine a été préparée en trois étapes. Cette voie de synthèse, appliquée en série substituée, a abouti à la 12-⁽¹³C)Névirapine avec un rendement de 11% sur 10 étapes et dans des quantités suffisantes pour la préparation de la 12-⁽¹³C)OH-Névirapine et de son dérivé sulfate. La préparation de ces métabolites est détaillée dans le troisième chapitre de ce manuscrit.

Une méthode alternative au passage par le CAPIC a également donné la Névirapine avec un rendement global de 11% sur 9 étapes de synthèse. Cette procédure passe par la 2-chloro-Névirapine et pourrait permettre de préparer la 2-OH-Névirapine, molécule que nous n'avons pas choisi d'étudier dans ce travail de thèse mais qui fait également parti des métabolites importants issus de la Névirapine.

Chapitre III

Synthèse de métabolites de la 12-(¹³C)Névirapine

Chapitre III

Synthèse de métabolites de la 12-(¹³C)Névirapine

De nombreux travaux montrent que la toxicité cutanée de la Névirapine ne serait pas due à la molécule elle-même, mais à l'un de ses métabolites, classant ainsi cette substance dans la catégorie des pro-haptènes. En particulier, les études d'inhibition réalisées par Jack Uetrecht et ses collaborateurs ont montré de façon indirecte que la 12-OH-Névirapine **37**, métabolite hépatique majeur, serait impliquée dans la toxidermie induite par la Névirapine chez le rat (**Figure III-1**).

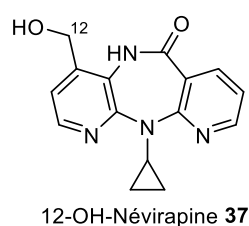


Figure III-1 : Structure de la 12-OH-Névirapine **37**, métabolite hépatique primaire de la Névirapine

La 12-OH-Névirapine migrerait vers la peau et c'est son dérivé sulfate **38** (**Figure III-2**), qui se formerait dans la peau des rats sous l'action d'une sulfotransférase épidermique, qui serait susceptible de modifier les protéines endogènes et ainsi déclencher les événements immunitaires menant à la toxidermie.

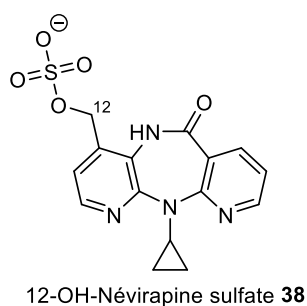


Figure III-2 : Structure du sulfate de la 12-OH-Névirapine **38**, métabolite secondaire de la Névirapine

Dans ce troisième chapitre sont détaillées les synthèses de trois dérivés de la 12-⁽¹³⁾C)Névirapine (**Figure III-3**) indispensables pour l'étude de l'activation métabolique de la Névirapine dans la peau.

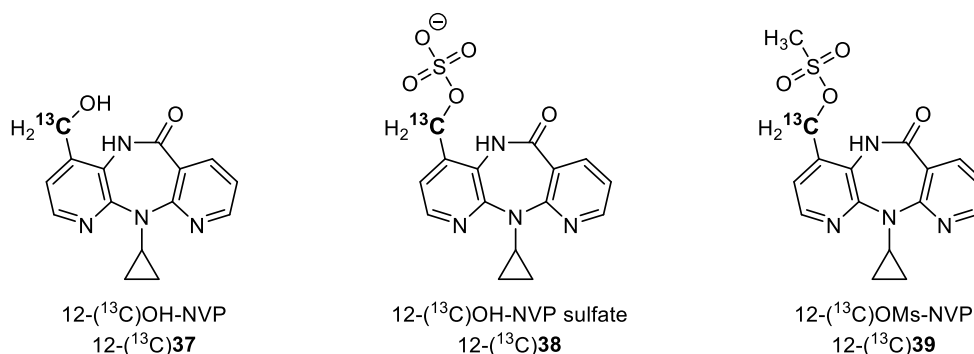


Figure III-3 : Dérivés de la Névirapine synthétisés dans ce travail de thèse

Pour commencer, nous avons préparé la 12-⁽¹³⁾C)OH-Névirapine 12-⁽¹³⁾C)37. En effet, l'utilisation de cette molécule sur les modèles d'épidermes humains reconstruits pourrait permettre d'étudier l'étape de sulfatation enzymatique. La synthèse de la 12-⁽¹³⁾C)OH-Névirapine sulfate 12-⁽¹³⁾C)38 a ensuite été optimisée. Cette molécule est indispensable pour déterminer si le sulfate est capable de modifier *in situ* les protéines épidermiques. Nous avons également préparé la 12-⁽¹³⁾C)mésyloxy-Névirapine 12-⁽¹³⁾C)39, très proche du sulfate mais possédant une réactivité chimique supérieure. L'application de cet excellent électrophile sur les épidermes humains reconstruits permettra de s'assurer de la réactivité des systèmes nucléophiles présents dans les modèles.

Ce chapitre s'articule en trois parties. Les deux premières concernent la préparation de la 12-⁽¹³⁾C)OH-Névirapine 12-⁽¹³⁾C)37. Deux méthodes de préparation ont été envisagées : l'autre permettant d'introduire le groupement alcool sur un petit intermédiaire de synthèse *via* une pyridine *N*-oxyde, l'autre par hydroxylation de la Névirapine. Le potentiel des pyridines *N*-oxydes pour l'introduction de la fonction alcool sur une picoline simple pouvant être utilisée comme précurseur de la Névirapine est d'abord exposé. Dans un second temps, nous détaillons plusieurs techniques d'hydroxylation de la Névirapine en 12-OH-Névirapine. Les essais ont été réalisés en série non substituée au carbone 13. Le mode opératoire le plus efficace a été appliqué à la préparation de la 12-⁽¹³⁾C)OH-Névirapine 12-⁽¹³⁾C)37. La dernière partie de ce chapitre explicite la préparation de la 12-⁽¹³⁾C)OH-Névirapine 12-⁽¹³⁾C)38 et de son analogue mésyle 12-⁽¹³⁾C)39.

I. Préparation de la 12-OH-Névirapine par hydroxylation d'une pyridine *N*-oxyde

Cette première partie est consacrée aux pyridines *N*-oxydes. Après avoir fait un bref rappel sur l'intérêt, la synthèse et la réduction des pyridines *N*-oxydes, nous exposons les tentatives d'hydroxylation d'une picoline simple par cette méthode.

I.1. Généralités sur les pyridines *N*-oxydes en chimie hétérocyclique

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les pyridines non substituées sont des substrats moyens pour les réactions de substitutions nucléophiles aromatiques et de mauvais candidats pour les substitutions électrophiles aromatiques. L'atome d'azote de la pyridine est quant à lui un nucléophile raisonnable. En effet, son doublet libre n'est pas délocalisé sur le cycle et la pyridine est une base faible avec un pK_b de 8,8.

Afin d'augmenter la réactivité d'une pyridine vis-à-vis des nucléophiles et des électrophiles, il est souvent possible de l'activer en la transformant en pyridine *N*-oxyde, stabilisée par la délocalisation des électrons de l'oxygène sur le cycle aromatique. Les orbitales HOMO d'une pyridine *N*-oxyde sont donc plus énergétiques que celles de la pyridine correspondante. Quelques formes mésomères limites montrant la réactivité des positions 2 et 4 vis-à-vis des nucléophiles et des électrophiles sont illustrées dans la **figure III-4**.

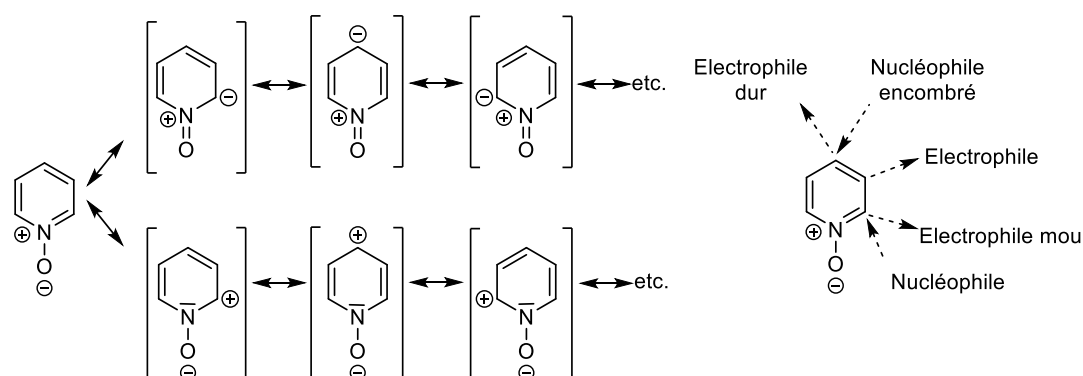


Figure III-4 : Formes mésomères limites de la pyridine *N*-oxyde et sites réactifs vis-à-vis des nucléophiles et des électrophiles

Décrites pour la première fois en 1926 par Meisenheimer,^[149] les pyridines *N*-oxydes sont toujours très utilisées comme activatrices pour préparer des pyridines parfois hautement substituées.^[150,151]

Les pyridines *N*-oxydes peuvent également servir d'oxydants. Chen et ses collaborateurs ont par exemple utilisé la pyridine *N*-oxyde pour transformer des halogénures benzyliques et allyliques en aldéhydes et en cétones (**figure III-5**).^[152]

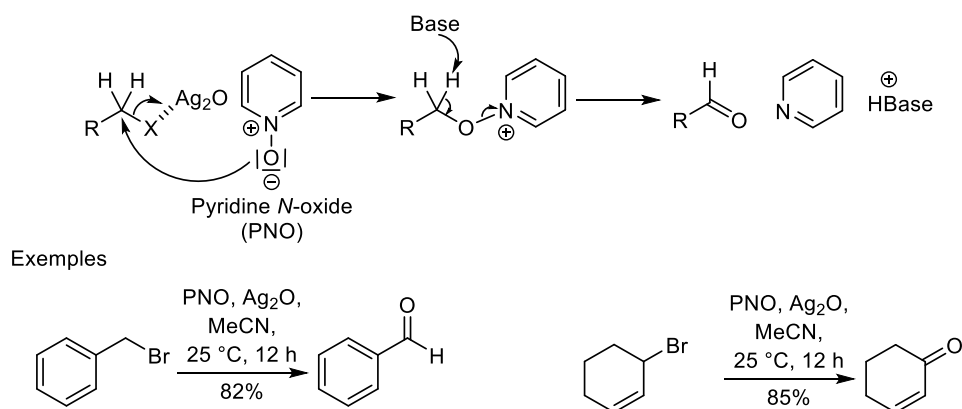


Figure III-5 : Exemple d'utilisation de la pyridine *N*-oxyde comme agent d'oxydation des halogénures benzyliques et allyliques^[152]

Les pyridines *N*-oxydes sont également de bons ligands en chimie organométallique.^[153-155]

Enfin, les pyridines *N*-oxydes et leurs dérivés sont présents dans les structures de certains produits à activité biologique.^[156] Le groupement *N*-oxide du minoxidil, molécule appliquée localement contre la chute de cheveux dont nous avons discuté dans le chapitre I, permet par exemple la sulfatation de cette prodrogue en son composé actif.^[33] Sa structure ainsi que celles de deux molécules actives plus récentes, à activités anti-inflammatoire et antibactérienne, sont présentées dans la **figure III-6**.^[157,158]

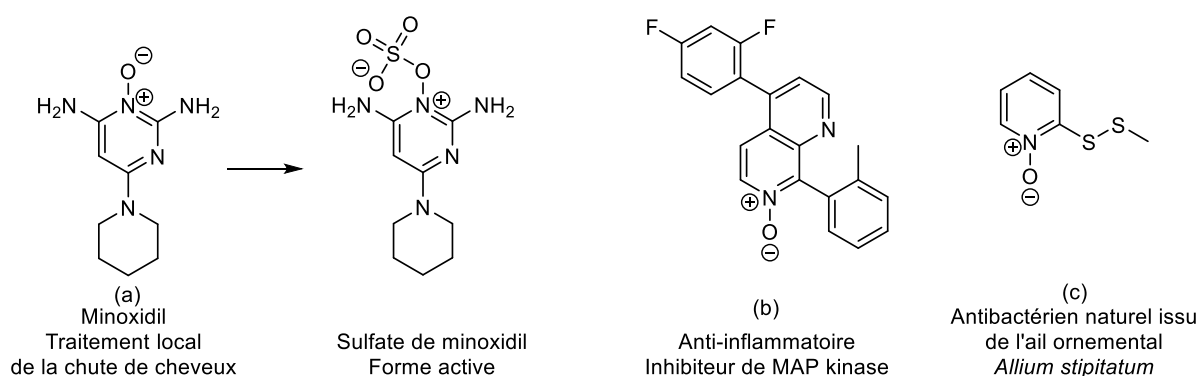
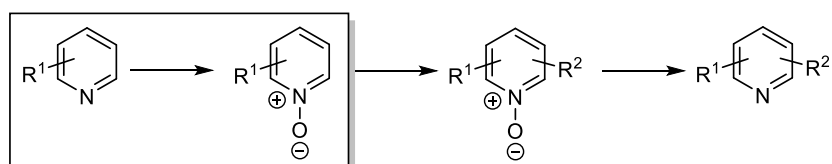


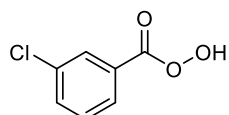
Figure III-6 : Exemples d'hétérocyles *N*-oxydés à activités biologiques : le minoxidil^[33] (a), un anti-inflammatoire expérimental^[157] (b), et un antibactérien naturel extrait de l'ail ornemental^[158] (c)

I.2. Synthèse et réduction des pyridines *N*-oxydes : revue de la littérature

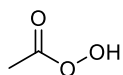
En plus de leur réactivité particulière qui les rend très utiles en chimie organique et organométallique, les pyridines *N*-oxydes ont l'avantage d'être simples à synthétiser.^[150] Certaines sont d'ailleurs disponibles dans le commerce à des tarifs raisonnables. Classiquement, une pyridine *N*-oxyde est générée par oxydation de la pyridine correspondante. Les peracides comme l'acide métachloroperbenzoïque^[159] (*m*-CPBA) et l'acide peracétique^[160,161] sont très utilisés. Le diméthylidioxirane (DMDO) donne également de bons résultats.^[162] Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est efficace mais il est susceptible d'oxyder les substituants d'une pyridine déjà fonctionnalisée.^[163] L'oxydation d'une pyridine en pyridine *N*-oxyde par H₂O₂ est généralement catalysée par un complexe métallique^[164–166] ou organométallique.^[167–169] Sharpless et ses collaborateurs ont par exemple montré en 1998 que le peroxyde d'hydrogène associé au méthyltrioxorhénium MeReO₃ donnait des rendements compris entre 80% et 99%, même sur des pyridines substituées.^[170] Ces oxydants constituent une liste non exhaustive des réactifs capables de transformer une pyridine en pyridine *N*-oxyde et sont illustrés par la **figure III-7**.



• Oxydants organiques classiques



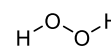
Acide métachloroperbenzoïque
(*m*-CPBA)



Acide peracétique

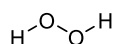


Diméthyl-dioxirane
(DMDO)

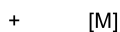


Peroxyde d'hydrogène
(H₂O₂)

• Oxydation par le peroxyde d'hydrogène catalysée par un complexe métallique

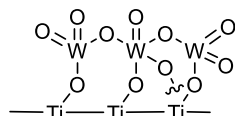
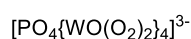
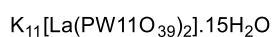


Peroxyde d'hydrogène
(H₂O₂)

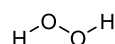


Complexe
métallique

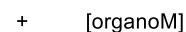
Exemples :



• Oxydation par le peroxyde d'hydrogène catalysée par un complexe organométallique



Peroxyde d'hydrogène
(H₂O₂)



Complexe
organométallique

Exemples :

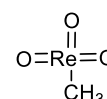
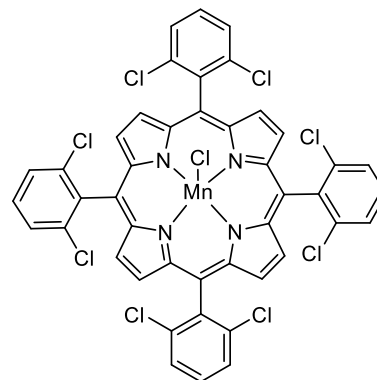
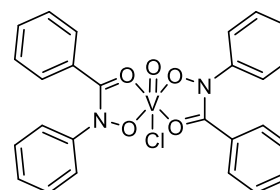


Figure III-7 : Exemples d'oxydants pour la préparation d'une pyridine *N*-oxyde à partir de la pyridine correspondante^[159-168,170]

Certaines pyridines *N*-oxydes peuvent être synthétisées *de novo* sans passer par la pyridine correspondante. Ces méthodes sont souvent basées sur des réactions de réarrangements ou de cycloadditions précédées parfois de réactions de condensations inter- ou intramoléculaires.^[171,172] Une synthèse très efficace de pyridine *N*-oxyde à partir d'un sel de pyrylium a par exemple été publiée par Pederson *et al.* en 1970 (**Figure III-8**).^[173]

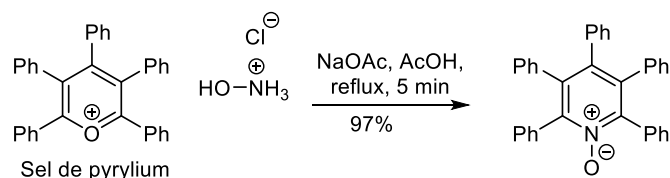
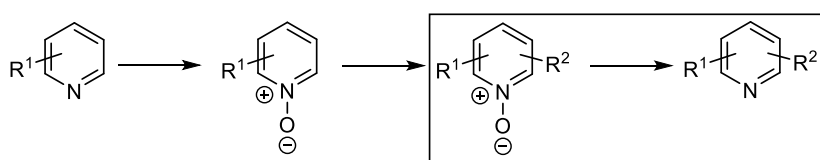


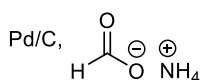
Figure III-8 : Exemple de synthèse *de novo* d'une pyridine *N*-oxyde à partir d'un sel de pyrylium^[173]

Après avoir substitué une pyridine *N*-oxyde, il suffit de réaliser une étape de réduction pour obtenir la pyridine fonctionnalisée correspondante. Les réductions catalysées par le palladium^[174–176] ou le zinc^[177,178] sont les méthodes les plus connues. D'autres métaux comme le fer,^[179] le titane,^[175,180] l'aluminium,^[181] ou le molybdène^[182] ont montré leur efficacité. Enfin, on peut mentionner les réactifs à base de phosphore trivalent (PPh₃,^[183] PCl₃,^[179] POCl₃,^[184] etc.) qui donnent de bons rendements. A nouveau, il convient de préciser que ces réducteurs constituent une liste non exhaustive des méthodes de transformation d'une pyridine *N*-oxyde en pyridine et que le choix du réactif dépend des autres substituants présents sur le cycle aromatique (**Figure III-9**).



• Réductions pallado-catalysées

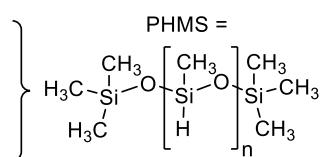
Pd/C, H₂



Pd/C, PHMS

Pd(PPh₃)₄, PHMS

etc.



• Autres métaux

Ti(*i*-PrO)₄, PHMS

Zn, NH₄Cl 30% aq.

AlI₃

Fe, AcOH

MoO₂Cl₂(DMF)₂, PPh₃

etc.

• Réactifs à base de phosphore

PPh₃

PCl₃

POCl₃

etc.

Figure III-9 : Exemples de réducteurs pour la préparation d'une pyridine à partir de la pyridine *N*-oxyde correspondante^[174–184]

I.3. Réaction de substitutions nucléophiles aromatiques sur les pyridines *N*-oxydes

Les pyridines *N*-oxydes peuvent être engagées dans de nombreuses réactions chimiques pour préparer des pyridines fonctionnalisées. On peut mentionner les substitutions nucléophiles et électrophiles aromatiques, les réactions radicalaires,^[185] les

cycloadditions,^[186,187] les couplages métallo-catalysés,^[176,188,189] etc. Dans cette partie du chapitre, nous nous attarderons sur les substitutions nucléophiles aromatiques.

Les substitutions nucléophiles aromatiques sont beaucoup plus efficaces sur une pyridine *N*-oxyde qu'à partir de la pyridine correspondante. Ces réactions sont généralement favorisées par l'utilisation préalable d'un électrophile réagissant avec l'atome d'oxygène de la *N*-oxyde. Quelques exemples de S_NAr sont proposés dans la **figure III-10**. L'introduction d'un nitrile peut par exemple se faire par substitution nucléophile aromatique de triméthylsilanecarbonitrile (TMS-CN) sur une pyridine *N*-oxyde (**Figure III-10a**). Comme l'a montré Fife en 1983,^[190] cette réaction est plus efficace après avoir formé un carbamate par addition-élimination de la *N*-oxyde sur le chlorure de diméthylcarbamoyle (Me₂NCOCl). Plus récemment, Yin *et al.* ont développé une technique permettant de transformer une variété de pyridines *N*-oxydes en 2-aminopyridines (**Figure III-10b**). Par analogie avec le travail de Fife,^[190] un traitement préalable avec de l'anhydride paratoluènesulfonique (Ts₂O) donne un ester sulfonique, encore plus réactif que la *N*-oxyde de départ vis-à-vis de l'amine nucléophile. Enfin, Yamanaka *et al.* ont analysé la régiosélectivité de la chloration d'une variété de pyridines 3-substituées (**Figure III-10c**).^[191] Généralement, le retour à la pyridine non oxydée se fait *in situ*.

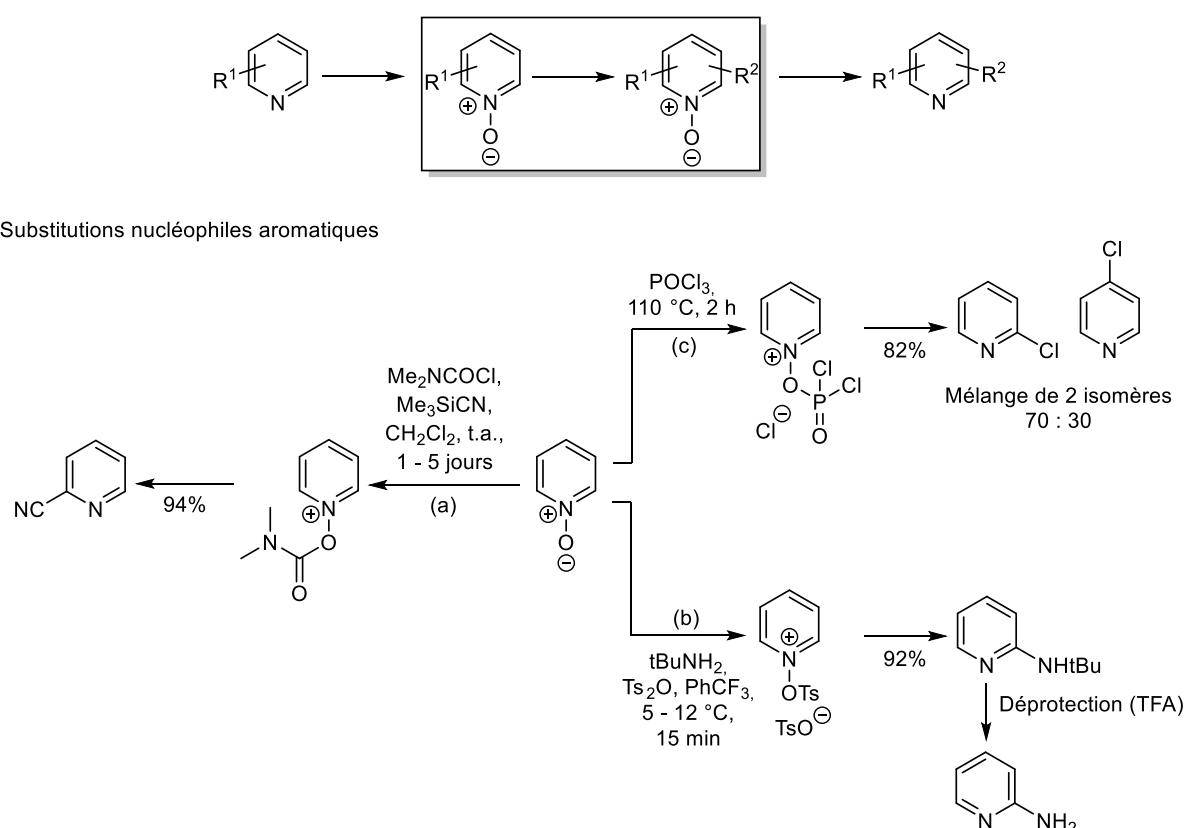


Figure III-10 : Exemples de réactions de substitutions nucléophiles aromatiques sur la pyridine *N*-oxyde permettant d'introduire un substituant nitrile^[190] (a), une amine^[192] (b) ou un halogène^[191] (c)

I.4. La réaction de Boekelheide : généralités

Décrite par Virgil Boekelheide en 1954,^[193] la réaction de Boekelheide est une méthode de préparation des hydroxyméthylpyridines à partir des picolines correspondantes, *via* leurs dérivés *N*-oxydes. Généralement, les substitutions nucléophiles aromatiques sur les pyridines *N*-oxydes sont favorisées, particulièrement en positions 2 et 4. Dans la réaction de Boekelheide, ce sont les méthyles des picolines *N*-oxydes qui sont rendus plus réactifs vis-à-vis des nucléophiles, notamment s'ils sont situés en positions 2 et 4. L'activation de la picoline se fait donc à plus grande distance. Son mécanisme (**Figure III-11**) débute par une addition élimination de l'oxygène de la *N*-oxyde sur un anhydride acétique. Un proton du méthyle, rendu relativement acide, est ensuite facilement arraché par l'anion acétate. La molécule possède alors la structure idéale pour un réarrangement sigmatropique [3,3], permettant de rétablir l'aromaticité. L'hydrolyse de l'acétoxyméthylpyridine issue de ce réarrangement donne une hydroxyméthylpyridine.

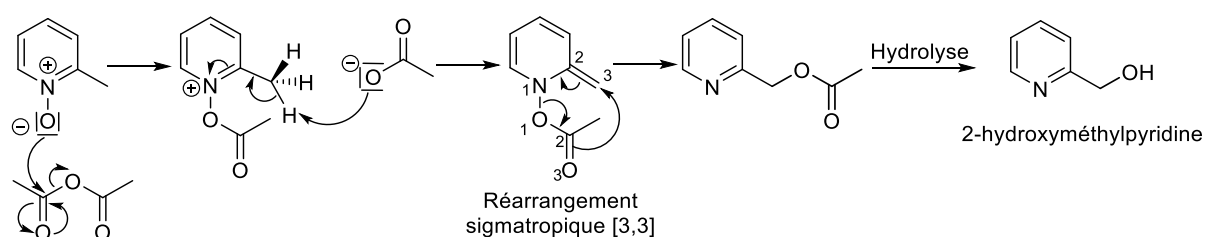


Figure III-11 : Mécanisme de la réaction de Boekelheide

Généralement, la réaction de Boekelheide est mise en œuvre en chauffant la picoline *N*-oxyde en présence d'un large excès d'anhydride acétique. Malheureusement, il a été montré dès 1968 que cette méthode pouvait donner un mélange d'isomères dont les structures sont illustrées par la **figure III-12**.^[194]

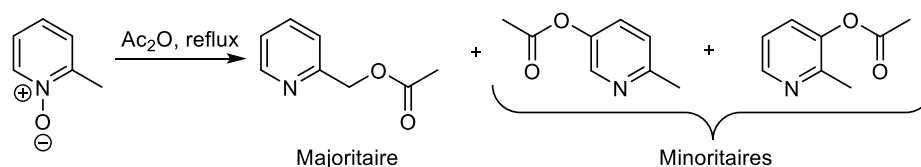


Figure III-12 : Mélange d'isomères généralement obtenus par la réaction de Boekelheide^[194]

En 1995, Fontenas *et al.*^[195] ont surmonté ce problème en remplaçant l'anhydride acétique par de l'anhydride trifluoroacétique et ont ainsi obtenu la 2-hydroxyméthylpyridine à partir de la 2-picoline-*N*-oxyde avec un rendement de 95%.

I.5. La réaction de Boekelheide pour la préparation de la 12-OH-Névirapine

La réaction de Boekelheide est une méthode très intéressante de préparation des hydroxyméthylpyridine. En 1995, Grozinger et ses collaborateurs ont donc eu l'idée de préparer la Névirapine N_7 -oxyde **40** puis de l'engager dans une réaction de Boekelheide pour obtenir la 12-acétoxyméthyl-Névirapine **41**, qui donne la 12-OH-Névirapine **37** après hydrolyse (**Figure III-13**).^[95]

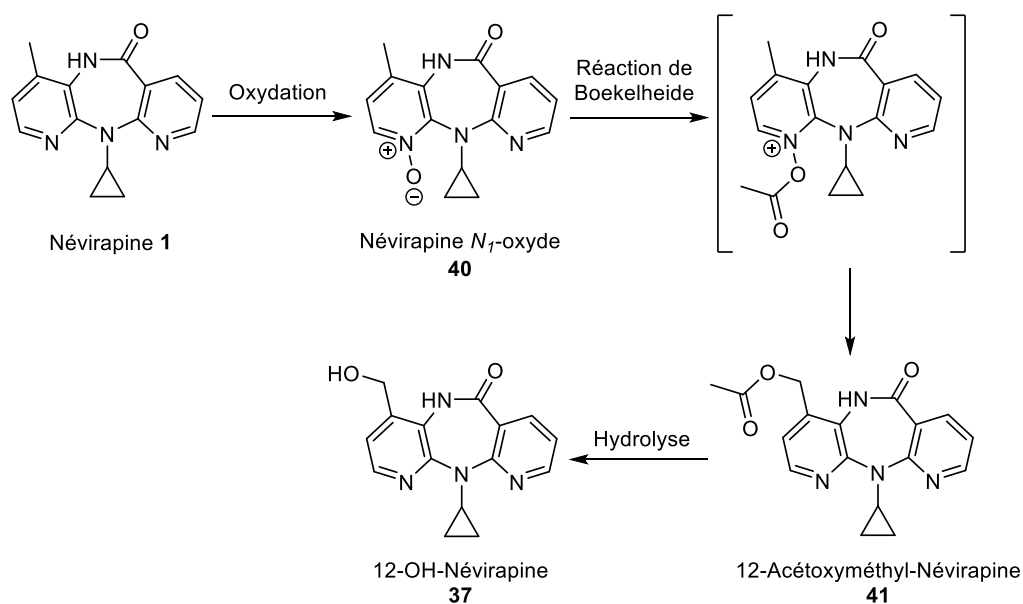


Figure III-13 : Méthode envisagée par Grozinger *et al.* pour la préparation de la 12-OH-Névirapine^[95]

La Névirapine a été traitée par du peroxyde d'hydrogène en présence d'acide acétique. Après 18 heures à 95 °C, les auteurs ont obtenu un mélange complexe de plusieurs produits d'oxydation sans parvenir à consommer toute la Névirapine de départ. Après purification par chromatographie sur gel de silice, quatre produits ont pu être séparés (**Figure III-14**) : la Névirapine de départ, la 8-OH-Névirapine N_1, N_{10} -dioxyde, la Névirapine N_{10} -oxyde et la Névirapine N_7 -oxyde **40**. La Névirapine N_7 -oxyde **40** nécessaire à la mise en œuvre de la réaction de Boekelheide a été obtenue avec un rendement de 17%.

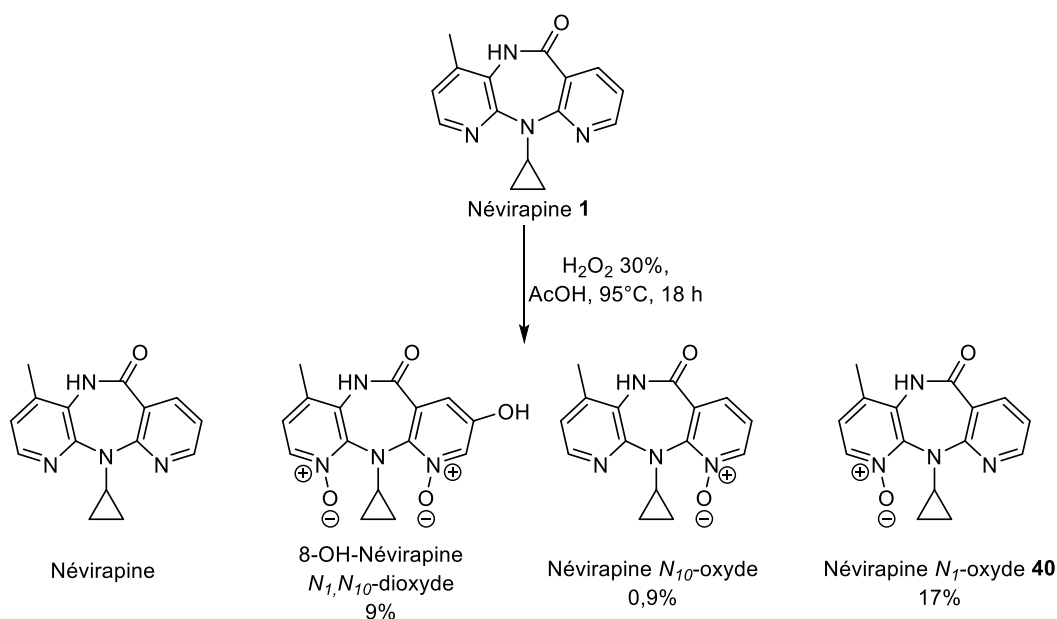


Figure III-14 : Mélange d'oxydation obtenu par Grozinger *et al.* lors de la préparation de la Névirapine N₁-oxyde^[95]

Décus par la difficulté de séparation des produits et le faible rendement, Grozinger *et al.* ont tout de même poursuivi les travaux en traitant la Névirapine N₁-oxyde par de l'anhydride acétique à 90 °C pendant 6 heures. L'ester obtenu a été saponifié et le pH a été ajusté pour donner la 12-OH-Névirapine avec un rendement de 60% (**Figure III-15**).

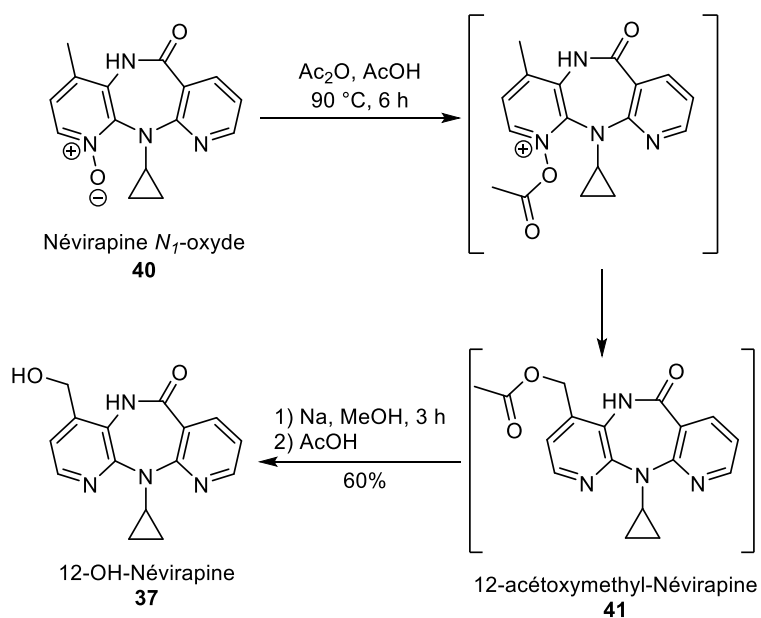


Figure III-15 : Préparation de la 12-OH-Névirapine par réaction de Boekelheide à partir de la Névirapine N₁-oxyde **40**^[95]

Le rendement global de cette synthèse de la 12-OH-Névirapine à partir de la Névirapine est de 10%. Les auteurs ont d'ailleurs décidé de changer de méthode pour la préparation de la 12-OH-Névirapine à plus grande échelle.

La synthèse de la 12-¹³CNévirapine ayant nécessité dix étapes de synthèse et l'achat de plusieurs grammes de précurseur substitué, nous avons tenté d'améliorer cette méthode de préparation de la 12-OH-Névirapine.

I.6. Tentative d'hydroxylation d'un précurseur de la Névirapine

Au vu du faible rendement obtenu par Grozinger *et al.* pour la préparation de la Névirapine *N*₇-oxyde, nous avons eu l'idée de réaliser la réaction de Boekelheide plus tôt dans la synthèse. Notre objectif était de préparer une hydroxyméthylpyridine plus simple, de la protéger, et de poursuivre par une synthèse similaire à celle que nous avons développée pour la Névirapine (**Figure III-16**). Nous avons choisi de partir de la 3-cyano-4-méthylpyridine **42** car sa transformation en pyridine *N*-oxyde **43** a déjà été décrite^[196] et que le substituant nitrile ne pose pas de problème avec les conditions de la réaction de Boekelheide.

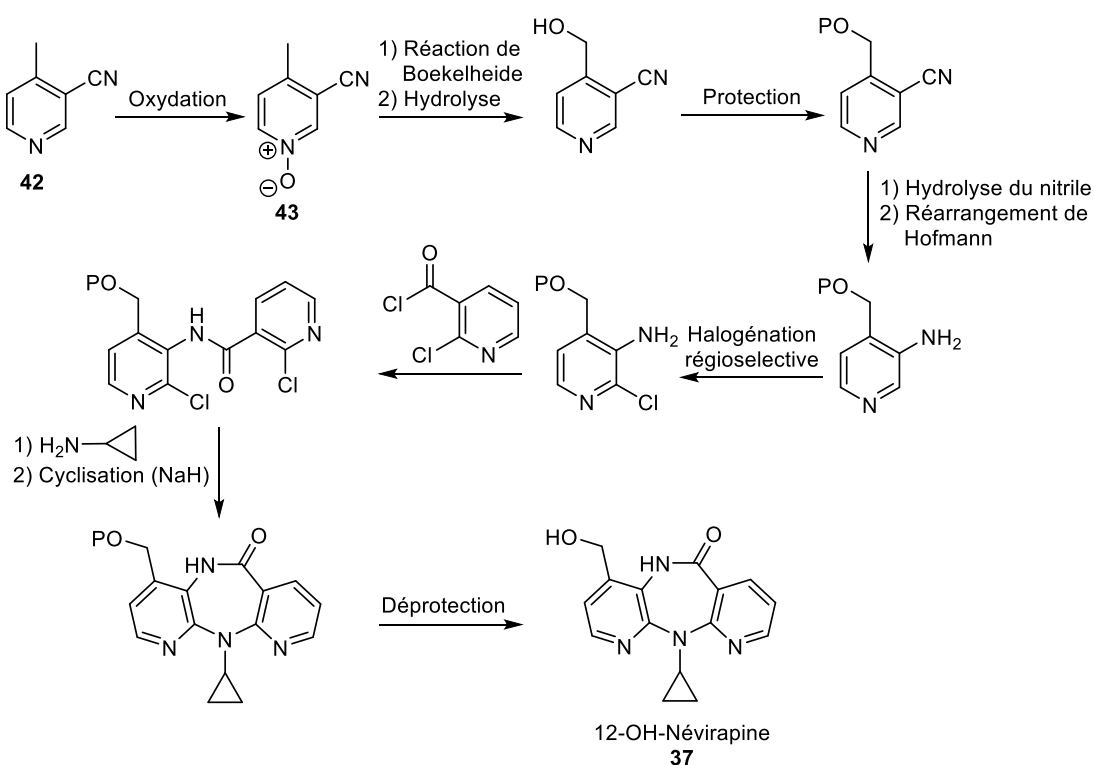


Figure III-16 : Voie de synthèse envisagée pour la préparation de la 12-OH-Névirapine par la méthode de la pyridine *N*-oxyde

La 3-cyano-4-méthylpyridine **42** a été préparée sans difficulté par hydrogénation de la molécule dichlorée **29** dont la synthèse a été décrite dans le chapitre précédent et résumée dans la **figure II-34**. La réaction de **29** avec le dihydrogène en présence de dichlorure de palladium (PdCl_2) donne la 3-cyano-4-méthylpyridine **42** ainsi qu'une petite quantité de pyridine réduite en énamine **44** dont la présence ne pose pas de problème puisque l'étape de synthèse suivante est une oxydation (**Figure III-17**).^[197]

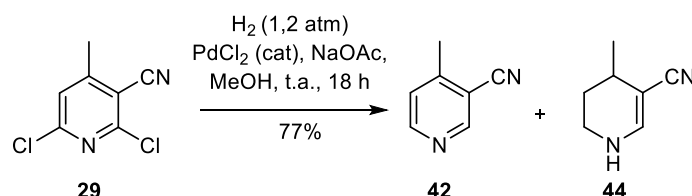


Figure III-17 : Préparation de la 3-cyano-4-méthylpyridine **42** par hydrogénation catalytique de la molécule dichlorée **29**^[197]

Le mélange des molécules **42** et **44** a ensuite été oxydé en pyridine *N*-oxyde **43** par du peroxyde d'hydrogène en milieu acide selon la méthode décrite en 1994 par Reimann et Benend.^[196] La pyridine *N*-oxyde **43** a été obtenue avec un rendement de 70% (**Figure III-18**).

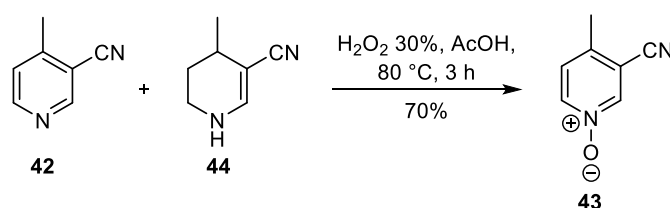


Figure III-18 : Préparation de la pyridine *N*-oxyde **43**

La réaction de Boekelheide a été réalisée sur la molécule **43** dans les conditions décrites par Reimann et Benend (**Figure III-19**).^[196]

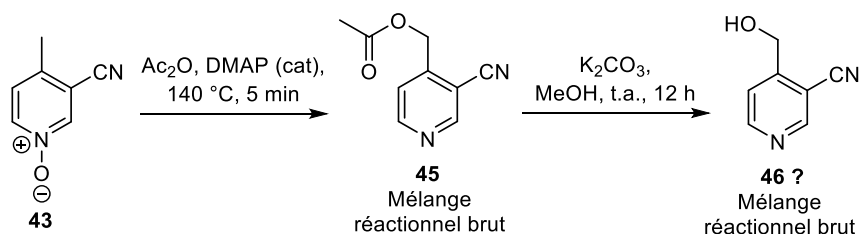


Figure III-19 : Tentative d'hydroxylation de la pyridine *N*-oxyde **43** par une réaction de Boekelheide

Malheureusement, le traitement par l'anhydride acétique à 140 °C pendant 5 minutes a donné un mélange complexe contenant l'acétoxyméthylpyridine souhaitée **45** ainsi que plusieurs molécules non caractérisées difficiles à éliminer. L'utilisation de l'anhydride

trifluoroacétique au lieu de l'anhydride acétique comme l'ont suggéré Fontenas *et al.*^[195] en 1995 n'a pas apporté d'amélioration significative mais l'ajout d'une quantité catalytique de DMAP nous a permis d'améliorer la proportion de **45** dans le mélange. La saponification de ce mélange par le carbonate de potassium dans du méthanol a donné un brut réactionnel qui semble contenir l'hydroxyméthylpyridine **46** souhaitée mais que nous n'avons pas réussi à purifier. Nous n'avons donc pas poursuivi la voie de synthèse illustrée dans la **figure III-16**. L'hydroxylation du groupement méthyle a été réalisée directement à partir de la Névirapine.

II. Préparation de la 12-(¹³C)OH-Névirapine à partir de la 12-(¹³C)Névirapine

En plus des travaux de Grozinger *et al.* sur la synthèse et l'hydroxylation des Névirapines *N*-oxydes,^[95] il existe dans la littérature quatre méthodes de préparation de la 12-OH-Névirapine **37**. Dans cette section du chapitre, nous évoquons d'abord les deux synthèses les plus récentes qui ne permettent malheureusement pas de passer en série substituée au carbone 13.^[147] Dans un second temps, les deux autres procédés passant par l'oxydation d'un dianion issu de la Névirapine^[95,198] sont exposés plus en détail. Nous expliquons ensuite la méthode mise au point au laboratoire pour l'obtention de la 12-(¹³C)OH-Névirapine. Pour finir, nous évoquons l'intérêt des oxaziridines de Davis pour l'hydroxylation de la Névirapine.

II.1. Méthodes récentes de préparation de la 12-OH-Névirapine

En 2000, Grozinger et ses collaborateurs ont publié les synthèses des cinq métabolites hépatiques majeurs de la Névirapine évoqués dans le premier chapitre de ce manuscrit : les 2-OH-, 3-OH-, et 8-OH-Névirapine, et la 12-OH-Névirapine ainsi que son dérivé oxydé 4-carboxy-Névirapine.^[147] Nous nous attarderons sur les deux voies de synthèse de la 12-OH-Névirapine.

Les deux méthodes ne passent pas par la Névirapine mais elles nécessitent la préparation de la 12-méthylthio-Névirapine **47** en cinq étapes à partir de la 3-amino-2-chloropyridine **48**, illustrée par la **figure III-20**. La pyridine **48** est d'abord transformée en sulfilimine **49** en présence de diméthylsulfide et de *N*-chlorosuccinimide (NCS). La sulfilimine **49** est ensuite convertie en 3-amino-2-chloro-4-méthylthiométhylpyridine **50** dans le toluène en présence de 2-*tert*-butyl-4-méthylphénol (BHT). Le couplage de **50** avec le chlorure de l'acide chloronicotinique **7** donne la molécule **51**. Après addition de cyclopropylamine pour donner la molécule **52**, la 12-méthylthio-Névirapine **47** est obtenue par cyclisation intramoléculaire en milieu basique. C'est à partir de **47** que les auteurs proposent deux méthodes différentes de préparation de la 12-OH-Névirapine **37**.

La première nécessite quatre étapes supplémentaires et donne un rendement global de 0,38% sur neuf étapes de synthèse. La seconde méthode n'en demande que trois et donne un rendement global similaire (0,37% sur les huit étapes de synthèse). Nous nous intéressons ici à la préparation de la 12-méthylthio-Névirapine **47** en cinq étapes à partir de la 3-amino-2-chloropyridine **48**.

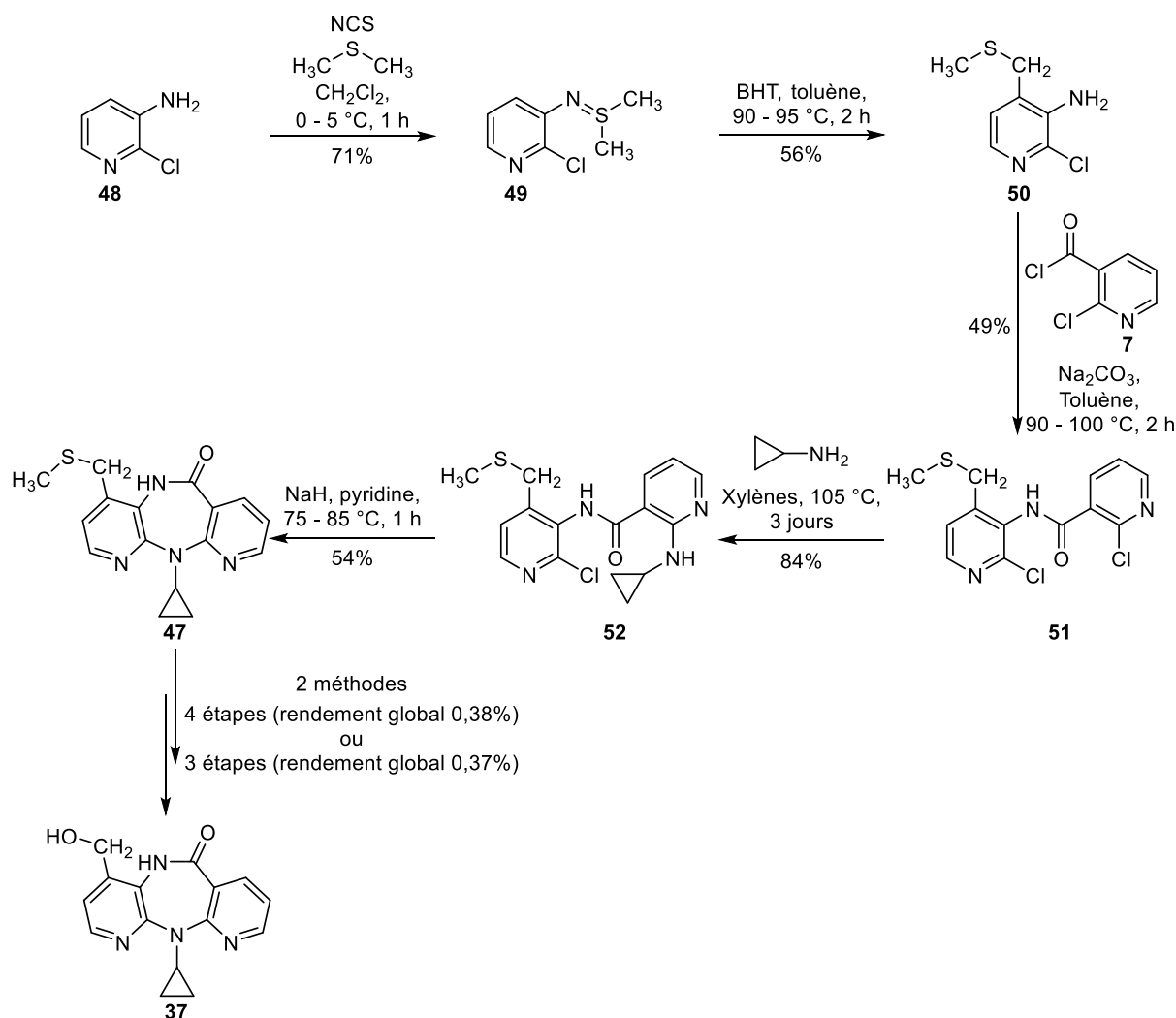


Figure III-20 : Méthode récente de préparation de la 12-OH-Névirapine **37** passant par un analogue soufré **47**^[147]

Malheureusement, le passage par la molécule **47** n'est pas compatible avec notre objectif de substitution au carbone 13. Nous aurions besoin de (2,2- ^{13}C)diméthylsulfide pour introduire l'isotope pendant la formation de la sulfilimine **49**. En effet, en raison de la symétrie du diméthylsulfide, nous aurions besoin de l'utiliser en version disubstituée. Le carbone 13 serait ensuite transféré sur la position souhaitée lors de la transformation de **49** en **50** (**Figure III-21**).

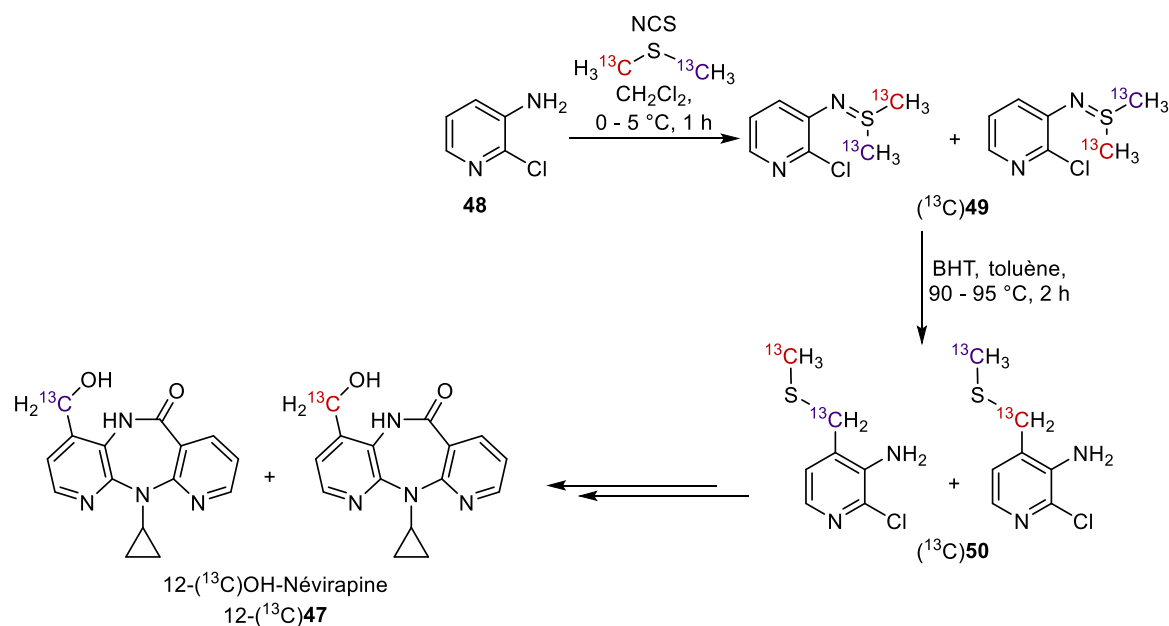


Figure III-21 : Accès à la 12-(¹³C)OH-Névirapine par la méthode publiée en 2000 par Grozinger *et al.*^[147]

Or, il est difficile de se procurer le produit disubstitué (2,2-¹³C)diméthylsulfide qui est d'ailleurs honéreux. Nous n'avons donc pas utilisé cette méthode pour préparer la 12-OH-Névirapine.

II.2. Préparation de la 12-OH-Névirapine par hydroxylation d'un dianion de la Névirapine : travaux publiés dans la littérature

Dans la littérature, trois méthodes de préparation de la 12-OH-Névirapine 37 passent par l'hydroxylation d'un dianion issu de la Névirapine et sont compatibles avec la substitution au carbone 13. Ce procédé nous a particulièrement intéressés car la synthèse de la 12-(¹³C)Névirapine avait déjà été réalisée au laboratoire.

La méthode historique a été publiée par Patel et Proudfoot en 1992,^[198] quatre ans avant la commercialisation de la Névirapine (Figure III-22). Dans un premier temps, les auteurs ont eu l'idée de préparer le 5,12-dianion 53 de la Névirapine en utilisant du diisopropylamide de lithium (LDA) avant de fonctionnaliser la position 12 par un groupement diméthylphénylsilyle (DMPS). Le produit silylé 54 souhaité a été obtenu avec un rendement de maximal de 37%. Les auteurs n'ont pas pu convertir la Névirapine complètement et ont observé la formation d'un isomère silylé 55. L'obtention de ce mélange est expliquée par une compétition entre deux positions de déprotonation de la Névirapine par le LDA : la position 7, menant à un dianion 56, et la position 12, aboutissant au dianion 53. Après avoir purifié le produit 12-silylé 54, la désilylation oxydante par les acides tétrafluoroborique et peracétique

aurait alors donné la 12-OH-Névirapine **37**. Malheureusement, cette réaction n'a pas fonctionné à cause du phénomène de protiodésilylation qui redonne la Névirapine de départ.

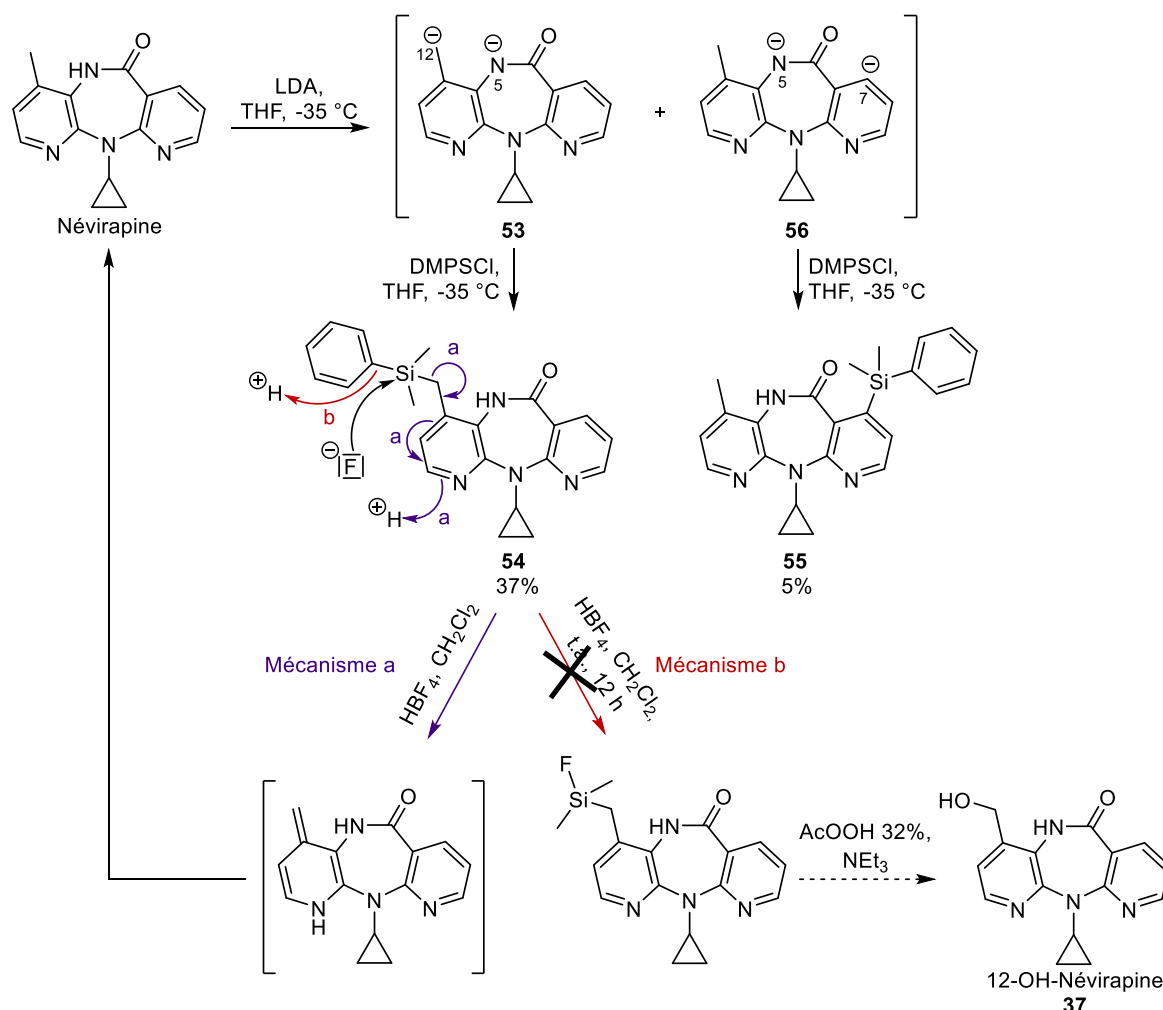


Figure III-22 : Tentatives de synthèse de la 12-OH-Névirapine **37** par silylation de la Névirapine puis désilylation oxydante réalisées par Patel et Proudfoot^[198]

Ces travaux, bien qu'infructueux pour la synthèse de la 12-OH-Névirapine, ont permis aux auteurs de travailler sur la compétition entre les positions de déprotonation de la Névirapine. L'anion **56** serait favorisé cinétiquement et l'anion souhaité **53** serait le produit thermodynamique. Ces observations ont été très importantes dans la suite de leurs travaux car elles leur ont permis de choisir la base appropriée (le LDA) et d'optimiser la formation du 5,12-dianion **53** afin de fonctionnaliser la position 12.

Finalement, Patel et Proudfoot^[198] ont réussi à préparer la 12-OH-Névirapine avec un rendement de 55% en traitant **53** par le peroxyde de molybdène-pyridine-hexaméthylphosphoramidate **57** (MoO₅.pyridine.HMPA, abrégé MoOPH) (**Figure III-23**). Nous parlerons plus en détail du MoOPH dans la prochaine section de ce chapitre.

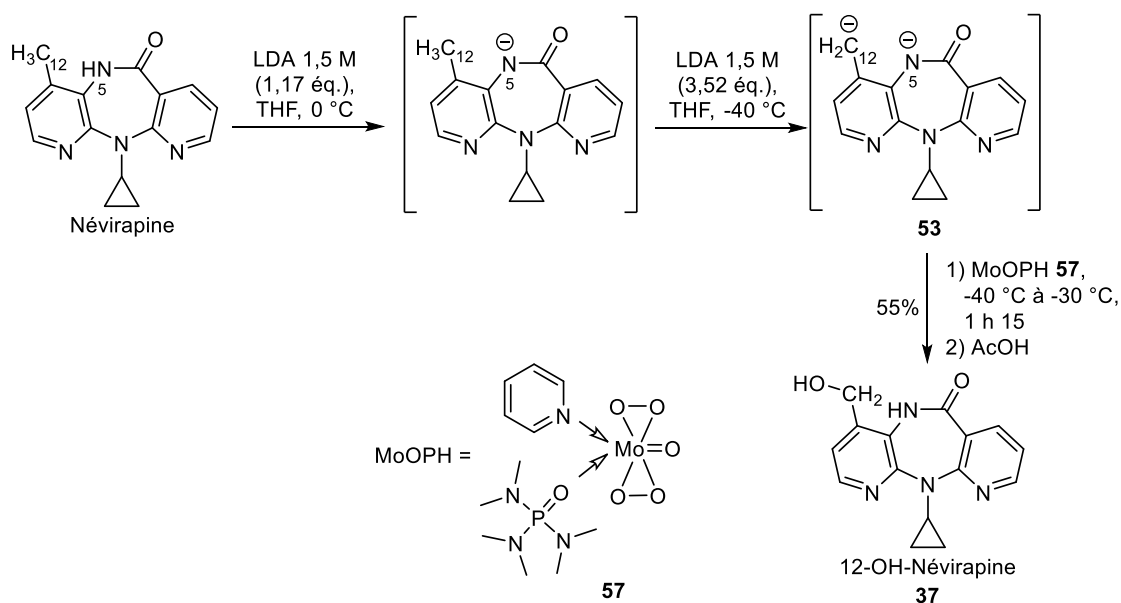


Figure III-23 : Préparation de la 12-OH-Névirapine **37** par l'utilisation du MoOPH sur le dianion **53** formé à partir de la Névirapine^[198]

Peu après Patel et Proudfoot et l'utilisation du MoOPH, Grozinger et ses collaborateurs ont publié leurs études sur les Névirapines *N*-oxydes évoquées précédemment dans ce manuscrit de thèse.^[95] Déçus par les faibles rendements (10% de rendement pour la 12-OH-Névirapine **37** à partir de la Névirapine *via* sa *N*₇-oxyde **40**), ils ont alors repris les travaux de Patel et Proudfoot en remplaçant le MoOPH, jugé trop instable, par de l'oxygène moléculaire. La 12-OH-Névirapine **37** a ainsi été obtenue avec un rendement de 30% après déprotonation par le LDA et traitement par de l'oxygène gazeux (**Figure III-24**).

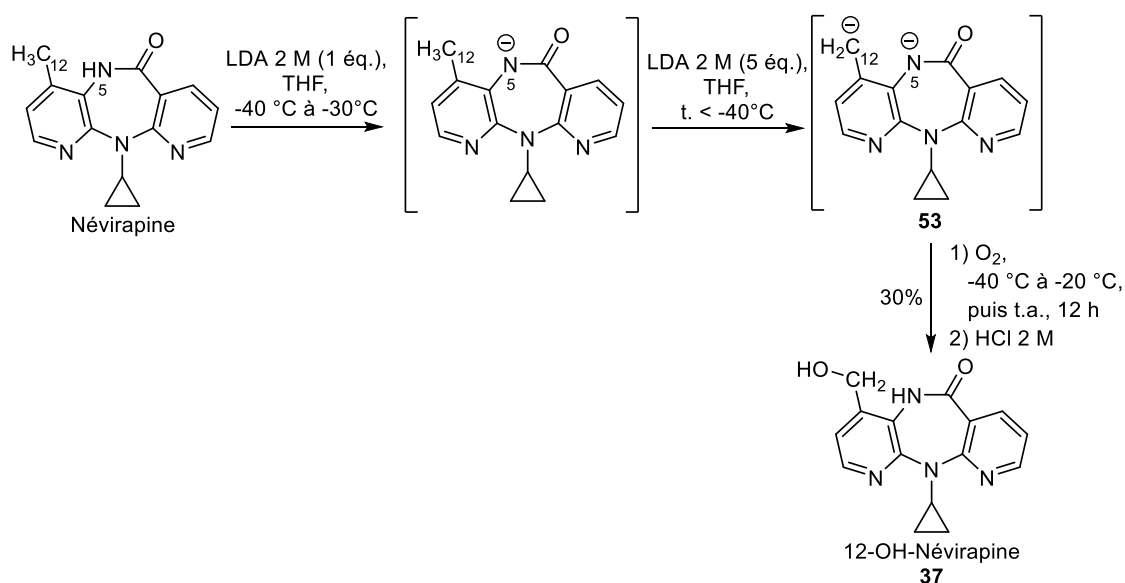


Figure III-24 : Préparation de la 12-OH-Névirapine **37** par l'utilisation d'oxygène moléculaire sur le dianion **53** formé à partir de la Névirapine^[95]

Dans la littérature, les trois méthodes de préparation de la 12-OH-Névirapine compatibles avec l'introduction de la substitution au carbone 13 sont donc les suivantes :

-Celles de Grozinger^[95] : la première passant par la Névirapine *N*₇-oxyde **40**, avec un rendement de seulement 10% à partir de la Névirapine, et la seconde par oxydation du dianion **53** de la Névirapine par l'oxygène moléculaire, pour laquelle il a obtenu un rendement de 30%.

-Celle de Proudfoot et Patel,^[198] qui proposent également d'oxyder **53** mais en utilisant un complexe à base de molybdène, le MoOPH **57**. Le rendement publié est de 55%.

Ces méthodes sont résumées dans la **figure III-25**.

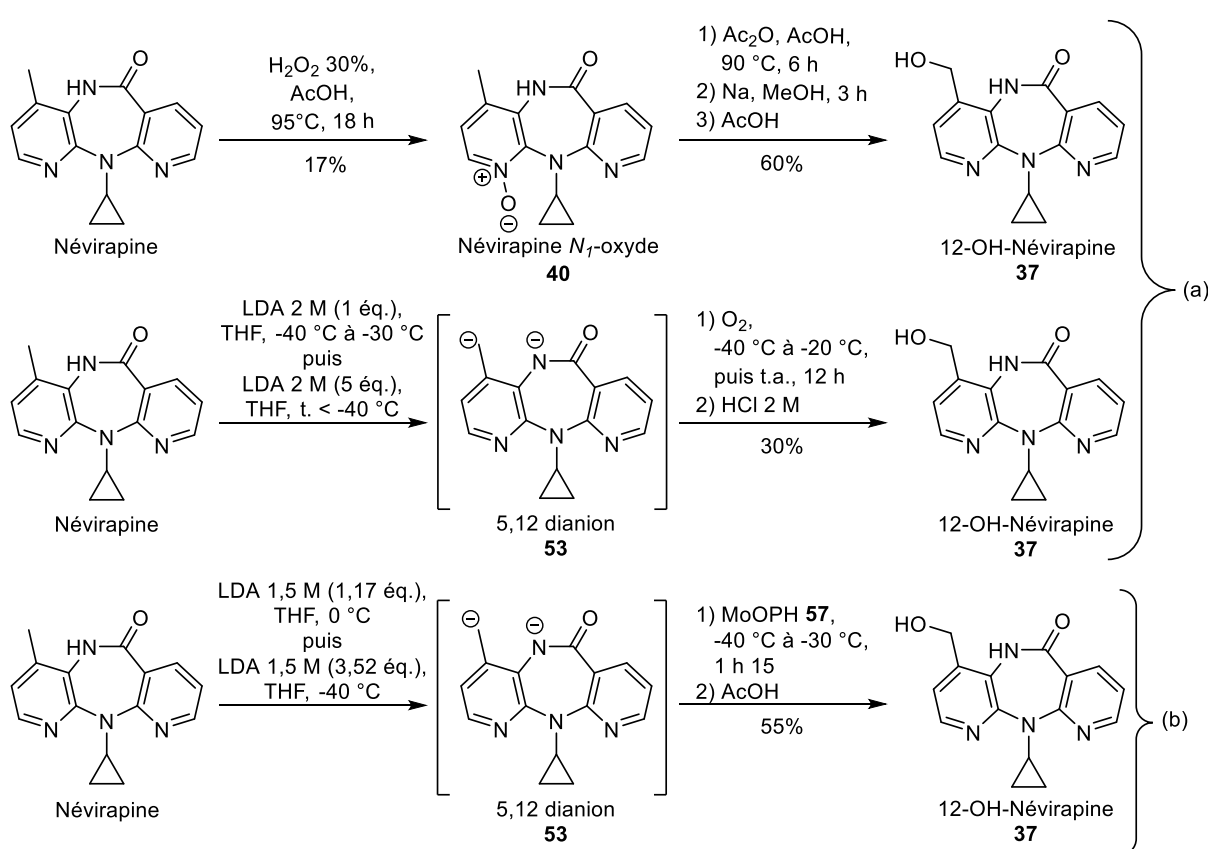


Figure III-25 : Résumé des méthodes de préparation de la 12-OH-Névirapine compatibles avec la substitution au carbone 13 publiées par Grozinger *et al.*^[95] (a) et Patel *et al.*^[198] (b)

Comme expliqué précédemment, le passage par la Névirapine *N*₇-oxyde **10** n'a pas été sélectionné car la préparation de cette molécule donne un rendement de seulement 10%. Nous nous sommes donc intéressés à la préparation et à l'hydroxylation du dianion **53**.

II.3. Hydroxylation de la Névirapine et de la 12-(¹³C)Névirapine

II.3.a. Le MoOPH : généralités et synthèse

Pour des raisons pratiques, nous avons commencé par utiliser le MoOPH pour oxyder le dianion **53** plutôt que l'oxygène gazeux. Ce complexe peroxydique à base de molybdène semblait d'ailleurs donner de meilleurs résultats dans les travaux de Patel *et al.*^[198] que l'oxygène utilisé par Grozinger et ses collaborateurs.^[95] Dans cette section du chapitre, nous proposons un bref rappel sur l'utilité du MoOPH en chimie organique ainsi que sur sa synthèse.

Le MoOPH **57** (peroxyde de molybdène-pyridine-hexaméthylphosphoramide, MoO₅.pyridine.HMPA, **figure III-26**) est un réactif d'oxydation développé par Edwin Vedejs en 1974.^[199] A l'origine, c'est Hubert Mimoun qui a publié la structure d'une série de complexes peroxydiques du molybdène et du tungstène à la fin des années 1960^[200] et qui a ensuite utilisé le MoO₅.HMPA pour des réactions d'époxydation.^[201]

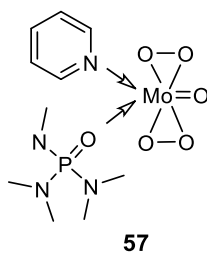


Figure III-26 : Structure du MoOPH

Depuis, le MoOPH a été beaucoup utilisé comme source d'oxygène électrophile pour α -hydroxyler des énolates d'aldéhydes,^[202] de cétones,^[203] d'esters,^[204] de phénols,^[205] d'amides,^[206] et de nombreuses autres fonctions. Très versatile, il peut également être utile pour réaliser des hydroxylations régio- et stéréosélectives. En 1986, Gamboni *et al.* ont par exemple utilisé le MoOPH couplé à du sec-butylate de potassium (sec-BuOK) pour hydroxyler un énolate d'ester dérivé du camphre. Ils ont réussi à obtenir l' α -hydroxyester de configuration S avec un rendement de 73% et un excès diastéréomérique de 98% (**Figure III-27**).

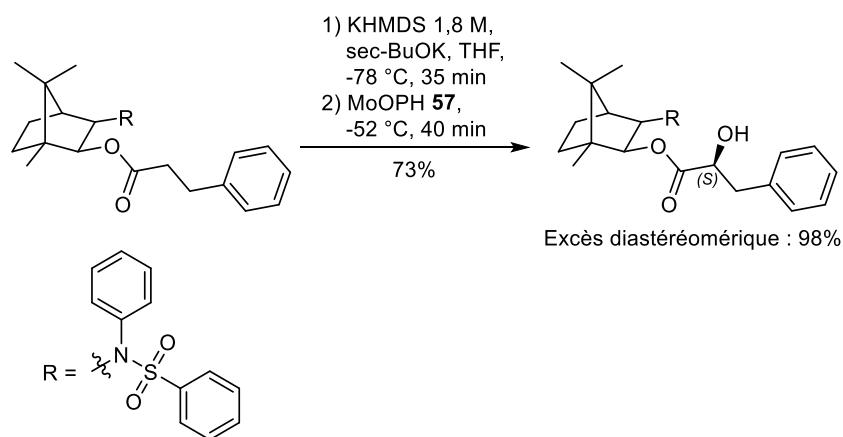


Figure III-27 : Résultats obtenus par Gamboni et ses collaborateurs pour l'hydroxylation d'un ester de camphre par le MoOPH^[204]

La revue *Organic Syntheses* a consacré un article détaillé écrit par Vedejs et Larsen sur la synthèse du MoOPH.^[207] Dans un premier temps, les auteurs proposent d'oxyder le trioxyde de molybdène VI (MoO_3) par du peroxyde d'hydrogène en solution aqueuse puis d'ajouter l'hexaméthylphosphoramidate (HMPA) afin d'obtenir un complexe intermédiaire $\text{MoO}_5 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{HMPA}$. Après un séchage de 24 heures sous un vide poussé, la complexation de la pyridine donne le $\text{MoO}_5 \cdot \text{pyridine} \cdot \text{HMPA}$ (MoOPH). Au laboratoire, nous avons suivi un protocole identique en partant de l'acide molybdique, forme monohydratée du trioxyde de molybdène, afin de préparer le MoOPH **57** avec un rendement global de 16% (**Figure III-28**).^[208]

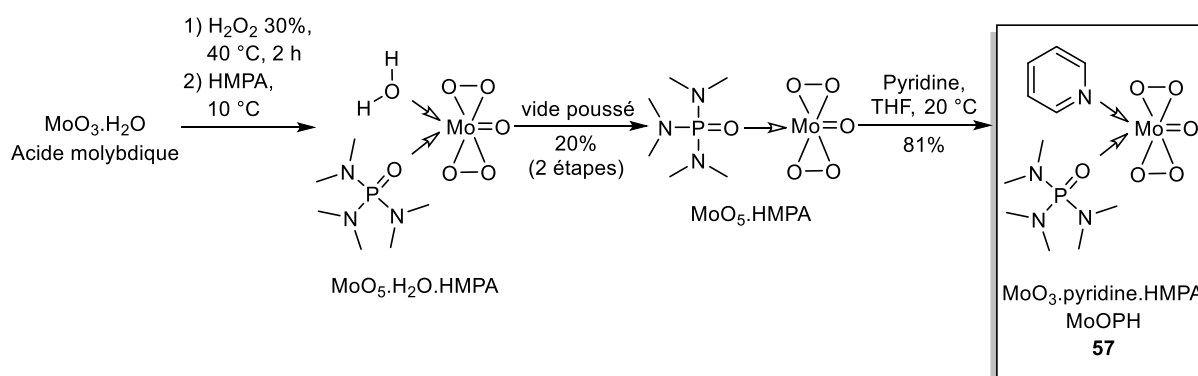


Figure III-28 : Synthèse du complexe d'hydroxylation MoOPH

Bien conservé à l'abri de l'humidité et de la lumière, le MoOPH a pu être conservé plusieurs mois à -40 °C.

II.3.b. Hydroxylation de la Névirapine puis de la 12-(¹³C)Névirapine par le MoOPH

Notre objectif a été de préparer le 5,12 dianion **53** par déprotonation de la Névirapine à l'aide d'une base forte, le diisopropylamide de lithium (LDA), avant de l'hydroxyler par le MoOPH **57**.

Dans un premier temps, nous avons suivi les conditions de Patel *et al.*^[198] (**Figure III-23**) en utilisant deux portions de LDA à une concentration de 1,45 M pour déprotoner la Névirapine en deux fois :

-D'abord à 0 °C, pour former l'anion issu de l'amide du cycle diazépino (atome d'azote 5),

-Puis à -40 °C, pour former **53**.

Nous avons ensuite ajouté le MoOPH sans attendre et agité à -40 °C pendant 1 h 15.

A l'issu du traitement, le brut réactionnel contenait un grand nombre de signaux difficiles à interpréter (notamment dans la zone des aromatiques), nous laissant penser que ce protocole aboutit à un mélange complexe de produits oxydés. De plus, la conversion de la Névirapine est incomplète. Le meilleur ratio NVP : 12-OH-NVP obtenu dans ces conditions est de 1 : 0,3 (**Figure III-29**).

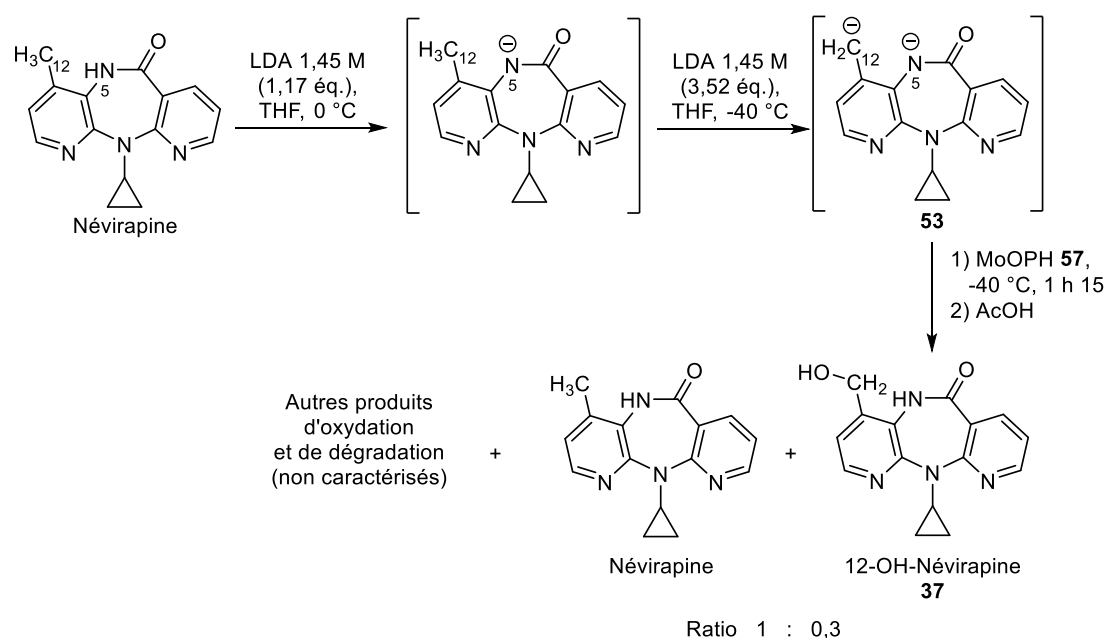


Figure III-29 : Première tentative d'hydroxylation réalisée au laboratoire selon la méthode de Patel *et al.*^[198]

Ce résultat nous a amenés à améliorer le mode de préparation du dianion **53** qui semblait également préoccuper Patel et ses collaborateurs.^[198] Leurs travaux ont notamment montré qu'un autre dianion **56** pouvait se former. Le produit souhaité **53** semble se former dans des conditions thermodynamiques à une température optimale de -40 °C. Les températures de formations de l'anion (0 °C) puis du dianion **53** (-40 °C) et la température d'oxydation par le MoOPH (-40 °C) ont donc été rigoureusement contrôlées et nous avons décidé de ne pas ajouter l'oxydant immédiatement mais d'attendre au minimum 30 minutes pour laisser l'équilibre se déplacer vers la formation de **53**. Nous avons également eu l'idée d'ajouter de l'hexaméthylphosphoramidate (HMPA) avant de laisser le système évoluer vers **53** puis d'introduire le MoOPH. En effet, le HMPA est notamment connu pour sa capacité à rendre les énolates de lithium plus réactifs. Les résultats de nos essais sont présentés dans le **tableau III-1**.

Entrée	HMPA	Formation du dianion 53 ^a	Temps de réaction ^c	NVP : 12-OH-NVP ^d
1	Non	Agitation 30 min	3 h	1 : 1,5
2	Oui	Ajout de HMPA puis agitation 30 min ^b	3 h	1 : 1,7
3	Non	Agitation 30 min	3 h 30	1 : 1
4	Oui	Ajout de HMPA puis agitation 30 min ^b	3 h 30	1 : 3,6
5	Non	Agitation 30 min	4 h	1 : 1,3
6	Oui	Ajout de HMPA puis agitation 30 min ^b	4 h	1 : 7
7	Oui	Ajout de HMPA puis agitation 30 min ^b	5 h	1 : 5
8	Oui	Ajout de HMPA puis agitation 40 min ^b	4 h	1 : 7
9	Oui	Ajout de HMPA puis agitation 50 min ^b	4 h	1 : 7

^aPour tous les essais : Le LDA (1,45 M) est ajouté en deux portions (1,17 éq. à 0 °C puis 3,52 éq. à -40 °C). Le milieu est ensuite agité 30 min.

^bLe HMPA (4,69 éq.) est ajouté à -40 °C après formation du dianion par le LDA puis le milieu est agité 30, 40 ou 50 min avant d'ajouter l'oxydant.

^cTemps de réaction après addition de l'oxydant.

^dRatio déterminé par RMN.

Tableau III-1 : Conditions testées pour l'hydroxylation de la Névirapine

Dans un premier temps, nous avons vérifié si l'ajout de HMPA était réellement intéressant dans cette réaction. Pour un temps de réaction de 3 h (**entrées 1 et 2**), nous nous sommes aperçus que même si la conversion de la Névirapine n'est pas complète, le rapport NVP : 12-OH-NVP est plus intéressant lorsqu'on utilise du HMPA. Au bout de 3 h 30 de réaction, l'effet du HMPA est encore plus significatif (**entrées 3 et 4**). La 12-OH-NVP devient largement majoritaire au bout de 4 h de réaction (**entrée 6**) alors que le même temps de réaction sans HMPA donne un rapport bien moins intéressant de 1 : 1,3 (**entrée 5**).

Comme pour les énolates de lithium, le HMPA semble rendre le dianion **53** plus réactif. Nous avons donc décidé d'utiliser du HMPA systématiquement juste après avoir formé **53** par déprotonation de la NVP.

Dans un second temps, nous avons déterminé le temps de réaction idéal. Le meilleur ratio (1 : 7) est obtenu au bout de 4 h (**entrée 6**). En agitant une heure de plus, on retombe à un rapport NVP : 12-OH-NVP de 1 : 5 (**entrée 7**).

Pour finir, quelques essais ont été réalisés afin de vérifier si une agitation plus longue du dianion **53** en présence de HMPA pouvait favoriser la réaction. Cependant, on n'observe aucune différence en agitant 30 min (**entrée 6**), 40 min (**entrée 8**) ou 50 min (**entrée 9**). Une agitation de 30 min à -40 °C semble suffire.

Les conditions de réactions choisies sont donc celles de l'**entrée 6**.

Même si nous avons réussi à favoriser la formation de 12-OH-NVP, les analyses RMN montrent que le brut réactionnel contient plusieurs produits d'oxydation et de dégradation et une quantité importante de HMPA. Un travail important a donc été réalisé afin de mettre en place une technique de purification efficace. Nous avons rencontré quelques difficultés liées aux faibles solubilités de la Névirapine et de la 12-OH-Névirapine. Finalement, nous avons combiné deux techniques de chromatographie liquide sur colonne :

-Une première colonne de Sephadex[®] LH-20. Ce gel est constitué d'un réseau de polysaccharides et permet la séparation des molécules selon leurs tailles. Cette première étape de purification nous a permis d'obtenir un mélange de Névirapine, de 12-OH-Névirapine et d'éliminer une grande partie du HMPA.

-Une colonne sur gel de silice avec un gradient d'éluion précis pour éliminer le HMPA résiduel et séparer la Névirapine de la 12-OH-Névirapine.

L'ensemble des paramètres évoqués précédemment ainsi que la technique de purification mise en place nous ont permis d'obtenir la 12-OH-Névirapine avec un rendement de 43%. Cette méthode a été choisie pour le passage en série substituée. Nous avons obtenu la 12-(¹³C)OH-Névirapine avec un rendement de 52% (**Figure III-30**). Malgré une attention particulière accordée à la purification de la 12-(¹³C)OH-Névirapine, des traces de 12-(¹³C)Névirapine dans le produit ont été détectées par RMN du carbone 13. Elles restent indétectables en RMN du proton.

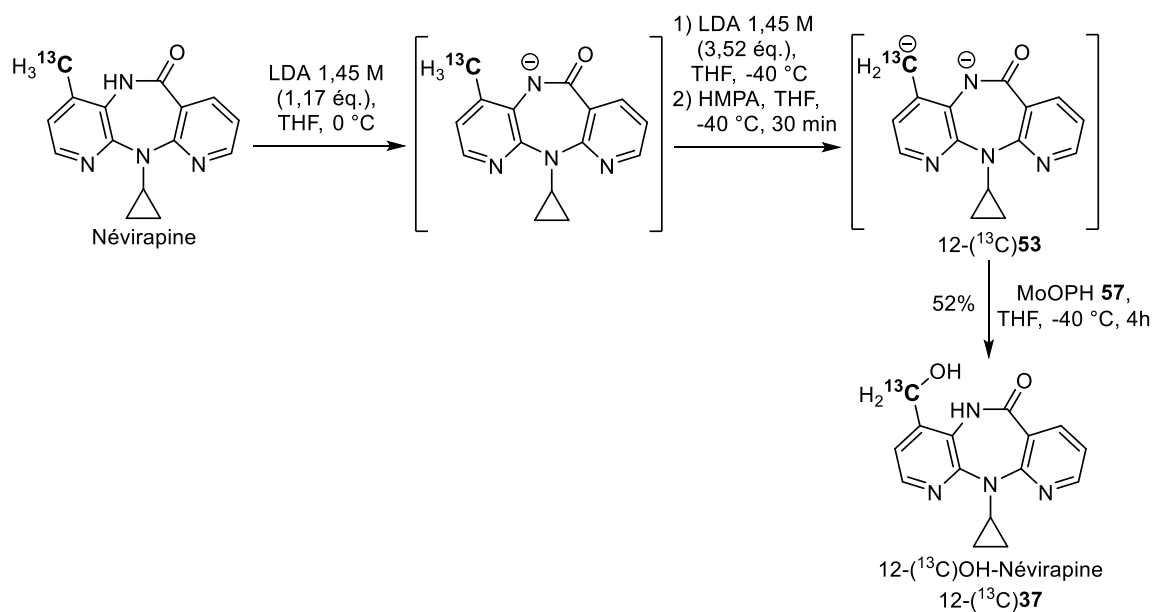


Figure III-30 : Préparation de la 12-(^{13}C)OH-Névirapine 12-(^{13}C)37

II.3.c. Hydroxylation de la Névirapine par une oxaziridine de Davis

De manière générale, le MoOPH **57** est un agent d'oxydation des énolates. Nous avons donc souhaité vérifier si d'autres oxydants, conçus pour réaliser le même type d'hydroxylation que le MoOPH, étaient capables de former la 12-OH-Névirapine **37** à partir du dianion **53**.

Les *N*-sulfonyloxaziridines développées par Franklin Davis et ses collaborateurs à la fin des années 1970^[209] et dans les années 1980^[210,211] ont particulièrement attiré notre attention.

Les oxaziridines sont des hétérocycles à trois chaînons contenant les atomes d'oxygène, d'azote et de carbone. Dans les oxaziridines de Davis, l'atome d'azote est substitué par un groupement sulfonyle (**Figure III-31**).

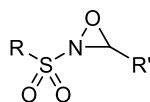


Figure III-31 : Structure générale d'une *N*-sulfonyloxaziridine

Tout comme le MoOPH, les *N*-sulfonyloxaziridines sont le plus souvent utilisées en synthèse organique comme source d'oxygène électrophile. Elles sont capables de transférer un atome d'oxygène sur une grande variété de nucléophiles.^[212] Certaines d'entre elles sont particulièrement intéressantes pour oxyder des substrats pro-chiraux avec une grande

stéréosélectivité. En particulier, l' α -hydroxylation stéréosélective des énolates par les oxaziridines de Davis a été très étudiée car les composés α -hydroxycarbonylés chiraux sont des intermédiaires clés dans la synthèse de nombreux produits à activité biologique. La (-)-camphorsulfonyloxaziridine joue par exemple un rôle crucial dans la première synthèse totale du paclitaxel, molécule cytotoxique très utilisée dans les traitements anti-cancéreux (**Figure III-32**). Cette synthèse totale a été publiée en 1994 par Holton et ses collaborateurs.^[213]

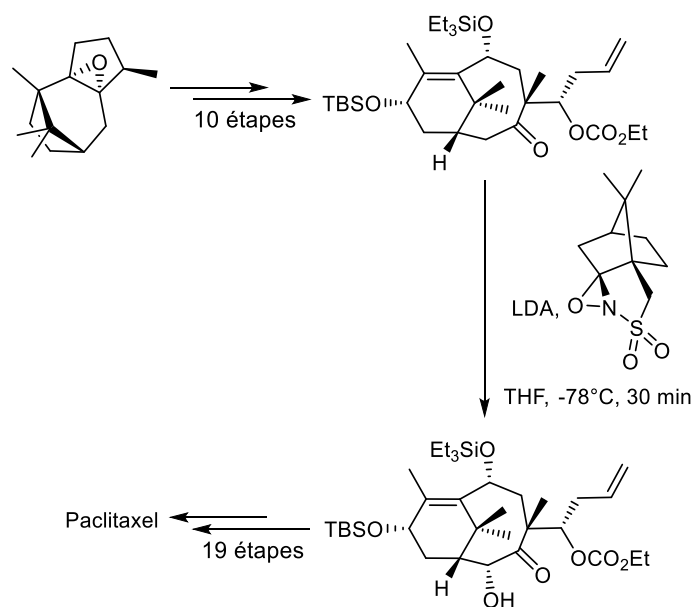


Figure III-32 : Etape d' α -hydroxylation par une *N*-sulfonyloxaziridine d'un intermédiaire de synthèse du paclitaxel^[213]

Le mécanisme d'oxydation par les *N*-sulfonyloxaziridines est similaire à celui du MoOPH. Nous avons donc voulu vérifier si, tout comme le MoOPH, les oxaziridines de Davis étaient capables d'hydroxyler la Névirapine.

La *N*-sulfonyloxaziridine **58** a été préalablement synthétisée par oxydation à l'oxone de l'imine commerciale **59** dans un milieu biphasique et tamponné par le carbonate de potassium. Le rendement de cette réaction est de 88% (**Figure III-33**).^[214]

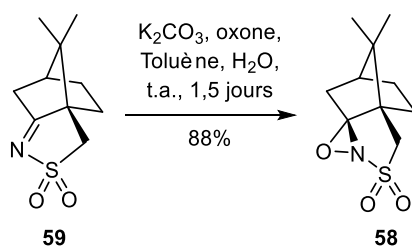


Figure III-33 : Préparation de l'oxaziridine de Davis **58**^[214]

Nous avons ensuite appliqué le protocole mis en place pour l'hydroxylation de la Névirapine en remplaçant le MoOPH **57** par l'oxaziridine de Davis **58** (Figure III-34). Après avoir formé le dianion **53** grâce à l'utilisation de deux portions successives de LDA, nous avons ajouté du HMPA et agité 30 minutes à -40 °C. L'oxaziridine **58** a ensuite été additionnée avant d'agiter à nouveau pendant 4 h à -40 °C. Par cette méthode, nous avons réussi à obtenir un brut réactionnel contenant un ratio 1 : 3 de Névirapine et de 12-OH-Névirapine, des produits d'oxydation et de dégradation non caractérisés issus de la Névirapine, ainsi que l'imine **59**, forme réduite de **58**.

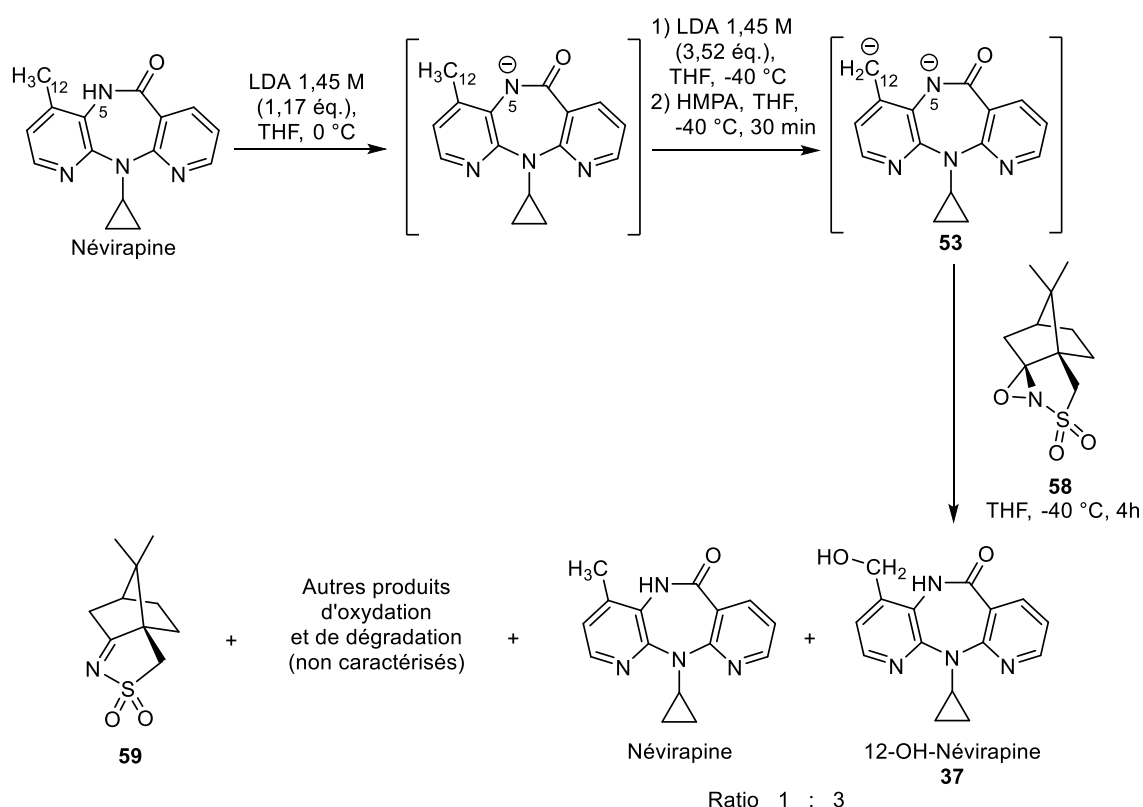


Figure III-34 : Hydroxylation du dianion **53** issu de la Névirapine par la *N*-sulfonyloxaziridine **58**

Nous avons effectué quelques essais en changeant le mode d'addition. En effet, l'ajout de la solution d'anion ou de dianion sur une solution d'oxaziridine **58** est plus habituel dans la littérature. Le temps de réaction a également été augmenté pour essayer d'améliorer la conversion de la Névirapine, mais aucune différence significative dans la composition du brut réactionnel n'a été observée. De plus, nous ne sommes pas parvenus à mettre en place une technique de purification efficace. L'oxaziridine de Davis **58** est donc capable de réaliser l'hydroxylation du dianion **53** de la Névirapine, mais l'utilisation du MoOPH **57** comme oxydant reste plus intéressante.

II.4. Synthèse de la 12-(¹³C)OH-Névirapine : bilan

La préparation de la 12-OH-Névirapine est l'étape de synthèse qui a présenté le plus de difficultés, en particulier lors de la purification du produit. Nous n'avons pas pu appliquer les méthodes récentes publiées en 2000 par Grozinger *et al.* en raison de leur incompatibilité avec notre objectif de substitution au carbone 13. Nous avons donc hydroxylé le dianion **53** issu de la Névirapine préparée au laboratoire. L'étape de préparation de **53** est déterminante pour la réussite de la réaction. Comme l'ont montré Patel et Proudfoot,^[198] la formation de **53** semble entrer en compétition avec la formation d'autres dianions menant à des produits d'oxydation différents de la 12-OH-Névirapine **37**. Un contrôle rigoureux de la température pendant toute la réaction et l'agitation du dianion avant l'étape d'oxydation a permis de faire évoluer le système vers la formation du dianion **53** souhaité. L'ajout de HMPA à la solution de **53** a amélioré considérablement la conversion de la Névirapine. La *N*-sulfonyloxaziridine **58** est capable d'hydroxyler **53**, mais le MoOPH **57** est un agent d'oxydation plus efficace dans ces conditions. Après avoir optimisé le mode opératoire ainsi que la technique de purification en combinant deux types de chromatographies, nous avons obtenu la 12-OH-Névirapine **37** avec un rendement de 43%. La 12-(¹³C)OH-Névirapine a été obtenue avec un rendement de 52%. Des traces résiduelles de 12-(¹³C)Névirapine ont été détectées dans le spectre RMN du carbone 13 du produit. Les synthèses de ces molécules sont résumées dans la **figure III-35**.

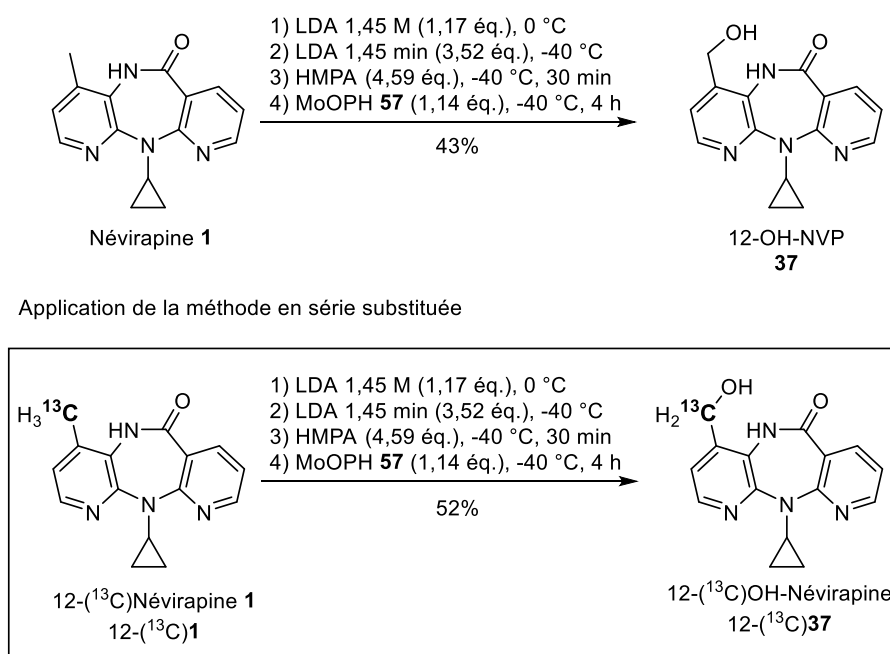


Figure III-35 : Bilan de la préparation de la 12-OH-Névirapine **37** et de son analogue substitué

III. Préparation de la 12-(¹³C)OH-Névirapine sulfate et de son analogue mésyle

Après avoir préparé le métabolite hépatique primaire 12-OH-Névirapine **37** et son analogue substitué au carbone 13, nous nous sommes intéressés à la synthèse du métabolite épidermique secondaire 12-(¹³C)OH-Névirapine sulfate. Nous avons également préparé la 12-(¹³C)mésyloxy-Névirapine afin de l'utiliser comme autre électrophile modèle. Dans cette section du chapitre, nous nous intéressons à la préparation de ces deux molécules à partir de la 12-(¹³C)OH-Névirapine.

III.1. Synthèse de la 12-(¹³C)OH-Névirapine sulfate

La 12-OH-Névirapine sulfate a été préparée pour la première fois par le groupe de Jack Utrecht et la synthèse a été publiée par Chen *et al.* en 2008^[79] (**Figure III-36**). Les auteurs proposent de traiter la 12-OH-Névirapine par le complexe de pyridine et de trioxyde de soufre (pyridine.SO₃) dans du diméthylformamide (DMF) à 0 °C. La 12-OH-Névirapine sulfate a été obtenue après une nuit d'agitation suivie d'une purification par extraction en phase solide.

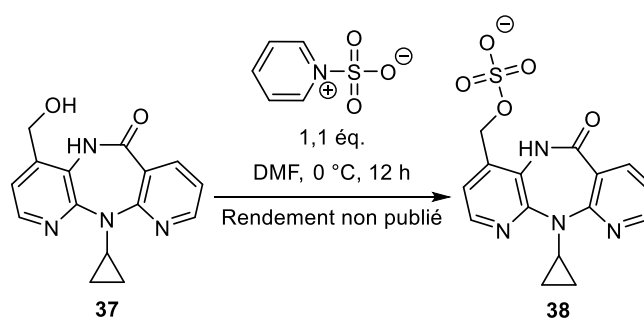
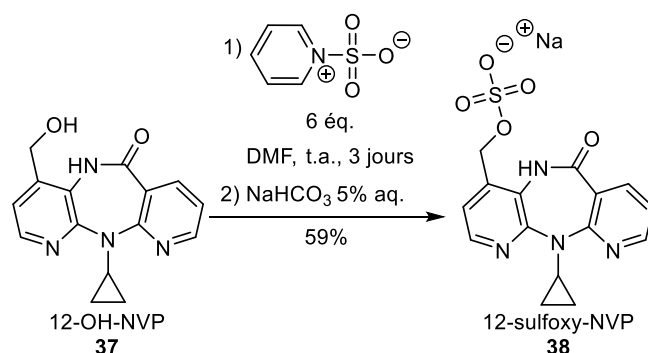


Figure III-36 : Synthèse de la 12-OH-Névirapine sulfate **38** publiée par Chen *et al.*^[79]

Le mode opératoire a été repris la même année par Antunes et ses collaborateurs,^[215] qui n'ont pas réussi à obtenir le sulfate **38**. Le groupe mené par Antunes a donc préféré travailler avec la 12-mésyloxy-Névirapine **39**. Les autres laboratoires travaillant sur le métabolisme de la Névirapine font référence à la publication de Chen *et al.*,^[79,216] d'autres ont eu la possibilité de recevoir la 12-OH-Névirapine sulfate de synthèse par Utrecht.^[217]

Au laboratoire, nous avons commencé par appliquer le mode opératoire de Chen et ses collaborateurs. La 12-OH-Névirapine **37** n'a pas pu être convertie complètement en sulfate **38**. Nous avons alors modifié les conditions expérimentales en utilisant 6 équivalents de pyridine.SO₃ et en poursuivant l'agitation trois jours à température ambiante pour consommer complètement l'alcool **37**.

Nous nous sommes également posé la question de la nature du contre-ion de la 12-OH-Névirapine sulfate qu'aucune publication ne mentionne. A l'issue de la sulfatation par le complexe pyridine.SO₃, le contre-ion est un pyridinium, ce qui est inhabituel en milieu biologique. Nous avons donc réalisé un échange avec le cation sodium grâce à un traitement par de l'hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO₃). Le protocole mis au point au laboratoire a abouti à la 12-OH-Névirapine sulfate de sodium **38** avec un rendement de 59%. La nature du contre-ion a été confirmée par microanalyse. La 12-(¹³C)OH-Névirapine sulfate de sodium a été obtenue avec un rendement de 46% (**Figure III-37**). Des traces résiduelles de 12-(¹³C)Névirapine ont été détectées dans le spectre RMN du carbone 13 correspondant.



Application de la méthode en série substituée

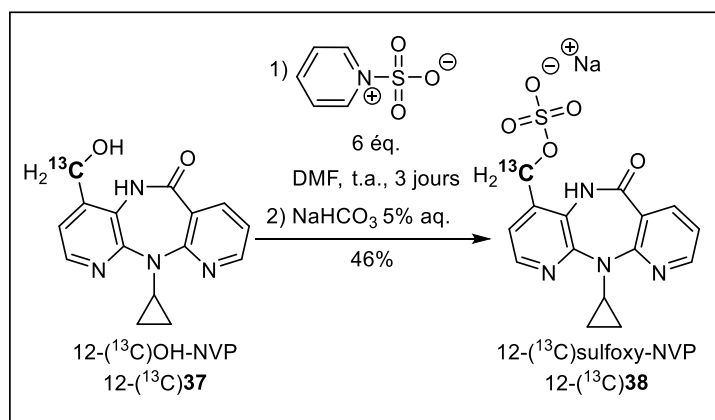


Figure III-37 : Préparation de la 12-OH-Névirapine sulfate **38** et de son analogue substitué 12-(¹³C)OH-Névirapine sulfate

III.2. Synthèse de la 12-(¹³C)mésyloxy-Névirapine

En plus de la Névirapine, de son métabolite hépatique primaire «alcool» et du métabolite secondaire «sulfate» supposé toxique, nous avons préparé la 12-mésyloxy-Névirapine **39** afin de l'utiliser comme électrophile modèle. Sa structure est proche du sulfate mais sa réactivité est supérieure. L'application de ce mésylate benzylique sur les épidermes humains reconstruits permettra de s'assurer de la réactivité des nucléophiles présents dans les modèles. De plus, la 12-mésyloxy-Névirapine **39** présente moins de problème de solubilité en phase organique que le sulfate **38**, le rendant plus facile à utiliser pour les tests de réactivité.

Nous avons dans un premier temps suivi la méthode publiée par Antunes *et al.*^[215] qui propose de traiter la 12-OH-Névirapine **37** par 0,81 équivalents de chlorure de méthanesulfonyle (MsCl) dans un milieu basifié par 0,81 équivalents de triéthylamine. Dans ces conditions, l'alcool **37** n'est pas totalement converti et nous avons obtenu un mélange de 12-mésyloxy-Névirapine **39** et de 12-chloro-Névirapine **60** qui se formerait à partir du mésylate lors de l'étape d'hydrolyse (**Figure III-38**).

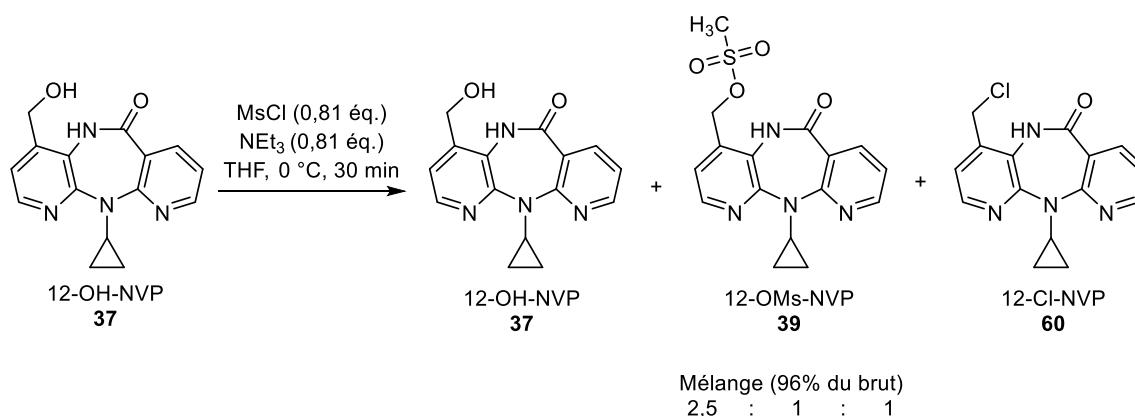
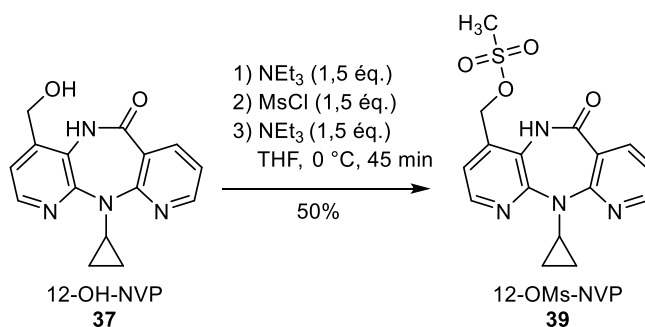


Figure III-38 : Résultats obtenus au laboratoire pour la synthèse de la 12-mésyloxy-Névirapine **39** par la méthode d'Antunes *et al.*^[215]

En augmentant la quantité de triéthylamine utilisée (deux portions représentant 1,5 équivalents chacune) et de chlorure de méthanesulfonyle (1,5 équivalents), la 12-OH-Névirapine **37** a pu être entièrement consommée et nous avons obtenu un mélange 1 : 0,3 de 12-mésyloxy-Névirapine **39** et de 12-chloro-Névirapine **60**. Après purification le produit **39** a été obtenu avec un rendement de 50%. Le même mode opératoire a abouti à la 12-(¹³C)mésyloxy-Névirapine avec un rendement de 52% (**Figure III-39**). Comme pour l'alcool et le sulfate, des traces résiduelles de 12-(¹³C)Névirapine ont été détectées dans le spectre RMN du carbone 13 correspondant.



Application de la méthode en série substituée

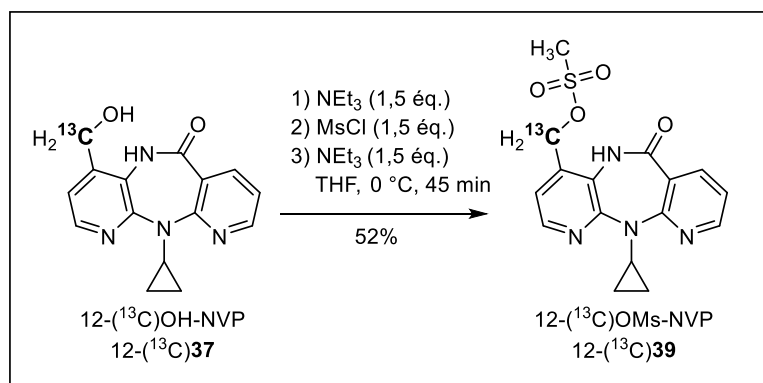


Figure III-39 : Préparation de la 12-mésyloxy-Névirapine **39** et de son analogue substitué 12-(¹³C)mésyloxy-Névirapine

IV. Synthèse de métabolites de la 12-(¹³C)Névirapine : conclusion

La 12-(¹³C)OH-Névirapine 12-(¹³C)**37** a été préparée à partir de la 12-(¹³C)Névirapine grâce à un agent d'hydroxylation à base de molybdène, le MoOPH. Cette réaction nécessite un contrôle rigoureux de la température et un ajout d'hexaméthylphosphotriamide afin d'augmenter la réactivité du dianion 12-(¹³C)**53** intermédiaire. Il n'a pas été possible de convertir complètement la 12-(¹³C)Névirapine et un mélange complexe de produits oxydés a été obtenu. La purification de ce produit reste donc longue et délicate mais nous avons réussi à obtenir un rendement de 52%. Il serait intéressant de poursuivre les investigations afin d'introduire la fonction alcool sur une pyridine intermédiaire plus simple comme nous l'avons tenté à partir de la 3-cyano-4-méthylpyridine **42**.

Une partie de l'alcool 12-(¹³C)**37** a été transformée en 12-(¹³C)OH-Névirapine sulfate avec un rendement de 46%. Le produit 12-(¹³C)**37** nous a également permis de préparer le 12-(¹³C)mésyloxy-Névirapine avec un rendement de 52%.

Les structures des molécules présentées dans ce chapitre sont rappelées dans la **figure III-40**.

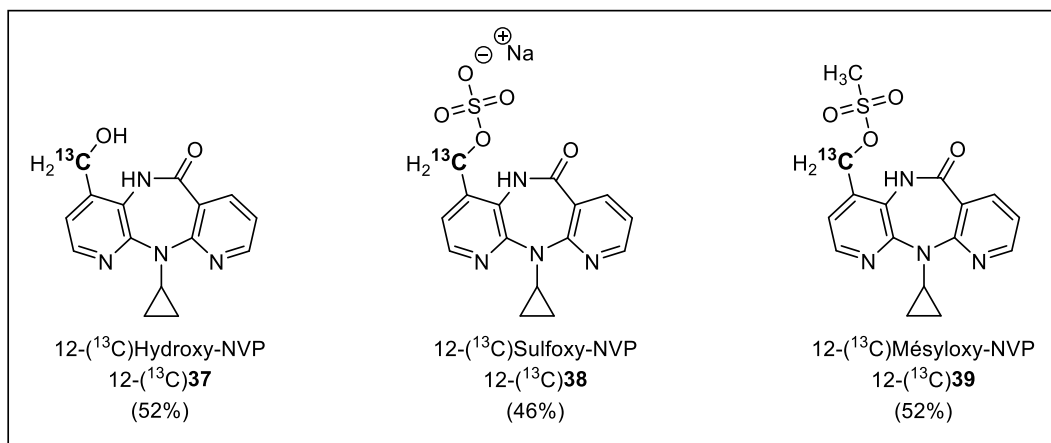


Figure III-40 : Dérivés de la Névirapine substitués au carbone 13 synthétisés dans ce travail de thèse

Chapitre IV

Réactivité de la 12-(¹³C)Névirapine et de ses dérivés dans des épidermes humains reconstruits

Chapitre IV

Réactivité de la 12-(¹³C)Névirapine et de ses dérivés dans des épidermes humains reconstruits

Le dernier chapitre de cette thèse est consacré à l'étude des interactions entre la 12-(¹³C)Névirapine et ses dérivés avec des épidermes humains reconstruits et en particulier à l'activation métabolique de la Névirapine dans la peau. Nous nous intéressons notamment à la formation possible de la 12-OH-Névirapine sulfate, métabolite supposé toxique, et à sa capacité à modifier les protéines épidermiques. Dans un premier temps, des études *in chemica* ont permis d'analyser la réactivité de la 12-(¹³C)mésyloxy-Névirapine, analogue du sulfate, vis-à-vis de plusieurs acides aminés. La 12-(¹³C)Névirapine et ses dérivés ont ensuite été appliqués sur les modèles d'épiderme humains reconstruits EpiSkin® dans le but d'étudier leur comportement *in stu*.

Ce chapitre s'articule en cinq parties. Nous évoquons d'abord le développement des modèles d'épidermes humains reconstruits, puis l'histoire et les principes physiques de la RMN HRMAS, avant de revenir sur les études antérieures combinant ces deux techniques. Les résultats des tests de réactivité de la 12-(¹³C)mésyloxy-Névirapine vis-à-vis de plusieurs acides aminés sont ensuite exposés. La fin de ce chapitre expose les résultats des études par RMN HRMAS de la réactivité de la 12-(¹³C)Névirapine et de ses dérivés dans les épidermes humains reconstruits EpiSkin®.

I. Les épidermes humains reconstruits

Comme nous l'avons expliqué précédemment, la formation d'un complexe antigénique stable entre un haptène et les protéines épidermiques pourrait être l'étape cruciale dans le déclenchement d'une toxidermie médicamenteuse. Certaines molécules, appelées pro-haptènes, ne sont pas toxiques en tant que telles mais le deviennent après transformation(s) enzymatique(s) au sein de l'épiderme. La Névirapine ferait partie de cette catégorie. Afin de mieux comprendre la bioactivation des pro-haptènes dans la peau et leurs interactions avec les nucléophiles biologiques, différents modèles d'étude ont été développés depuis les années 1930.

I.1. Modèles d'études des mécanismes d'interactions haptène-protéine : un peu d'histoire

Historiquement, les premiers travaux sur les interactions haptène-protéine se sont appuyés sur l'utilisation de l'aniline comme nucléophile modèle en parallèle d'études chez l'animal. Landsteiner *et al.* ont ainsi observé un lien entre la réactivité des molécules étudiées et la formation d'un complexe antigénique chez l'animal.^[218,219] Au fil du temps, les modèles utilisés ont cherché à se rapprocher des conditions d'interactions entre les haptènes et les protéines. Ainsi, dans les années 1980 ont été réalisées des études de réactivité avec des acides aminés comme la lysine, la cystéine et la glycine.^[220] Des petits peptides modèles ont également été utilisés.^[221] Enfin, dans les années 1990, ce sont les protéines et notamment l'albumine sérique humaine qui ont été mises en réaction avec des sensibilisants cutanés électrophiles.^[222]

Parallèlement aux études *in chemica* en solution se sont développées des techniques de culture cellulaire visant à reconstruire des épidermes aussi proches que possible de l'épiderme humain. Dans les années 1960, un premier modèle constitué de couches de kératinocytes cultivés à partir d'explants de peau a vu le jour.^[223] C'est en 1975 qu'a véritablement commencé l'histoire des épidermes humains reconstruits avec les travaux de Rheinwald et Green.^[85] En faisant proliférer des kératinocytes humains sur une trame de fibroblastes nourriciers, ils ont obtenu le premier épiderme reconstruit sous forme de lambeaux, mais sans couche cornée fonctionnelle. En 1983, un modèle possédant une couche cornée fonctionnelle a été mis au point par culture de kératinocytes sur un derme inerte servant de support.^[224] La couche cornée a été obtenue par exposition à l'air. Trois ans plus tard, un épiderme reconstruit a été cultivé sur un support dermique possédant des fibroblastes et capable de produire du collagène et d'autres molécules de la matrice extracellulaire.^[225] Depuis 1993, il existe des modèles d'épidermes reconstruits contenant également des mélanocytes indispensables à l'étude de la pigmentation cutanée et des effets des rayonnements ultraviolets.^[226] En 1997, les cellules de Langerhans ont été intégrées dans la composition de certains modèles d'épidermes humains reconstruits.^[227,228] Aujourd'hui, la culture de cellules de peau s'est démocratisée.^[229] Le développement des modèles a connu un véritable essor au début des années 2000, notamment afin de faire face au 7^{ème} amendement à la Directive Cosmétique Européenne qui interdit toute commercialisation de produits cosmétiques dont les ingrédients ont été testés sur les animaux.^[230] Les progrès techniques permettent de reconstruire des épidermes dont la structure, la composition, l'apparence et les fonctionnalités sont hautement similaires à celles de la peau humaine.^[231]

I.2. Les principaux modèles d'épidermes humains reconstruits

Plusieurs modèles d'épidermes humains reconstruits ont été mis au point et certains d'entre eux sont commercialisés. Ils diffèrent principalement par leurs propriétés structurales et par le support sur lequel les épidermes sont fixés.^[232] Dans les prochains paragraphes, nous nous attardons brièvement sur deux des modèles les plus connus, les modèles EpiDerm[®] (MatTek Corporation-Ashland, USA) et SkinEthic[®] (Episkin, France). Le troisième modèle, EpiSkin[®] (Episkin, France), qui a été choisi pour nos études, est présenté plus en détail.

Le modèle EpiDerm[®] a été mis sur le marché dès 1993. Une version «*full thickness*» composé de kératinocytes humains et d'un derme contenant des fibroblastes est également disponible. La compagnie MatTek décrit EpiDerm[®] comme un modèle multicouche hautement différencié formé d'une culture de kératinocytes humains normaux.

Le modèle SkinEthic[®] est reconstitué au contact de l'air par culture de kératinocytes humains normaux pendant 17 jours. Les cellules, bien différenciées, reposent sur un support inerte de polycarbonate. Le modèle possède une couche cornée ainsi que les différentes strates constituant l'épiderme humain naturel. Les épidermes humains reconstruits SkinEthic[®] ont été étudiés au laboratoire de Dermatochimie.^[4,6,233,234] Nous présenterons les travaux réalisés sur ce modèle dans une partie ultérieure de ce manuscrit. Ces épidermes présentent l'avantage d'être commercialisés en grand format (4 cm²) mais doivent être décollés de leur support sous l'action d'une enzyme, la dispase II.

I.3. Le modèle EpiSkin[®]

I.3.a. Présentation du modèle EpiSkin[®]

Pour nos études, nous avons choisi de travailler avec le modèle d'épiderme humain reconstruit EpiSkin[®]. Cet épiderme repose sur une matrice de collagène bovin de type I recouverte d'un film de collagène humain de type IV mimant le derme. L'épiderme est reconstitué à partir de kératinocytes de sujets adultes ayant subi des opérations de chirurgie esthétique, puis déposé sur la matrice de collagène. Morphologiquement, les épidermes humains reconstruits EpiSkin[®] possèdent toutes les couches des épidermes humains natifs (**Figure IV-1**). La couche cornée est cependant plus épaisse.

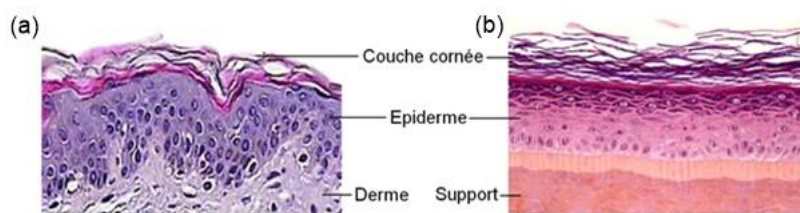


Figure IV-1 : Coupes histologiques d'un épiderme humain (a) et du modèle EpiSkin® (b)^[235]

Le modèle EpiSkin® est disponible en deux formats : le format large (1,07 cm²) que nous utilisons au laboratoire, et le format étroit (0,38 cm²).

1.3.b. Applications

A l'instar des modèles EpiDerm® et SkinEthic®, les épidermes humains reconstruits EpiSkin® peuvent être mis en contact avec des xénobiotiques afin de réaliser des tests d'irritation,^[236] de corrosion,^[237] ou encore de phototoxicité.^[238] Ils servent également pour acquérir des données sur le transport de molécules à travers l'épiderme. Les applications font l'objet de validations par le Centre Européen pour la Validation de Méthodes Alternatives (*European Centre for the Validation of Alternative Methods – ECVAM*). Les protocoles validés sont d'ailleurs proposés par EpiSkin®.

La présence dans ces modèles des systèmes enzymatiques de phase I et de phase II du métabolisme cutané a été démontrée. En 2009, les niveaux d'expression de 61 enzymes ont été étudiés par quantification de l'expression de leurs ARN messagers, et comparés avec ceux des enzymes dans des échantillons *ex vivo* de peau humaine.^[239] Les profils d'expression ont été similaires avec quelques exceptions, notamment celui des enzymes à cytochromes P450 qui semblent moins exprimées. Plus récemment, en 2014, les activités apparentes de plusieurs enzymes ont été déterminées grâce à l'utilisation de substrats fluorescents dans des épidermes humains reconstruits, et notamment dans le modèle EpiSkin®.^[235] Les résultats montrent que les modèles sont similaires à la peau humaine en terme de métabolisme des xénobiotiques (**Tableau IV-1**). Trois classes d'enzymes ont été étudiées et clairement identifiées dans les modèles : les oxydoréductases, les transférases et les hydrolases. Cette caractéristique des modèles est cruciale dans notre étude qui repose sur la bioactivation de la Névirapine dans l'épiderme.

-	-	Cytochromes P450 (CYP450)	1A1 / 1B1, 2B6 / 2E1, 3A5 / 3A7...
EC 1	Oxydoréductases	Alcool / Aldéhyde déshydrogénases (ADH / ALDH)	EC 1.1.1.1 / EC 1.2.1.3
		Peroxydases	EC 1.11.x
EC 2	Transférases	Catéchol- <i>O</i> -méthyl transférases (COMT)	EC 2.1.1.6
		<i>N</i> -acétyltransférases (NAT)	EC 2.3.1
		Glucuronosyltransférases (UGT)	EC 2.4.1.17
		Glutathion <i>S</i> -transférases (GST)	EC 2.5.1.18
		Sulfotransférases (SULT)	EC 2.8.2.x
EC 3	Hydrolases	Estérases (ES)	EC 3.1.x

Tableau IV-1 : Systèmes enzymatiques actifs identifiés dans les épidermes humains reconstruits^[235]

II. La RMN HRMAS, une technique d'analyse de choix

La RMN HRMAS (High-Resolution Magic Angle Spinning) est une technique dérivée de la RMN du solide développée à l'origine pour suivre des réactions chimiques et étudier des structures semi-solides. Pour cela, l'échantillon tourne à une fréquence de rotation élevée en formant un angle de 54,7 ° avec le champ magnétique principal (**Figure IV-2**).

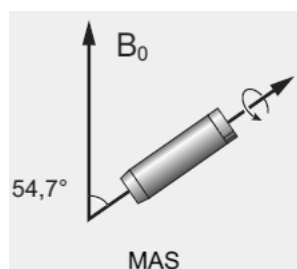


Figure IV-2 : Echantillon en rotation à l'angle magique par rapport au champ magnétique principal B_0 ^[86]

En RMN HRMAS, il est possible d'obtenir des spectres de haute qualité, proche de celle obtenue par RMN en phase liquide homogène.

Dans cette partie, nous faisons un bref rappel sur l'histoire de cette technique avant de passer à son aspect théorique. Différentes applications de la RMN HRMAS sont ensuite évoquées.

II.1. Un peu d'histoire

La RMN HRMAS a vu le jour dans les années 1950. En 1959,^[240] Andrew *et al.* ont étudié par RMN du sodium 23 l'effet de l'inclinaison d'un tube rempli de chlorure de sodium. Pour des angles allant de 50 ° à 100 °, ils ont mesuré la largeur du signal correspondant.

Pour la première fois, un affinement maximal du signal a été observé pour un angle d'inclinaison très précis de $54,7^\circ$, appelé angle magique. Cet effet s'explique par l'élimination de l'interaction magnétique dipôle-dipôle, également appelée couplage dipolaire. Parallèlement aux travaux d'Andrew *et al.*, Lowe a montré la présence de bandes de rotation latérales sur des spectres acquis en RMN du fluor 19 à partir d'échantillon de fluorure de calcium ou de téflon tournant à l'angle magique.^[241] Ces bandes latérales, caractéristiques d'une anisotropie résiduelle (inhomogénéités de champ), peuvent être supprimées en augmentant significativement la vitesse de rotation de l'échantillon. En 1975, Doskočilová *et al.* ont démontré, sur un système hétérogène modélisé par un solvant contenant des billes de verre, qu'une vitesse de rotation élevée associée à l'inclinaison à l'angle magique supprimait les différences de susceptibilités magnétiques dues à la nature du système.^[242] L'ensemble de ces expériences a montré l'effet «magique» de la rotation à $54,7^\circ$ à grande vitesse d'un échantillon hétérogène sur les couplages dipolaires, les inhomogénéités de champ et les différences de susceptibilités magnétiques. Elles ont apporté la preuve que la RMN HRMAS avait la capacité de moyenniser ces mécanismes d'élargissement des raies afin d'acquies des spectres de qualité sur des échantillons hétérogènes.

II.2. Principes de base de la RMN HRMAS

Dans un milieu liquide homogène, l'environnement autour d'une molécule est isotrope. En d'autres termes, l'environnement est identique dans toutes les directions de l'espace. Seuls les déplacements chimiques et les couplages indirects (appelés couplages scalaires J) ne sont pas moyennés. Par opposition, dans un solide, les mouvements des molécules sont faibles, parfois inexistant, et le milieu est anisotrope. En plus des déplacements chimiques et des couplages scalaires, d'autres paramètres ne sont pas moyennés. En particulier, plusieurs phénomènes sont à l'origine d'une augmentation de la largeur du signal :

- Les interactions dipolaires. Elles proviennent du couplage dans l'espace des moments magnétiques de deux noyaux.

- Les différences de susceptibilités magnétiques. Elles caractérisent la capacité d'un matériau à s'aimanter sous l'effet d'un champ magnétique.

- L'anisotropie de déplacement chimique. Lorsqu'une molécule possède différentes orientations dans l'espace, comme c'est le cas dans un milieu anisotrope, un même noyau ne va pas être influencé de manière identique par le champ magnétique local. Un même spin va donc subir différentes constantes d'écran en fonction de son orientation par rapport à l'environnement. Ainsi, le signal obtenu est élargi car il correspond à une somme d'un ensemble de signaux.

-Les interactions quadripolaires. Elles concernent les noyaux de spin supérieur à $\frac{1}{2}$ et sont liées à la distribution du nuage électronique de l'atome.

La RMN HRMAS a la faculté de moyenniser ces mécanismes d'élargissement grâce à la rotation rapide de l'échantillon à l'angle magique.

II.3. Applications de la RMN HRMAS

Afin de pouvoir étudier un solide par RMN HRMAS, celui-ci doit tout de même posséder un certain degré de liberté. Ainsi, cette technique est particulièrement adaptée à l'analyse de solides mous : résines, gels, polymères, catalyseurs, aliments, plantes, tissus biologiques, etc. La liste d'applications de la RMN HRMAS est longue. Nous proposons ici quelques exemples.

II.3.a. La RMN HRMAS en chimie

En chimie, la RMN HRMAS trouve son plus grand intérêt pour l'étude de la synthèse de molécules sur support solide. Cette technique de synthèse repose sur l'utilisation d'une résine solide sur laquelle sont greffées, généralement de façon covalente, les molécules qui doivent réagir. Des synthèses multi-étapes peuvent être réalisées, comme si le chimiste ajoutait des maillons à une chaîne. Or, pour analyser les molécules intermédiaires par RMN en phase liquide, celles-ci doivent être détachées de la résine. Afin de contourner ce problème, Stöver *et al.* ont proposé dès 1989 d'utiliser la RMN HRMAS.^[243] Les auteurs ont montré que l'on pouvait obtenir des spectres RMN de haute résolution de l'éphédrine greffée à une résine de polystyrène gonflée dans du chloroforme deutéré. Depuis cette première expérience, la RMN HRMAS a permis d'étudier de nombreux composés fixés à des résines insolubles.^[244,245] Dans un exemple récent, Posset *et al.* ont mis à profit la RMN HRMAS pour caractériser les intermédiaires réactionnels d'une réaction de Sonogashira avec le catalyseur ancré sur un support solide à base de silice.^[246]

II.3.b. La RMN HRMAS en biologie

La RMN HRMAS a été utilisée pour l'analyse d'échantillons biologiques variés et parfois très complexes.

Dans un premier temps, des produits biologiques membranaires ont été étudiés en suspension aqueuse.^[247,248] Ces travaux ont été très importants pour l'analyse des systèmes membranaires et notamment pour commencer à comprendre l'agencement des polysides, des lipides et des peptides constitutifs ou associés à une membrane cellulaire.^[249,250]

Les expériences sur les membranes ont ouvert la porte aux travaux de RMN HRMAS sur des systèmes plus complexes comme les cellules et les tissus. Les composés membranaires ont ainsi pu être étudiés non plus en suspension aqueuse mais directement à la surface des bactéries.^[251]

La RMN HRMAS a également été utilisée pour caractériser *in situ* des métabolites présents dans plusieurs types cellulaires. On peut par exemple citer l'étude des métabolites de la glie dans des cellules isolées à partir de cerveaux de rats^[252] ou encore les travaux publiés par Humpfer *et al.* sur les cellules sanguines humaines.^[253]

En 1996, Cheng *et al.* ont étendu l'utilisation de la RMN HRMAS à des tissus biologiques en réalisant des spectres de nodules lymphatiques.^[254] En raison de la forte teneur en acides gras des échantillons, les auteurs ont utilisé une séquence CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) qui a atténué les signaux en fonction de leurs temps de relaxation et leur a permis d'obtenir des spectres monodimensionnels du proton bien résolus. Leurs études ont d'ailleurs permis de caractériser des cellules malignes présentes dans les nodules. En 1997, les mêmes auteurs ont mis en évidence un lien entre l'analyse qualitative et quantitative des tissus par RMN HRMAS et leur histopathologie.^[255] En particulier, en étudiant la maladie de Pick (maladie neurodégénérative), ils se sont aperçus que le taux de *N*-acétylaspartate était lié à la dégénérescence. La RMN HRMAS leur a également permis de montrer une différence de temps de relaxation entre les métabolites des régions atteintes et ceux des régions saines.

Les travaux de Cheng *et al.* ont été suivis par de très nombreuses recherches sur les tissus biologiques par RMN HRMAS. Des travaux sur divers tissus et organes ont vu le jour. Le cerveau, la prostate, le foie, les reins, le cœur, l'utérus, l'œil, le sein ou les muscles ont vu leur métabolome étudié par RMN HRMAS.^[256] Ainsi, cette technique est très utile en métabolomique, science qui analyse l'ensemble des métabolites présents dans une cellule ou un tissu.^[257] En particulier, la RMN HRMAS associée à la métabolomique est un outil précieux pour la recherche en cancérologie^[258,259] et peut même servir d'outil de diagnostic des cancers.^[260,261]

II.3.c. La RMN HRMAS en agronomie et en agroalimentaire

La caractérisation des produits agroalimentaires est un autre exemple d'application de la RMN HRMAS. En effet, de nombreux produits agroalimentaires sont des solides mous qui se prêtent donc parfaitement à cette technique. La détermination de la composition des produits par RMN HRMAS permet parfois de déterminer une origine géographique, de vérifier une étape de production ou être utilisée pour un contrôle de qualité.

Dès 1989, l'analyse de graines de tournesol et de haricot par RMN HRMAS a permis de déterminer leurs compositions lipidiques.^[262] Plus récemment, en 2007, l'origine de pains italiens a pu être identifiée en associant la RMN HRMAS avec d'autres outils analytiques comme la spectrométrie de masse.^[263] La RMN HRMAS a également été utilisée pour déterminer le niveau d'hydratation de granules d'amidon, propriété liée à la qualité de certaines céréales.^[264] Des produits animaux comme la viande d'agneau,^[265] de bœuf,^[266] ou encore le saumon fumé^[267] ont vu leur profil métabolique étudié par RMN HRMAS. Les fromages italiens ont également été très étudiés, notamment le célèbre parmigiano reggiano dans les années 2000^[268] et la mozzarella di bufala campana plus récemment.^[269] En 2000, une étude sur la composition de la pulpe et du jus de mangue a permis de suivre les modifications biochimiques survenant lors du mûrissement des fruits.^[270]

La RMN HRMAS peut aussi permettre d'étudier les pesticides dans les sols en permettant par exemple de travailler avec des prélèvements hydratés comme les argiles.^[271] En 2006, l'équipe toulousaine de RMN Biomédicale a analysé par RMN HRMAS du phosphore 31 et du proton les métabolites d'un ver de terre, ce qui a permis de conclure sur la dispersion du glyphosate dans les sols,^[272] herbicide actuellement très controversé et dont l'autorisation fait débat au niveau européen.

Qu'elles soient appliquées à la chimie, la biologie, la médecine ou l'agroalimentaire, ces nombreuses études montrent que la RMN HRMAS est une technique polyvalente et innovante.

III. Les épidermes humains reconstruits associés à la RMN HRMAS pour l'étude des interactions haptènes-protéines

Depuis plusieurs années, le laboratoire de Dermatochimie développe l'utilisation de molécules substituées au carbone 13 en association avec la résonance magnétique nucléaire pour l'étude, au niveau moléculaire, des interactions entre les molécules toxiques et les biomolécules telles que les protéines. Récemment, cette approche a été étendue à l'étude par RMN HRMAS des épidermes humains reconstruits SkinEthic®.^[4]

III.1. Etude du modèle d'épiderme humain reconstruit SkinEthic® en RMN HRMAS

En 2013, le laboratoire de Dermatochimie s'est intéressé à l'analyse de plusieurs échantillons d'épidermes humains reconstruits SkinEthic® par RMN HRMAS.^[4]

Dans un premier temps, il a été montré que la centrifugation et le changement de température altéraient peu leur qualité. Cette stabilité des échantillons au cours de l'analyse est indispensable pour garantir des études fiables et reproductibles. En effet, il avait déjà été montré que d'autres tissus pouvaient être affectés par les analyses HRMAS.^[273,274]

Deuxièmement, le modèle d'épiderme a été caractérisé par RMN HRMAS. Les composants des épidermes humains reconstruits observables en RMN HRMAS ont été attribués en croisant les données provenant des tables de déplacements chimiques de la littérature avec des expériences de corrélations homonucléaires $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ (DIPSI) et hétéronucléaires $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ (HSQC) (**Figure IV-3**). Une vingtaine d'acides aminés a été répertoriée dans l'épiderme. Il convient de préciser qu'un filtre CPMG est habituellement utilisé afin d'atténuer les signaux dus aux macromolécules.

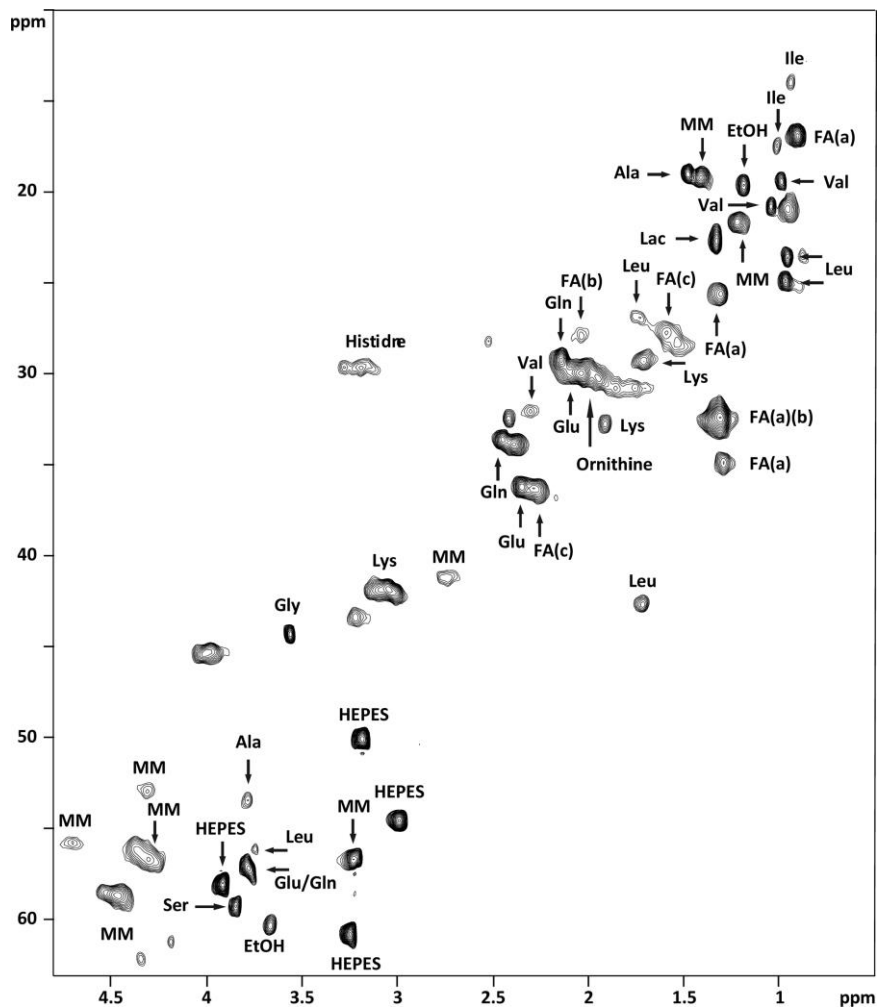


Figure IV-3 : Spectre HSQC de l'épiderme humain reconstruit « blanc » obtenu par RMN HRMAS^[4]

Pour nos études sur la Névirapine, nous avons choisi le modèle d'épiderme humain reconstruit EpiSkin[®] qui est plus simple d'utilisation.

Au laboratoire, des expériences de RMN HRMAS 1D et 2D ont déjà été réalisées sur plusieurs échantillons d'épidermes humains reconstruits SkinEthic[®] et EpiSkin[®] et les résultats ont été très semblables. Les changements de température et les effets de la force centrifuge due à la rotation des échantillons à grande vitesse n'ont pas été significatifs. La caractérisation par RMN HRMAS du modèle EpiSkin[®] (résultats non publiés) montre qu'il est hautement similaire à l'épiderme SkinEthic[®].

III.2. Etude de l'interaction entre des haptènes et les épidermes humains reconstruits en RMN HRMAS

Pour aller plus loin, le laboratoire de Dermatochimie a développé un protocole en plusieurs étapes permettant de suivre par RMN HRMAS la réactivité des haptènes dans les épidermes humains reconstruits. Les molécules cibles substituées au carbone 13 sont d'abord synthétisées. Elles sont ensuite appliquées sur les épidermes humains reconstruits, en solution dans un solvant servant de véhicule pour la pénétration dans l'épiderme. Après incubation à 37 °C, les épidermes sont congelés à -80 °C. Des échantillons sont préparés à froid et les données sont acquises en RMN HRMAS à 4 °C.^[4]

Le premier haptène analysé selon cette méthode est le dodécanesulfonate de (¹³C)méthyle (**Figure IV-4**). La présence d'adduits avec les protéines épidermiques a été confirmée par l'apparition de nouvelles corrélations sur les spectres 2D HSQC, en comparaison avec les tâches de corrélation existant déjà dans un épiderme «blanc».

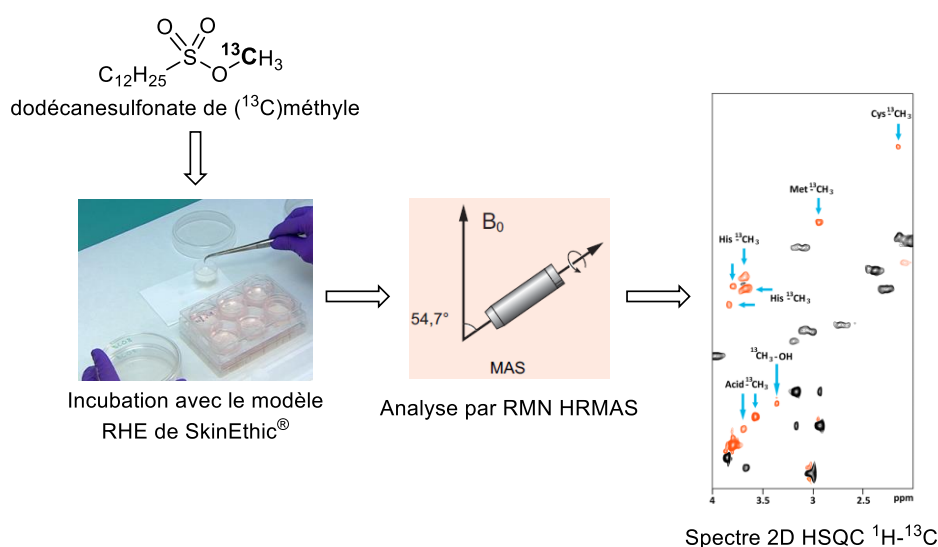


Figure IV-4 : Etude de la réactivité du dodécanesulfonate de (¹³C)méthyle avec le modèle RHE de SkinEthic[®] par RMN HRMAS

Les travaux de 2013 constituent une preuve de concept de l'utilisation de la RMN HRMAS sur les épidermes humains reconstruits comme nouveau modèle d'étude des interactions haptènes-protéines. Depuis, d'autres haptènes ont été testés selon le même protocole avec succès.^[5,233]

III.3. Etude de l'activation métabolique et de la réactivité de pro-haptènes dans des épidermes humains reconstruits en RMN HRMAS

Comme nous l'avons mentionné précédemment, il a été montré que les modèles d'épidermes humains reconstruits possédaient un matériel enzymatique comparable à celui d'un épiderme natif. Ils seraient donc théoriquement capables de transformer des pro-haptènes non toxiques en haptènes. Ainsi, entre 2013 et 2015, l'activation métabolique dans des épidermes humains reconstruits de trois familles de pro-haptènes a été étudiée par RMN HRMAS.^[234] La transformation de ces pro-haptènes a permis de confirmer la présence et l'activité dans les épidermes humains reconstruits de plusieurs enzymes comme les peroxydases et les mono-oxygénases à cytochromes P450.

Plus récemment, c'est la bioactivation de l'alcool cinnamique qui a été analysée.^[6] Molécule odorante très utilisée en parfumerie, l'alcool cinnamique est un allergène bien connu. La théorie communément admise permettant d'expliquer ce potentiel allergisant est son oxydation par une alcool deshydrogénase épidermique en un aldéhyde réactif vis-à-vis des nucléophiles de la peau (**Figure IV-5**).

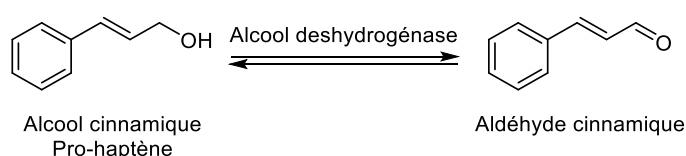


Figure IV-5 : Voie d'activation communément admise de l'alcool cinnamique dans l'épiderme

Contrairement à cette théorie, l'incubation de l'alcool cinnamique substitué au carbone 13 avec des épidermes humains reconstruit suivie de l'analyse des échantillons par RMN HRMAS n'a pas mis en évidence la formation de cinnamaldéhyde. Les métabolites détectés par cette technique pourraient correspondre à la formation d'autres espèces réactives comme un époxy-alcool et un sulfate allylique (**Figure IV-6**). Le protocole d'étude des épidermes humains reconstruits par RMN HRMAS a donc permis de proposer des voies métaboliques alternatives pour l'activation de l'alcool cinnamique dans la peau.

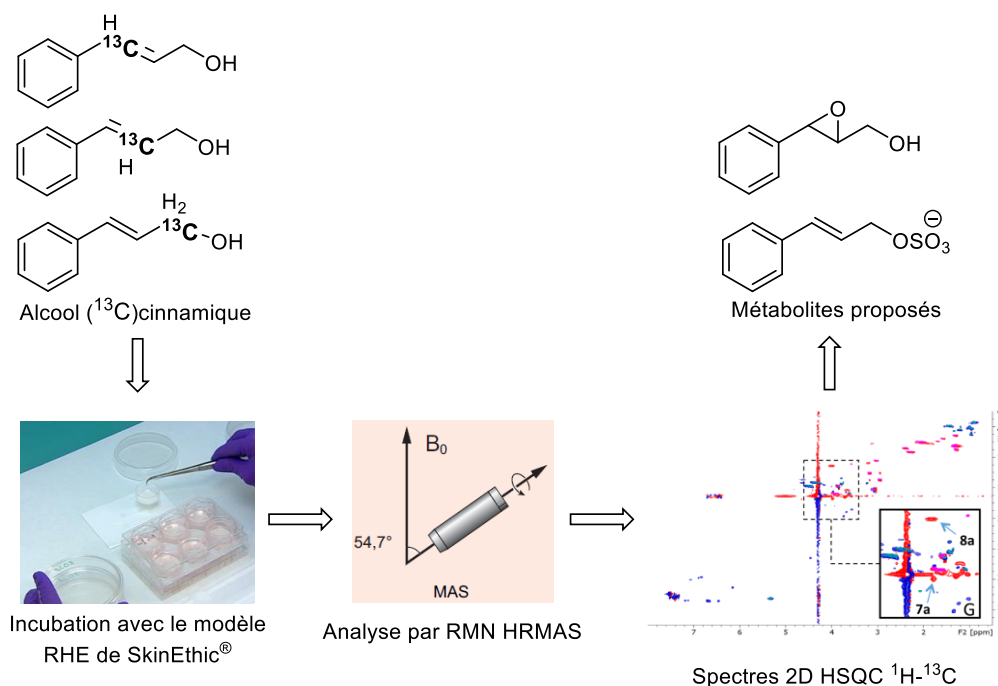


Figure IV-6 : Utilisation du protocole de RMN HRMAS sur les épidermes humains reconstruits pour l'étude de l'activation métabolique de l'alcool cinnamique

A la lumière de ces travaux, nous proposons dans ce travail de thèse d'aller plus loin en étudiant, dans des épidermes humains reconstruits, l'activation métabolique de la Névirapine. Cet antirétroviral n'est pas appliqué sur la peau mais peut subir une activation métabolique primaire dans le foie avant de déclencher de graves toxidermies.

IV. Réactivité de la 12-(^{13}C)mésoxy-Névirapine en phase liquide

En 2010, Antunes et ses collaborateurs^[275] ont synthétisé et caractérisé des adduits entre la 12-mésoxy-Névirapine et des nucléophiles biologiques. La 12-mésoxy-Névirapine, plus soluble et plus réactive que le sulfate, permet de greffer la Névirapine à plusieurs types de nucléophiles. Nous avons complété la base de données publiée par Antunes *et al.*^[275] avec une méthodologie différente en mettant en réaction dans un tube RMN la 12-(^{13}C)mésoxy-Névirapine avec des acides aminés nucléophiles. Les informations ainsi récoltées en phase liquide faciliteront l'interprétation des spectres de RMN HRMAS acquis à partir des modèles d'épidermes humains reconstruits incubés avec la Névirapine et ses dérivés.

IV.1. Acides aminés sélectionnés et protocole expérimental

Les acides aminés ont été sélectionnés pour leur réactivité vis-à-vis des xénobiotiques. Cinq acides aminés possédant un groupement nucléophile sulfuré, oxygéné ou aminé ont été choisis : la cystéine (cys), la lysine (lys), la tyrosine (tyr), l'arginine (arg), et l'histidine (his)

(**Figure IV-7**). Les extrémités *N*-terminales des acides aminés sont acétylées. Selon leurs solubilités dans le solvant d'essai, les acides aminés *N*-acétylés ont été testés soit dans leur version acide carboxylique, soit sous leur forme estérifiée. Les acides aminés ont d'abord été testés en milieu aqueux. Pour la tyrosine, nous avons complété les études par des tests dans le DMSO deutéré.

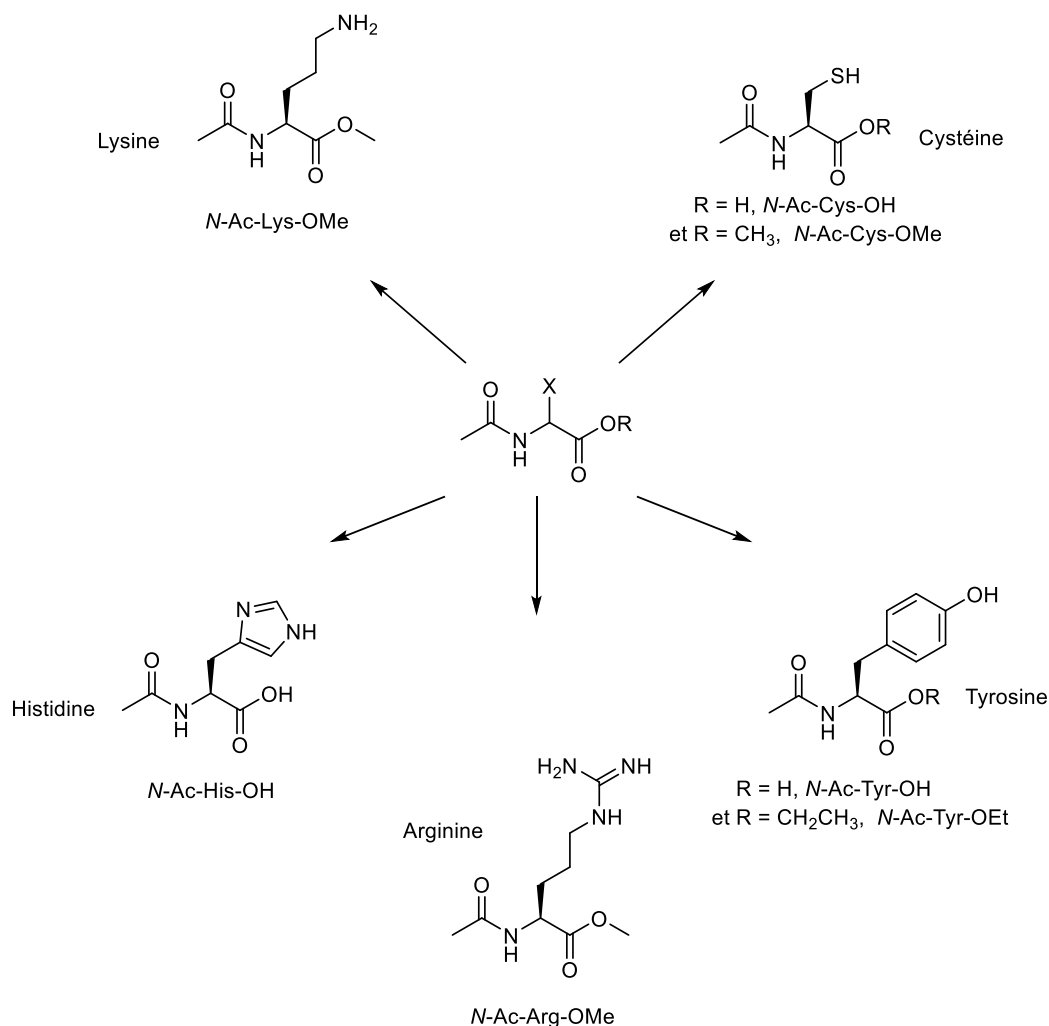


Figure IV-7 : Acides aminés sélectionnés pour les études de réactivité en solution de la 12- ^{13}C mésyloxy-Névirapine

Pour les tests en milieu aqueux, l'acide aminé a été solubilisé dans un tampon phosphate (pH 7,4). D'autre part, la 12- ^{13}C mésyloxy-Névirapine a été mise en solution dans l'acétonitrile deutéré (CD_3CN). Ce mélange de solvants organique et aqueux se veut plus proche des phénomènes observés dans les épidermes humains reconstruits qu'un solvant organique seul. Juste avant la première analyse, 300 μL de chaque solution ont été prélevés et mélangés avant de transférer ce milieu réactionnel dans un tube RMN. Les concentrations des deux solutions ont été calculées afin de mettre en réaction dix équivalents d'acide aminé pour un équivalent de 12- ^{13}C mésyloxy-Névirapine.

En ce qui concerne la tyrosine, des analyses complémentaires ont été réalisées dans le DMSO deutéré pour des raisons de solubilité.

Un premier spectre RMN a été réalisé après 15 minutes (durée de la préparation du tube et des acquisitions) puis au bout de 2 heures, 6 heures, 24 heures, 4 jours, et un mois. Au bout d'un mois, une expérience bidimensionnelle HSQC ^1H - ^{13}C a été effectuée puis le contenu du tube RMN a été repris et analysé par LC-MS afin de confirmer et compléter les données (**Figure IV-8**).

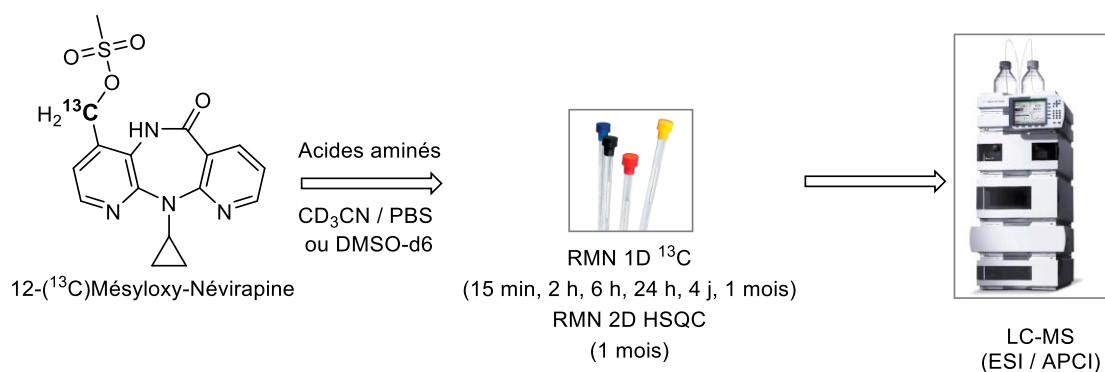


Figure IV-8 : Protocole expérimental mis en place pour l'analyse de la réactivité en solution de la 12- ^{13}C mésyloxy-Névirapine

IV.2. Réactivité de la 12- ^{13}C mésyloxy-Névirapine en milieu aqueux

IV.2.a. Comportement de la 12-mésyloxy-Névirapine en l'absence d'acide aminé (tube témoin)

Dans un premier temps, le comportement de la 12-mésyloxy-Névirapine dans le mélange CD_3CN / tampon phosphate a été étudié en série non substituée au carbone 13. Nous souhaitons évaluer la vitesse d'hydrolyse de la molécule en 12-hydroxy-Névirapine (**Figure IV-9**).

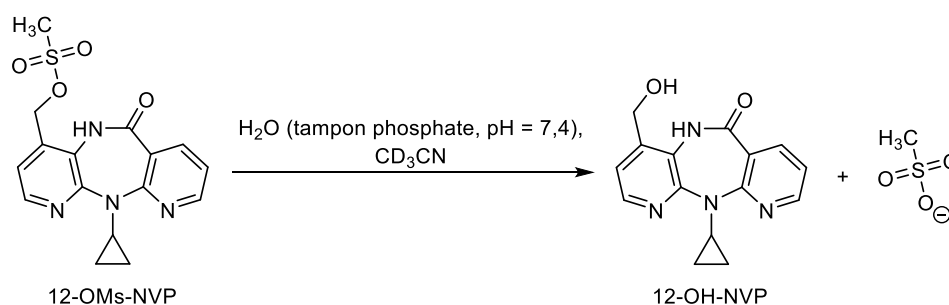


Figure IV-9 : Hydrolyse de la 12-mésyloxy-Névirapine (12-OMs-NVP) dans le tube RMN

En effet, une hydrolyse trop rapide nous aurait empêchés d'étudier sa réactivité vis-à-vis de nucléophiles différents de l'eau. La 12-mésyloxy-Névirapine a été solubilisée dans le mélange de solvant et des spectres RMN au bout de 15 minutes, 2 heures, 6 heures et 24 heures ont été réalisés (**Figure IV-10**).

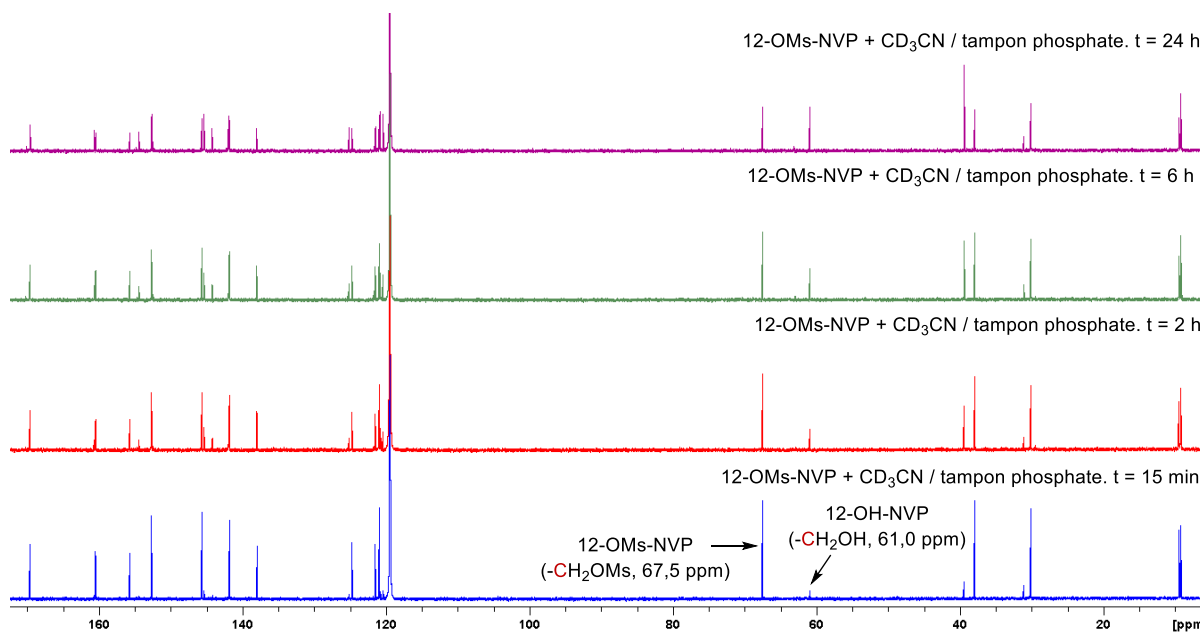


Figure IV-10 : Suivi cinétique de l'hydrolyse de la 12-mésyloxy-Névirapine (12-OMs-NVP) par RMN ^{13}C

L'hydrolyse du mésyle s'observe facilement par la disparition progressive du signal à 67,5 ppm au profit de l'apparition du signal correspondant à la molécule hydrolysée en 12-OH-Névirapine, moins déblindé, à 61,0 ppm.

On observe qu'au bout de 24 heures dans ce milieu, il reste une quantité significative de 12-mésyloxy-Névirapine dans le tube RMN. Il est donc possible de travailler dans le mélange CD_3CN / tampon phosphate pour nos études de réactivité.

IV.2.b. Réactivité de la 12- (^{13}C) mésyloxy-Névirapine avec les acides aminés en milieu aqueux

• Réactivité de la 12- (^{13}C) mésyloxy-Névirapine avec la cystéine

La 12- (^{13}C) mésyloxy-Névirapine a été mise en réaction avec l'ester méthylique de la *N*-acétylcystéine. En bloquant le carboxylate de l'acide aminé, notre objectif était de former uniquement des adduits avec la chaîne latérale soufrée qui est la seule fonction nucléophile restante (**Figure IV-11**).

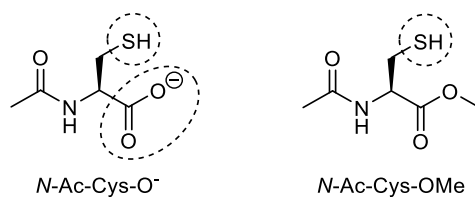


Figure IV-11 : Structures de la *N*-acétylcystéine, de son ester méthylique et groupements réactifs possibles (entourés en pointillés)

La 12- (^{13}C) mésyloxy-Névirapine est très réactive vis-à-vis de la *N*-Ac-Cys-OMe (**Figure IV-12**). En effet, il n'a fallu que le temps de préparation du tube et de l'acquisition RMN (15 minutes environ) pour consommer entièrement la 12- (^{13}C) mésyloxy-Névirapine. Un adduit (^{13}C) **61a** se forme immédiatement, donnant des signaux dans la zone de déplacement chimique attendue pour une liaison $^{13}\text{CH}_2\text{-S}$ (32,1 ppm et 32,3 ppm). Le produit d'hydrolyse (12- $(^{13}\text{C})\text{OH-NVP}$) à 60,7 ppm est également détecté dès les premières acquisitions. Au bout de 4 jours, on observe l'apparition d'un signal faible (32,4 ppm) témoignant de la présence d'une autre liaison $^{13}\text{CH}_2\text{-S}$ appartenant à un adduit (^{13}C) **61b**.

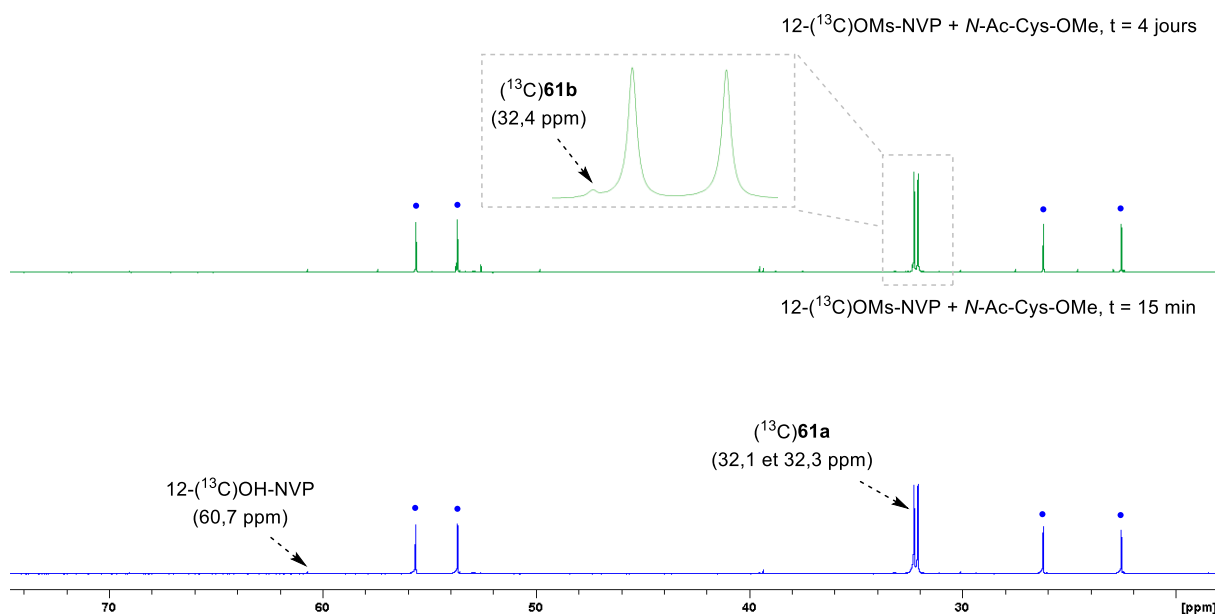


Figure IV-12 : Réactivité de la 12- (^{13}C) mésyloxy-Névirapine (12- $(^{13}\text{C})\text{OMs-NVP}$) vis-à-vis de l'ester méthylique de la *N*-acétylcystéine (les signaux correspondant à l'acide aminé non modifié sont indiqués par un rond bleu •)

Dans nos études de réactivité en phase liquide, nous nous sommes aperçus que les adduits formés donnaient souvent des signaux «doublés» en RMN du carbone 13. En 2010, Antunes et ses collaborateurs^[275] ont fait la même observation. Les auteurs ont montré que ce phénomène était dû à la présence de deux conformères en équilibre.

La **figure IV-13** représente l'équilibre conformationnel proposé par Antunes *et al.* dans le cas d'un adduit avec le tryptophane.

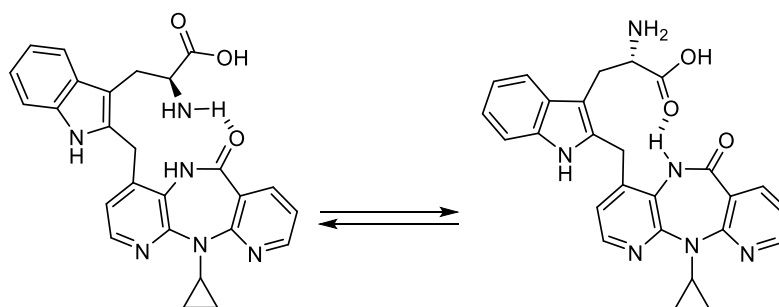


Figure IV-13 : Équilibre conformationnel proposé par Antunes *et al.*^[275] pour expliquer la présence de signaux RMN «doublés» correspondant aux adduits formés entre la 12-mésyloxy-Névirapine et le tryptophane

A l'échelle de temps de la RMN, la présence de deux conformères est détectée à température ambiante par des déplacements chimiques légèrement différents. A 65 °C (température de coalescence), les auteurs n'observent plus qu'un seul signal correspondant à la moyenne des signaux des deux conformères détectés à température ambiante.

Dans nos tests de réactivité, nous observons en moyenne une différence de 0,1 ppm entre les deux signaux, ce qui correspond aux résultats publiés par Antunes et ses collaborateurs.

En ce qui concerne le produit (¹³C)**61a**, nous envisageons une réaction de substitution nucléophile de la chaîne latérale soufrée de la *N*-acétylcystéine sur la 12-(¹³C)mésyloxy-Névirapine. La molécule (¹³C)**61b** pourrait être un produit d'hydrolyse de (¹³C)**61a**.

Les structures proposées pour les produits (^{13}C)**61a** et (^{13}C)**61b** sont présentées dans le **tableau IV-2**.

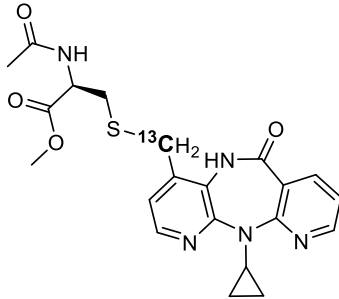
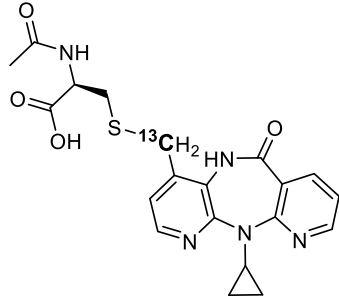
Adduit	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm) (HSQC ^1H - ^{13}C)	Structure proposée
(^{13}C) 61a	32,1 32,3*	3,55 – 4,12	
(^{13}C) 61b	32,4	Non détecté	

Tableau IV-2 : Caractérisations par RMN des composés (^{13}C)**61a** et (^{13}C)**61b**

*Présence de deux conformères

Le mélange réactionnel a été analysé par LC-MS. Les ions moléculaires correspondants, leurs rapports m/z et leurs temps de rétention sont présentés dans le **tableau IV-3**.

Ion moléculaire	m/z (ESI/APCI)	Temps de rétention (min)
$[(^{13}\text{C})\mathbf{61a} + \text{H}]^+$	443	2,75
$[(^{13}\text{C})\mathbf{61b} + \text{H}]^+$	429	2,55

Tableau IV-3 : Résultats LC-MS : analyses des ions moléculaires issus des adduits (^{13}C)**61a** et (^{13}C)**61b**

Les rapports m/z des ions moléculaires détectés confirment la présence de (^{13}C)**61a** et de son produit d'hydrolyse (^{13}C)**61b** dans le milieu.

Un test de réactivité a également été réalisé vis-à-vis de la *N*-acétylcystéine non estérifiée. La 12- ^{13}C mésyloxy-Névirapine est complètement consommée au bout de quatre jours (**Figure IV-14**).

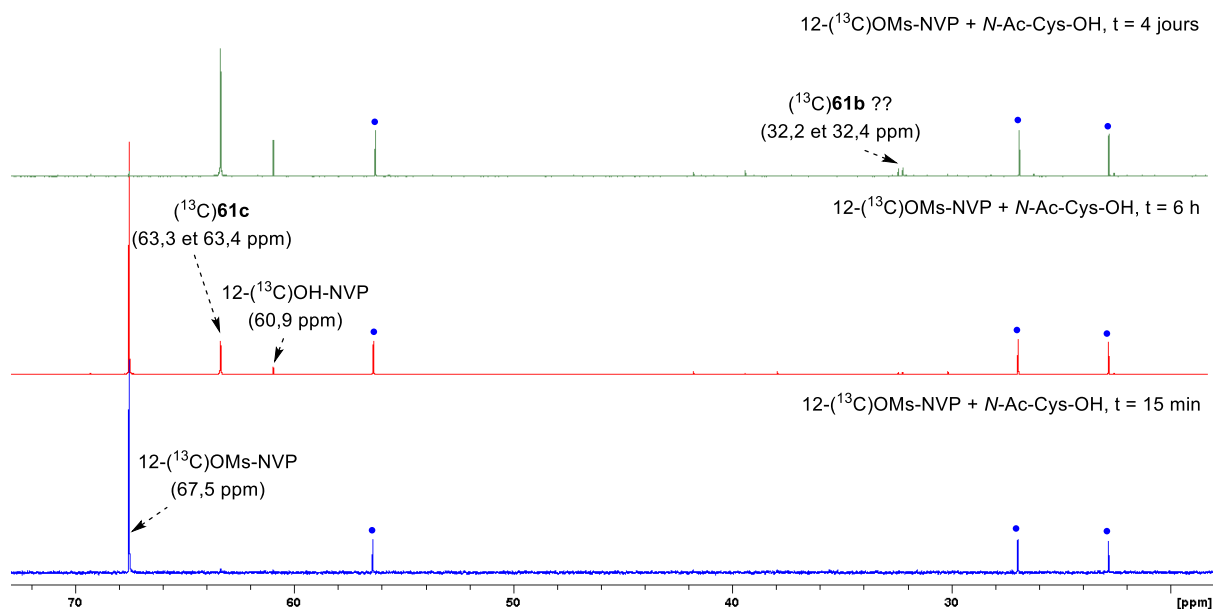


Figure IV-14 : Réactivité de la 12- ^{13}C mésyloxy-Névirapine (12- ^{13}C OMs-NVP) vis-à-vis de la *N*-acétylcystéine (les signaux correspondant à l'acide aminé non modifié sont indiqués par un rond bleu •)

Nous observons dès 6 heures à 60,9 ppm la formation par hydrolyse de la 12- ^{13}C hydroxy-Névirapine (12- ^{13}C OH-NVP). Un second signal se trouvant dans la même zone de déplacement chimique (63,3 ppm et 63,4 ppm) témoigne de la présence d'un adduit (^{13}C)**61c** sous la forme de deux conformères. Une autre espèce minoritaire donne deux signaux dans la zone de déplacement chimique correspondant aux liaisons $^{13}\text{CH}_2\text{-S}$ (32,2 ppm et 32,4 ppm).

La *N*-acétylcystéine non estérifiée possède deux groupements nucléophiles : le carboxylate et le thiol (**Figure IV-15**).

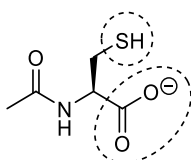


Figure IV-15 : Structure de la *N*-acétylcystéine et groupements réactifs possibles (entourés en pointillés)

En ce qui concerne le produit (^{13}C)**61c**, nous envisageons une réaction du carboxylate sur la 12- ^{13}C mésyloxy-Névirapine. Pour l'espèce minoritaire à 32,2 ppm et 32,4 ppm, une substitution nucléophile du groupement thiol sur la 12- ^{13}C mésyloxy-Névirapine pourrait

aboutir à l'adduit (^{13}C)**61b** qui a déjà été observé dans le test précédent. Cet adduit en particulier reste hypothétique car nous n'avons qu'un déplacement chimique de référence (32,4 ppm). Les structures des adduits envisagés sont représentées dans le **tableau IV-4**.

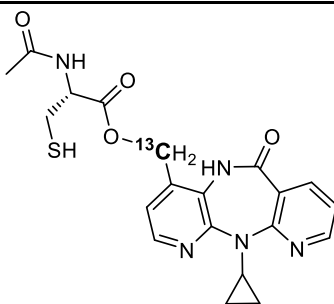
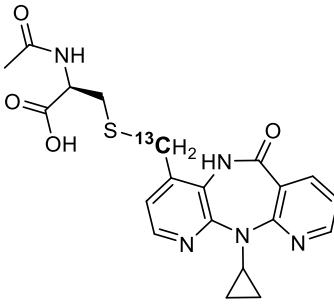
Adduit	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm) (HSQC ^1H - ^{13}C)	Structure proposée
(^{13}C) 61c	63,3 63,4*	5,18 – 5,28	
(^{13}C) 61b ?	32,2 32,4*	3,69 – 3,95	

Tableau IV-4 : Caractérisations par RMN des composés (^{13}C)**61c** et (^{13}C)**61b**

*Présence de deux conformères

Le milieu réactionnel a été analysé par LC-MS. Les adduits (^{13}C)**61c** et (^{13}C)**61b** proposés ont une masse identique de $428,47 \text{ g.mol}^{-1}$, mais un seul ion moléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ possédant un rapport masse sur charge (m/z) de 429 a été détecté. Il semblerait qu'un seul de ces deux produits se trouve dans le mélange. D'après le temps de rétention du produit détecté en LC-MS (2,76 minutes), il ne s'agirait pas de (^{13}C)**61b** dont le temps de rétention serait de 2,55 minutes (**Tableau IV-3**). Nous pensons donc que l'adduit (^{13}C)**61b** n'est pas présent dans le mélange. Or, un signal correspondant à une liaison $^{13}\text{CH}_2\text{-S}$ est visible sur les spectres RMN à 32,2 et 32,4 ppm.

D'autres ions moléculaires ont été détectés par LC-MS dans des quantités faibles avec des rapports m/z plus élevés. Les m/z font penser aux produits (^{13}C)**61d**, (^{13}C)**61e**, et (^{13}C)**61f**.

La *N*-acétylcystine, formée par oxydation à partir de deux molécules de *N*-acétylcystéine, a également été détectée. Les ions moléculaires, leurs rapports *m/z* et les temps de rétention des adduits (^{13}C)**61c-f** sont présentés dans le **tableau IV-5**.

Ion moléculaire	<i>m/z</i> (ESI/APCI)	Temps de rétention (min)	Structure proposée
$[(^{13}\text{C})\mathbf{61c} + \text{H}]^+$	429	2,76	
$[(^{13}\text{C})\mathbf{61d} + \text{H}]^+$	590	2,60	
$[(^{13}\text{C})\mathbf{61e} + \text{H}]^+$	694	3,02	
$[(^{13}\text{C})\mathbf{61f} + \text{H}]^+$	855	3,00	

Tableau IV-5 : Résultats LC-MS : analyses des ions moléculaires issus des adduits (^{13}C)**61c-f**

Comme nous l'avons mentionné précédemment, le produit (^{13}C)**61b** ne semble pas se former lors de la réaction de la 12- (^{13}C) mésyloxy-Névirapine avec la *N*-acétylcystéine. Pourtant, nous avons détecté par RMN une liaison $^{13}\text{CH}_2\text{-S}$ à 32,2 et 32,4 ppm. Parmi les structures proposées dans le **tableau IV-5**, la seule possédant une liaison $^{13}\text{CH}_2\text{-S}$ est (^{13}C)**61e**. Les signaux RMN à 32,2 et 32,4 ppm pourraient donc être dus à cet adduit et non à (^{13}C)**61b** comme nous le soupçonnions au départ.

• Réactivité de la 12- (^{13}C) mésyloxy-Névirapine avec la lysine

La solubilité de la *N*-acétyllysine dans le milieu CD_3CN / tampon phosphate a été testée. Visuellement, la solution semblait homogène mais lors de l'acquisition RMN, il n'a pas été possible de réaliser les opérations de «shim» de façon à obtenir des signaux bien résolus et un spectre exploitable. En observant le milieu réactionnel après quelques minutes de repos, deux phases bien distinctes apparaissent dans le tube RMN. Les phases organiques (CD_3CN) et aqueuse (tampon phosphate) ne sont pas miscibles en présence de *N*-acétyllysine.

Les tests de réactivité vis-à-vis de la *N*-acétyllysine ont donc été réalisés avec son ester méthylique (*N*-Ac-Lys-OMe) (**Figure IV-16**).

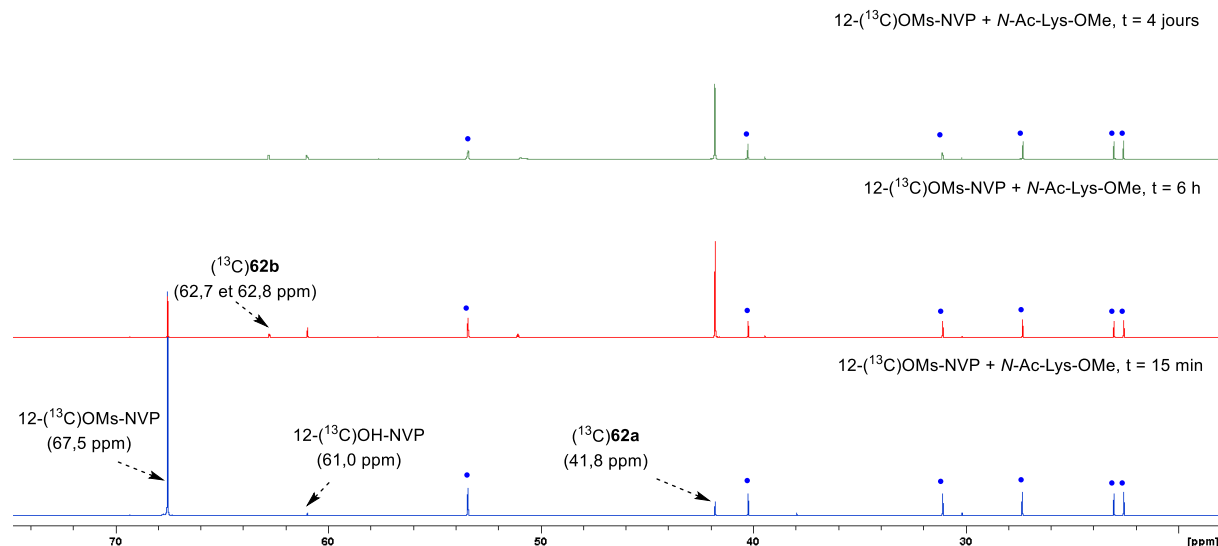


Figure IV-16 : Réactivité de la 12- (^{13}C) mésyloxy-Névirapine (12- (^{13}C) OMs-NVP) vis-à-vis de l'ester méthylique de la *N*-acétyllysine (les signaux correspondant à l'acide aminé non modifié sont indiqués par un rond bleu •)

La 12- (^{13}C) mésyloxy-Névirapine réagit rapidement avec la *N*-Ac-Lys-OMe puisque dès la première acquisition, on observe l'apparition d'une nouvelle espèce (^{13}C)**62a** donnant un signal dans la zone de déplacement chimique attendue pour une liaison $^{13}\text{CH}_2\text{-N}$ (41,8 ppm). La 12- (^{13}C) OH-Névirapine, produit d'hydrolyse du mésyle, se forme rapidement.

Un second adduit (^{13}C)**62b** est détectable au bout de six heures sous la forme de deux conformères à l'origine de deux signaux à 62,7 ppm et 62,8 ppm.

Le **tableau IV-6** présente les structures proposées pour les molécules (^{13}C)**62a** et (^{13}C)**62b**. Le produit (^{13}C)**62a** pourrait être formé par substitution nucléophile de la chaîne latérale aminée de la lysine sur la position benzylique activée de la 12-(^{13}C)métyloxy-Névirapine. Pour le produit (^{13}C)**62b**, le déplacement chimique observé en RMN ^{13}C serait en accord avec un adduit de type $^{13}\text{CH}_2\text{-O}$. Il pourrait être issu d'une réaction de transestérification entre la *N*-Ac-Lys-OMe et la 12-(^{13}C)OH-Névirapine libérée par hydrolyse du mésyle.

Adduit	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm) (HSQC ^1H - ^{13}C)	Structure proposée
(^{13}C) 62a	41,8	4,58 – 4,88	
(^{13}C) 62b	62,7 62,8*	4,78 – 4,97	

Tableau IV-6 : Caractérisations par RMN des composés (^{13}C)**62a** et (^{13}C)**62b**

*Présence de deux conformères

Les analyses LC-MS ont permis de valider la présence de (^{13}C)**62a** dans un mélange réactionnel contenant également la 12-(^{13}C)OH-Névirapine (**Tableau IV-7**). L'ion moléculaire issu de l'adduit proposé (^{13}C)**62b** n'a pas été détecté.

Ion moléculaire	m/z (ESI/APCI)	Temps de rétention (min)
$[(^{13}\text{C})\mathbf{62a} + \text{H}]^+$	468	2,16

Tableau IV-7 : Résultats LC-MS : analyse de l'ion moléculaire issu de l'adduit (^{13}C)**62a**

• Réactivité de la 12-¹³C)mésyloxy-Névirapine avec l'histidine

Selon le même protocole, la 12-¹³C)mésyloxy-Névirapine a été mise en réaction avec la *N*-acétylhistidine. Pour des raisons de solubilité, nous n'avons pas testé son dérivé estérifié. Comme pour la cystéine et la lysine, nous avons observé dès la première acquisition (15 minutes) une espèce (¹³C)**63a** dans la zone attendue pour une liaison ¹³CH₂-O (63,1 ppm) (**Figure IV-17**). Une deuxième molécule (¹³C)**63b** est détectable par RMN au bout de deux heures et ses signaux RMN ¹³C augmentent avec le temps (47,0 ppm et 47,1 ppm). Le produit (¹³C)**63b** semble se présenter sous la forme de deux conformères avec deux déplacements chimiques légèrement différents. Enfin, un troisième adduit (¹³C)**63c** comporterait deux carbones substitués au carbone 13. Il fait son apparition au bout de deux heures et est bien visible au bout de six heures. La molécule (¹³C)**63c** donne des signaux «doublés», ce qui nous laisse penser à nouveau à la présence d'un équilibre conformationnel dont le basculement serait plus lent que l'échelle de temps de la RMN à la température d'acquisition (25 °C).

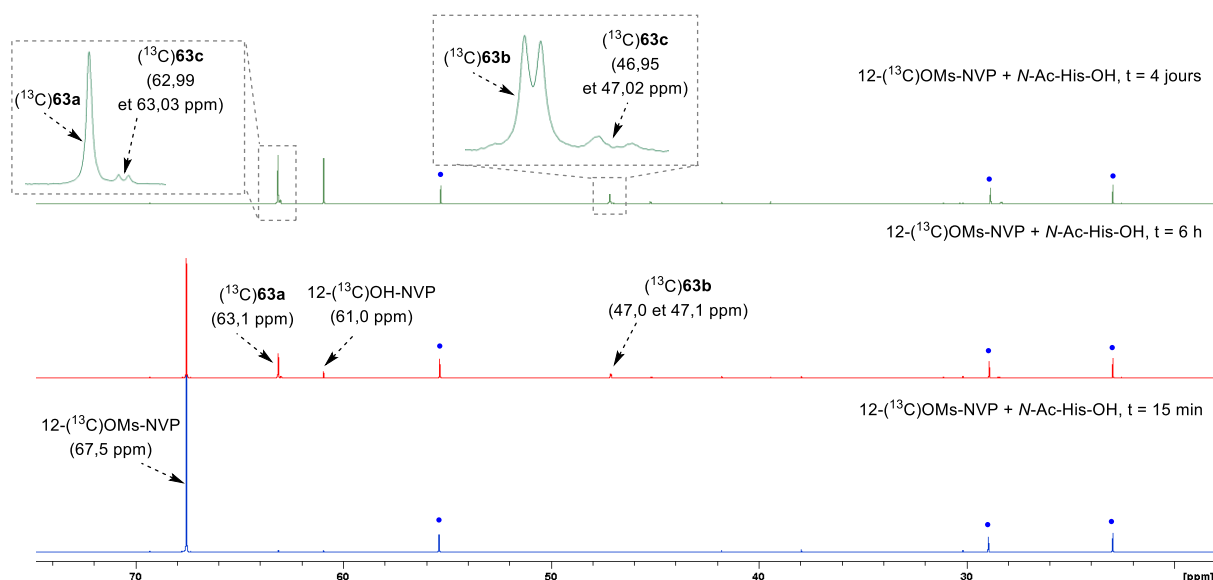


Figure IV-17 : Réactivité de la 12-¹³C)mésyloxy-Névirapine (12-¹³C)OMs-NVP) vis-à-vis de la *N*-acétylhistidine (les signaux correspondant à l'acide aminé non modifié sont indiqués par un rond bleu •)

Le **tableau IV-8** donne les structures proposées pour les trois adduits (¹³C)**63a-c**. Le produit (¹³C)**63a** serait issu d'une réaction de l'extrémité carboxylate de l'acide aminé sur la 12-¹³C)mésyloxy-Névirapine 12-¹³C)**39**. L'adduit (¹³C)**63b** correspondrait à une réaction de substitution nucléophile entre la 12-¹³C)mésyloxy-Névirapine et l'un des atomes d'azote du noyau imidazole. Enfin, le produit minoritaire (¹³C)**63c** pourrait être constitué de *N*-acétylhistidine doublement substituée par la 12-¹³C)Névirapine.

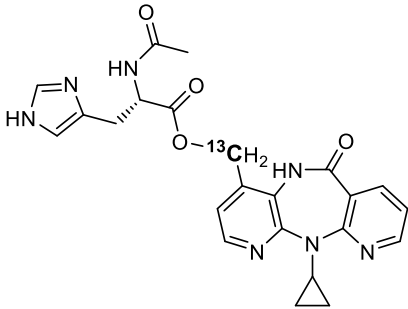
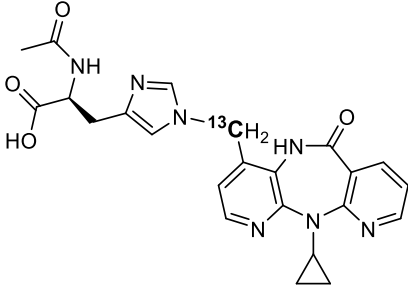
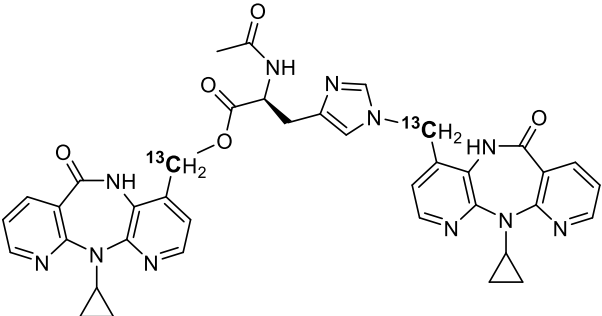
Adduit	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm) (HSQC ^1H - ^{13}C)	Structure proposée
$(^{13}\text{C})\mathbf{63a}$	63,1	5,09 – 5,28	
$(^{13}\text{C})\mathbf{63b}$	47,0 47,1*	5,15 – 5,38	
$(^{13}\text{C})\mathbf{63c}$	46,95 47,02* 62,99 63,03*	Non détectable	

Tableau IV-8 : Caractérisations par RMN des composés (^{13}C)**63a-c**

*Présence de deux conformères

Les adduits (^{13}C)**63a** et (^{13}C)**63b** ont la même masse molaire (462,47 g.mol⁻¹). Les analyses LC-MS du milieu réactionnel montrent la présence d'un seul produit qui génère un ion moléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ possédant un rapport m/z de 463. La molécule (^{13}C)**63c** a également été détectée. Le **tableau IV-9** donne les temps de rétention ainsi que les rapports m/z des ions moléculaires issus de ces adduits.

Ion moléculaire	m/z (ESI/APCI)	Temps de rétention (min)
$[(^{13}\text{C})\mathbf{63a} + \text{H}]^+$ ou $[(^{13}\text{C})\mathbf{63b} + \text{H}]^+$	463	2,16
$[(^{13}\text{C})\mathbf{63c} + \text{H}]^+$	728	2,61

Tableau IV-9 : Résultats LC-MS : analyses des ions moléculaires issus des adduits (^{13}C)**63a-c**

• Réactivité de la 12-(¹³C)mésyloxy-Névirapine avec l'arginine

Le troisième nucléophile aminé testé est l'arginine. Comme avec la *N*-acétyllysine, le mélange *N*-acétylarginine / 12-(¹³C)mésyloxy-Névirapine dans l'acétonitrile deutéré et le tampon phosphate aboutit à une séparation de phases au bout de quelques minutes. Nous avons donc utilisé l'ester méthylique de la *N*-acétylarginine (*N*-Ac-Arg-OMe).

Un adduit (¹³C)**64a** est détecté par RMN ¹³C dès les premières quinze minutes de réaction (**Figure IV-18**). L'intensité du signal associé (41,7 ppm) augmente régulièrement au cours du temps. La zone de déplacement chimique correspond à la formation d'une liaison ¹³CH₂-N. Une autre molécule (¹³C)**64b** donne deux signaux dans la zone de déplacement chimique des liaisons ¹³CH₂-O (62,6 ppm et 62,7 ppm) et nous observons le signal du produit d'hydrolyse 12-(¹³C)OH-Névirapine. La 12-(¹³C)mésyloxy-Névirapine est entièrement consommée au bout de 24 heures.

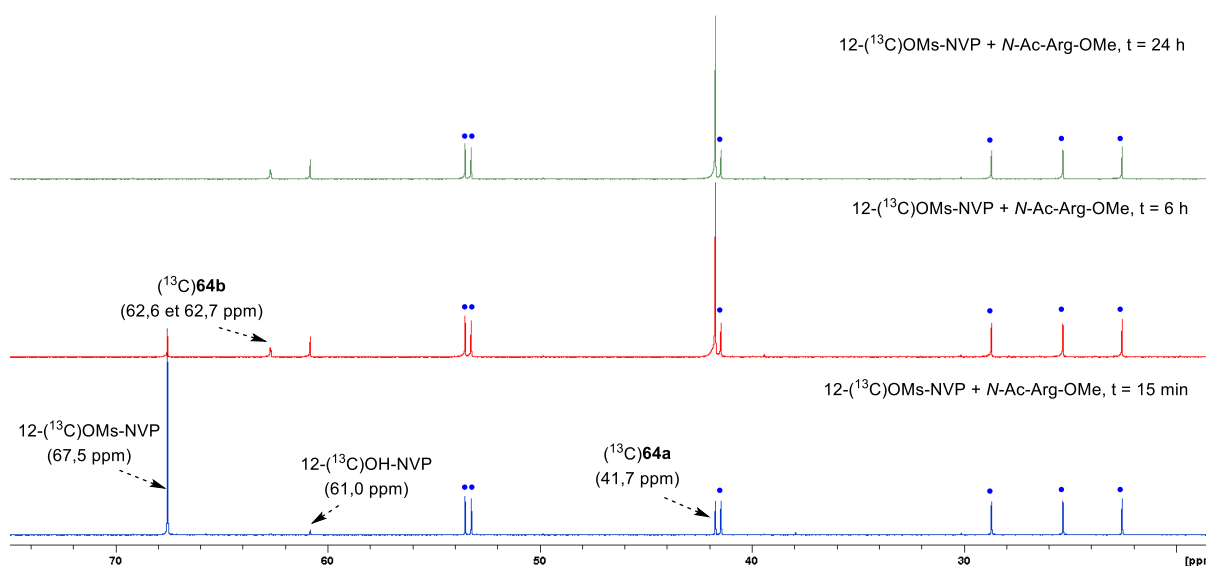


Figure IV-18 : Réactivité de la 12-(¹³C)mésyloxy-Névirapine (12-(¹³C)OMs-NVP) vis-à-vis de l'ester méthylique de la *N*-acétylarginine (les signaux correspondant à l'acide aminé non modifié sont indiqués par un rond bleu •)

Le produit (¹³C)**64a** pourrait être issu d'une réaction de la chaîne latérale de l'acide aminé sur la 12-(¹³C)mésyloxy-Névirapine. L'adduit (¹³C)**64b** pourrait se former par transestérification entre la *N*-Ac-Arg-OMe et la 12-(¹³C)OH-Névirapine. Les structures proposées pour les adduits (¹³C)**64a** et (¹³C)**64b** sont représentées dans le **tableau IV-10**.

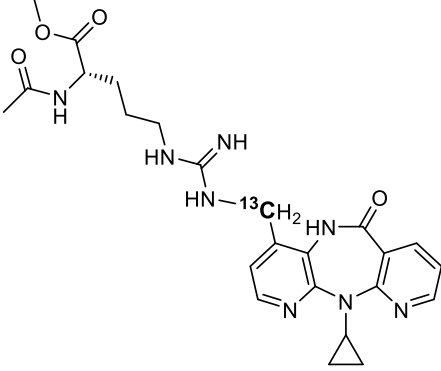
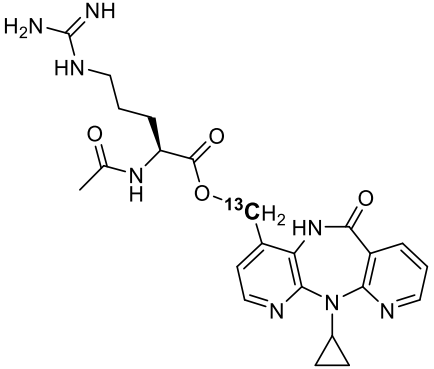
Adduit	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm) (HSQC ^1H - ^{13}C)	Structure proposée
$(^{13}\text{C})\mathbf{64a}$	41,7	4,55 – 4,90	
$(^{13}\text{C})\mathbf{64b}$	62,6 62,7*	4,63 – 4,95	

Tableau IV-10 : Caractérisations par RMN des composés $(^{13}\text{C})\mathbf{64a}$ et $(^{13}\text{C})\mathbf{64b}$

*Présence de deux conformères

Les produits $(^{13}\text{C})\mathbf{64a}$ et $(^{13}\text{C})\mathbf{64b}$ ont une masse molaire de $495,55 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ et $481,52 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectivement. Ils n'ont pas été détectés en LC-MS.

• Réactivité de la 12- (^{13}C) mésyloxy-Névirapine avec la tyrosine

La 12- (^{13}C) mésyloxy-Névirapine a également été mise en réaction avec la *N*-acétyltyrosine. Nous n'avons pas testé son ester éthylique dans le mélange CD_3CN / tampon phosphate car il n'y est pas soluble. Nous présentons dans une partie ultérieure de ce chapitre des études de réactivité avec la *N*-acétyltyrosine et avec son ester éthylique (*N*-Ac-Tyr-OEt) dans le DMSO deutéré.

Dès les premières minutes de réaction, un nouveau produit $(^{13}\text{C})\mathbf{65}$ apparaît, donnant des signaux à 62,8 et 62,9 ppm (**Figure IV-19**). Là encore, nous envisageons la présence de deux conformères. L'adduit continue à se former sur quatre jours. Le produit d'hydrolyse (12- $(^{13}\text{C})\text{OH-NVP}$) est également observé à 61,0 ppm.

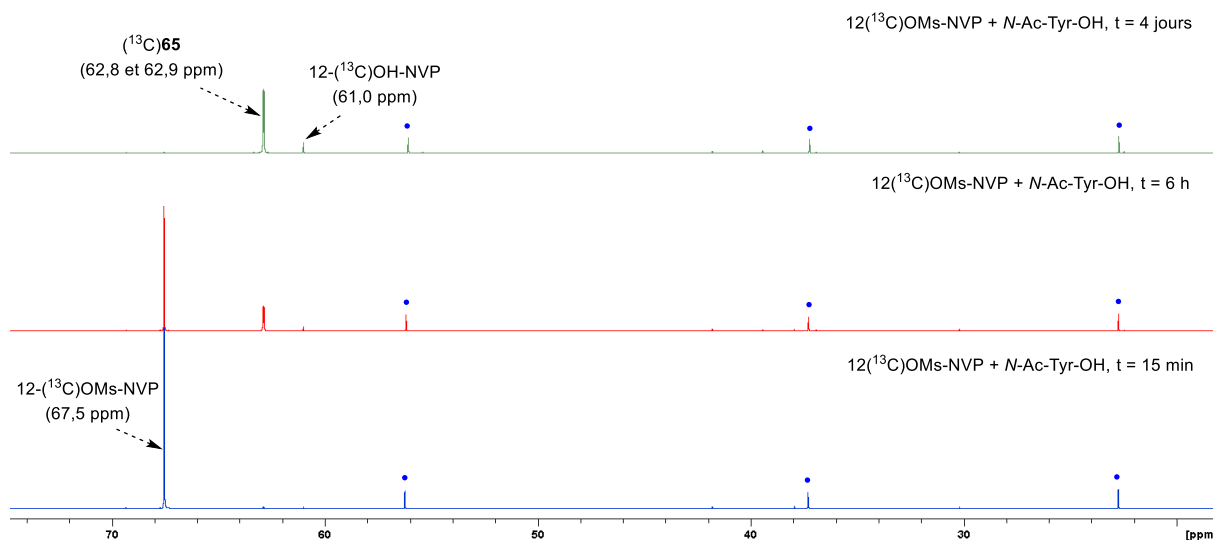


Figure IV-19 : Réactivité de la 12-(^{13}C)mésyloxy-Névirapine (12-(^{13}C)OMs-NVP) vis-à-vis de la *N*-acétyltyrosine en milieu aqueux (les signaux correspondant à l'acide aminé non modifié sont indiqués par un rond bleu •)

En ce qui concerne l'adduit (^{13}C)65, deux structures au moins peuvent correspondre au déplacement chimique obtenu car la *N*-acétyltyrosine possède deux groupements nucléophiles possibles (**Figure IV-20**).

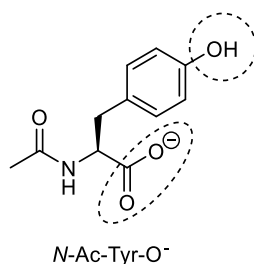


Figure IV-20 : Structure de la *N*-acétyltyrosine et groupements réactifs possibles (entourés en pointillés)

En effet, puisque l'acide aminé n'est pas protégé à l'extrémité C-terminale, on peut s'attendre à une réaction du carboxylate sur la 12-(^{13}C)mésyloxy-Névirapine comme nous l'avons observé pour certains acides aminés précédemment étudiés. Le carbone 13 de la liaison $^{13}\text{CH}_2\text{-O}$ formée donnerait un signal dans la zone de déplacement chimique observée (62,8 ppm et 62,9 ppm). Néanmoins, d'après les simulations RMN, une réaction de la 12-(^{13}C)mésyloxy-Névirapine avec la partie phénol de l'acide aminé serait également à l'origine d'une liaison $^{13}\text{CH}_2\text{-O}$ dont le carbone 13 peut donner un signal dans la même zone. Les deux structures proposées sont présentées dans le **tableau IV-11**.

Adduit	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Structure proposée
$(^{13}\text{C})\mathbf{65}$	62,8 62,9*	5,00 – 5,27	

Tableau IV-11 : Caractérisation par RMN du composé $(^{13}\text{C})\mathbf{65}$

*Présence de deux conformères

Les deux adduits possèdent la même masse moléculaire de $488,51 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. En LC-MS, on détecte bien un ion moléculaire $[(^{13}\text{C})\mathbf{65} + \text{H}]^+$ de rapport m/z égal à 489. La molécule $(^{13}\text{C})\mathbf{65}$ associée possède un temps de rétention de 2,83 minutes. Ces données valident la formation d'un adduit avec la *N*-acétyltyrosine mais ne nous permettent pas de trancher entre les deux structures proposées dans le **tableau IV-11**.

IV.3. Réactivité de la 12- (^{13}C) mésyloxy-Névirapine en milieu organique

Pour aller plus loin dans nos études de réactivité de la 12- (^{13}C) mésyloxy-Névirapine vis-à-vis de la tyrosine, nous avons réalisé des tests en milieu organique. En effet, les études en milieu aqueux ne nous ont pas permis de déterminer la structure de l'adduit $(^{13}\text{C})\mathbf{65}$ (**Tableau IV-11**). Nous avons envisagé la formation d'un adduit soit avec l'extrémité C-terminale de l'acide aminé, soit avec sa chaîne latérale phénol. Afin d'obtenir des références de déplacements chimique pour chacun de ces adduits, nous avons comparé les résultats obtenus en mettant en réaction la 12- (^{13}C) mésyloxy-Névirapine avec la *N*-acétyltyrosine d'une part, et avec l'ester éthylique de cet acide aminé d'autre part. En effet, tandis que la *N*-acétyltyrosine possède deux groupements nucléophiles, la protection de la fonction acide carboxylique permet d'étudier uniquement la réactivité de la chaîne latérale phénol de cet acide aminé (**Figure IV-21**).

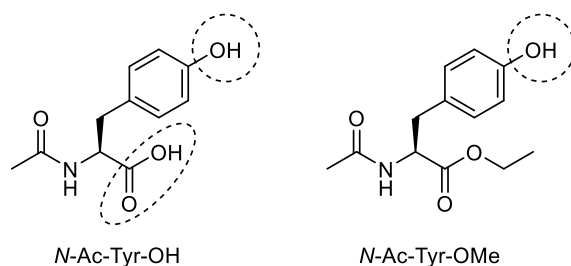


Figure IV-21 : Structures de la *N*-acétyltyrosine, de son ester éthylique et groupements réactifs possibles (entourés en pointillés)

Nous avons donc utilisé le DMSO qui solubilise bien les deux versions de cet acide aminé afin de pouvoir comparer les données.

IV.3.a. Comportement de la 12-mésyloxy-Névirapine dans le DMSO deutéré

Pour commencer, nous avons étudié la réactivité de la 12-mésyloxy-Névirapine dans le DMSO deutéré en l'absence d'acide aminé. La molécule a été solubilisée dans le solvant deutéré et des analyses par RMN ont été réalisées au bout de quinze minutes, deux heures, six heures, un jour et quatre jours. Les spectres obtenus au bout de quinze minutes, six heures et quatre jours sont présentés dans la **figure IV-22**.

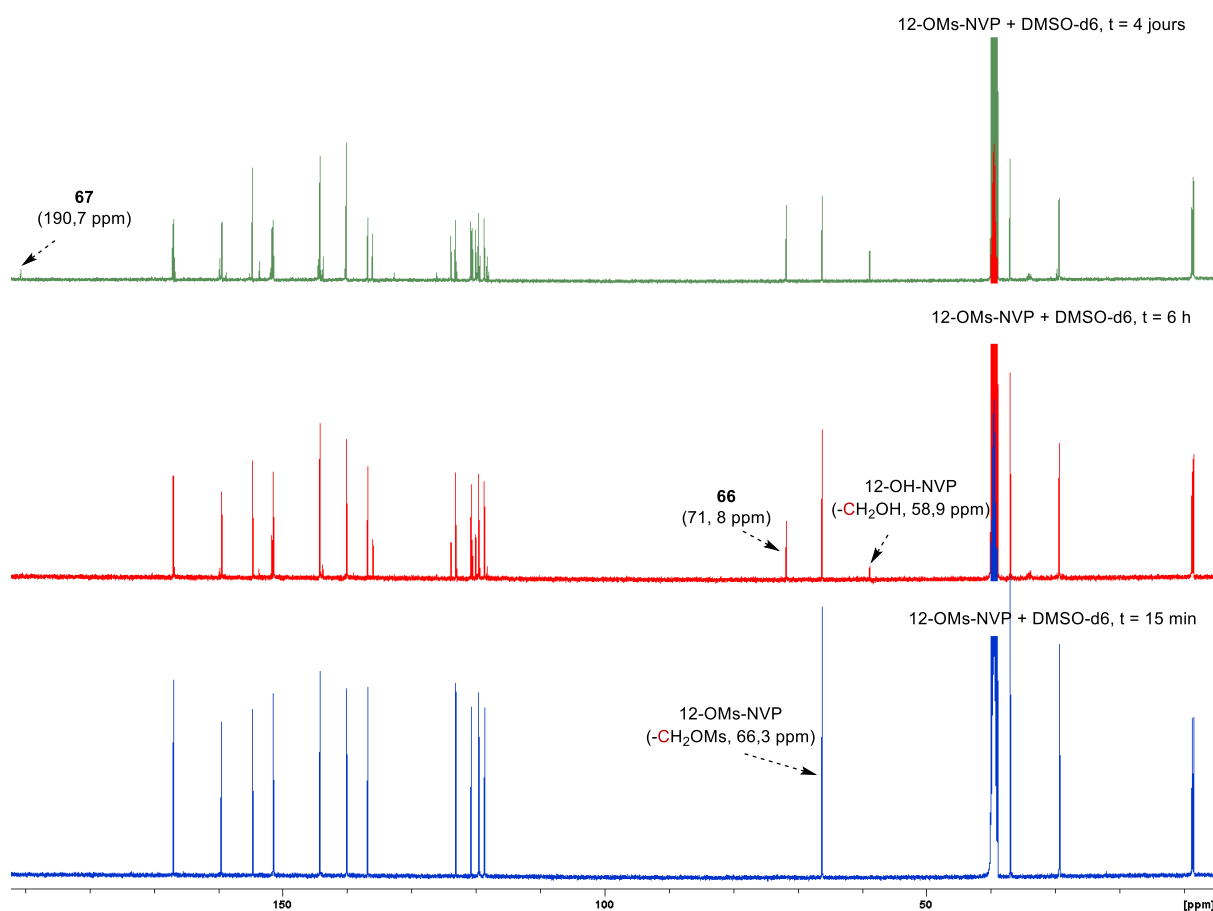


Figure IV-22 : Réactivité de la 12-mésyloxy-Névirapine (12-OMs-NVP) vis-à-vis du DMSO deutéré

Au bout de six heures, un nouveau produit **66** est détecté dans le mélange (71,8 ppm) ainsi que le produit d'hydrolyse (12-OH-NVP, 58,9 ppm). Après quatre jours, le milieu réactionnel contient la 12-mésyloxy-Névirapine, un peu de produit d'hydrolyse, le produit **66** et une nouvelle molécule **67** (190,7 ppm). Le rapport entre les trois produits **39**, **37**, **66** et **67** dans le mélange au bout de quatre jours est de 1 : 0,39 : 1,19 : 0,14. Afin de caractériser les molécules **66** et **67**, des analyses plus poussées (DEPT 135, HSQC ^1H - ^{13}C , HMBC ^1H - ^{13}C) ont été effectuées.

La molécule **66** donne un signal caractéristique dans la zone de déplacement chimique correspondant aux liaisons $\text{CH}_2\text{-O}$ (71,8 ppm). Il pourrait s'agir d'un adduit formé avec le DMSO deutéré utilisé comme solvant (et donc en large excès). En effet, le DMSO possède un caractère nucléophile par son atome d'oxygène. On peut donc envisager une réaction de substitution nucléophile comme l'illustre la **figure IV-23**.

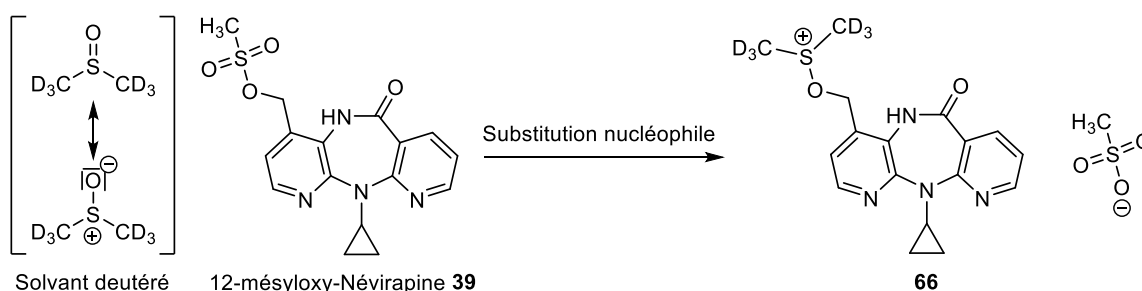


Figure IV-23 : Réaction envisagée entre la 12-mésyloxy-Névirapine et le DMSO deutéré utilisé comme solvant

Les analyses RMN 1D montrent des signaux très proches pour **66** et la 12-mésyloxy-Névirapine. En deux dimensions, les tâches de corrélation sont superposées. Nous souhaitons surtout observer une corrélation entre les protons du CH_2 benzylique (multiplet entre 5,37 ppm et 5,60 ppm) et les carbones portant les atomes de deutérium. Ces atomes sont séparés par quatre liaisons et deux hétéroatomes, la corrélation n'est pas visible en HMBC. Il est difficile de confirmer cette structure qui reste donc hypothétique.

En ce qui concerne la molécule **67**, nous avons supposé la formation de la 4-formyl-Névirapine après avoir repéré les signaux typiquement déblindés des aldéhydes en RMN du carbone 13 (190,7 ppm) et du proton (10,62 ppm). Ces deux signaux sont effectivement corrélés dans l'analyse HSQC. Les signaux attribués au produit **67** en RMN du proton correspondent d'ailleurs à ceux qui ont été publiés en 1995 par Grozinger *et al.*^[95] pour la 4-formyl-Névirapine. Des corrélations ont été détectées en RMN bidimensionnelle hétéronucléaire ^1H - ^{13}C à longue distance (HMBC). Elles valident la structure de **67** et sont illustrées dans la **figure IV-24**.

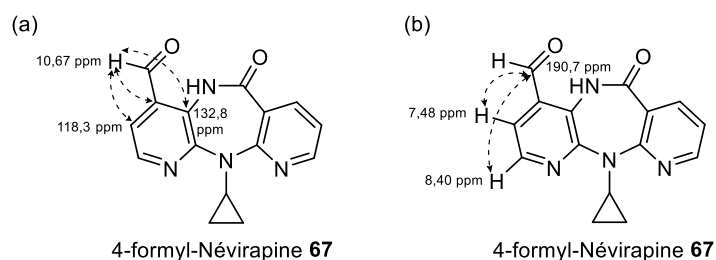


Figure IV-24 : Corrélations observées en HMBC entre les protons du cycle pyridine et le carbonyle de la 4-formyl-Névirapine **67** (a) et entre le proton aldéhydique de **67** et les carbones du cycle pyridine (b)

L'ensemble des analyses confirme donc l'oxydation dans le DMSO deutéré de la 12-mésyloxy-Névirapine en 4-formyl-Névirapine **67**.

Pour expliquer la formation de l'aldéhyde **67**, un mécanisme réactionnel passant par **66** et analogue à ceux des oxydations réalisées en présence de DMSO (oxydation de Kornblum par exemple) peut être proposé (**Figure IV-25**).

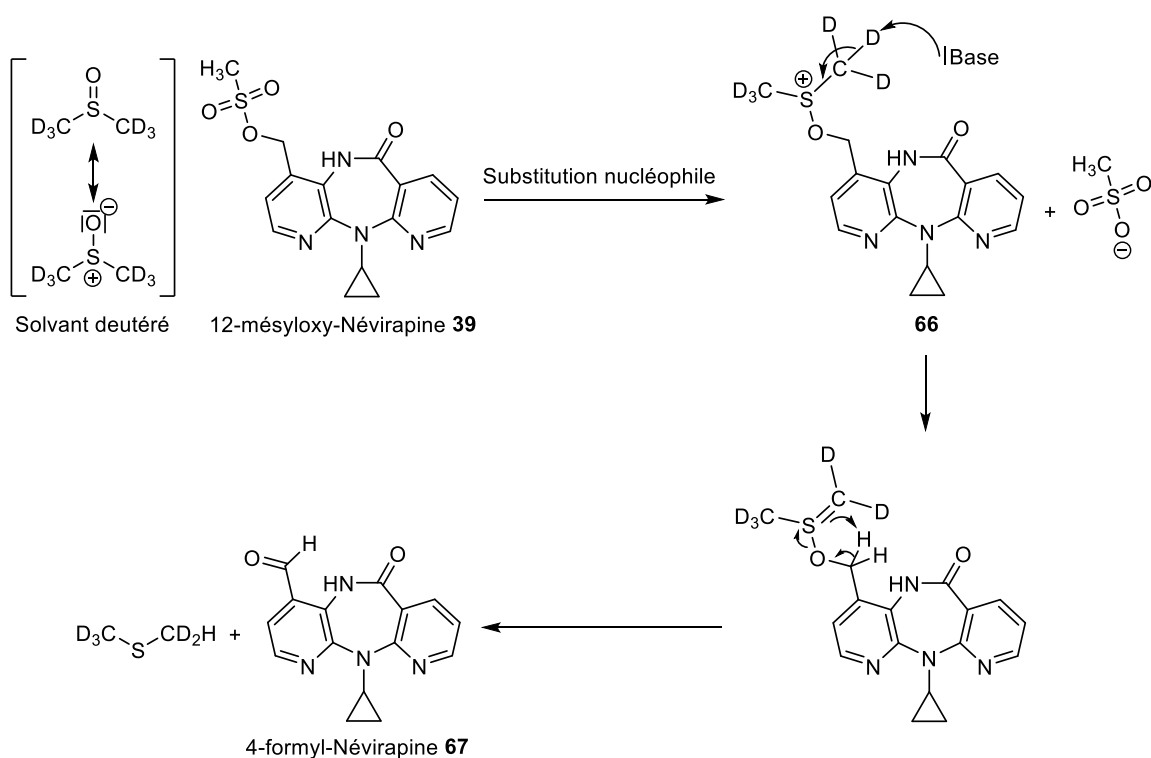


Figure IV-25 : Proposition de mécanisme pour la formation de la 4-formyl-Névirapine **67**

IV.3.b. Réactivité de la 12-(^{13}C)métyloxy-Névirapine avec la tyrosine dans le DMSO deutéré

La 12-(^{13}C)métyloxy-Névirapine a été mise en réaction avec dix équivalents de *N*-acétyltyrosine dans le DMSO deutéré. La réaction a été suivie régulièrement par RMN pendant un mois. La **figure IV-26** montre les analyses RMN ^{13}C réalisées au bout de quinze minutes, un jour, une semaine et un mois.

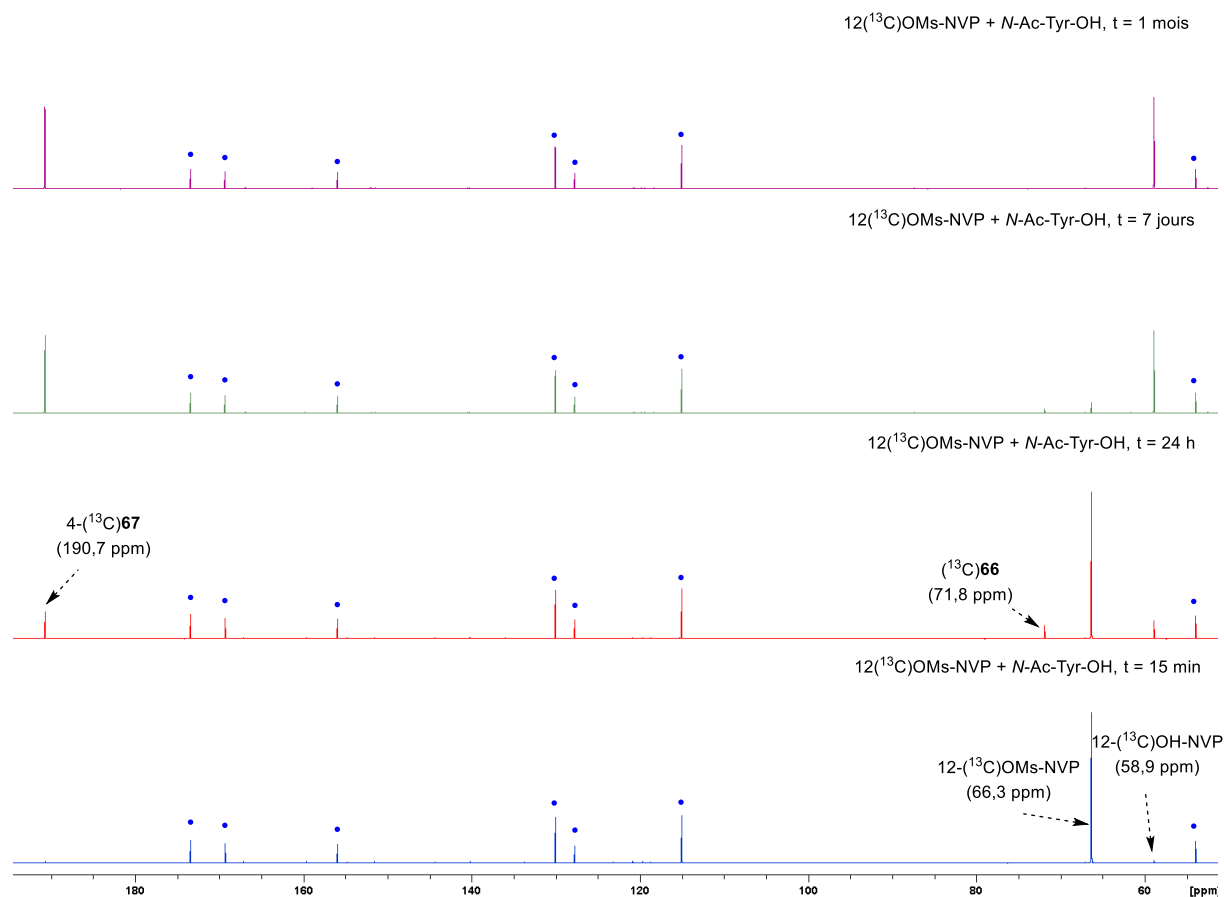


Figure IV-26 : Réactivité de la 12-(^{13}C)métyloxy-Névirapine (12-(^{13}C)OMs-NVP) vis-à-vis de la *N*-acétyltyrosine en milieu organique (les signaux correspondant à l'acide aminé non modifié sont indiqués par un rond bleu •)

Nous avons observé l'apparition de l'adduit (^{13}C)66 (71,8 ppm) dès les deux premières heures de réaction. Il ne semble pas stable car il n'est plus détectable au bout de deux semaines. La 4-(^{13}C)formyl-Névirapine 4-(^{13}C)67 (190,7 ppm) se forme régulièrement au cours du temps, tout comme le produit d'hydrolyse 12-(^{13}C)hydroxy-Névirapine (12-(^{13}C)OH-NVP, 58,9 ppm). Aucune réaction n'a été observée avec l'acide aminé. Après deux semaines dans ces conditions, la 12-(^{13}C)métyloxy-Névirapine est complètement consommée. Les analyses RMN n'évoluent plus, même après un mois de réaction.

Les analyses LC-MS confirment la présence, au bout d'un mois de réaction, de la 12-⁽¹³C)OH-NVP et de la 4-⁽¹³C)formyl-Névrapine 4-⁽¹³C)**67**. Le **tableau IV-12** donne le temps de rétention de l'aldéhyde 4-⁽¹³C)**67** ainsi que le rapport m/z de l'ion moléculaire détecté en spectrométrie de masse.

Ion moléculaire	m/z (ESI/APCI)	Temps de rétention (min)
[4- ⁽¹³ C) 67 + H] ⁺	282	1,66

Tableau IV-12 : Résultats LC-MS : analyse de l'ion moléculaire issu de la 4-⁽¹³C)formyl-Névrapine 4-⁽¹³C)**67**

Le même protocole a été appliqué à l'ester éthylique de la *N*-acétyltyrosine avec des résultats identiques. Aucune réaction avec l'acide aminé n'est observée. Au bout d'un mois, le milieu réactionnel contient l'aldéhyde 4-⁽¹³C)**67**, le produit d'hydrolyse, et l'acide aminé utilisé en excès (10 équivalents).

IV.4. Conclusion

L'hypothèse de travail se base sur la sulfatation enzymatique de la 12-OH-Névrapine en 12-OH-Névrapine sulfate, métabolite supposé toxique par formation d'adduits antigéniques avec les protéines de la peau.

Nous avons décrit dans cette section du chapitre la réactivité en phase liquide de la 12-⁽¹³C)mésyloxy-Névrapine vis-à-vis de certains acides aminés, choisis pour leurs propriétés nucléophiles. Analogue de la 12-⁽¹³C)OH-Névrapine sulfate, le mésyle possède une réactivité supérieure. Il nous a donc permis de greffer des acides aminés à la 12-⁽¹³C)Névrapine afin d'établir des références de déplacements chimiques pour différents types d'adduits. La présence de la plupart de ces adduits a été confirmée par LC-MS.

Les acides aminés non estérifiés réagissent par leurs groupements acides carboxyliques. Certains adduits sont détectés en RMN du carbone 13 sous la forme de deux conformères. Dans le DMSO deutéré, la 12-⁽¹³C)mésyloxy-Névrapine est oxydée en 4-⁽¹³C)formyl-Névrapine. La tyrosine et son ester éthylique ont été testés dans ce milieu organique mais aucune réaction n'a été observée. Ces analyses complètent les travaux publiés par Antunes et ses collaborateurs^[275] sur la formation d'adduits entre la 12-mésyloxy-Névrapine et des nucléophiles modèles. Les **tableaux IV-13** et **IV-14** présentent la base de données ainsi élaborée. Elle permet de faciliter l'interprétation des spectres de RMN HRMAS acquis à partir des modèles d'épidermes humains reconstruits incubés avec la 12-⁽¹³C)Névrapine et ses dérivés.

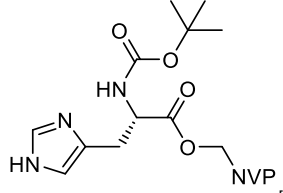
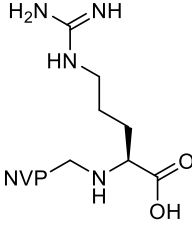
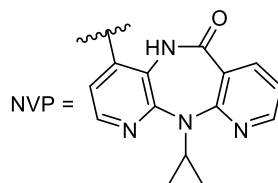
Acide aminé	Produit	Solvant RMN	$\delta^{13}\text{C}$ -12 (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)
<i>N</i> -Acétylcystéine	(^{13}C) 61c	CD_3CN / PBS	63,3 63,4*	5,18 – 5,28
<i>N</i> -Acétylhistidine	(^{13}C) 63a	CD_3CN / PBS	63,1	5,09 – 5,28
<i>N</i> -Boc-histidine	 Synthétisé par Antunes et al. ^[275]	DMSO-d6	62,0	5,17 – 5,34
<i>N</i> -Acétylarginine	(^{13}C) 64b	CD_3CN / PBS	62,6 62,7*	4,63 – 4,95
Arginine	 Synthétisé par Antunes et al. ^[275]	DMSO-d6	50,3	3,57 - 3,88

Tableau IV-13 : Caractérisations RMN d'adduits formés entre la Névirapine (NVP) et des acides aminés, liés par leurs extrémités *N*-terminales ou *C*-terminales

*Présence de deux conformères



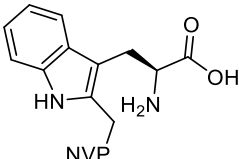
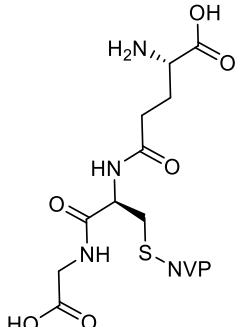
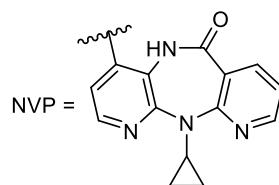
Nucléophile	Produit	Solvant RMN	$\delta^{13}\text{C}$ -12 (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)
<i>N</i> -Acétylcystéine	⁽¹³ C) 61b Egalement synthétisé par Antunes <i>et al.</i> ^[275]	CD ₃ CN / PBS	32,2 32,4*	3,69 – 3,95
		Acétone-d6	32,5 32,3* (Antunes <i>et al.</i> ^[275])	3,91 - 4,21 (Antunes <i>et al.</i> ^[275])
Ester méthylique de la <i>N</i> -acétylcystéine	⁽¹³ C) 61a	CD ₃ CN / PBS	32,1 32,3*	3,55 – 4,12
Ester méthylique de la <i>N</i> -acétyllysine	⁽¹³ C) 62a	CD ₃ CN / PBS	41,8	4,68 – 4,97
<i>N</i> -Acétylhistidine	⁽¹³ C) 63b	CD ₃ CN / PBS	47,0 47,1*	5,09 – 5,28
Ester méthylique de la <i>N</i> -acétylarginine	⁽¹³ C) 64a	CD ₃ CN / PBS	41,7	4,55 – 4,90
Tryptophane	 Synthétisé par Antunes <i>et al.</i> ^[275]	DMSO-d6	28,0 28,2*	4,13 – 4,46
Glutathion	 Synthétisé par Antunes <i>et al.</i> ^[275]	DMSO-d6	30,5 30,7*	3,75 – 3,77 4,17 - 4,21

Tableau IV-14 : Caractérisations RMN d'adduits formés entre la Névirapine (NVP) et des nucléophiles modèles, liés par leurs chaînes latérales

*Présence de deux conformères



V. Etude par RMN HRMAS de la réactivité de la 12-(¹³C)Névirapine et de ses dérivés dans des épidermes humains reconstruits

Dans la section précédente, nous avons mis à profit la réactivité en phase liquide de la 12-(¹³C)mésyloxy-Névirapine vis-à-vis de certains acides aminés afin d'établir une base de données de déplacements chimiques correspondant à différents types d'adduits. Dans cette partie, nous proposons d'aller plus loin en nous approchant au maximum du devenir épidermique *in vivo* de la Névirapine, de la 12-OH-Névirapine et de son sulfate. Le système 12-(¹³C)Névirapine / épiderme humain reconstruit a donc été analysé en RMN HRMAS. La base de données établie en phase liquide permet de faciliter l'interprétation des spectres.

Nous évoquons d'abord le mode opératoire utilisé, de la réception des modèles EpiSkin[®] au laboratoire jusqu'à l'acquisition des données en RMN HRMAS. Les résultats des analyses du système 12-(¹³C)Névirapine / EpiSkin[®] par RMN HRMAS sont ensuite exposés.

V.1. Mode opératoire

V.1.a. Manipulation des épidermes humains reconstruits

Le protocole employé pour la manipulation des épidermes humains reconstruits EpiSkin[®] s'inspire de celui publié en 2013^[4] qui avait été développé pour la manipulation des épidermes reconstruits SkinEthic[®] (**Figure IV-27**). Les épidermes humains reconstruits sont remis en culture dès leur réception au laboratoire et après 24 heures à 37 °C dans une étuve à CO₂, les molécules substituées au carbone 13 sont appliquées à leur surface. Les peaux sont remises à incuber le temps souhaité, rincées à l'eau et congelées à -80 °C. Les inserts de RMN HRMAS sont préparés par carottage de la peau congelée (-30 °C) et l'analyse se fait à 4 °C.

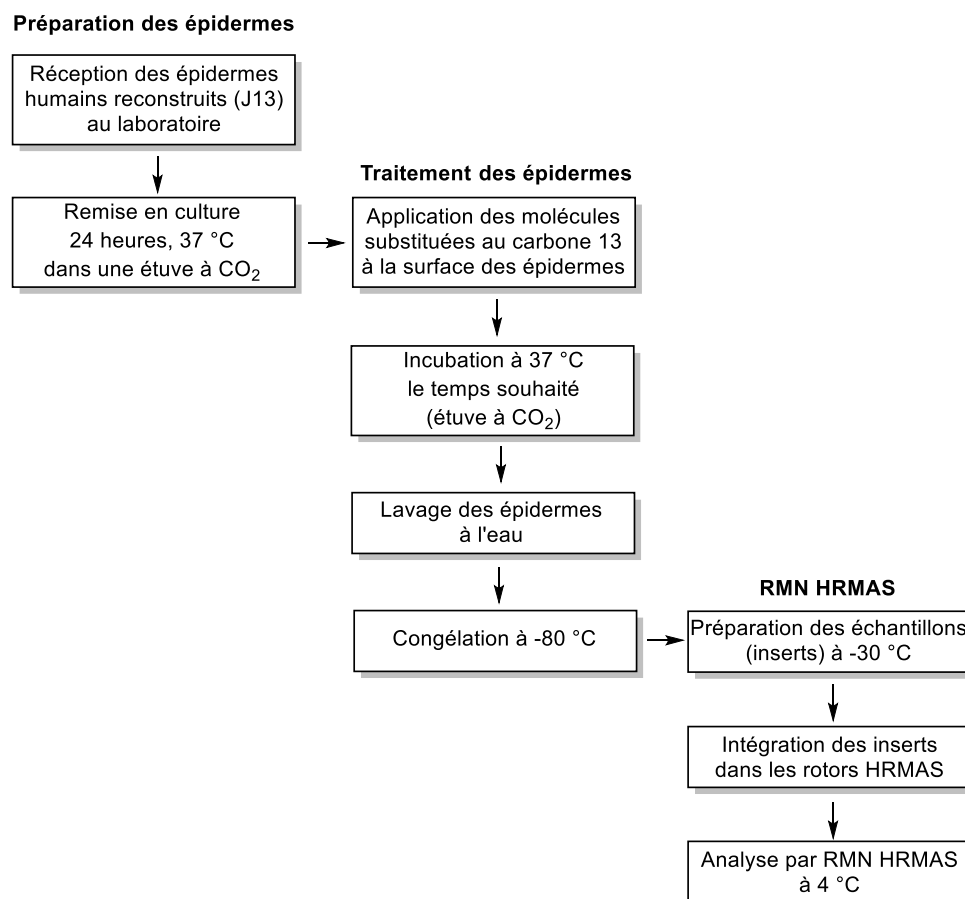


Figure IV-27 : Protocole général pour la manipulation et l'analyse des épidermes humains reconstruits

V.1.b. Acquisitions RMN HRMAS

Les acquisitions RMN HRMAS sont réalisées au service de RMN de la Faculté de Chimie de Strasbourg, à une fréquence proton de 500,03 MHz. Le spectromètre est équipé d'une sonde HRMAS de 4 mm triple résonance (¹H, ¹³C et ³¹P). L'échantillon est maintenu à 4 °C par un flux d'air asséché, maintenant ainsi une certaine stabilité métabolique de l'échantillon pendant l'analyse. L'échantillon est mis en rotation à 3502 Hz afin de garder les bandes latérales de rotation loin de la région spectrale d'intérêt.

Nous avons réalisé des expériences 2D de type HSQC ¹H-¹³C. Ces expériences sont constituées de plusieurs séquences :

1. Séquence 1D ¹H «one pulse», couplée à une présaturation de l'eau inspirée de la méthode du Watergate.
2. Séquence 1D ¹H CPMG, également couplée à une présaturation de l'eau. Cette séquence filtre les signaux correspondant aux lipides et aux macromolécules contenus dans l'épiderme, permettant ainsi une meilleure observation des signaux d'intérêt.
3. Séquence 2D ¹H-¹³C hétéronucléaire HSQC.

4. Séquence 1D ^1H CPMG avec présaturation de l'eau. Ce spectre CPMG permet de contrôler la qualité de l'échantillon.

V.2. Comportement du modèle EpiSkin[®] en présence de DMSO

Insolubles dans l'acétone et dans la plupart des solvants organiques à la concentration de 0,4 M, la 12- (^{13}C) Névirapine, la 12- $(^{13}\text{C})\text{OH}$ -Névirapine et son sulfate ont été appliquées sur les épidermes humains reconstruits en solution dans le DMSO.

Le DMSO est un très bon solvant avec un pouvoir de pénétration cutanée élevé.^[276] Il est d'ailleurs régulièrement utilisé comme véhicule pour faire pénétrer des substances dans des cultures cellulaires de peau, notamment dans des épidermes humains reconstruits.^[238,277,278] Cependant, il a été montré qu'il pouvait induire des modifications des cellules de la peau.^[279]

Nous avons donc préparé un échantillon témoin en appliquant 30 μL de DMSO sur l'épiderme avant une incubation de 24 heures à 37 °C. La peau a ensuite été décollée de son support et rincée abondamment à l'eau milliQ. Des études réalisées au laboratoire ont montré que ce rinçage était nécessaire pour éliminer l'excès de DMSO n'ayant pas pénétré dans l'épiderme et perturber le moins possible l'acquisition des données.^[234]

La **figure IV-28** permet de comparer qualitativement le profil métabolique de l'échantillon traité par le DMSO avec l'échantillon «blanc».

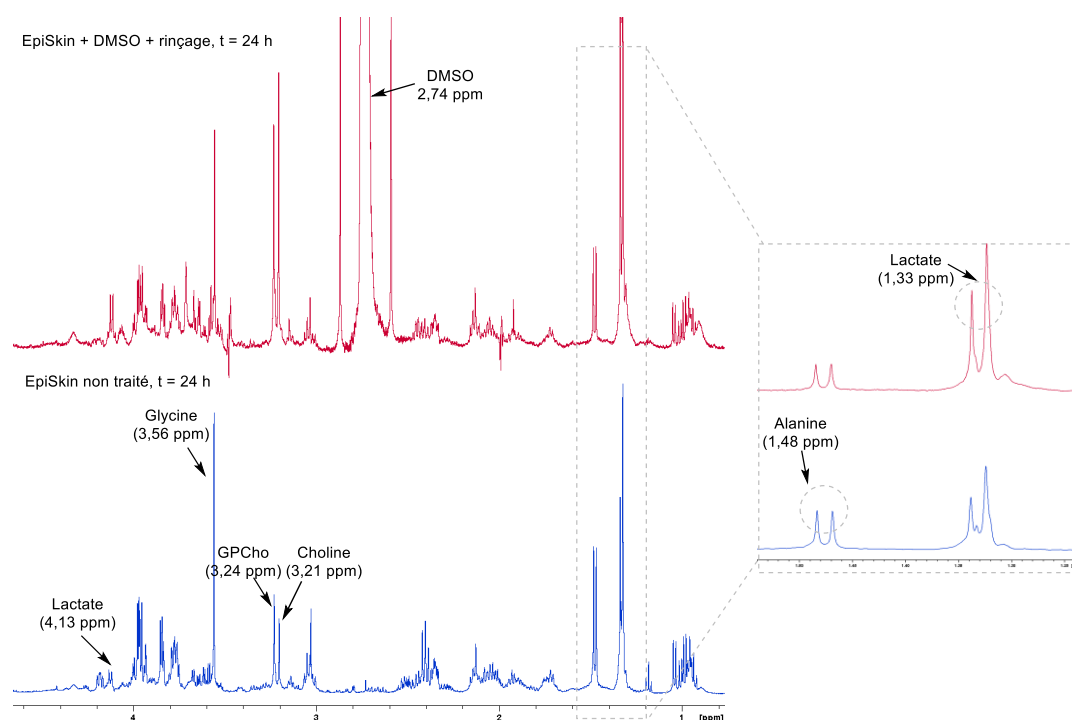


Figure IV-28 : Spectres 1D ^1H de l'épiderme non traité et de l'épiderme incubé avec du DMSO

Par comparaison avec les données publiées en 2013 sur les interactions de l'acétone avec les épidermes humains reconstruits SkinEthic[®],^[4] le DMSO semble influencer davantage le métabolome du modèle EpiSkin[®]. Les modifications clairement visibles sont une augmentation des signaux issus du lactate (1,33 et 4,13 ppm), de la choline (3,20 ppm) et de la glycérophosphocholine (GPCho, 3,23 ppm), tandis que les signaux dus à la glycine (3,56 ppm) et à l'alanine (1,48 ppm) diminuent.

La **figure IV-29** montre la superposition du spectre issu de l'expérience 2D HSQC de l'échantillon blanc non traité (en bleu) avec celui obtenu à partir de l'échantillon traité par le DMSO (en rouge).

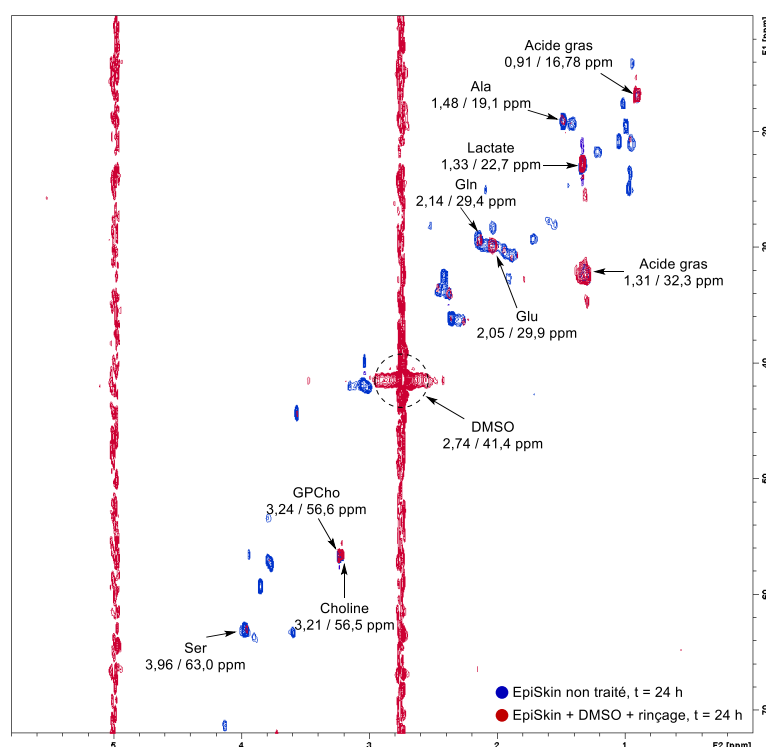


Figure IV-29 : Spectre 2D HSQC ^1H - ^{13}C de l'épiderme traité par le DMSO superposé au spectre de l'épiderme non traité

Le spectre montre une saturation de la tâche de corrélation due au DMSO (2,74 / 41,4 ppm). Malgré un rinçage abondant permettant d'éliminer le solvant n'ayant pas pénétré dans l'épiderme, une quantité importante de DMSO reste visible sur le spectre. Cette observation confirme le pouvoir de pénétration élevé de cette molécule. Par effet de saturation, certains métabolites de l'épiderme ne sont plus détectés. Ce phénomène doit être pris en compte dans l'interprétation des résultats de RMN HRMAS.

V.3. Application de la 12-¹³C)Névirapine et de ses dérivés sur les épidermes humains reconstruits

Après avoir analysé par RMN HRMAS un échantillon «blanc» non traité et vérifié l'effet du DMSO sur les épidermes humains reconstruits, nous avons appliqué la 12-¹³C)Névirapine, la 12-¹³C)OH-Névirapine, la 12-¹³C)OH-Névirapine sulfate et la 12-¹³C)mésyloxy-Névirapine sur les épidermes humains reconstruits.

Afin de réaliser un suivi cinétique du devenir de chaque molécule dans la peau, nous avons préparé plusieurs échantillons avec des temps d'incubations différents (**Tableau IV-15**).

Molécule	Solvant	Temps d'incubation
12- ¹³ C)Névirapine (12- ¹³ C)NVP)	DMSO, 0,4 M, 30 µL	8 h, 24 h, 48 h
12- ¹³ C)OH-Névirapine (12- ¹³ C)OH-NVP)	DMSO, 0,4 M, 30 µL	1 h, 8 h, 24 h, 48 h
12- ¹³ C)OH-Névirapine sulfate (12- ¹³ C)OH-NVP sulfate)	DMSO, 0,4 M, 30 µL	1 h, 8 h, 24 h
12- ¹³ C)mésyloxy-Névirapine (12- ¹³ C)OMs-NVP)	Acétone / DMSO (9 / 1), 0,4 M, 30 µL	1 h, 8 h, 24 h

Tableau IV-15 : Solvants, concentrations, volumes et temps d'incubations utilisés pour l'incubation des molécules substituées au carbone 13 avec les épidermes humains reconstruits

Toutes les molécules ont été appliquées à une concentration de 0,4 M avec un volume de 30 µL. Hormis la 12-¹³C)mésyloxy-Névirapine, les molécules ont été solubilisées dans le DMSO. La 12-¹³C)mésyloxy-Névirapine a pu être mise en solution dans un mélange d'acétone et de DMSO.

V.3.a. Etude par RMN HRMAS du comportement de la 12-¹³C)Névirapine dans les épidermes humains reconstruits

La 12-¹³C)Névirapine a été appliquée sur les épidermes humains reconstruits en solution dans le DMSO (**Figure IV-30**). Afin de suivre son éventuelle activation métabolique dans l'épiderme, nous avons préparé trois échantillons avec des temps d'incubations différents : 8 heures, 24 heures et 48 heures.

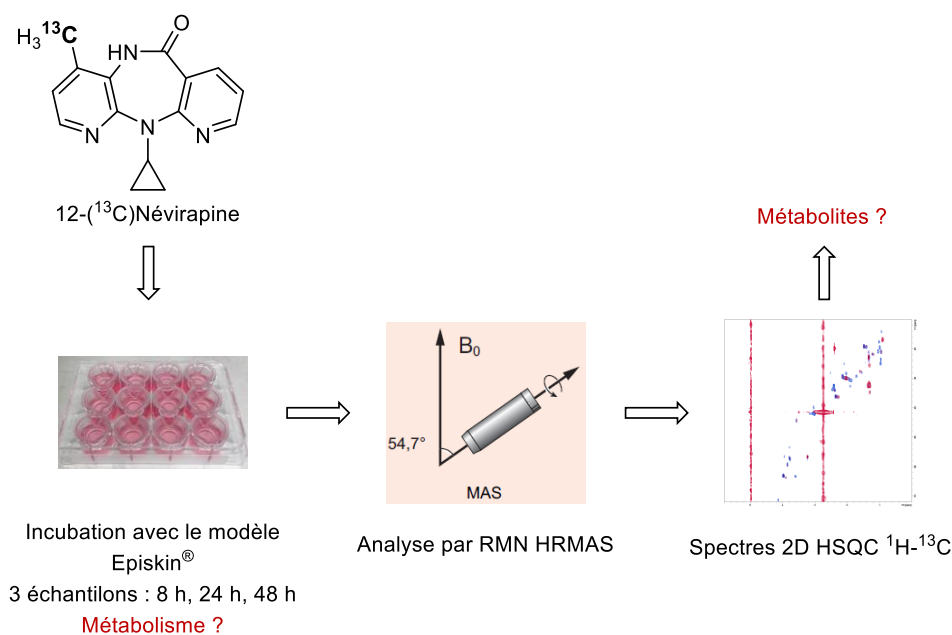


Figure IV-30 : Protocole mis en place pour l'étude de l'activation métabolique de la 12-(¹³C)Névirapine dans les épidermes humains reconstruits

Nous nous sommes aperçus que la 12-(¹³C)Névirapine en solution dans le DMSO à 0,4 M ne pénétrait pas correctement dans l'épiderme, malgré la capacité élevée de ce solvant à faire pénétrer les substances qu'il solubilise. La 12-(¹³C)Névirapine semble précipiter sur l'épiderme tandis que le DMSO y entre en grande partie, laissant une certaine quantité de 12-(¹³C)Névirapine sous la forme d'une poudre blanche mouillée par le solvant à la surface de l'épiderme. La pénétration de la 12-(¹³C)Névirapine semble cependant s'améliorer au cours du temps.

En raison de cette mauvaise pénétration, la quantité de 12-(¹³C)Névirapine dans l'épiderme est plus faible que nous le souhaitons. Les expériences hétéronucléaires ¹H-¹³C en deux dimensions (HSQC) font tout de même apparaître des tâches de corrélation correspondant à la molécule, ce qui confirme qu'une partie de la 12-(¹³C)Névirapine est entrée dans l'épiderme.

En ce qui concerne le profil métabolique, le spectre 1D ¹H CPMG de l'épiderme non traité et ceux des échantillons traités à la 12-(¹³C)Névirapine montrent peu de différences.

La **figure IV-31** présente les superpositions des spectres issus des expériences 2D des échantillons incubés avec la 12-(¹³C)Névirapine pendant 24 heures (**Figure IV-31a**) et 48 heures (**figure IV-31b**) avec celui de l'épiderme blanc. Les spectres obtenus à 8 heures et 24 heures ne montrent aucune évolution.

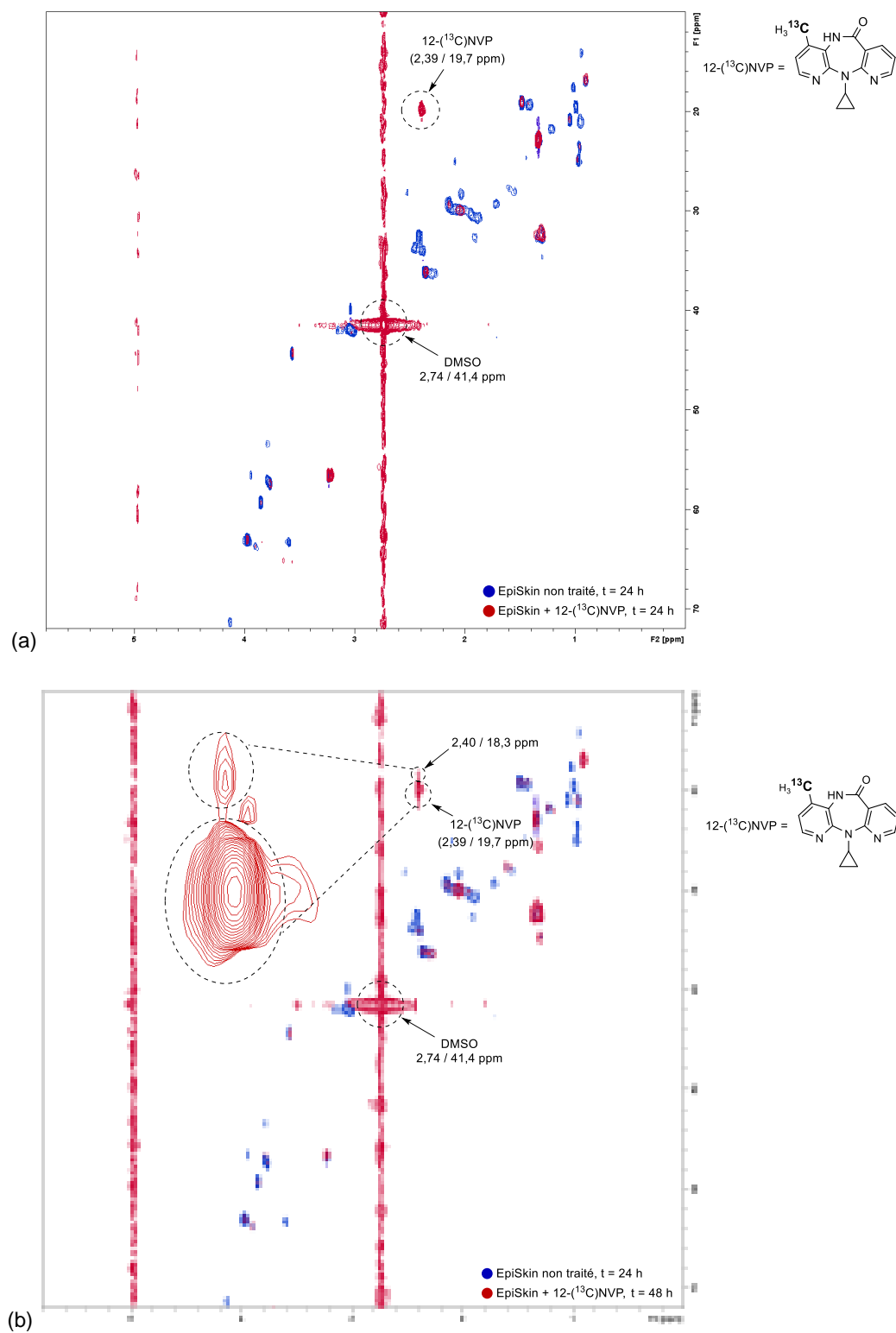


Figure IV-31 : Spectres 2D HSQC ^1H - ^{13}C (superposés au blanc) de l'épiderme après 24 heures d'incubation avec la $^{12}\text{-}^{13}\text{C}$ Névirapine ($^{12}\text{-}^{13}\text{C}$ NVP) (a) et après 48 heures d'incubation (b)

Dans l'épiderme, la $^{12}\text{-}^{13}\text{C}$ Névirapine semble subir peu de modification.

Au bout de 48 heures, une nouvelle tâche de corrélation apparaît (2,40 et 18,3 ppm) dans une zone très proche de la corrélation due à la position substituée de la 12-(^{13}C)Névirapine (2,39 et 19,7 ppm). Ces déplacements chimiques nous indiquent que le méthyle benzylique de la Névirapine (position substituée au carbone 13) n'est pas modifié. Nous émettons deux hypothèses pour expliquer la présence de ce signal.

Premièrement, nous savons que, dans le foie, la Névirapine peut être prise en charge par plusieurs CYP450 pour aboutir à des métabolites hydroxylés. En particulier, les 2-, 3-, et 8-OH-Névirapine sont des métabolites hépatiques connus. Ils ont été caractérisés par RMN et les déplacements chimiques en solution des méthyles benzyliques correspondants sont proches de ceux de la Névirapine (**Figure IV-32**).^[80,147,280]

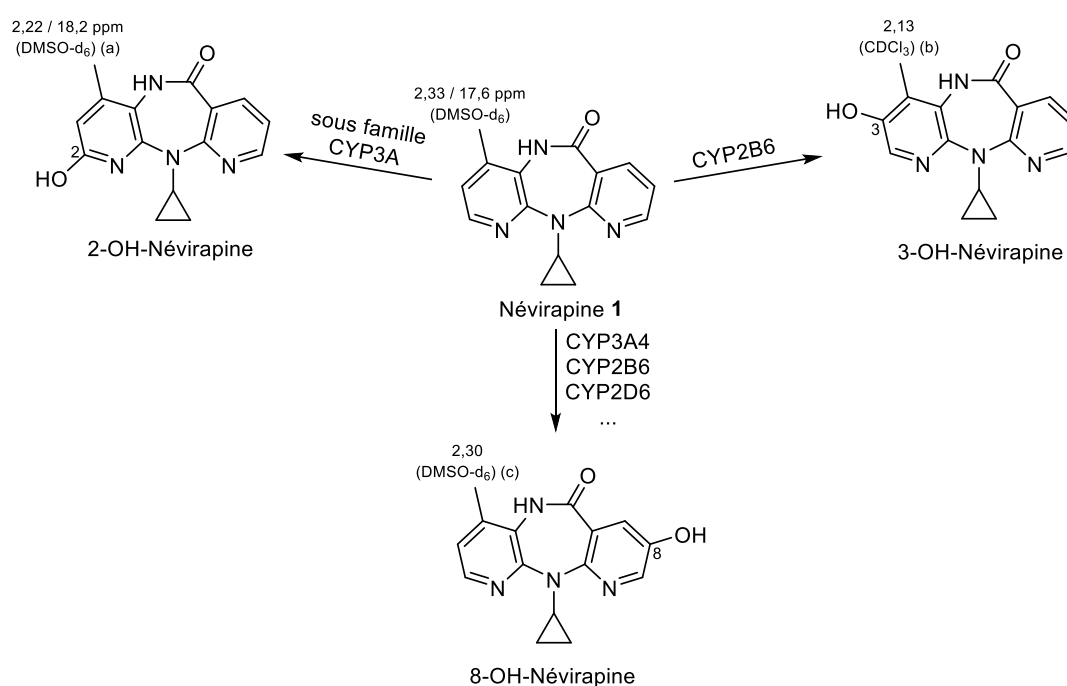


Figure IV-32 : Métabolites hépatiques différents de la 12-OH-Névirapine et déplacements chimiques décrits en solution par Antunes et al.^[80] (a), Klunder^[280] (b) et Grozinger et al.^[147] (c).

Nous pouvons proposer une prise en charge de la Névirapine par des CYP450 épidermiques qui aboutirait à des métabolites semblables. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser une extraction à partir des échantillons d'épidermes puis une analyse LC-MS avant d'envisager de substituer d'autres positions de la Névirapine au carbone 13.

La seconde hypothèse repose sur une modification du groupement cyclopropylamine. Le métabolisme oxydatif des cyclopropylamines a été beaucoup étudié car ce groupement inhibe l'activité de certaines enzymes à CYP450.^[281]

Par analogie avec les travaux publiés dans la littérature sur d'autres molécules cyclopropylaminées,^[75,76,78,282] la Névirapine pourrait être prise en charge dans l'épiderme par un système enzymatique d'oxydoréduction (CYP450, monoamines oxydases, peroxydases...) pour donner de petites molécules électrophiles d'une part (cyclopropanone^[283] et/ou acroléine), et la Névirapine *N*-déalkylée d'autre part (**Figure IV-33**). Les analyses RMN de la Névirapine *N*-déalkylée en solution ont été publiées dans la littérature et les déplacements chimiques du méthyle benzylique (2,28 et 17,8 ppm), proches de ceux de la Névirapine (2,33 et 17,6 ppm), pourraient également correspondre au signal détecté dans les épidermes (2,40 et 18,3 ppm).^[284]

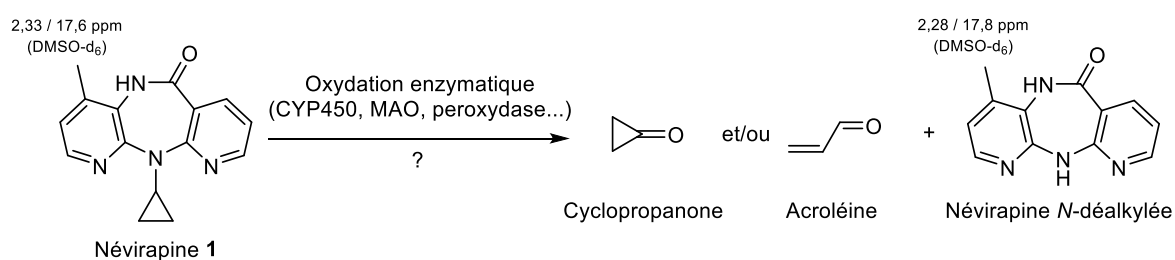


Figure IV-33 : Transformation métabolique proposée pour le groupement cyclopropylamine de la Névirapine

Afin d'étudier le devenir de la cyclopropylamine dans les épidermes humains reconstruits, une substitution au carbone 13 de ce groupement devra être envisagée (positions 13 et/ou 14 de la Névirapine) (**Figure IV-34**) afin de détecter par RMN HRMAS la formation de cyclopropanone et/ou d'acroléine dans les épidermes humains reconstruits.

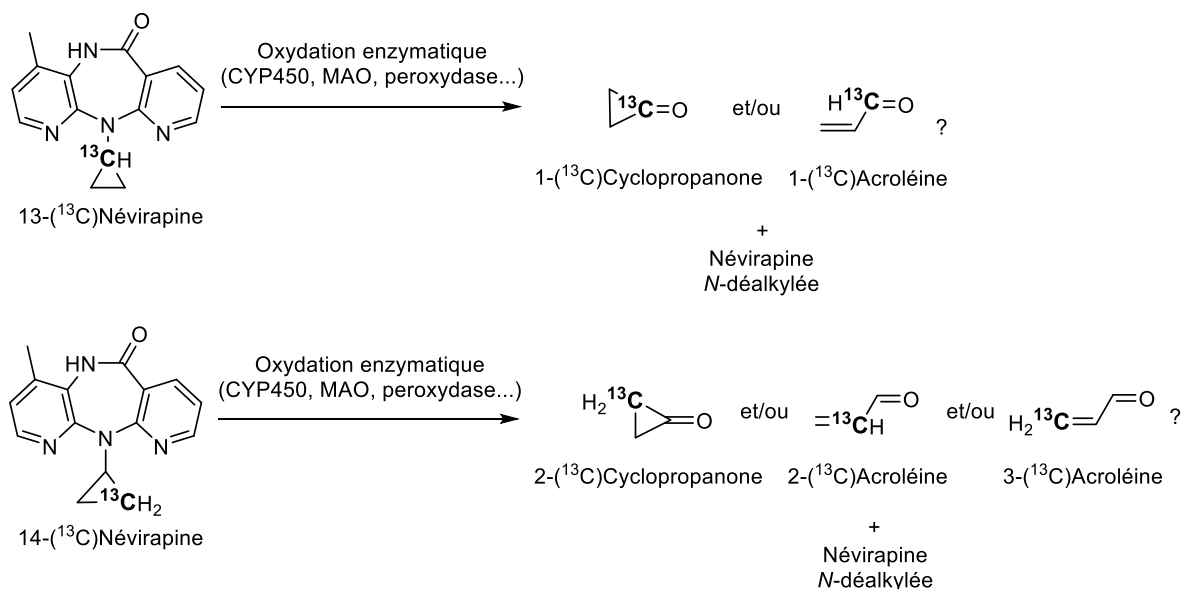


Figure IV-34 : Propositions de substitutions au carbone 13 pour l'étude de l'activation métabolique du groupement cyclopropylamine de la 12-(^{13}C)Névirapine

Nous ne détectons pas de 12-(^{13}C)OH-Névirapine (4,81, 62,3 ppm). La 12-(^{13}C)Névirapine ne serait donc pas hydroxylée en position 12 dans les épidermes humains reconstruits (**Figure IV-35**), ce qui corrobore l'hypothèse selon laquelle le métabolite alcool se formerait dans le foie.

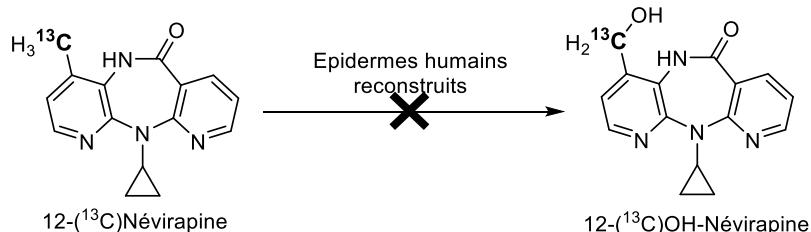


Figure IV-35 : Réaction d'hydroxylation de la 12-(^{13}C)Névirapine, non observée dans les épidermes

V.3.b. Etude par RMN HRMAS de l'interaction de la 12-(^{13}C)OH-Névirapine avec les épidermes humains reconstruits

Selon l'hypothèse proposée par Sharma *et al.*,^[83] la 12-OH-Névirapine serait produite à partir de la Névirapine dans le foie et diffuserait à travers l'organisme jusqu'à l'épiderme pour y être sélectivement activée en 12-OH-Névirapine sulfate par une sulfotransférase épidermique. Afin de vérifier cette hypothèse, la 12-(^{13}C)OH-Névirapine a été appliquée sur les épidermes humains reconstruits (**Figure IV-36**)

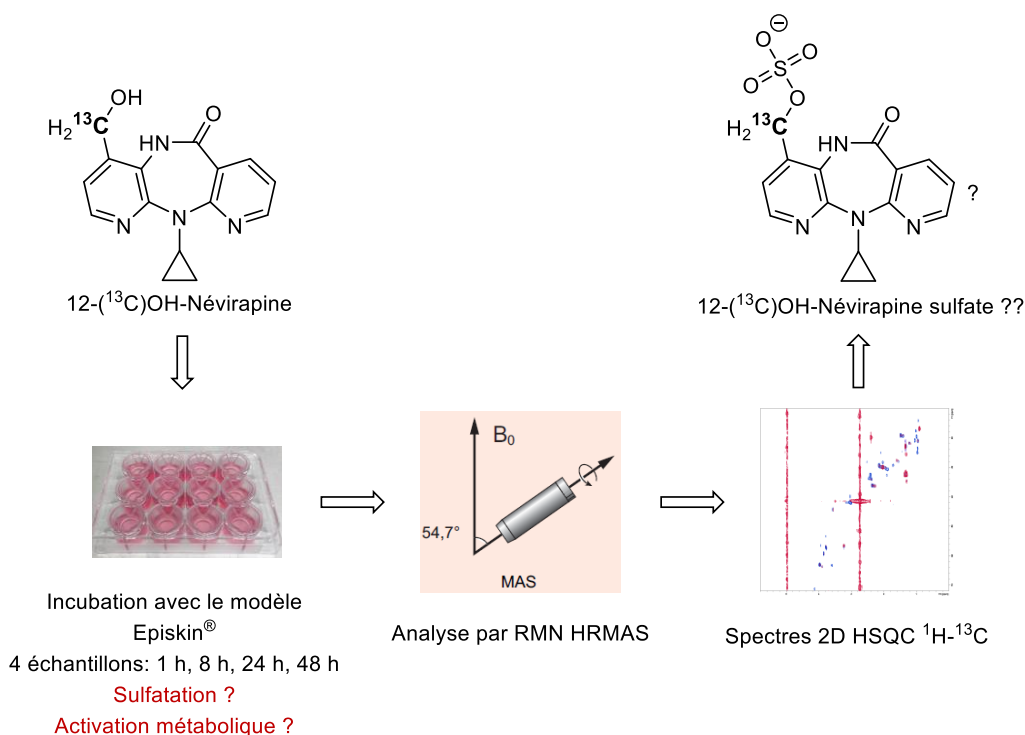
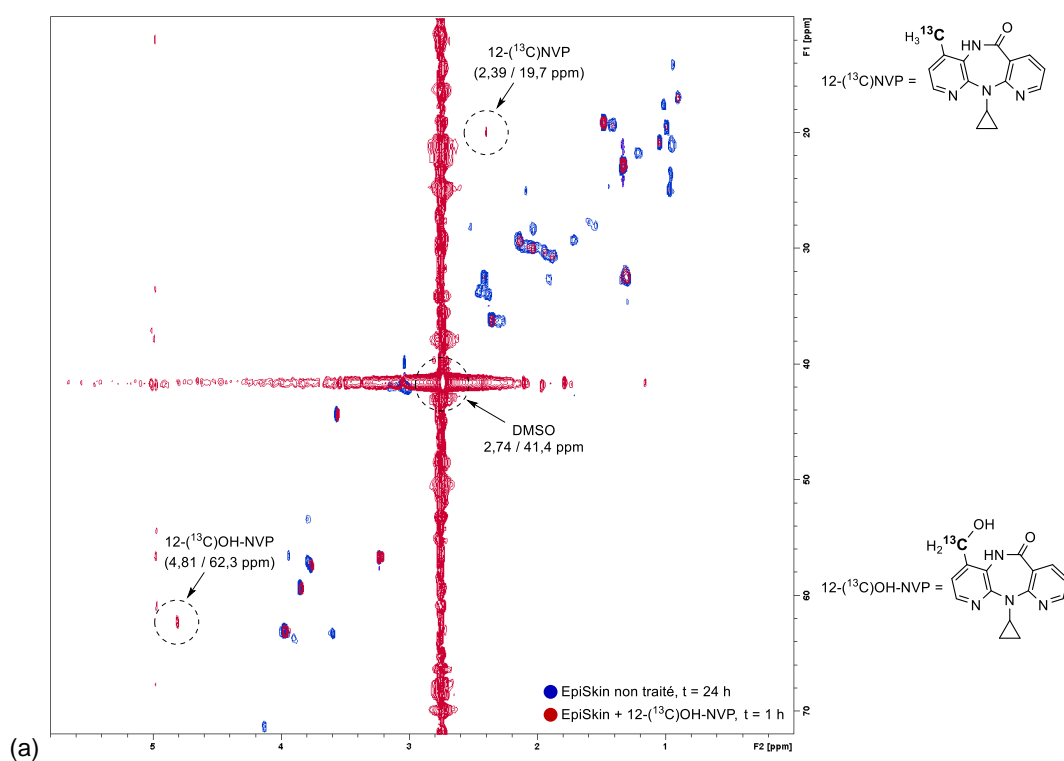


Figure IV-36 : Protocole mis en place pour l'étude de l'activation métabolique de la 12-(^{13}C)OH-Névirapine dans les épidermes humains reconstruits

Nous avons remarqué, lors de l'application de la 12- $(^{13}\text{C})\text{OH-Névirapine}$ sur les épidermes, que sa pénétration cutanée était meilleure que celle la 12- $(^{13}\text{C})\text{Névirapine}$ même si une petite quantité de résidu solide reste à la surface de l'épiderme.

Les spectres HSQC obtenus après incubation de la 12- $(^{13}\text{C})\text{OH-Névirapine}$ dans les épidermes humains reconstruits pendant 1 heure et 48 heures sont présentés dans les **figures IV-37a-b**. Nous n'observons pas de différence entre 1 heure, 8 heures et 24 heures. Comme nous l'avons fait pour la 12- $(^{13}\text{C})\text{Névirapine}$, ces spectres ont été superposés avec celui de l'échantillon non traité.



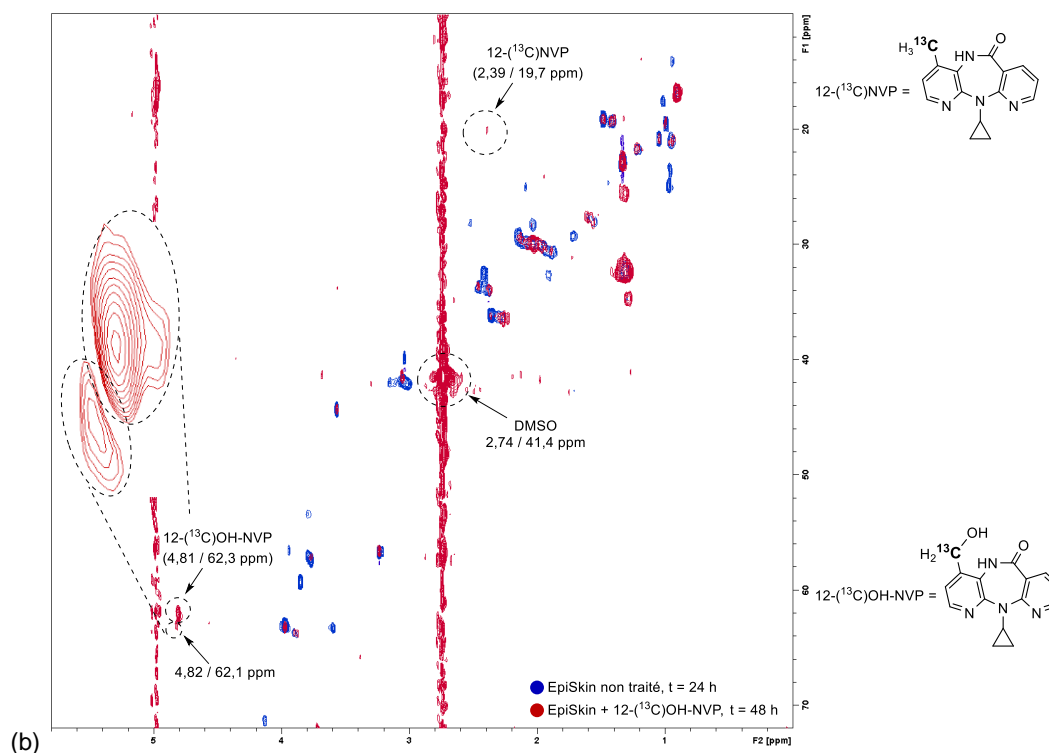


Figure IV-37 : Spectres 2D HSQC ^1H - ^{13}C (superposés au blanc) de l'épiderme après 1 heure d'incubation avec la $12\text{-}(^{13}\text{C})\text{OH-Névirapine}$ ($12\text{-}(^{13}\text{C})\text{OH-NVP}$) (a) et après 48 heures d'incubation (b)

La $12\text{-}(^{13}\text{C})\text{Névirapine}$ est présente en faible quantité dans le produit appliqué sur les épidermes, la tâche de corrélation correspondante (2,39 et 19,7 ppm) est donc détectée.

Au bout de 48 heures, une nouvelle tâche de corrélation (4,82 et 62,1 ppm) apparaît, très proche du signal dû à la $12\text{-}(^{13}\text{C})\text{OH-Névirapine}$ (4,81 et 62,3 ppm), nous indiquant qu'une transformation pourrait avoir lieu à une position différente de celle qui a été substituée au carbone 13. Ce résultat n'est pas sans rappeler celui obtenu avec la $12\text{-}(^{13}\text{C})\text{Névirapine}$. Par analogie, nous émettons deux hypothèses.

Dans un premier temps, comme nous l'avons mentionné précédemment, il a été montré lors des études de métabolisme que la Névirapine subissait des hydroxylations dans le foie pour donner les 2-, 3- et 8-OH-Névirapine. Nous proposons une transformation métabolique similaire dans les épidermes humains reconstruits à partir de la $12\text{-}(^{13}\text{C})\text{OH-Névirapine}$ (**Figure IV-38**).

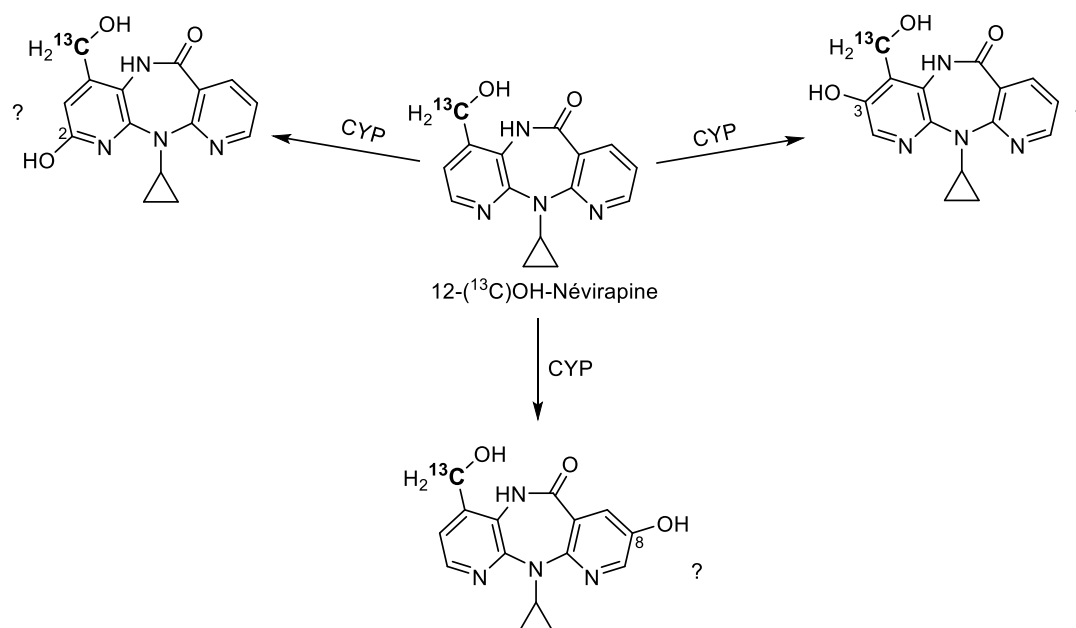


Figure IV-37 : Métabolites hypothétiques issus de la 12-(¹³C)OH-Névirapine

Afin de vérifier cette hypothèse, les positions 2, 3 et 8 de la 12-OH-Névirapine pourraient être substituées au carbone 13.

Nous pouvons également suggérer une transformation du groupement cyclopropylamine similaire à celle évoquée pour la Névirapine, aboutissant à la 12-(¹³C)OH-Névirapine *N*-déalkylée (**Figure IV-39**).

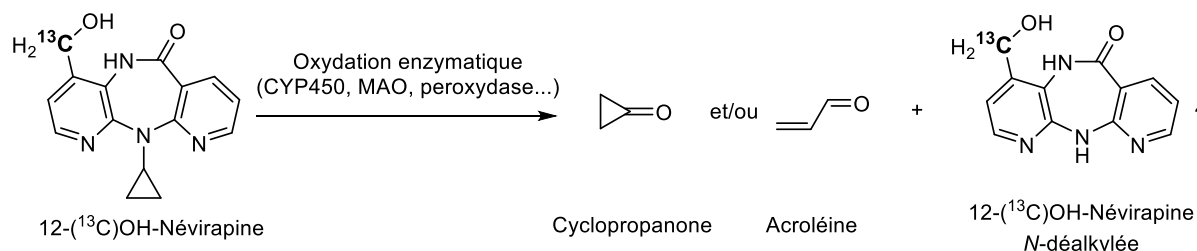


Figure IV-39 : Transformation métabolique proposée pour le groupement cyclopropylamine de la 12-(¹³C)OH-Névirapine

Comme nous l'avons vu dans le cas de la Névirapine, nous suggérons une substitution au carbone 13 de la 12-OH-Névirapine au niveau du groupement cyclopropylamine afin d'étudier cette voie métabolique.

Aucune activation de la fonction alcool n'a été observée. En particulier, la 12-(¹³C)OH-Névirapine sulfate (5,22, 67,9 ppm) n'a pas été détectée dans les épidermes humains reconstruits (**Figure IV-40**).

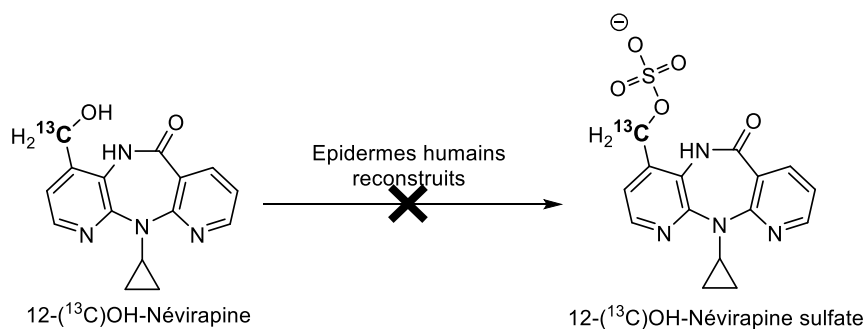


Figure IV-40 : Réaction de sulfatation de la 12-(^{13}C)OH-Névirapine, non observée dans les épidermes

Les travaux de Sharma *et al.*^[83] reposent sur la sulfatation de la 12-OH-Névirapine dans l'épiderme, mais nos résultats ne confirment pas cette hypothèse.

V.3.c. Etude par RMN HRMAS de l'interaction de la 12-(^{13}C)OH-Névirapine sulfate avec les épidermes humains reconstruits

La réactivité de la 12-(^{13}C)OH-Névirapine sulfate vis-à-vis des épidermes humains reconstruits a également été analysée par RMN HRMAS. Nous souhaitons vérifier si ce métabolite, supposé toxique, était capable de former des liaisons covalentes avec les nucléophiles de la peau (**Figure IV-41**). La 12-(^{13}C)OH-Névirapine sulfate a été incubée avec les épidermes humains reconstruits pendant 1 heure, 8 heures et 24 heures.

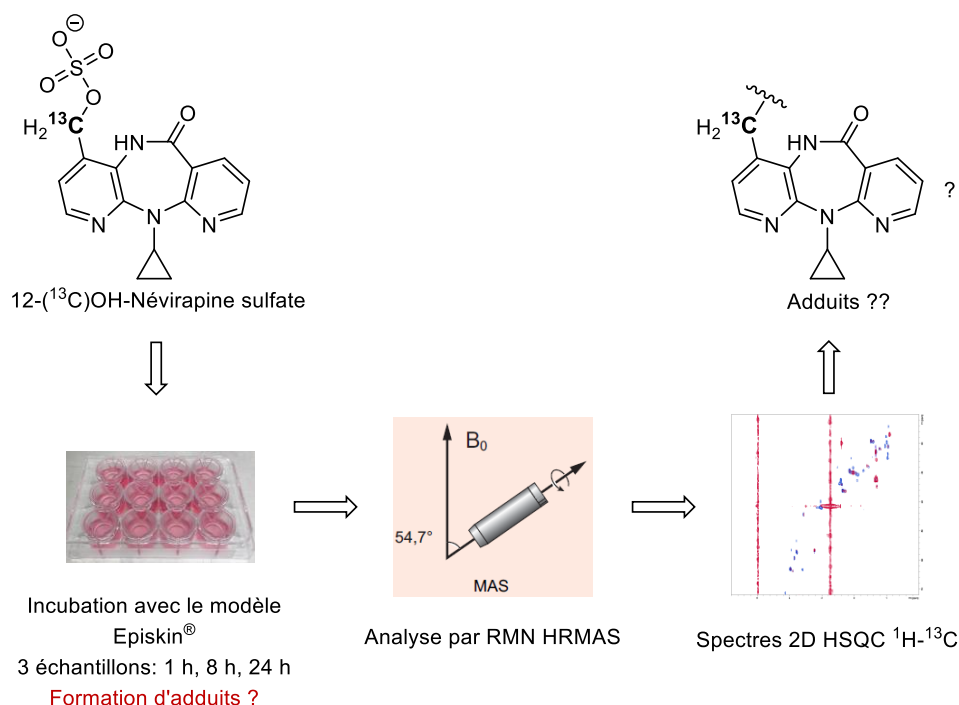
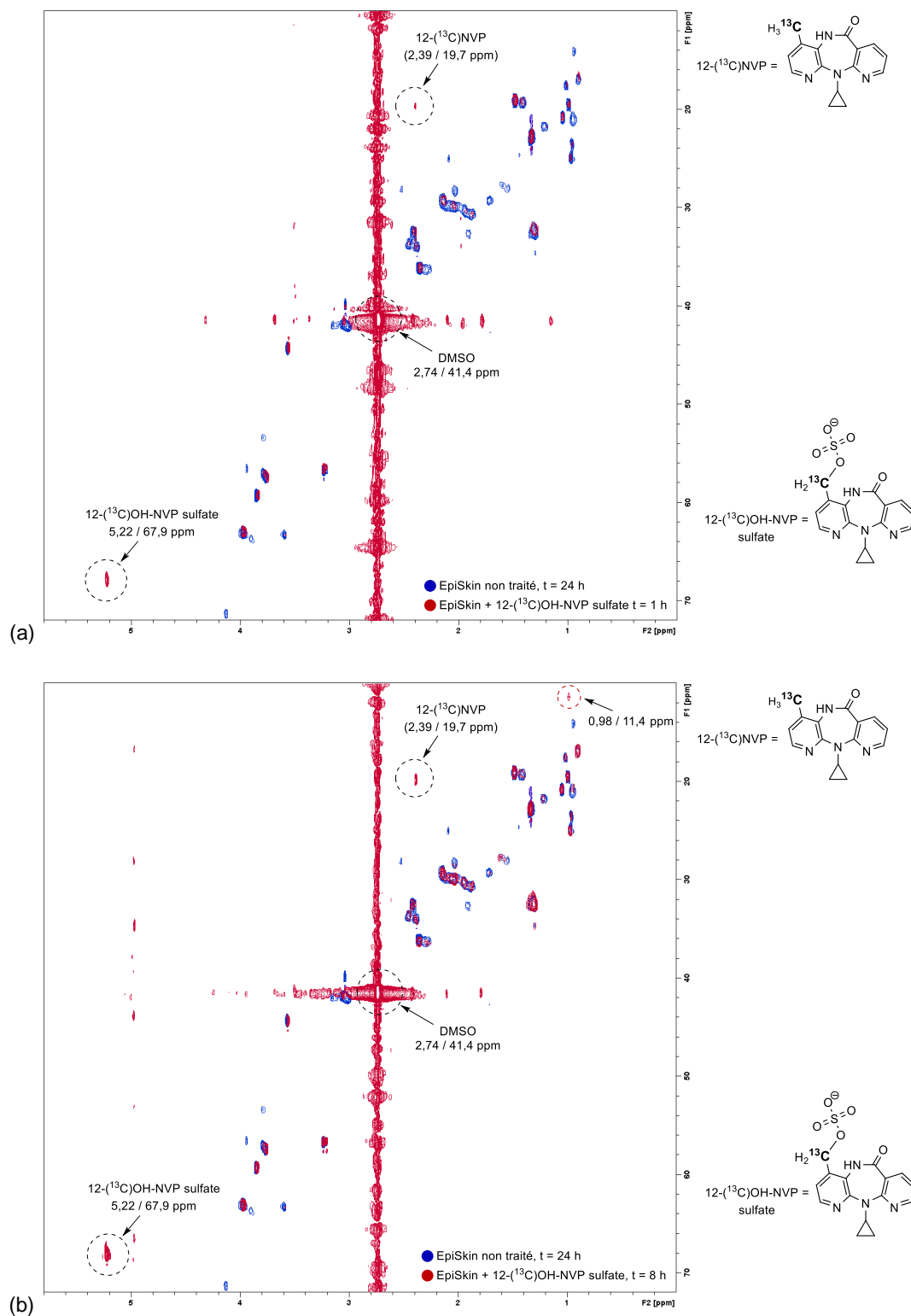


Figure IV-41 : Protocole mis en place pour l'étude de la réactivité de la 12-(^{13}C)OH-Névirapine sulfate dans les épidermes humains reconstruits

Visuellement, la pénétration cutanée du sulfate est meilleure que celles de la 12- (^{13}C) Névirapine et de l'alcool. Nous n'avons pas observé de résidu solide à la surface des épidermes.

Les spectres HSQC obtenus pour les trois temps d'incubation sont présentés dans la figure IV-42.



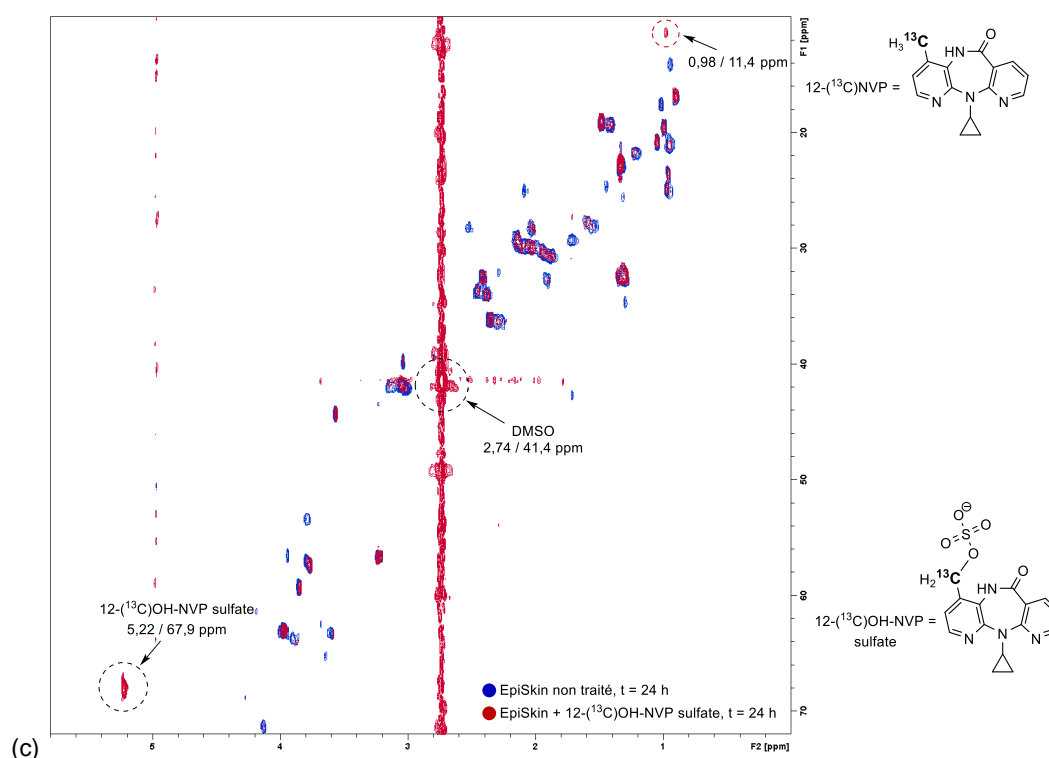


Figure IV-42 : Spectres 2D HSQC ^1H - ^{13}C (superposés au blanc) de l'épiderme après 1 heure d'incubation avec la 12-(^{13}C)OH-Névirapine sulfate (12-(^{13}C)OH-NVP sulfate) (a), après 8 heures d'incubation (b) et après 24 heures d'incubation (c)

La 12-(^{13}C)Névirapine est présente en faible quantité dans le produit appliqué sur les épidermes, le signal correspondant (2,39 et 19,7 ppm) est donc présent dans les deux premiers spectres. A 24 heures, il est possible que la Névirapine ait diffusé vers le milieu de culture ou ait été métabolisée.

Une nouvelle tâche de corrélation apparaît au bout de 24 heures dans une zone relativement blindée (0,98 et 11,4 ppm). Son intensité augmente à 48 heures. Il est peu probable que ce signal soit issu de la position de type benzylique que nous avons substituée au carbone 13 car elle est habituellement déblindée. Nous attribuons donc cette tâche de corrélation soit à une position non substituée d'un dérivé de la Névirapine, soit à un métabolite de la peau qui se formerait en quantité suffisante pour être détecté.

Les déplacements chimiques de cette tâche de corrélation sont caractéristiques d'une chaîne carbonée aliphatique. Dans la structure de la Névirapine et de ses dérivés, le groupement cyclopropyle est la seule chaîne aliphatique. Les signaux obtenus en RMN ^1H des protons CH_2 du cycle, situés dans un cône de blindage, ont des déplacements chimiques faibles qui pourraient éventuellement correspondre à la corrélation détectée (environ 0,30 ppm et 0,90 ppm pour la Névirapine et ses dérivés).

Cependant, en RMN du ^{13}C , les signaux sont plus blindés (entre 8 et 9 ppm) (**Figure IV-43**) que la tâche de corrélation détectée (11,4 ppm). Il est donc peu probable que le signal provienne de ce groupement.

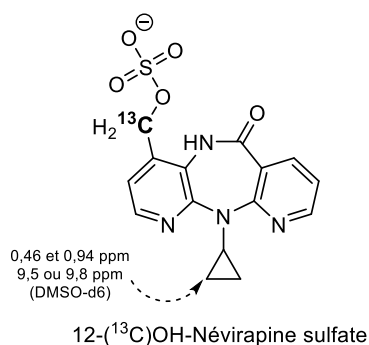


Figure IV-43 : Déplacements chimiques du groupement cycloproylamine ($-\text{CH}_2$) de la 12- ^{13}C -OH-Névirapine sulfate obtenus en phase liquide

Dans les tables de déplacements chimiques disponibles dans la littérature,^[285,286] les données RMN de l'acide 2-aminobutyrique sont très proches du signal détecté dans les épidermes (**Figure IV-44**).

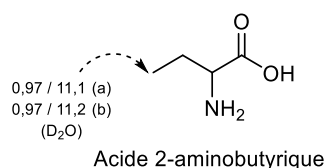


Figure IV-44 : Déplacements chimiques en phase liquide (D_2O) de l'acide 2-aminobutyrique publiés dans les bases de données *Human Métabolome Database*^[285] (a) et *Biological Magnetic Resonance Data Bank*^[286] (b)

Une production importante de cet acide aminé dans l'épiderme pourrait être à l'origine de ce signal. Cependant, nous ne pouvons expliquer un tel comportement de l'épiderme. L'origine de la corrélation à 0,98 et 11,4 ppm reste pour l'heure inconnue.

Aucun adduit avec les nucléophiles de l'épiderme n'est observable. De façon surprenante, la 12- ^{13}C -OH-Névirapine sulfate n'est pas non plus hydrolysée en alcool dans la peau. En effet, même après 48 heures d'incubation, aucune trace de 12- ^{13}C -OH-Névirapine (corrélation attendue à 4,81 et 62,3 ppm) n'est détectée (**Figure IV-45**).

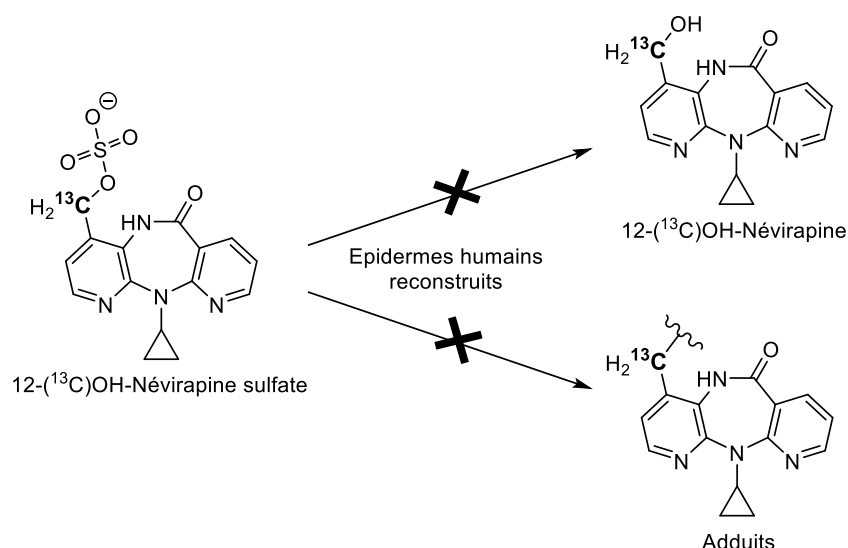


Figure IV-45 : Réactivité envisagée de la 12-(¹³C)OH-Névirapine sulfate dans les épidermes, non observée

La formation de 12-(¹³C)OH-Névirapine sulfate dans la peau et sa réactivité vis-à-vis des protéines épidermiques est l'hypothèse la plus défendue dans la littérature pour expliquer la toxicité de la Névirapine. Or, nous n'avons détecté aucune interaction entre cette molécule et les épidermes humains reconstruits. Elle semble d'ailleurs plutôt chimiquement stable puisque son produit d'hydrolyse n'a pas été observé, même après 24 heures dans un milieu contenant pourtant beaucoup d'eau. La stabilité du sulfate va à l'encontre des hypothèses de Sharma *et al.*^[83,84] basées sur une forte réactivité de ce métabolite.

V.3.d. Etude par RMN HRMAS de l'interaction de la 12-(¹³C)mésyloxy-Névirapine avec les épidermes humains reconstruits

La 12-(¹³C)mésyloxy-Névirapine, qui est un électrophile modèle plus réactif que le sulfate, a été étudiée afin de confirmer que la réactivité de dérivés activés de la 12-(¹³C)OH-Névirapine pouvait être observée par RMN HRMAS dans les épidermes humains reconstruits. La 12-(¹³C)mésyloxy-Névirapine a donc été appliquée sur les épidermes avec des temps d'incubations identiques à ceux choisis pour le sulfate : 1 heure, 8 heures et 24 heures (**Figure IV-46**).

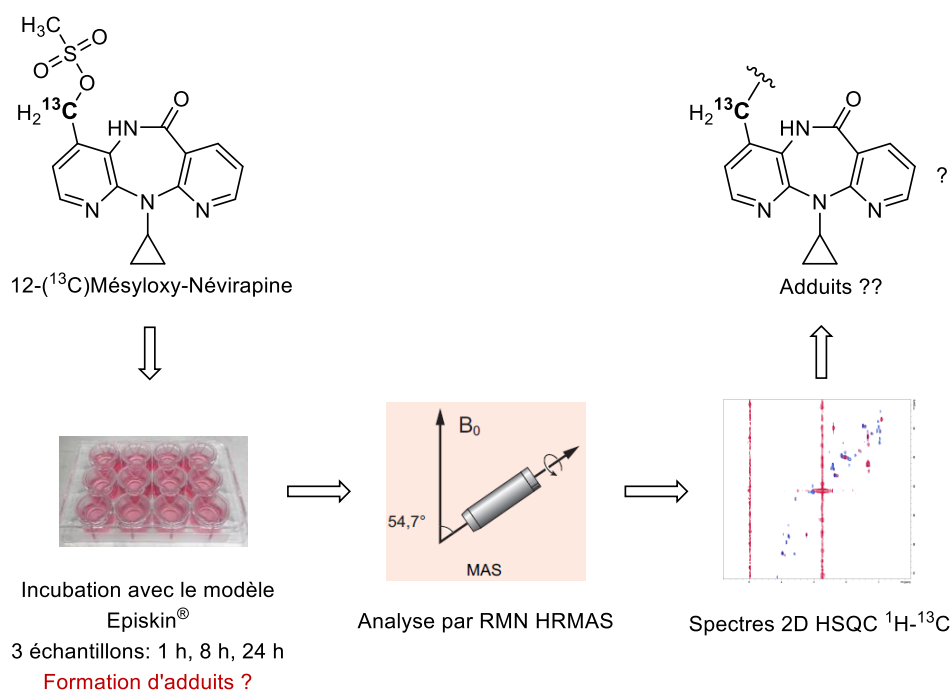
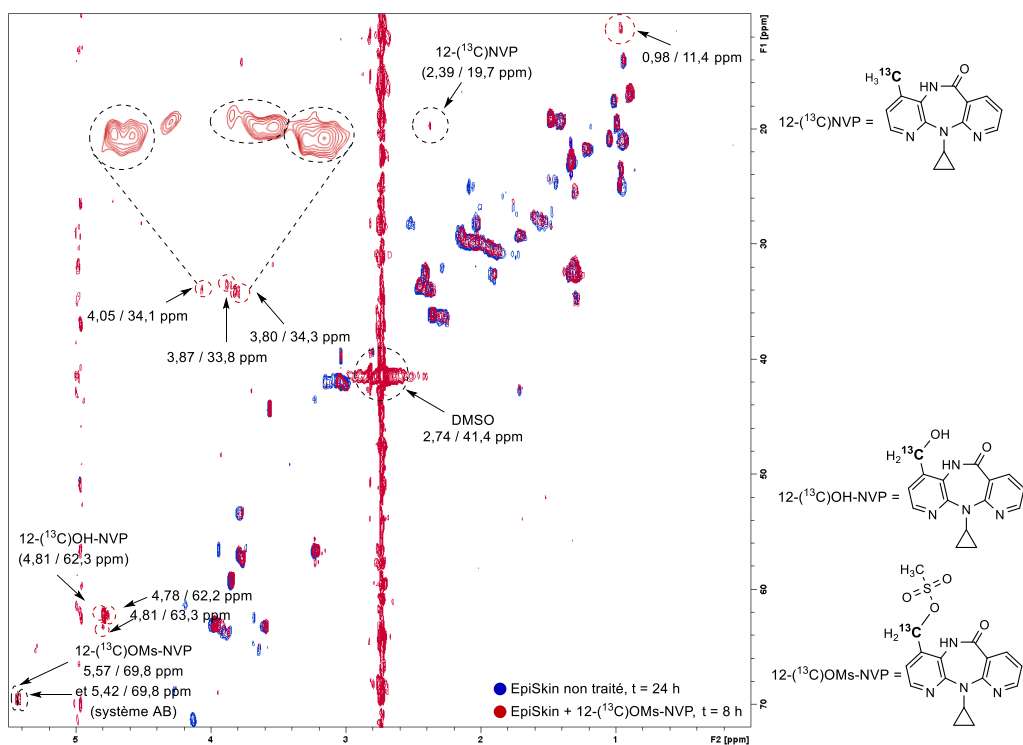
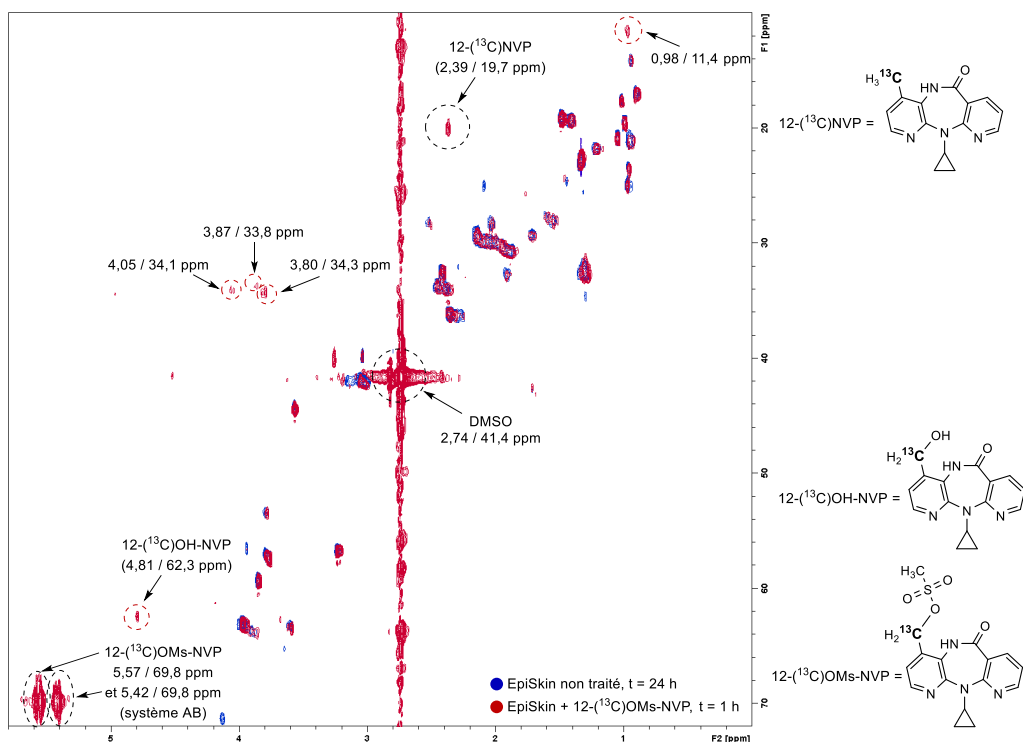


Figure IV-46 : Protocole mis en place pour l'étude de la réactivité de la 12-(¹³C)mésyloxy-Névirapine dans les épidermes humains reconstruits

La 12-(¹³C)mésyloxy-Névirapine pose beaucoup moins de problèmes de solubilité que la Névirapine, l'alcool et le sulfate. Lors des essais de réactivité en phase liquide, nous avons observé une certaine réactivité de la 12-(¹³C)mésyloxy-Névirapine avec le DMSO. Nous avons donc réduit au maximum la proportion de DMSO dans le solvant utilisé pour l'application sur les épidermes humains reconstruits. Il a été possible d'utiliser un mélange 9 / 1 d'acétone et de DMSO. Visuellement, la 12-(¹³C)mésyloxy-Névirapine en solution dans ce mélange de solvant semble bien pénétrer dans l'épiderme.

Les spectres HSQC obtenus au bout de 1 heure, 8 heures et 24 heures sont présentés dans la **figure IV-47**.



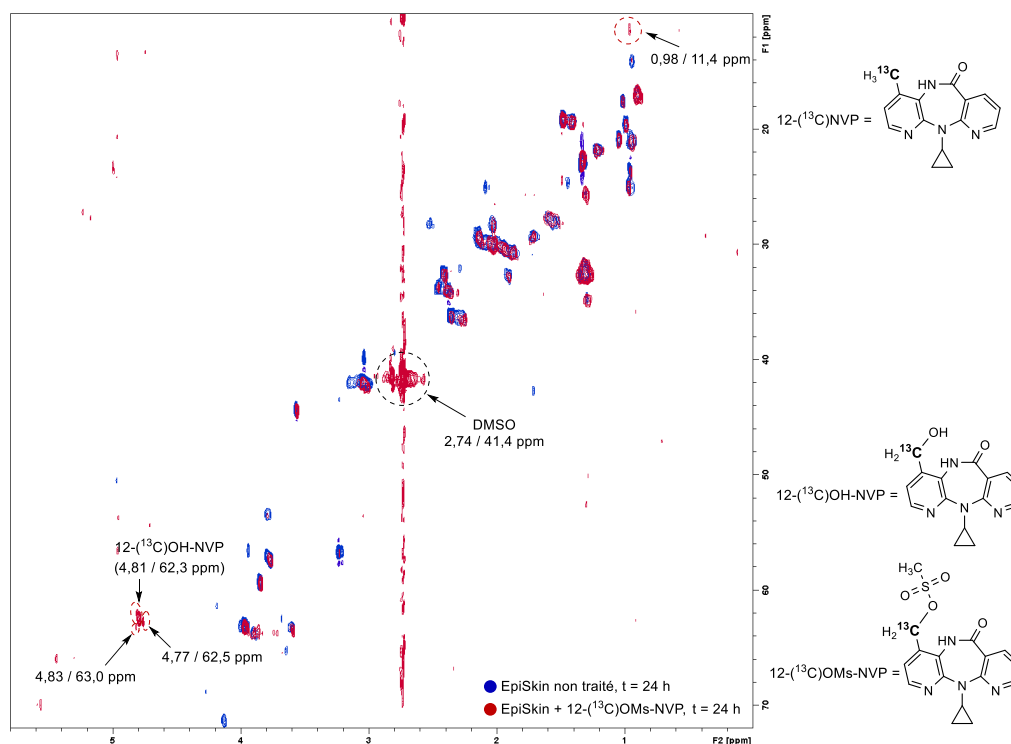


Figure IV-47 : Spectres 2D HSQC ^1H - ^{13}C (superposés au blanc) de l'épiderme après 1 heure d'incubation avec la $12\text{-}(^{13}\text{C})\text{mésyloxy-Névirapine}$ ($12\text{-}(^{13}\text{C})\text{OMs-NVP}$) (a), après 8 heures d'incubation (b) et après 24 heures d'incubation (c)

Le signal correspondant à la $12\text{-}(^{13}\text{C})\text{Névirapine}$ (2,39 et 19,7 ppm) est présent dans les spectres à 1 heure et 8 heures car cette molécule est présente dans le produit appliqué sur les épidermes. A 24 heures, en raison du phénomène de diffusion ou d'une prise en charge par le métabolisme, la $12\text{-}(^{13}\text{C})\text{Névirapine}$ n'est plus détectée.

Après une heure d'incubation, nous observons une tâche de corrélation intense correspondant à la $12\text{-}(^{13}\text{C})\text{mésyloxy-Névirapine}$ (deux tâches de corrélation dues à un système AB : 5,57 et 69,8 ppm, 5,57 et 69,8 ppm). L'intensité de ce signal est plus importante que celle des signaux obtenus pour les autres molécules substituées appliquées sur les épidermes. Cela confirme notre première impression sur une meilleure pénétration dans l'épiderme de la $12\text{-}(^{13}\text{C})\text{mésyloxy-Névirapine}$. Au bout de 8 heures, la quantité de $12\text{-}(^{13}\text{C})\text{mésyloxy-Névirapine}$ a beaucoup diminué et à 24 heures, le produit n'est plus détecté. Comparée à la $12\text{-}(^{13}\text{C})\text{OH-Névirapine}$ sulfate, la $12\text{-}(^{13}\text{C})\text{mésyloxy-Névirapine}$ semble donc bien plus réactive dans l'épiderme.

Au bout d'une heure d'incubation, la $12\text{-}(^{13}\text{C})\text{OH-Névirapine}$ (4,81 et 62,3 ppm), produit d'hydrolyse de la $12\text{-}(^{13}\text{C})\text{mésyloxy-Névirapine}$, est présente dans la peau (**Figure IV-48**).

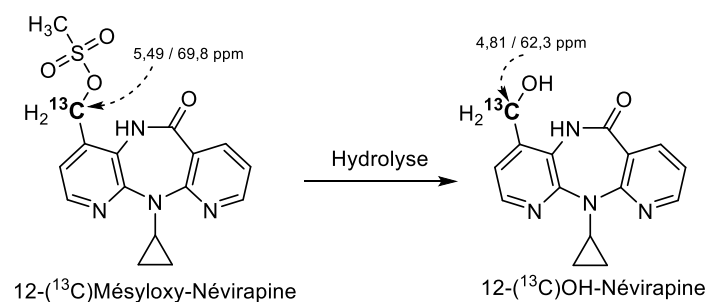


Figure IV-48 : Hydrolyse de la 12- ^{13}C mésyloxy-Névirapine observée dans les épidermes humains reconstruits

La 12- ^{13}C OH-Névirapine connaît ensuite une évolution particulière. A 8 heures et 24 heures, deux autres corrélations très proches de celle issue de cet alcool sont détectées. Au moins deux autres produits seraient des dérivés de la 12- ^{13}C OH-Névirapine dans lesquels la position 12 ne serait pas modifiée. Cette observation est en adéquation avec les résultats obtenus lors de l'application de la 12- ^{13}C OH-Névirapine sur les épidermes.

Une nouvelle tâche de corrélation apparaît au bout d'une heure dans une zone relativement blindée (0,98 et 11,4 ppm). Ce produit correspond à celui qui avait été observé au bout de 24 heures lors de l'étude de la 12- ^{13}C OH-Névirapine sulfate. Son intensité est qualitativement la même dans les trois spectres.

Enfin, trois signaux sont détectés dès 1 heure d'incubation (4,05 / 34,1 ppm, 3,87 / 33,8 ppm et 3,80 / 34,3 ppm). Ces nouvelles tâches de corrélation traduisent la formation d'adduits entre la 12- ^{13}C mésyloxy-Névirapine et les épidermes humains reconstruits. Ces produits présentent des déplacements chimiques caractéristiques des adduits formés entre la 12- ^{13}C mésyloxy-Névirapine et les nucléophiles soufrés (cystéine, glutathion) identifiés en RMN liquide. La 12- ^{13}C mésyloxy-Névirapine, par opposition au sulfate, est donc capable de modifier les résidus soufrés endogènes des épidermes humains reconstruits (**Figure IV-49**).

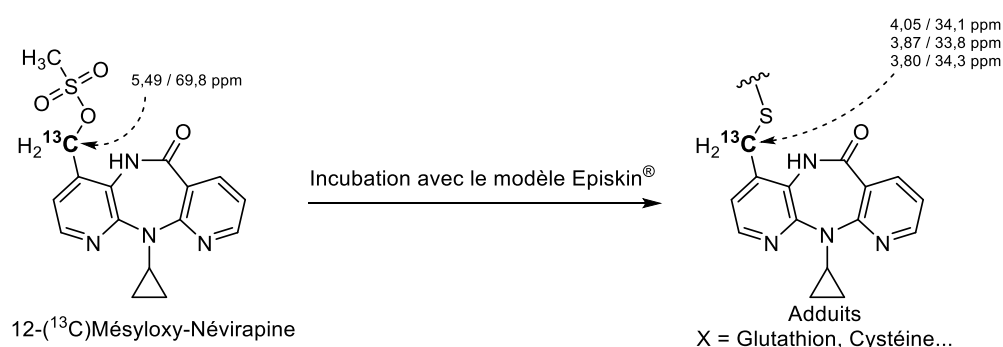


Figure IV-49 : Formation d'adduits entre la 12- ^{13}C mésyloxy-Névirapine et des résidus soufrés présents dans l'épiderme

VI. Conclusion

Les travaux de Sharma *et al.*,^[83,84] proposent que la Névirapine soit métabolisée dans le foie en 12-OH-Névirapine, molécule non réactive qui diffuserait vers l'épiderme où elle serait transformée en 12-OH-Névirapine sulfate, capable de modifier les protéines épidermiques et de déclencher une toxidermie.

Nos travaux montrent que la 12-OH-Névirapine ne se formerait pas dans les épidermes humains reconstruits, ce qui corrobore l'hypothèse de sa formation dans le foie. Cependant, plusieurs observations ne permettent pas de confirmer l'hypothèse de Sharma *et al.*^[83,84]

Première observation : aucune activation de la 12-(¹³C)OH-Névirapine en sulfate n'a été détectée.

Pourtant, d'autres transformations métaboliques peuvent être observées. En effet, les épidermes humains reconstruits ont la faculté de métaboliser la 12-(¹³C)Névirapine et la 12-(¹³C)OH-Névirapine. Ces molécules subirait certaines transformations n'affectant pas la position substituée au carbone 13, nous n'avons donc pas de certitudes à propos de la ou des réaction(s) mise(s) en jeu. Cependant, deux hypothèses au moins peuvent être émises. Par analogie avec le métabolisme hépatique de la Névirapine, la 12-(¹³C)Névirapine et la 12-(¹³C)OH-Névirapine pourraient être prises en charge par un ou plusieurs CYP450 pour donner un ou des métabolite(s) hydroxylé(s) en positions 2, 3 et / ou 8 (**Figure IV-50**).

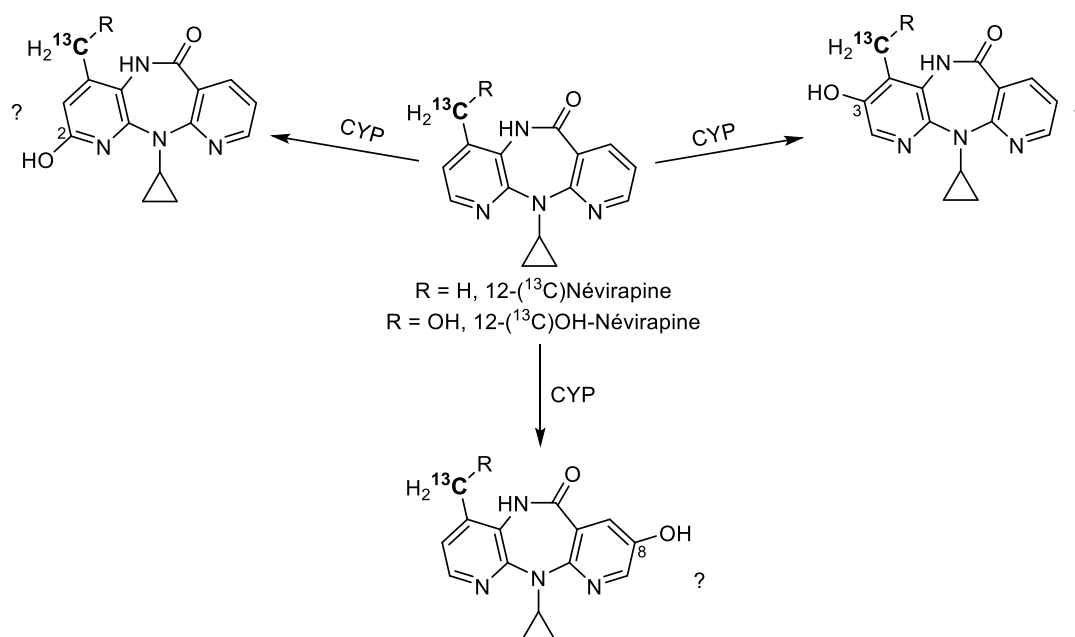


Figure IV-50 : Voies métaboliques d'hydroxylation proposées pour la 12-(¹³C)Névirapine et son dérivé alcool

Nous proposons également une voie métabolique impliquant le groupement cyclopropylamine. En effet, certaines molécules cyclopropylaminées peuvent être *N*-déalkylées par des systèmes d'oxydoréduction (CYP450, monoamines oxydases, peroxydases...) qui libèrent en parallèle de l'acroléine et/ou de la cyclopropanone (**Figure IV-51**). Ces dérivés très électrophiles pourraient alors réagir avec les résidus nucléophiles des protéines épidermiques.

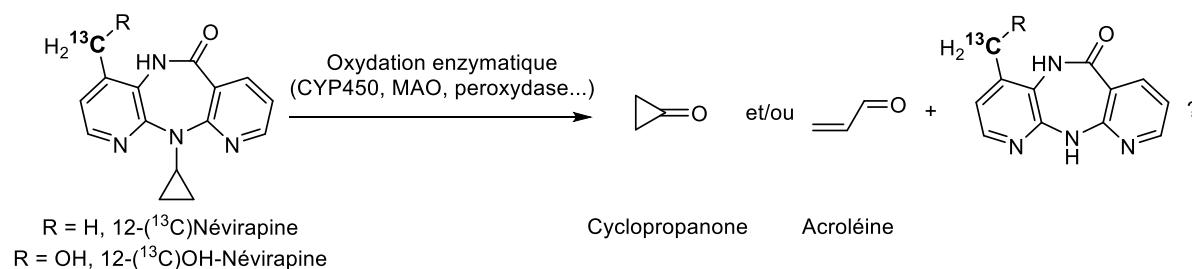


Figure IV-51 : Voie métabolique proposée pour le groupement cyclopropylamine de 12- ^{13}C Névirapine et de son dérivé alcool

Deuxième observation : de façon surprenante, la 12- ^{13}C OH-Névirapine sulfate n'interagit pas avec les épidermes humains reconstruits. Alors que ce sulfate benzylique devrait être particulièrement activé, aucune réaction d'hydrolyse et aucune autre réactivité n'est observée. Des essais en solution réalisés au sein du laboratoire canadien de Jack Uetrecht ont d'ailleurs montré que le sulfate était relativement stable, même en présence de bases telles que la lysine ou l'ammoniac.^[287]

Troisième observation : les épidermes humains reconstruits sont capables de réagir avec un dérivé activé de la Névirapine. En effet, la 12- ^{13}C mésyloxy-Névirapine forme des adduits avec certains nucléophiles soufrés de l'épiderme. L'observation d'adduits est essentielle car elle valide la faculté des épidermes humains reconstruits à réagir avec un dérivé activé de la Névirapine. L'absence d'interaction de la 12- ^{13}C OH-Névirapine sulfate avec les épidermes résulte donc de la faible réactivité de cette molécule.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Souvent réduite à son rôle de barrière physique, la peau est un organe métabolique à part entière. En effet, elle est équipée de nombreux systèmes enzymatiques de détoxification ayant pour but de transformer les xénobiotiques en substances facilement éliminables.^[12] Malheureusement, il peut arriver que les métabolites ainsi générés soient plus réactifs que la molécule initiale et conduisent à des pathologies telles que les toxidermies médicamenteuses. A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement curatif. Seuls l'interruption du traitement et les soins locaux peuvent soulager les patients qui gardent souvent des séquelles psychologiques importantes.^[2] En ce sens, il est important de pouvoir évaluer le potentiel toxique des médicaments en comprenant les mécanismes à l'origine des toxidermies. Cela reste un véritable défi car leur nature imprévisible rend les essais chez l'homme quasiment impossibles et les modèles animaux sont rares.

I. Problématique de thèse

La Névirapine (**Figure 1**) est un médicament antirétroviral qui inhibe la transcriptase inverse du VIH de type 1. En association avec d'autres antirétroviraux, elle est très prescrite aux patients victimes du virus du SIDA, notamment pour limiter le risque de transmission de la mère à l'enfant.

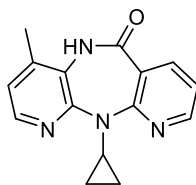


Figure 1 : Structure de la Névirapine

Malgré ses bénéfiques thérapeutiques, la Névirapine peut provoquer de graves effets secondaires hépatiques. Elle provoque également des lésions cutanées chez 9% des patients. Si la plupart des effets secondaires cutanés sont modérés, 16% des patients atteints souffrent de graves toxidermies qui mettent en jeu leur pronostic vital.^[63] Ces effets indésirables médicamenteux, rares et imprévisibles, sont appelés réactions idiosyncratiques.

Les mécanismes immunitaires à l'origine des réactions idiosyncratiques sont pour l'heure méconnus. Des preuves indirectes montrent que la plupart de ces réactions ne seraient pas induites par le médicament lui-même, mais par un ou plusieurs métabolite(s) généré(s) par le métabolisme des xénobiotiques.^[69] Ces molécules sont nommées pro-haptènes.

Les premiers travaux consacrés à la toxidermie induite par la Névirapine ont été réalisés dans un modèle animal développé dès le début des années 2000.^[288] Cependant, à l'échelle moléculaire, les deux étapes clés impliquées dans l'induction d'une toxidermie médicamenteuse par un pro-haptène seraient la bioactivation de la molécule et la formation d'un complexe antigénique entre l'haptène ainsi généré et une protéine épidermique. La compréhension des mécanismes réactionnels qui régissent ces phénomènes passe donc par la chimie.

Il existe peu de protocoles permettant d'analyser à l'échelle moléculaire la bioactivation d'un médicament dans la peau humaine et de mettre en évidence l'interaction des molécules potentiellement toxiques avec l'épiderme. Depuis le début des années 2010, le laboratoire de Dermatochimie travaille sur un nouveau modèle d'étude des interactions haptènes-protéines basé sur l'utilisation d'épidermes humains reconstruits associés à la RMN HRMAS. La technique a été utilisée avec succès pour étudier le devenir dans la peau de plusieurs allergènes de contact.^[4,6,233,234] Dans le travail de thèse ici présenté, le protocole épiderme humain reconstruit / RMN HRMAS a été appliqué pour la première fois à l'étude d'un médicament administré par voie orale et qui n'entre pas en contact avec la surface de la peau. Cette substance subit des transformations métaboliques de phase I dans le foie avant de rejoindre l'épiderme.

II. Hypothèse de travail et objectifs

L'hypothèse principale de ce travail de thèse est basée sur des résultats issus d'études *in vivo* réalisées chez le rat et *in vitro* sur des homogénats de peau humaine.^[79,83,84] La Névirapine, prise par voie orale, serait métabolisée dans le foie par un cytochrome P450 en un intermédiaire hydroxylé, la 12-OH-Névirapine. Ce métabolite primaire non réactif pourrait diffuser jusqu'à l'épiderme pour y être sélectivement pris en charge par une sulfotransférase. La 12-OH-Névirapine sulfate ainsi formée serait suffisamment réactive pour alkyler les protéines épidermiques et déclencher la réponse immunitaire à l'origine des toxidermies (**Figure 2**).

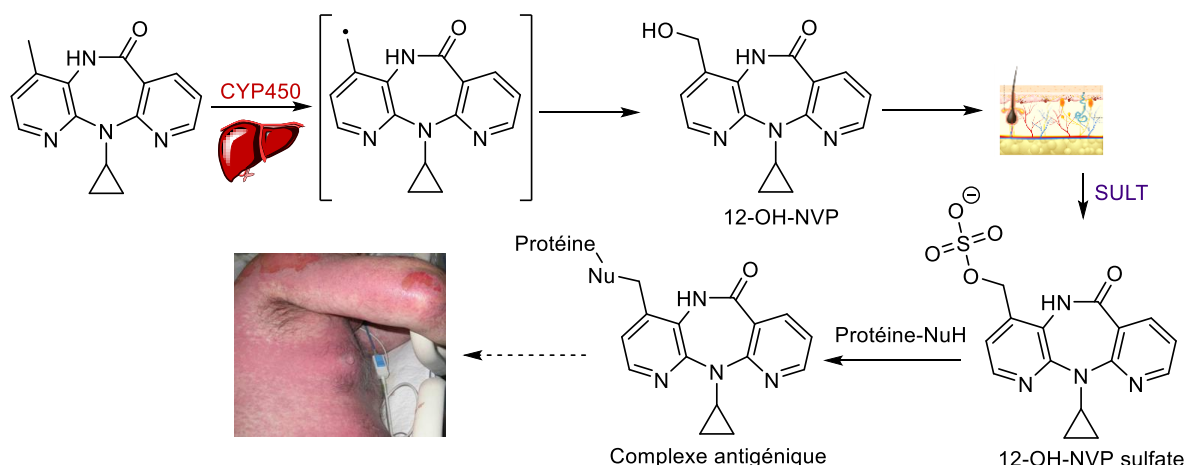


Figure 2 : Hypothèse de travail

La Névirapine se prête donc parfaitement aux objectifs de ce travail de thèse qui ont été :

- D'étudier par RMN HRMAS l'activation métabolique du principe actif d'un médicament et d'un de ses métabolites primaires hépatiques dans des épidermes humains reconstruits,
- D'analyser les interactions entre les métabolites éventuellement générés et les épidermes humains reconstruits.

III. Chimie

L'étude du devenir des substances appliquées sur les épidermes humains reconstruits par RMN HRMAS nécessite l'utilisation de molécules substituées au carbone 13, idéalement au niveau de la position supposée réactive.^[87] La 12-(¹³C)Névirapine, la 12-(¹³C)OH-Névirapine et la 12-(¹³C)OH-Névirapine sulfate ont donc été synthétisées. Un quatrième dérivé, la 12-(¹³C)mésyloxy-Névirapine, a également été préparé afin de disposer d'un électrophile modèle analogue au sulfate mais avec une réactivité supérieure (Figure 3).

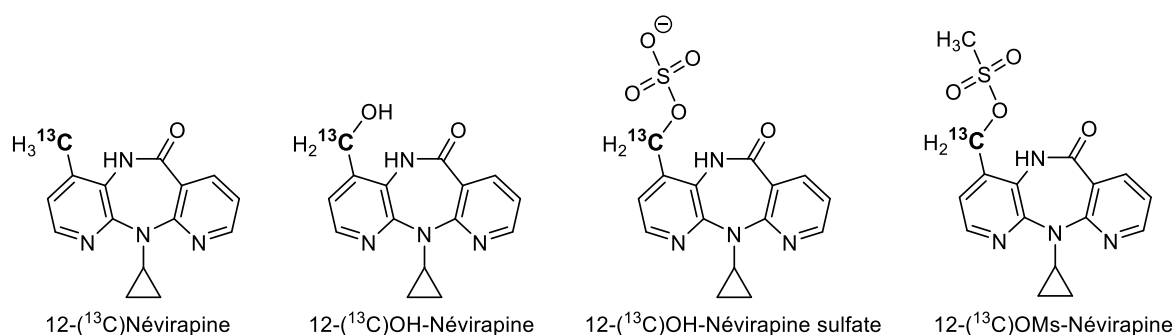


Figure 3 : Molécules synthétisées dans ce travail de thèse

Une méthode de synthèse efficace de la 12-(¹³C)Névirapine à partir d'un petit précurseur substitué au carbone 13 a été développée. En ce qui concerne les métabolites alcool, sulfate et mésyle préparés à partir de la 12-(¹³C)Névirapine, les rendements restent moyens mais les quantités synthétisées ont permis de réaliser des études par RMN HRMAS. Globalement, les principales difficultés rencontrées dans les synthèses sont liées à la purification et à la faible solubilité de ces molécules. Nous travaillons actuellement à l'amélioration de la synthèse et de la purification de la 12-OH-Névirapine.

IV. Résultats obtenus en RMN HRMAS

Nous n'avons pas observé la formation de 12-(¹³C)OH-Névirapine à partir de la 12-(¹³C)Névirapine dans les épidermes humains reconstruits. Nous pouvons confirmer que cette molécule est un métabolite primaire formé dans le foie.

L'application de la 12-(¹³C)OH-Névirapine sur les épidermes n'a pas abouti à l'observation de 12-(¹³C)OH-Névirapine sulfate. L'activation du métabolite primaire hépatique de la Névirapine n'a donc pas été détectée dans les épidermes.

Cependant, les épidermes humains reconstruits semblent avoir la capacité de métaboliser la 12-(¹³C)Névirapine et la 12-(¹³C)OH-Névirapine. En effet, l'incubation de ces molécules avec les épidermes humains reconstruits nous a permis d'observer l'apparition de métabolites par RMN HRMAS.

Nous soupçonnons la prise en charge de la Névirapine et de ses dérivés par des systèmes enzymatiques d'oxydoréduction aboutissant à des transformations n'affectant pas la position 12 des molécules. Comme cela a été montré dans le foie, une hydroxylation par des cytochromes P450 des positions 2, 3 et 8 est envisageable.^[67,68] Le groupement cyclopropylamine est également connu pour inactiver certains cytochromes P450^[281] et agit comme un inhibiteur suicide d'autres enzymes comme les monoamines oxydases ou les alcools déshydrogénases.^[77] Le mécanisme précis de la bioactivation métabolique des cyclopropylamines n'est pas totalement élucidé. Il aboutirait à la libération de carbonyles α,β -insaturés comme l'acroléine et/ou à la formation de cyclopropanone (**Figure 4**).^[283]

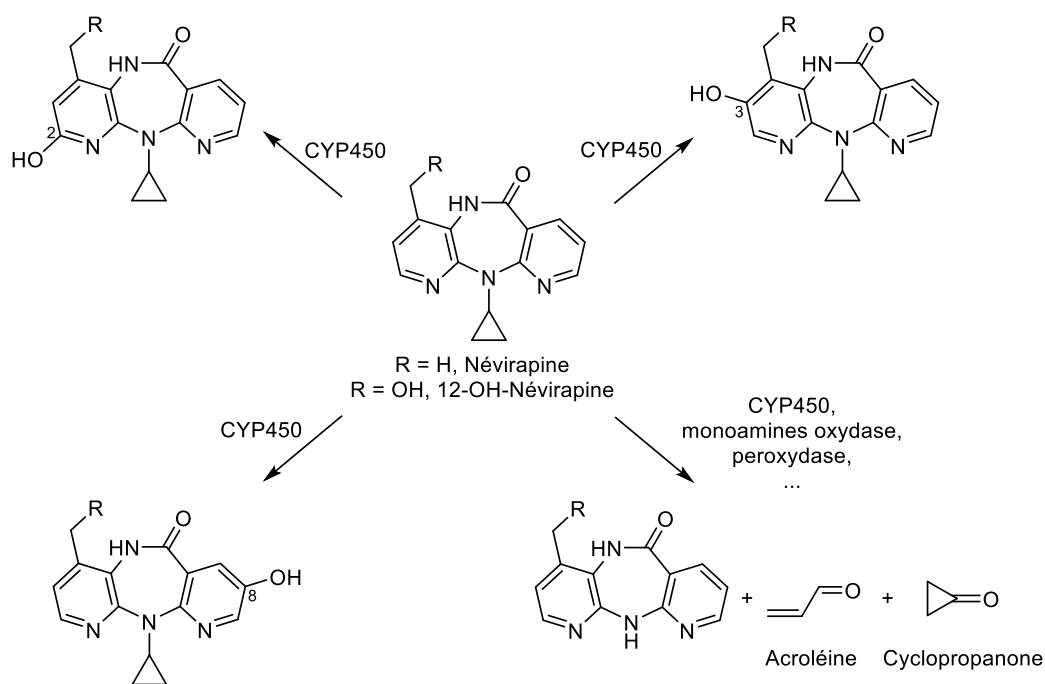


Figure 4 : Transformations métaboliques proposées dans les épidermes humains reconstruits pour la Névirapine et la 12-OH-Névirapine

L'acroléine en tant qu'accepteur de Mickael, est potentiellement toxique. Au laboratoire, des adduits entre un allergène de contact α,β -insaturé, le cinnamaldéhyde, et les épidermes humains reconstruits ont d'ailleurs déjà été observés par RMN HRMAS. Pour valider l'une ou l'autre des hypothèses, une substitution au carbone 13 des positions supposées réactives est actuellement envisagée.

Nous avons aussi testé la réactivité de deux dérivés activés de la 12- $(^{13}\text{C})\text{OH}$ -Névirapine : le sulfate, métabolite secondaire supposé épidermique, et le mésyle, employé comme électrophile modèle. Seul le mésyle interagit avec les épidermes humains reconstruits en formant des adduits avec les résidus soufrés. La 12- $(^{13}\text{C})\text{OH}$ -Névirapine sulfate n'a montré aucune réactivité. La 12-OH-Névirapine sulfate, présentée dans la littérature comme l'entité toxique, ne nous semble pas réactive. Il est possible que la bioactivation de la Névirapine passe par une voie alternative à la sulfatation.

V. Discussion

Les résultats obtenus en RMN HRMAS ne permettent pas de confirmer l'hypothèse de la sulfatation de la 12-OH-Névirapine dans la peau en un dérivé activé capable de modifier les protéines épidermiques.

En terme de protocole expérimental, la 12-(¹³C)Névirapine et ses dérivés sont solubles uniquement dans le DMSO. Malgré le pouvoir pénétrant accru de ce solvant,^[279] les molécules étudiées entrent difficilement dans l'épiderme. Récemment, des patchs tests ont été effectués chez une vingtaine de patients infectés par le virus du SIDA et sensibilisés à la Névirapine, avec des résultats positifs chez deux d'entre eux.^[289] Dans les conditions occlusives des patchs tests, la Névirapine semble pénétrer dans l'épiderme. Nos travaux constituent les premières applications de ces substances à la surface des épidermes humains reconstruits et sans occlusion, la Névirapine et ses dérivés y entrent difficilement. Cela explique que les signaux obtenus en RMN HRMAS soient faibles et peu nombreux. Cela ne nous a néanmoins pas empêchés de détecter des transformations métaboliques pour la 12-(¹³C)Névirapine et la 12-(¹³C)OH-Névirapine ainsi que des adduits pour la 12-(¹³C)mésyloxy-Névirapine.

Le protocole épidermes humains reconstruits / RMN HRMAS développé au laboratoire de Dermatochimie devra probablement être adapté, au cas par cas, aux molécules faiblement solubles et / ou faiblement pénétrantes. Une optimisation des conditions d'applications (véhicule, temps d'incubation, rinçage...) sera nécessaire pour une analyse complète du devenir de ces molécules dans les épidermes humains reconstruits.

Nous pouvons nous interroger sur les activités relatives des sulfotransférases dans l'épiderme humain et dans la peau des rats. A ce jour, elles ont été peu étudiées. Les activités des sulfotransférases épidermiques (isoforme SULT1A1, qui serait impliquée dans le métabolisme de la Névirapine) n'ont été comparées quantitativement chez l'homme et le rat que sur un seul substrat, le minoxidil.^[16] Pour ce substrat, il a été montré que la SULT1A1 était deux fois plus active dans les épidermes des rats que dans celui de l'homme. La ou les voie(s) de bioactivation de la Névirapine chez l'homme pourrai(en)t être bien plus complexe(s) que celle(s) élucidée(s) chez le rat.

Nous devons également être prudents sur l'utilisation des épidermes reconstruits en tant que modèles de peau humaine. En particulier, il a été montré que les ARN messagers de l'isoforme SULT1A1, fortement soupçonnée de sulfater la 12-OH-Névirapine dans la peau, étaient plus exprimés dans le derme des modèles *Full Thickness* que dans l'épiderme EpiSkin[®].^[239] En ce qui concerne les activités relatives des sulfotransférases SULT1A1 dans

les modèles et dans la peau humaine, elles ont été comparées vis-à-vis d'un seul substrat, le *para*-nitrophénol. Des traces de sulfatation de ce substrat ont été détectées dans des explants de peau humaine mais pas dans le modèle EpiSkin[®].^[235]

Le protocole épidermes humains reconstruits / RMN HRMAS a montré un bon potentiel dans l'étude *in situ* du métabolisme de plusieurs pro-haptènes.^[6] Un travail de thèse précédemment réalisé au laboratoire a par exemple permis de mettre en évidence l'activité de peroxydases et de mono-oxygénases à cytochromes P450.^[234] En ce qui concerne les sulfotransférases, il serait pertinent d'appliquer la 12-(¹³C)Névirapine et ses dérivés sur des modèles *Full Thickness* comportant un derme fonctionnel avant d'en analyser l'épiderme par RMN HRMAS. Des premiers tests de séparation du derme et de l'épiderme de ces modèles ont d'ailleurs été réalisés au laboratoire.

Enfin, il est fort probable qu'il existe plus d'une voie de bioactivation des pro-haptènes à l'origine des toxidermies médicamenteuses, et pour une voie d'activation, de nombreux adduits sont possibles. Les combinaisons sont donc multiples. Nous gardons à l'esprit que les adduits détectés en RMN HRMAS ne sont pas forcément ceux qui déclenchent la plus forte réaction du système immunitaire. De plus, des facteurs génétiques entrent en ligne de compte. Il existe non seulement des différences d'expressions des enzymes du métabolisme d'un patient à l'autre, mais également des variabilités dans les répertoires des récepteurs des lymphocytes T, et un polymorphisme des protéines du CMH (protéines HLA, *Human Leucocyte Antigen*).^[290]

L'étude des mécanismes moléculaires menant à la formation d'un complexe antigénique haptène-protéine s'inscrit donc dans un ensemble de travaux nécessaires à la compréhension des toxidermies médicamenteuses.

Partie expérimentale

Experimental section

Chemistry

General informations

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

Tetrahydrofuran (THF) was dried by passing through activated alumina under argon pressure using Glass Technology GTS100 devices. All the following distillation were carried out under an argon atmosphere. Methanol (MeOH) was dried with CaH₂ (calcium hydride), filtered and distilled. Acetonitrile (CH₃CN) was dried by shaking with activated 4 Å molecular sieves. Xylenes (mixture of isomers) was distilled under reduced pressure from P₂O₅. Diglyme and hexamethylphosphoramide (HMPA) were distilled from CaH₂ under reduced pressure and stored over 4 Å molecular sieves. Dimethylformamide (DMF) was distilled under reduced pressure and stored over 4 Å molecular sieves. Diisopropylamine was distilled from potassium hydroxide (KOH).

All commercially available reagents were used as received. *n*-Butyllithium was gauged according to the procedure described by Suffert.^[291] Extractive procedures were performed using technical grade solvents. All aqueous solutions were saturated.

Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed on glass-backed precoated silica gel plates (Merck 60 F254) with visualization by ultraviolet light (254 nm) and cerium phosphomolybdic acid (PMA/Ce). PMA/Ce was prepared by mixing phosphomolybdic acid (2 g), cerium (IV) sulfate (0.8 g), sulfuric acid (4.8 mL) and water (72.5 mL).

Flash column chromatography was carried out using silica gel 60 (particle size 40 - 63 µm, Merck).

Gel filtration chromatography was performed with Sephadex[®] LH-20 (particle size 25 - 100 µm, GE Healthcare).

Proton (^1H NMR) and carbon (^{13}C NMR) nuclear magnetic resonance spectra were recorded on 300 MHz or 500 MHz instruments (Bruker). Chemical shifts (δ) are reported in parts per million (ppm). The residual solvent signal was used as the internal standard. Multiplicities are indicated by s (singlet), br s (broad singlet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet) and m (multiplet). Constant coupling (J) are given in Hertz. Data are reported as followed: chemical shift, multiplicity, integration, coupling constant(s) J. Signal attributions were determined either in the basis of unambiguous chemical shift or coupling patterns. HSQC and HMBC experiments were performed when necessary to complete spectral assignment. Melting points were measured using a Bütchi-totolli 510 apparatus. MW refers to molecular weight ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

Synthesis of ^{13}C -substituted molecules

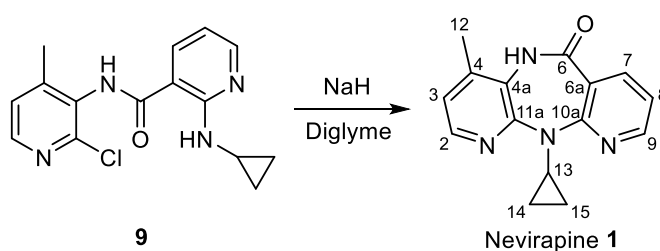
Synthesis of Nevirapine **1** and 12-(^{13}C)Nevirapine 12-(^{13}C)**1**

Nevirapine **1**

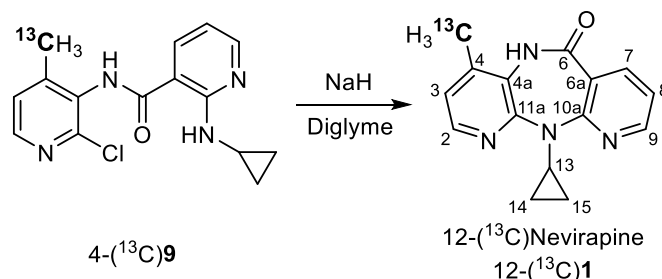
$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}$

$\text{MW} = 266.30 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

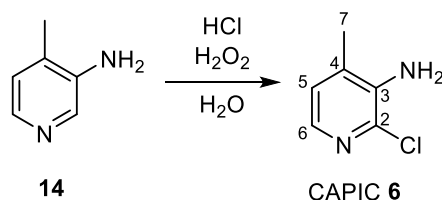
$\text{TLC } R_f = 0.49$ (toluene/acetone, 70:30); rev: PMA/Ce



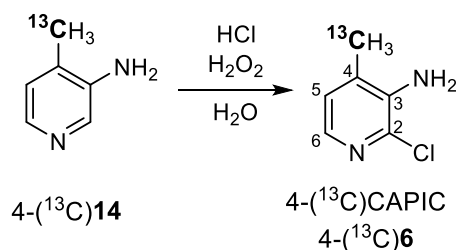
Sodium hydride (60% in mineral oil, 0.715 g, 17.9 mmol, 3.47 equiv.) was suspended in diglyme (2.1 mL) and heated to 120 °C. In an other flask, **9** (1.559 g, 5.15 mmol, 1 equiv.) was dissolved in dry diglyme (7.5 mL) to give a yellow solution which was carefully added to the hot suspension of sodium hydride. The reaction mixture was stirred at 135 °C for 3 h, cooled to 0 °C and quenched with ethanol (3 mL). The excess ethanol was evaporated and the mixture was poured into distilled water (64 mL). The pH was adjusted to 7 using glacial acetic acid to give a yellow precipitate. The suspension was stirred overnight, cooled to 0 °C and filtered. The solid was washed with cold water (3 x 8 mL) and prepurified by column chromatography (dichloromethane/acetone, 80:20 and 70:30) to give 1.086 g of a yellow powder. The product was taken up in methanol (8.5 mL), refluxed, cooled to 0 °C and filtered to give pure Nevirapine **1** (0.820 mg, 60%) as a white powder. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- D_6): δ 0.34 (m, 2H, **H-14** and **H-15**), 0.87 (m, 2H, **H-14** and **H-15**), 2.33 (s, 3H, **H-12**), 3.62 (m, 1H, **H-13**), 7.05 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 5.0 \text{ Hz}$, **H-3**), 7.18 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5 \text{ Hz}$ and $^3J_{\text{HH}} = 4.5 \text{ Hz}$, **H-8**), 8.01 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5 \text{ Hz}$ and $^4J_{\text{HH}} = 2.0 \text{ Hz}$, **H-7**), 8.07 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 4.5 \text{ Hz}$, **H-2**), 8.50 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 5.0 \text{ Hz}$ and $^4J_{\text{HH}} = 2.0 \text{ Hz}$, **H-9**), 9.91 (s, 1H, NH). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO- D_6): δ 8.54 (**C-14** or **C-15**), 8.76 (**C-14** or **C-15**), 17.6 (**C-12**), 29.3 (**C-13**), 119.3 (**C-8**), 120.9 (**C-6a**), 122.3 (**C-3**), 124.9 (**C-4a**), 140.0 (**C-7**), 140.7 (**C-4**), 143.6 (**C-2**), 151.3 (**C-9**), 154.2 (**C-11a**), 160.0 (**C-10a**), 167.0 (**C-6**). Mp : 247 °C - 249 °C (litt. 247 °C - 249 °C).

12-(¹³C)Nevirapine 12-(¹³C)1C₁₄¹³CH₁₄N₄OMW = 267.30 g.mol⁻¹TLC R_f = 0.49 (toluene/acetone, 70:30); rev: PMA/Ce

Starting from 4-(¹³C)9 (1.125 g, 3.70 mmol, 1 equiv.) and sodium hydride (60% in mineral oil, 0.514 g, 12.9 mmol, 3.47 equiv.), the same procedure as for the synthesis of Nevirapine 1 was repeated to give pure 12-(¹³C)Nevirapine 12-(¹³C)1 (0.516 g, 52%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ 0.34 (m, 2H, **H-14** and **H-15**), 0.87 (m, 2H, **H-14** and **H-15**), 2.33 (d, 3H, ¹J_{CH} = 128.0 Hz, ¹³CH₃), 3.62 (m, 1H, **H-13**), 7.06 (dd, 1H, ³J_{CH} = 5.0 Hz, ³J_{HH} = 5.0 Hz, **H-3**), 7.19 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.5 Hz and ³J_{HH} = 5.0 Hz, **H-8**), 8.01 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.0 Hz and ⁴J_{HH} = 2.0 Hz, **H-7**), 8.07 (d, 1H, ³J_{HH} = 5.0 Hz, **H-2**), 8.50 (dd, 1H, ³J_{HH} = 4.5 Hz and ⁴J_{HH} = 2.0 Hz, **H-9**), 9.88 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-D₆): δ 8.5 (**C-14** or **C-15**), 8.7 (**C-14** or **C-15**), 17.5 (¹³C-12), 29.3 (**C-13**), 119.3 (**C-8**), 120.9 (**C-6a**), 122.2 (**C-3**), 124.9 (**C-4a**), 140.0 (**C-7**), 140.7 (d, ¹J_{CC} = 42.0 Hz, **C-4**), 143.6 (d, ³J_{CC} = 3.4 Hz, **C-2**), 151.3 (**C-9**), 154.2 (**C-11a**), 159.9 (**C-10a**), 167.0 (**C-6**).

2-Chloro-4-methyl-3-pyridinamine 6 (CAPIC)**C₆H₇ClN₂****MW** = 142.59 g.mol⁻¹**TLC** R_f = 0.56 (dichloromethane/acetone, 91:9); rev: PMA/Ce

14 (0.543 g, 5.02 mmol, 1 equiv.) was dissolved in concentrated hydrochloric acid (10 mL). A solution of 30% hydrogen peroxide (0.56 mL, 5.48 mmol, 1.09 equiv.) was added over 30 minutes and the solution was stirred at room temperature for 40 minutes. The pH was adjusted to 8-9 using a 4 M sodium hydroxide aqueous solution to give an orange suspension. Dichloromethane (20 mL) was added to make the precipitate soluble and the aqueous phase was extracted with dichloromethane (4 x 50 mL). The reunited organic phases were dried over MgSO₄, evaporated and dried under vacuum. The yellow solid was purified by column chromatography (petroleum ether/acetone, 85:15) to give CAPIC **6** as white powder (0.521 g, 73%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ 2.15 (s, 3H, **H-7**), 5.26 (s, 2H, NH₂), 6.97 (d, 1H, ³J_{HH} = 4.6 Hz, **H-5**), 7.50 (d, 1H, ³J_{HH} = 4.6 Hz, **H-6**). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-D₆): δ 17.6 (**C-7**), 124.9 (**C-5**), 131.5 (**C-4**), 135.0 (**C-3**), 135.8 (**C-6**), 139.5 (**C-2**). Mp : 64 °C - 66 °C (litt. 65 °C - 66 °C).

2-Chloro-4-(¹³C)methyl-3-pyridinamine 4-(¹³C)6 (4-(¹³C)CAPIC)**C₅¹³CH₇ClN₂****MW** = 143.59 g.mol⁻¹**TLC** R_f = 0.56 (dichloromethane/acetone, 91:9); rev: PMA/Ce

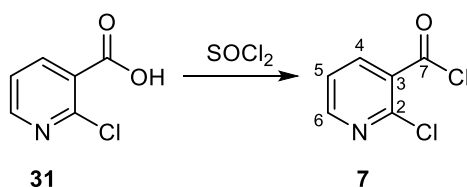
Starting from 4-¹³C)**14** (0.665 g, 6.09 mmol, 1 equiv.), 37% hydrochloric acid (12,1 mL) and 35% hydrogen peroxide (0.68 mL, 6.66 mmol, 1.1 equiv.), the same procedure as described for the preparation of **6** gave 4-¹³C)**6** (0.624 g, 71%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-D6): δ 2.14 (d, 3H, ¹J_{CH} = 127.5 Hz, ¹³CH₃), 5.27 (s, 2H, NH₂), 6.99 (dd, 1H, ³J_{HH} = 4.6 Hz and ³J_{CH} = 4.6 Hz, **H-5**), 7.50 (d, 1H, ³J_{HH} = 4.6 Hz, **H-6**). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-D6): δ 17.6 (¹³C-7), 124.9 (**C-5**), 131.5 (d, ¹J_{CC} = 42.9 Hz, **C-4**), 135.0 (d, ²J_{CC} = 2.1 Hz, **C-3**), 135.8 (d, ³J_{CC} = 3.8 Hz, **C-6**), 139.5 (**C-2**).

2-Chloro-3-pyridinecarbonyl chloride **7**

C₆H₃Cl₂NO

MW = 176.00 g.mol⁻¹

TLC : unstable on silica gel



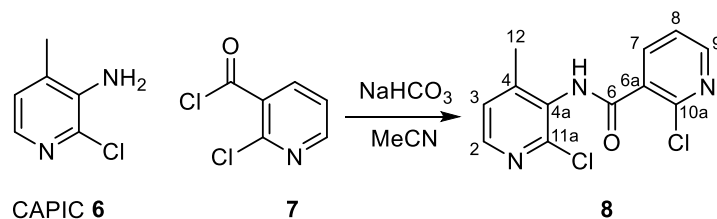
A solution of 2-chloro-3-pyridinecarboxylic acid **31** (20.0 g, 126.9 mmol) and dimethylformamide (5 drops) in thionyl chloride (30 mL) was refluxed for 4 h. After evaporation of the excess thionyl chloride under reduced pressure, **7** was obtained as a light green solid (21.6 g, 97%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.45 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz and ³J_{HH} = 4.5 Hz, **H-5**), 8.41 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.1 Hz and ³J_{HH} = 2.1 Hz, **H-4**), 8.59 (dd, 1H, ³J_{HH} = 4.8 Hz and ³J_{HH} = 1.8 Hz, **H-6**). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): Mp : 56 °C - 58 °C (litt. 55 °C - 58 °C).

2-Chloro-*N*-(2-chloro-4-methyl-3-pyridinyl)-3-pyridinecarboxamide **8**

C₁₂H₉Cl₂N₃O

MW = 282.13 g.mol⁻¹

TLC R_f = 0.42 (toluene/acetone, 70:30); rev: PMA/Ce



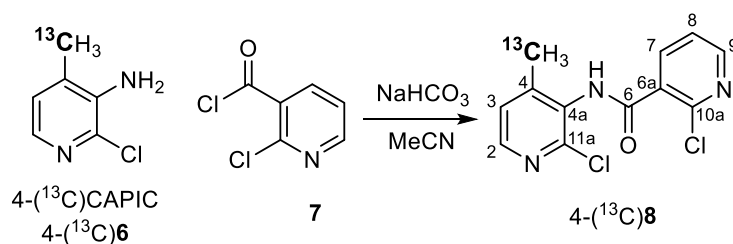
To a suspension of CAPIC **6** (0.976 g, 6.84 mmol, 1 equiv.) and sodium hydrogenocarbonate (0.727 g, 8.65 mmol, 1.27 equiv.) in dry acetonitrile (10 mL) was added a solution of 2-chloro-3-pyridinecarbonyl chloride **7** (1.295 g, 7.36 mmol, 1.08 equiv.) in dry acetonitrile (13.7 mL) over a period of 30 minutes. After 3.5 days, the suspension was poured into cold water (60 mL). The white solid was filtered, washed with cold water (4 x 10 mL), and dried under vacuum to give **8** as a white powder (1.607 g, 83%). ¹H NMR (500 MHz, Acetone-D6): δ 2.47 (s, 3H, **H-12**), 7.39 (d, 1H, ³J_{HH} = 4.5 Hz, **H-3**), 7.56 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.5 Hz and ³J_{HH} = 4.8 Hz, **H-8**), 8.13 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.5 Hz and ³J_{HH} = 1.7 Hz, **H-7**), 8.24 (d, 1H, ³J_{HH} = 4.5 Hz, **H-2**), 8.54 (dd, 1H, ³J_{HH} = 4.6 Hz and ³J_{HH} = 1.7 Hz, **H-9**), 9.59 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (125 MHz, Acetone-D6): δ 18.8 (**C-12**), 123.8 (**C-8**), 126.1 (**C-3**), 130.9 (**C-4a**), 133.5 (**C-10a**), 139.1 (**C-7**), 148.1 (**C-6a**), 148.5 (**C-2**), 150.1 (**C-4**), 150.4 (**C-11a**), 151.8 (**C-9**), 164.7 (**C-6**). Mp : 188 °C - 190 °C (litt. 189 °C - 191 °C).

2-Chloro-*N*-[2-chloro-4-(¹³C)methyl-3-pyridinyl]-3-pyridinecarboxamide 4-(¹³C)**8**

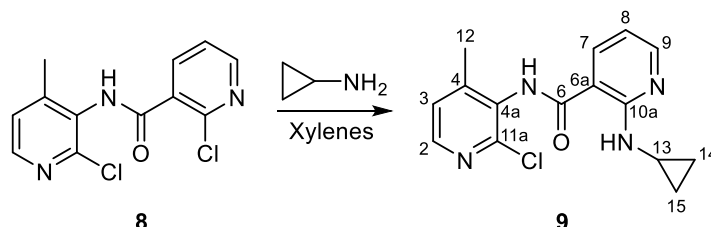
C₁₁¹³CH₉Cl₂N₃O

MW = 283.13 g.mol⁻¹

TLC R_f = 0.42 (toluene/acetone, 70:30); rev: PMA/Ce



Starting from 4-(¹³C)**6** (0.677 g, 4.02 mmol, 1 equiv.), sodium hydrogenocarbonate (0.433 g, 5.15 mmol, 1.28 equiv.) and 2-chloro-3-pyridinecarbonyl chloride **7** (0.765 g, 4.35 mmol, 1.08 equiv.), the same procedure as described for the synthesis of **8** gave the desired product 4-(¹³C)**8** as a white powder (0.966 g, 85%). ¹H NMR (500 MHz, Acetone-D6): δ 2.47 (d, 3H, ¹J_{CH} = 128.7 Hz, **H-12**), 7.39 (dd, 1H, ³J_{HH} = 4.7 Hz, ³J_{CH} = 4.7 Hz, **H-3**), 7.56 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.5 Hz and ³J_{HH} = 4.8 Hz, **H-8**), 8.13 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.5 Hz and ³J_{HH} = 1.9 Hz, **H-7**), 8.24 (d, 1H, ³J_{HH} = 4.9 Hz, **H-2**), 8.54 (dd, 1H, ³J_{HH} = 4.6 Hz and ³J_{HH} = 1.9 Hz, **H-9**), 9.55 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (125 MHz, Acetone-D6): δ 18.8 (¹³C-12), 123.8 (**C-8**), 126.1 (d, ²J_{CC} = 1.6 Hz, **C-3**), 130.9 (**C-4a**), 133.5 (**C-10a**), 139.1 (**C-7**), 148.1 (**C-6a**), 148.5 (d, ³J_{CC} = 3,3 Hz, **C-2**), 150.1 (d, ¹J_{CC} = 43.4 Hz, **C-4**), 150.3 (d, ³J_{CC} = 1.8 Hz, **C-11a**), 151.8 (**C-9**), 164.7 (**C-6**).

N*-(2-Chloro-4-methyl-3-pyridinyl)-2-(cyclopropylamino)-3-pyridinecarboxamide*9****C₁₅H₁₅ClN₄O****MW** = 302.76 g.mol⁻¹**TLC** R_f = 0.45 (toluene/acetone, 70:30); rev: PMA/Ce

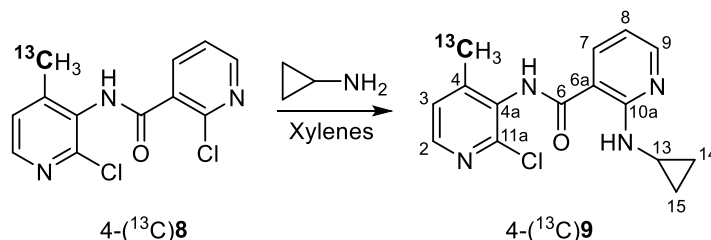
A suspension of **8** (1.377 g, 4.88 mmol, 1 equiv.), and cyclopropylamine (1.4 mL, 19.5 mmol, 4 equiv.) in xylenes (8 mL) was heated to 120 °C in a 50 mL round-bottom pressure flask. After 24 h, the suspension was cooled to room temperature and a further quantity of cyclopropylamine (0.7 mL, 9.76 mmol, 2 equiv.) was added. The mixture was heated at 120 °C for an additional period of 3 days. After cooling to room temperature, dichloromethane (100 mL) was added and the organic phase was washed with water (100 mL). The organic phase was dried over MgSO₄, evaporated under reduced pressure to give an orange thick oil which was taken up in dichloromethane and diethyl ether several times until the obtention of the product **9** as a yellow solid (1.568 g). The crude product was used in the next step without further purification. ¹H NMR (300 MHz, Acetone-D₆): δ 0.46 (m, 2H, **H-14** and **H-15**), 0.74 (m, 2H, **H-14** and **H-15**), 2.33 (s, 3H, **H-12**), 2.92 (m, 1H, **H-13**), 6.68 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.7 Hz and ³J_{HH} = 4.7 Hz, **H-8**), 7.34 (dd, 1H, ³J_{HH} = 5.0 Hz and ⁴J_{HH} = 0.5 Hz, **H-3**), 8.20 (d, 1H, ³J_{HH} = 4.8 Hz, **H-2**), 8.22 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.7 Hz and ³J_{HH} = 1.8 Hz, **H-7**), 8.31 (dd, 1H, ³J_{HH} = 4.8 Hz and ³J_{HH} = 1.8 Hz, **H-9**), 9.39 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (125 MHz, Acetone-D₆): δ 7.43 (**C-14** and **C-15**), 17.8 (**C-12**), 24.5 (**C-13**), 109.7 (**C-6a**), 112.1 (**C-8**), 125.9 (**C-3**), 131.9 (**C-4a**), 137.4 (**C-7**), 148.1 (**C-2**), 150.1 (**C-4**), 150.7 (**C-11a**), 153.4 (**C-9**), 160.3 (**C-10a**), 168.0 (**C-6**).

N-[2-Chloro-(4-¹³C)methyl-3-pyridinyl]-2-(cyclopropylamino)-3-pyridinecarboxamide 4-(¹³C)9

C₁₄¹³**CH**₁₅**Cl**₂**N**₄**O**

MW = 303.76 g.mol⁻¹

TLC R_f = 0.45 (toluene/acetone, 70:30); rev: PMA/Ce



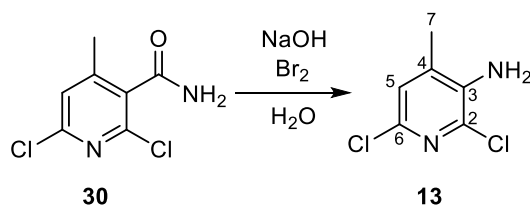
Starting from 4-(¹³C)**8** (1.056 g, 3.73 mmol, 1 equiv.) and cyclopropylamine (1 mL, 14.5 mmol, 4 equiv and 0.5 mL, 7.26 mmol, 2 equiv.) in xylenes (6 mL) the same procedure as described for the synthesis of **9** gave the desired product 4-(¹³C)**9** as a yellow solid (1.206 g). ¹H NMR (300 MHz, Acetone-D₆): δ 0.46 (m, 2H, **H-14** or **H-15**), 0.74 (m, 2H, **H-14** or **H-15**), 2.33 (d, 3H, ¹J_{CH} = 128.5 Hz, ¹³CH₃), 2.91 (m, 1H, **H-13**), 6.68 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.5 Hz and ³J_{HH} = 4.5 Hz, **H-8**), 7.34 (dd, 1H, ³J_{HH} = 4.5 Hz and ³J_{CH} = 4.5 Hz, **H-3**), 8.21 (d, 1H, ³J_{HH} = 4.5 Hz, **H-2**), 8.22 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.5 Hz and ³J_{HH} = 1.5 Hz, **H-7**), 8.31 (dd, 1H, ³J_{HH} = 5.0 Hz and ³J_{HH} = 2.0 Hz, **H-9**), 9.41 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (125 MHz, Acetone-D₆): δ 7.43 (**C-14** and **C-15**), 18.5 (¹³CH₃), 24.6 (**C-13**), 109.6 (**C-6a**), 112.1 (**C-8**), 125.9 (d, ²J_{CC} = 1.8 Hz, **C-3**), 131.9 (**C-4a**), 137.4 (**C-7**), 148.1 (d, ³J_{CC} = 3.6 Hz, **C-2**), 150.1 (d, ¹J_{CC} = 43.4 Hz, **C-4**), 150.7 (d, ³J_{CC} = 1.8 Hz, **C-11a**), 153.4 (**C-9**), 160.3 (**C-10a**), 168.0 (**C-6**).

2,6-Dichloro-4-methyl-3-pyridinamine **13**

C₆**H**₆**Cl**₂**N**₂

MW = 177.03 g.mol⁻¹

TLC R_f = 0.74 (dichloromethane/acetone, 91:9); rev: PMA/Ce



To a solution of sodium hydroxide (3.411 g, 85.2 mmol, 4 equiv.) in water (20 mL) was added bromine (1.2 mL, 23.4 mmol, 1.1 equiv.) at 0 °C. The amide **30** (4.373 g, 21.3 mmol, 1 equiv.) was added by portions during 2 hours. The mixture was heated at 65 °C overnight

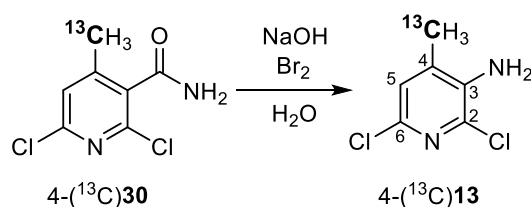
and cooled to 0 °C. The orange precipitate was filtered, washed with cold water (3 x 20 mL) and dried under vacuum to give **13** as an orange powder (3.504 g, 93%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-D6): δ 2.15 (s, 3H, **H-7**), 5.47 (s, 2H, NH₂), 7.13 (s, 1H, **H-5**). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-D6): δ 17.6 (**C-7**), 124.3 (**C-5**), 132.2 (**C-2** or **C-6**), 133.5 (**C-2** or **C-6**), 135.5 (**C-4**), 139.2 (**C-3**). Mp : 85 °C – 86 °C (litt. 83.5 °C - 85.5 °C).

2,6-Dichloro-4-(¹³C)methyl-3-pyridinamine 4-(¹³C)**13**

C₅¹³**CH**₆**Cl**₂**N**₂

MW = 178.03 g.mol⁻¹

TLC R_f = 0.74 (dichloromethane/acetone, 91:9); rev: PMA/Ce



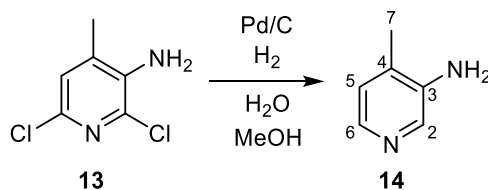
The same procedure as for the synthesis of **13** was repeated times starting from 4-(¹³C)**30** (1.282 g, 6.21 mmol, 1 equiv.), sodium hydroxide (0.998 g, 24.8 mmol, 4 equiv.) and bromine (0.35 mL, 6.83 mmol, 1.1 equiv.) to give 1.014 g of 4-(¹³C)**13** (92%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-D6): δ 2.16 (d, 3H, ¹J_{CH} = 148.5 Hz, ¹³CH₃), 5.50 (s, 2H, NH₂), 7.15 (d, 1H, ³J_{CH} = 4.0 Hz, **H-5**). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-D6): δ 17.6 (¹³**C-7**), 124.3 (d, ²J_{CC} = 1.9 Hz, **C-5**), 132.1 (d, ³J_{CC} = 1.4 Hz, **C-2** or **C-6**), 133.4 (d, ³J_{CC} = 5.1 Hz, **C-2** or **C-6**), 135.5 (d, ¹J_{CC} = 42.4 Hz, **C-4**), 139.4 (**C-3**).

4-Methyl-3-pyridinamine **14**

C₆**H**₈**N**₂

MW = 108.14 g.mol⁻¹

TLC R_f = 0.04 (dichloromethane/acetone, 91:9); rev: PMA/Ce



To a degassed mixture of **13** (3.501 g, 19.8 mmol, 1 equiv.) in methanol (14.5 mL) and water (3.4 mL) was added a catalytic quantity of Pd/C (10wt. %). The suspension was heated

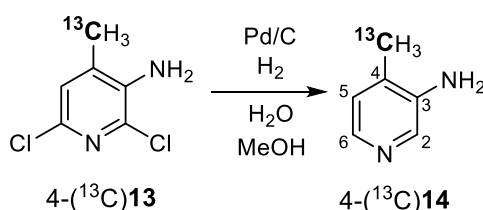
at 80 °C under an hydrogen atmosphere (pressure 1.1 atm) for 24 h and cooled to room temperature. The catalyst was filtered on Celite and washed with methanol (250 mL). The filtrate was concentrated under reduced pressure, taken up in distilled water (50 mL) and the pH was adjusted to 7-8 with a saturated aqueous solution of NaHCO₃. The aqueous phase was extracted with CHCl₃ (6 x 100 mL). The reunited organic phases were washed with water (500 mL), dried over MgSO₄, evaporated under reduced pressure and dried under vacuum to give **14** as a yellow solid (1.584 g, 74%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ 2.06 (s, 3H, **H-7**), 5.09 (s, 2H, **NH₂**), 6.90 (d, 1H, ³J_{HH} = 4.5 Hz, **H-5**), 7.68 (d, 1H, ³J_{HH} = 4.5 Hz, **H-6**), 7.93 (s, 1H, **H-2**). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-D₆): δ 16.7 (**C-7**), 124.8 (**C-5**), 128.7 (**C-4**), 135.9 (**C-6** or **C-2**), 137.4 (**C-6** or **C-2**), 143.4 (**C-3**). Mp : 104 °C – 106 °C (litt. 104 °C - 105 °C).

4-(¹³C)Methyl-3-pyridinamine 4-(¹³C)**14**

C₅¹³CH₈N₂

MW = 109.14 g.mol⁻¹

TLC R_f = 0.04 (dichloromethane/acetone, 91:9); rev: PMA/Ce



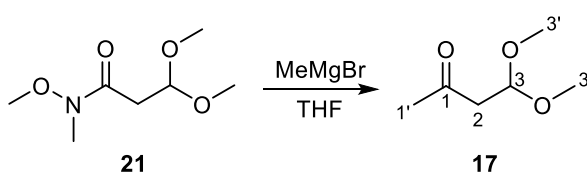
The same procedure as for the synthesis of **14** was repeated starting from 4-(¹³C)**13** (1.366 g, 7.67 mmol) to give 4-(¹³C)**14** (0.801 mg, 96%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ 2.05 (d, 3H, ¹J_{CH} = 126.5 Hz, ¹³CH₃), 5.06 (s, 2H, **NH₂**), 6.90 (dd, 1H, ³J_{HH} = 5.0 Hz and ³J_{CH} = 5.0 Hz, **H-5**), 7.65 (d, 1H, ³J_{HH} = 4.5 Hz, **H-6**), 7.89 (d, 1H, ⁴J_{CH} = 0.5 Hz, **H-2**). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-D₆): δ 16.8 (¹³**C-7**), 124.7 (**C-5**), 128.6 (d, ¹J_{CC} = 43.1 Hz, **C-4**), 135.9 (**C-6** or **C-2**), 137.4 (d, ³J_{CC} = 2.9 Hz, **C-6** or **C-2**), 143.4 (**C-3**).

4,4-Dimethoxy-2-butanone **17**

C₆H₁₂O

MW = 132.16 g.mol⁻¹

TLC R_f = 0.41 (petroleum ether/ethyl acetate, 50:50); rev: PMA/Ce



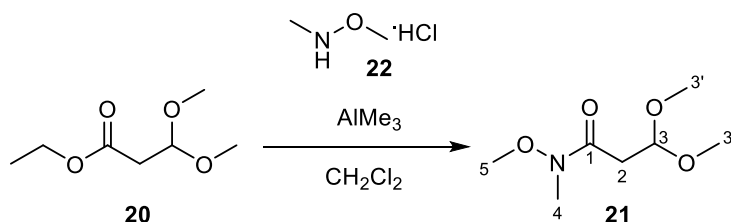
N,3,3-Trimethoxy-*N*-methyl-propanamide **21** (1 mL, 6.12 mmol, 1 equiv.) was dissolved in tetrahydrofuran (19 mL) and cooled to 0 °C. A solution of methylmagnesium bromide (3 M in diethyl ether, 4,1 mL, 12.2 mmol, 2 equiv.) was slowly added. The yellow solution was stirred at 0 °C for 4 h. A saturated aqueous solution of ammonium chloride (35 mL) was carefully added and the aqueous phase was extracted with diethyl ether (4 x 50 mL), washed with water (100 mL), dried over magnesium sulfate and evaporated to give **17** as a yellow oil (0.475 mg, 59%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.16 (s, 3H, **H-1'**), 2.71 (d, 2H, ³J_{HH} = 5.7 Hz, **H-2**), 3.33 (s, 6H, **H-3'**), 4.76 (t, 1H, ³J_{HH} = 5.7 Hz, **H-3**). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 31.0 (**C-1'**), 47.2 (**C-2**), 53.7 (2C, **C-3'**), 101.4 (**C-3**), 205.4 (**C-1**).

N,3,3-Trimethoxy-*N*-methyl-propanamide **21**

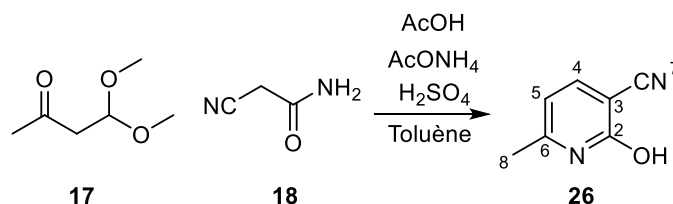
C₇**H**₁₅**NO**₄

MW = 177.20 g.mol⁻¹

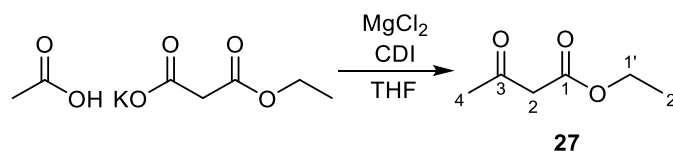
TLC R_f = 0.33 (petroleum ether/ethyl acetate, 50:50); rev: PMA/Ce



A degassed suspension of *N*,*O*-dimethylhydroxylamine hydrochloride **22** (3.960 g, 40.6 mmol, 2.27 equiv.) in dichloromethane (40 mL) was cooled to 0 °C. Trimethylaluminum (2 M in hexanes, 20.3 mL, 40.6 mmol, 2.27 equiv.) was carefully added during 30 min to give a pink solution which was stirred at room temperature for 15 min and cooled to -10 °C. A degassed solution of **20** (2.5 mL, 17.9 mmol, 1 equiv.) in dichloromethane (11,5 mL) was added during 30 min and the resulting mixture was stirred at -10 °C. After 1.5 h, 10% hydrochloric acid (40 mL) was carefully added. The aqueous phase was extracted with dichloromethane (4 x 100 mL). The organic phases were washed with sodium hydrogenocarbonate (200 mL) and water (200 mL), dried over magnesium sulfate, evaporated and dried under vacuum to give **21** as a yellow oil (2.735 g, 86%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.73 (d, 2H, ³J_{HH} = 5.7 Hz, **H-2**), 3.14 (s, 3H, N-CH₃), 3.35 (s, 6H, **H-3'**), 3.65 (s, 3H, N-O-CH₃), 4.82 (t, 1H, ³J_{HH} = 5.7 Hz, **H-3**). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 31.8 (N-CH₃), 36.3 (**C-2**), 54.1 (2C, **C-3'**), 61.2 (N-O-CH₃), 102.2 (**C-3**), 170.4 (**C-1**).

1,2-Dihydro-6-methyl-2-hydroxy-3-pyridinecarbonitrile 26**C₇H₆N₂O****MW** = 134.14 g.mol⁻¹**TLC** R_f = 0.37 (ethyl acetate); rev: PMA/Ce

4,4-Dimethoxy-2-butanone **17** (2 mL, 15.07 mmol, 1 equiv.), cyanoacetamide **18** (1.584 g, 18.84 mmol, 1.25 equiv.), ammonium acetate (81 mg, 1.16 mmol, 0.07 equiv.) and acetic acid (0.56 mL, 9.78 mmol, 0.41 equiv.) were dissolved in toluene (50 mL). The mixture was heated at reflux overnight in a Dean-Stark apparatus. The mixture was evaporated and the red solid residue was dissolved in ethanol (7 mL). Sulfuric acid (50 % in water, 4.5 mL, 30.15 mmol, 2 equiv.) was added over 40 min. The solution was heated at 50 °C during 30 min and cooled to 5 °C. Water (4,3 mL) was added over 50 min to give a yellow precipitate which was filtered, washed with cold ethanol (2 x 4 mL), and dried under vacuum to give **26** as a yellow powder (227 mg, 11%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-D₆): δ 2.27 (s, 3H, **H-8**), 6.20 (d, 1H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, **H-4**), 8.00 (d, 1H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, **H-5**), 12.55 (br s, 1H, OH). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-D₆): δ 19.2 (**C-8**), 99.5 (**C-3**), 105.1 (**C-5**), 116.8 (**C-7**), 148.9 (**C-4**), 153.8 (**C-6**), 160.7 (**C-2**). Mp : dec. > 305 °C (litt. dec. > 285 °C).

Ethyl acetoacetate 27**C₆H₁₀O₃****MW** = 130.14 g.mol⁻¹**TLC** R_f = 0.43 (petroleum ether/ethyl acetate, 80:20); rev: PMA/Ce

Magnesium dichloride (1.735 g, 18.2 mmol, 1.04 equiv.) and ethyl potassium malonate (4.465 g, 26.2 mmol, 1.5 equiv.) were suspended in dry tetrahydrofuran (36 mL) and stirred at 50 °C for 4 h. In an other flask, acetic acid (1 mL, 17.5 mmol, 1 equiv.) was dissolved in dry tetrahydrofuran (30 mL) and cooled to 5 °C before adding carbonyldiimidazole (3.410 g, 20.6 mmol, 1,2 equiv.) by portions. The mixture was warmed to room temperature, stirred for

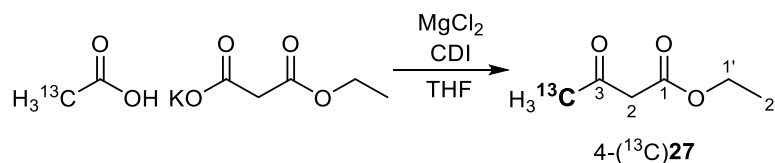
1 h, and added to the cooled suspension of activated potassium ethyl malonate. The reaction medium was stirred at room temperature overnight. Tetrahydrofuran was evaporated to give a white sticky residue which was taken up in ethyl acetate (100 mL). The organic extract was washed with saturated solutions of potassium hydrogenosulfate (2 x 100 mL), sodium carbonate (2 x 100 mL) and sodium chloride (1 x 100 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated in vacuo to yield crude ethyl acetoacetate **27** (1.752 g, 77%). The yellowish oil was used in the next step without further purification. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): ketone tautomer δ 1.14 (t, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 7.2$ Hz, **H-2'**), 2.12 (s, 3H, **H-4**), 3.32 (s, 2H, **H-2**), 4.04 (q, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.2$ Hz, **H-1'**) ; enol tautomer δ 1.14 (t, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, **H-2'**), 1.81 (s, 2H, **H-2**), 4.04 (q, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, **H-1'**), 4.83 (s, 2H, **H-2**), 11.96 (s, 1H, OH). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): ketone tautomer δ 13.9 (**C-2'**), 29.9 (**C-4**), 49.9 (**C-2**), 61.1 (**C-1'**), 167.0 (**C-1**), 200.6 (**C-3**) ; enol tautomer δ 14.1 (**C-2'**), 21.0 (**C-4**), 59.7 (**C-1'**), 89.6 (**C-2**), 172.5 (**C-1**), 175.3 (**C-3**).

4-(^{13}C)Ethyl acetoacetate 4-(^{13}C)**27**

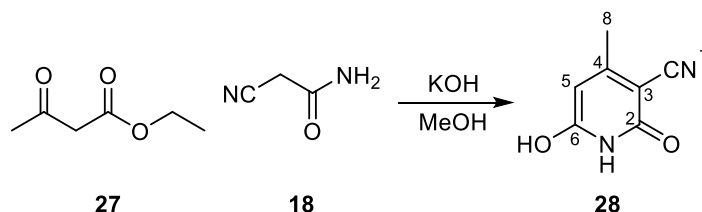
$\text{C}_5^{13}\text{CH}_{10}\text{O}_3$

MW = 131.14 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

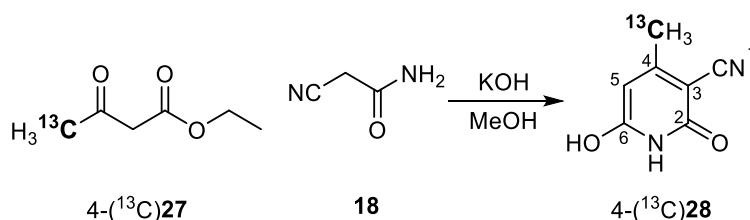
TLC Rf = 0,43 (petroleum ether/ethyl acetate, 80:20); rev: PMA/Ce



Starting from ethyl potassium malonate (4.185 g, 24.6 mmol, 1.5 equiv.), magnesium dichloride (1.624 g, 17.1 mmol, 1.04 equiv.), carbonyldiimidazole (3.193 g, 19.7 mmol, 1.2 equiv.), and 2-(^{13}C)acetic acid (1 g, 16.4 mmol, 1 equiv.), the same procedure as for the synthesis of ethyl acetoacetate **27** gave 1.725 g of 4-(^{13}C)ethyl acetoacetate 4-(^{13}C)**27** as a yellowish oil (80%). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): ketone tautomer δ 1.19 (t, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz, **H-2'**), 2.19 (d, 3H, $^1J_{\text{CH}} = 128.0$ Hz, $^{13}\text{CH}_3$), 3.37 (s, 2H, **H-2**), 4.10 (q, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, **H-1'**) ; enol tautomer δ 1.19 (t, 3H, $^3J_{\text{HH}}$ is masked by the ketone tautomer, **H-2'**), 1.86 (d, 2H, $^1J_{\text{CH}} = 128.5$ Hz, $^{13}\text{CH}_3$), 4.10 (q, 2H, $^3J_{\text{HH}}$ is masked by the ketone tautomer, **H-1'**), 4.89 (d, 2H, $^2J_{\text{CH}} = 2.5$ Hz, **H-2**), 12.02 (d, 1H, $^3J_{\text{CH}} = 17.5$ Hz, OH). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): ketone tautomer δ 14.1 (**C-2'**), 30.2 ($^{13}\text{C-4}$), 50.2 (d, $^2J_{\text{CC}} = 14.0$ Hz, **C-2**), 61.4 (**C-1'**), 167.2 (**C-1**), 200.9 (d, $^1J_{\text{CC}} = 42.0$ Hz, **C-3**) ; enol tautomer δ 14.2 (**C-2'**), 21.2 ($^{13}\text{C-4}$), 60.0 (**C-1'**), 89.8 (d, $^2J_{\text{CC}} = 7.1$ Hz, **C-2**), 172.7 (d, $^3J_{\text{CC}} = 5.3$ Hz, **C-1**), 175.5 (d, $^1J_{\text{CC}} = 49.0$ Hz, **C-3**).

1,2-Dihydro-6-hydroxy-4-methyl-2-oxo-3-pyridinecarbonitrile 28**C₇H₆N₂O₂****MW = 150.13 g.mol⁻¹**

To a suspension of cyanoacetamide **18** (1.976 g, 23.50 mmol, 1 equiv.) in ethyl acetoacetate **27** (3.15 mL, 23.50 mmol, 1 equiv.) was added a solution of potassium hydroxide (1.450 g, 25.85 mmol, 1.1 equiv.) in methanol (41 mL). The reaction mixture was refluxed overnight. After cooling at room temperature and then at 0 °C, the white precipitate was filtered and washed with cold methanol (4 x 15 mL). The solid residue was dissolved in a minimum amount of hot water to give a yellow solution. Concentrated hydrochloric acid was added until pH 1. The white precipitate was cooled to 0 °C, filtered, washed with cold distilled water (4 x 15 mL), and dried under vacuum overnight to give **28** (2.893 g, 82%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-D₆): δ 2.22 (s, 3H, **H-8**), 4.69 (br s, 2H, **OH** and **NH**), 5.60 (s, 1H, **H-5**). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-D₆): δ 20.8 (**C-8**), 89.4 (**C-3**), 92.7 (**C-5**), 117.2 (**C-7**), 160.6 (**C-4**), 161.0 (**C-2** or **C-6**), 161.9 (**C-2** or **C-6**). Mp : dec. > 300 - 302 °C (litt. : dec. > 304 °C).

1,2-Dihydro-6-hydroxy-(4-¹³C)methyl-2-oxo-3-pyridinecarbonitrile 4-(¹³C)28**C₆¹³CH₆N₂O₂****MW = 151.13 g.mol⁻¹**

Starting from cyanoacétamide **18** (0.960 g, 11.42 mmol, 1 équiv.), 4-(¹³C)**27** (1.496 g, 11.41 mmol, 1 equiv.) and potassium hydroxide (0.713 g, 12.71 mmol, 1.1 equiv.) the same procedure as for the synthesis of **28** gave 4-(¹³C)**28** as a white powder (1.139 g, 66%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ 2.22 (d, 3H, ¹J_{CH} = 129.0 Hz, ¹³CH₃), 5.59 (d, 1H, ³J_{CH} = 3.5 Hz, **H-5**), 12.16 (br s, 2H, **OH** and **NH**). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-D₆): δ 20.7 (¹³C-8), 89.2

(**C-3**), 92.6 (**C-5**), 117.2 (**C-7**), 160.4 (d, $^1J_{CC} = 41.9$ Hz, **C-4**), 161.0 (**C-2** or **C-6**), 161.8 (**C-2** or **C-6**).

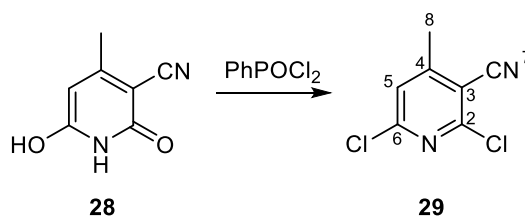
2,6-Dichloro-4-methyl-3-pyridinecarbonitrile **29**

C₇**H**₄**Cl**₂**N**₂

MW = 187.03 g.mol⁻¹

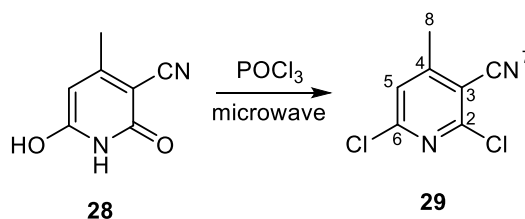
TLC R_f = 0.86 (petroleum ether/ethyl acetate, 50:50); rev: PMA/Ce

Method A



28 (4.247 g, 28.30 mmol, 1 equiv.) was suspended in phenylphosphonic dichloride (20 mL, 141.4 mmol, 5 equiv.) and stirred at 180 °C overnight. After cooling at room temperature and then at 0 °C, water was very carefully added to give a beige precipitate. The solid was filtered, thoroughly washed with water until the pH of the filtrate reached 7, and dried under vacuum overnight to give **29** as a beige powder (4.447 g, 84%). **¹H NMR** (300 MHz, DMSO-D₆): δ 2.54 (s, 3H, **H-8**), 7.82 (s, 1H, **H-5**). **¹³C NMR** (125 MHz, DMSO-D₆): δ 20.1 (**C-8**), 110.1 (**C-3** or **C-7**), 113.8 (**C-3** or **C-7**), 124.8 (**C-5**), 150.8 (**C-2** or **C-6**), 152.2 (**C-2** or **C-6**), 158.2 (**C-4**). Mp : 108 °C – 110 °C (litt. : 108 °C – 109 °C).

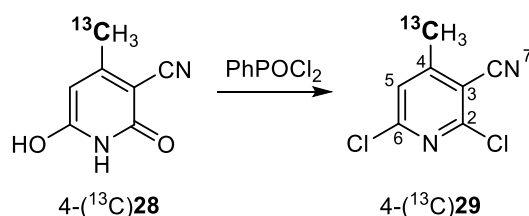
Method B



A mixture of **28** (1.002 g, 6.67 mmol, 1 equiv.) and phosphorous oxychloride (2.5 mL, 26.7 mmol, 4 equiv.) in a 35 mL microwave tube reactor was heated at 130 °C in a microwave oven (maximum pressure 17 Bar, power 300 W, PowerMAX ON) for 2 h. After cooling at room temperature and then at 0 °C, the black solution was carefully quenched with cold water. The brown precipitate was filtered and purified by column chromatography (petroleum ether/ethyl acetate, 90:10) to give **29** as a beige powder (1.016 g, 81%).

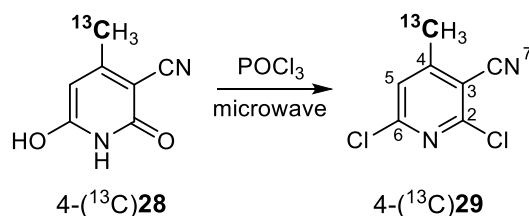
2,6-Dichloro-4-(¹³C)methyl-3-pyridinecarbonitrile 4-(¹³C)29**C₆¹³CH₄Cl₂N₂****MW = 188.03 g.mol⁻¹****TLC R_f = 0.86 (petroleum ether/ethyl acetate, 50:50); rev: PMA/Ce**

Method A



Starting from 4-(¹³C)28 (2.344 g, 15.51 mmol, 1 equiv.) and phenylphosphonic dichloride (11 mL, 5 equiv.) the same procedure as for the synthesis of 29 by method A gave 4-(¹³C)29 as a beige powder (2.405 g, 82%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ 2.53 (d, 3H, ¹J_{CH} = 131.0 Hz, ¹³CH₃), 7.83 (d, 1H, ³J_{CH} = 4.0 Hz, H-5). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-D₆): δ 20.2 (¹³C-8), 110.2 (C-3 or C-7), 113.8 (C-3 or C-7), 124.8 (d, ²J_{CC} = 2.3 Hz, C-5), 150.9 (d, ³J_{CC} = 2.6 Hz, C-2 or C-6), 152.2 (d, ³J_{CC} = 4.6 Hz, C-2 or C-6), 158.2 (d, ¹J_{CC} = 42.0 Hz, C-4).

Method B



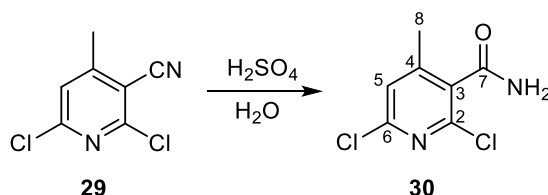
Starting from 4-(¹³C)28 (0.888 g, 5.88 mmol) and POCl₃ (2.2 mL) The same procedure as for the synthesis of 29 by method B was repeated to give 0.944 g of 4-(¹³C)29 (87%).

2,6-Dichloro-4-methyl-3-pyridinecarboxamide **30**

$C_7H_6Cl_2N_2O$

MW = 205.04 g.mol⁻¹

TLC Rf = 0,61 (ethyl acetate); rev: PMA/Ce



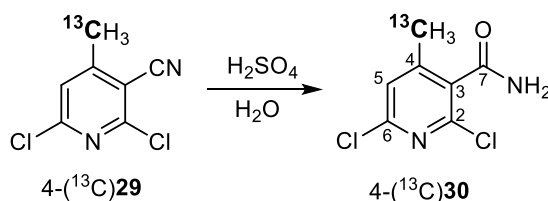
29 (3.977 g, 21.3 mmol) was heated at 100 °C in 80% sulfuric acid (74 mL) for 16 h. The solution was poured into crushed ice (120 g) and adjusted to pH 7 with 30% ammonium hydroxide at 0 °C. The precipitate was filtered, washed with cold water (3 x 15 mL), and dried under vacuum to give **30** as a beige powder (3.876 g, 89%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-D6): δ 2.32 (s, 3H, **H-8**), 7.55 (s, 1H, **H-5**), 7.90 and 8.08 (2 s, NH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-D6): δ 18.6 (**C-8**), 124.6 (**C-5**), 133.3 (**C-3**), 145.1 (**C-2** or **C-6**), 147.9 (**C-2** or **C-6**), 150.7 (**C-4**), 165.8 (**C-7**). Mp : 173 °C – 175 °C (litt. : 173 °C – 175 °C).

2,6-Dichloro-4-(¹³C)methyl-3-pyridinecarboxamide 4-(¹³C)**30**

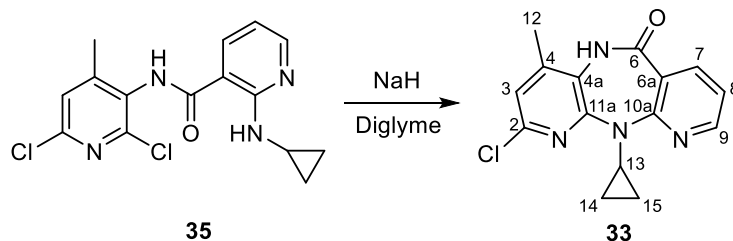
$C_6^{13}CH_6Cl_2N_2O$

MW = 206.04 g.mol⁻¹

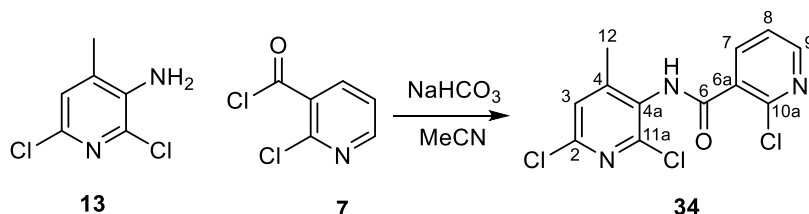
TLC Rf = 0,61 (ethyl acetate); rev: PMA/Ce



The same procedure as for the synthesis of **30** was repeated starting from 4-(¹³C)**29** (2.399 g, 12.76 mmol) and 80% sulfuric acid (36 mL) to give 2.316 g of 4-(¹³C)**30** (88%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-D6): δ 2.31 (d, 3H, ¹J_{CH} = 130.0 Hz, ¹³CH₃), 7.56 (d, 1H, ³J_{CH} = 4.0 Hz, **H-5**), 7.92 and 8.09 (2 s, NH₂). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-D6): δ 18.6 (¹³CH₃), 124.6 (d, ²J_{CC} = 2.5 Hz, **C-5**), 133.3 (**C-3**), 145.0 (d, ³J_{CC} = 3.5 Hz, **C-2** or **C-6**), 147.9 (d, ³J_{CC} = 4.9 Hz, **C-2** or **C-6**), 150.7 (d, ¹J_{CC} = 42.0 Hz, **C-4**), 165.8 (**C-7**).

2-Chloro-Nevirapine 33**C₁₅H₁₃N₄OCl****MW** = 300.74 g.mol⁻¹**TLC** R_f = 0.30 (dichloromethane/ethyl acetate, 50:50); rev: PMA/Ce

The same procedure as for the synthesis of Nevirapine **1** was repeated starting from sodium hydride (60% in mineral oil, 0.325 g, 8.13 mmol, 4.15 equiv.) in dry diglyme (1.1 mL) and **35** (0.878 g as a mixture of **34**, **35**, and **36** containing 1.96 mmol of **35**) in dry diglyme (4.5 mL) to give a yellow solid. The solid was purified by column chromatography (dichloromethane/acetone, 80²:20 and 70:30) to give 0.346 g of **33** as yellow powder (39%) as a white powder. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-D₆): δ 0.36 (m, 2H, **H-14** and **H-15**), 0.89 (m, 2H, **H-14** and **H-15**), 2.33 (s, 3H, **H-12**), 3.54 (m, 1H, **H-13**), 7.22 (s, 1H, **H-3**), 7.22 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.5 Hz and ³J_{HH} = 4.8 Hz, **H-8**), 8.02 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.5 Hz and ³J_{HH} = 1.8 Hz, **H-7**), 8.53 (dd, 1H, ³J_{HH} = 4.8 Hz and ³J_{HH} = 2.1 Hz, **H-9**), 9.95 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-D₆): δ 8.45 (**C-14** or **C-15**), 8.64 (**C-14** or **C-15**), 17.6 (**C-12**), 29.3 (**C-13**), 119.8 (**C-6a**), 120.8 (**C-4a**), 121.7 (**C-8**), 124.4 (**C-3**), 140.2 (**C-11a**), 143.3 (**C-2**), 144.6 (**C-7**), 151.5 (**C-7**), 153.6 (**C-9**), 159.3 (**C-10a**), 166.7 (**C-6**).

2-Chloro-N-(2,6-dichloro-4-methyl-3-pyridinyl)-3-pyridinecarboxamide 34**C₁₂H₈Cl₃N₃O****MW** = 316.57 g.mol⁻¹**TLC** R_f = 0.42 (toluene/acetone, 70:30); rev: PMA/Ce

The same procedure as for the synthesis of **8** was repeated starting from a suspension of **13** (1.500 g, 8.47 mmol, 1 equiv.) and sodium hydrogenocarbonate (0.819 g, 9.74 mmol, 1.15 equiv. and 0.360 g, 4.48 mmol, 0.5 equiv. added 2 days later) in dry acetonitrile (20 mL)

and a solution of **7** (1.566 g, 8.90 mmol, 1.05 equiv.) in dry acetonitrile (27 mL) to give the product **34** as a white powder (2.584 g, 96%). ¹H NMR (300 MHz, Acetone-D₆): δ 2.49 (s, 3H, **H-12**), 7.52 (s, 1H, **H-3**), 7.56 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.5 Hz and ³J_{HH} = 5.1 Hz, **H-8**), 8.13 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.5 Hz and ³J_{HH} = 1.2 Hz, **H-7**), 8.54 (dd, 1H, ³J_{HH} = 5.1 Hz and ³J_{HH} = 1.2 Hz, **H-9**), 9.66 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (75 MHz, Acetone-D₆): δ 18.7 (**C-12**), 123.7 (**C-3**), 125.9 (**C-8**), 130.5 (**C-6a**), 133.1 (**C-4a**), 139.0 (**C-7**), 148.0 (**C-2** or **C-10a** or **C-11a**), 148.3 (**C-2** or **C-10a** or **C-11a**), 149.1 (**C-2** or **C-10a** or **C-11a**), 151.8 (**C-9**), 153.2 (**C-4**), 164.8 (**C-6**). Mp : 178 °C - 180 °C (litt. 179 °C - 180 °C).

2-Cyclopropylamino-*N*-(2,6-dichloro-4-methyl-3-pyridinyl)-3-pyridinecarboxamide **35**

C₁₅**H**₁₄**Cl**₂**N**₄**O**

MW = 337.20 g.mol⁻¹

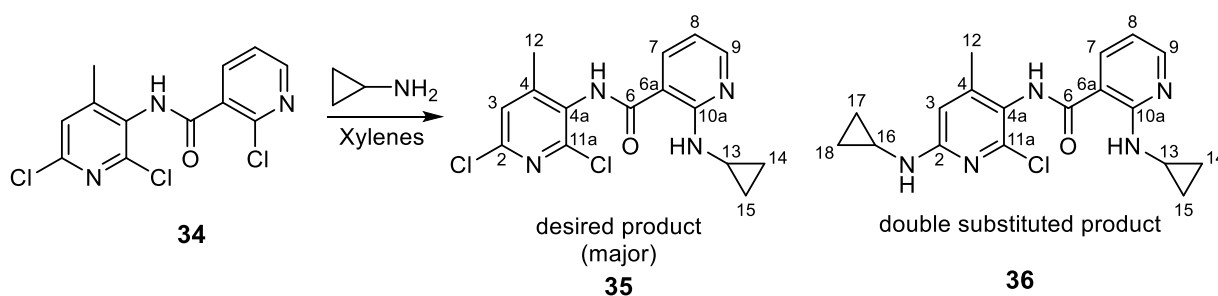
TLC R_f = 0.42 (toluene/acetone, 70:30); rev: PMA/Ce

2-Cyclopropylamino-*N*-(2-chloro-6-cyclopropylamino-4-methyl-3-pyridinyl)-3-pyridinecarboxamide **36**

C₁₈**H**₂₀**Cl****N**₅**O**

MW = 357.84 g.mol⁻¹

TLC R_f = 0.42 (toluene/acetone, 70:30); rev: PMA/Ce



Starting from **34** (1.027 g, 3.25 mmol, 1 equiv.) and cyclopropylamine (0.9 mL, 13.0 mmol, 4 equiv and 0.45 mL, 6.50 mmol, 2 equiv.) in xylenes (10.4 mL) the same procedure as described for the synthesis of **9** gave a mixture of three inseparable products (containing 73% of the desired product **35**, 18% of starting material **34**, and 9% of the double substitution product **36**) as a yellow solid (1.135 g). ¹H NMR (500 MHz, Acetone-D₆): desired product **35** δ 0.46 (m, 2H, **H-14** and **H-15**), 0.74 (m, 2H, **H-14** and **H-15**), 2.35 (s, 3H, **H-12**), 2.92 (m, 1H, **H-13**), 6.68 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.0 Hz and ³J_{HH} = 5.0 Hz, **H-8**), 7.47 (s, 1H, **H-3**), 8.21 (dd,

1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.0$ Hz and $^3J_{\text{HH}} = 1.5$ Hz, **H-7**), 8.32 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 4.5$ Hz and $^3J_{\text{HH}} = 1.5$ Hz, **H-9**), 9.47 (br s, 1H, **NH**).

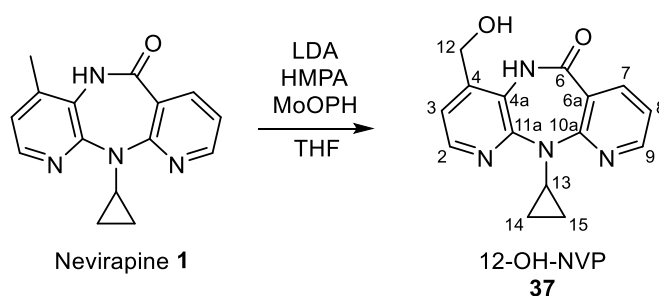
Synthesis of 12-(^{13}C)Nevirapine derivatives

12-Hydroxy-Nevirapine **37**

$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$

MW = 282.30 g.mol $^{-1}$

TLC $R_f = 0.31$ (ethyl acetate); rev: PMA/Ce



1,25 M LDA solution was prepared according to the following procedure and used immediately :

A solution of freshly distilled diisopropylamine (2 mL, 14.3 mmol, 1 equiv.) in dry THF (3 mL) was cooled below -50 °C. A solution of *n*-butyllithium (2.23 M in hexanes, 6.4 mL, 14.3 mmol, 1 equiv.) was slowly added and the resulting mixture was allowed to warm up to -15 °C during 1 h.

To a suspension of Nevirapine **1** (0.491 g, 1.84 mmol, 1 equiv.) in anhydrous THF (19 mL) cooled to 0 °C was added a freshly prepared solution of LDA (1.25 M in THF and hexanes, 1.7 mL, 1.12 mmol, 1,15 equiv.). The resulting yellow solution was cooled to -40 °C. Another portion of LDA was added in 1 min (5.11 mL, 6.38 mmol, 3,46 equiv.) to give a dark red mixture. After the addition of HMPA (1.48 mL, 8.50 mmol, 4,61 equiv.), the solution was stirred during 1 h at -40 °C. MoOPH (0.906 g, 2.10 mmol, 1,14 equiv.) was added in one portion and the mixture was stirred during 4 h at -40 °C. The reaction was quenched by a saturated solution of Na_2SO_3 (50 mL) and the mixture was vigorously stirred during 15 min, before adjusting the pH to 7-8 using a saturated solution of NH_4Cl . Water (20 mL) and AcOEt (50 mL) were added and the aqueous phase was extracted with AcOEt (8 x 50 mL). The combined organic phases were washed with a saturated solution of NaCl (200 mL) and evaporated under reduced pressure to give an orange oil (2.174 g). The crude product was prepurified by a Sephadex LH-20 column (dichloromethane/methanol, 50:50) to give a solid residue containing Nevirapine, 12-OH-Nevirapine and HMPA. This yellow solid (248 mg) was

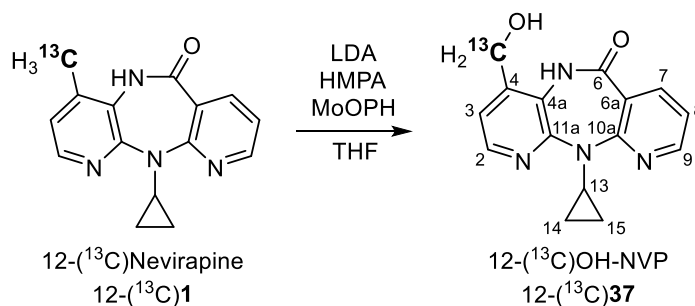
then purified by silica gel column chromatography (dichloromethane/ethyl acetate gradient, 70:30 to 100% ethyl acetate and ethyl acetate/methanol 95/5) to give pure 12-OH-Nevirapine **37** as a white solid (225 mg, 43%). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, Methanol-D₄): δ 0.44 (m, 2H, **H-14** and **H-15**), 0.94 (m, 2H, **H-14** and **H-15**), 3.74 (m, 1H, **H-13**), 4.68 [A part of an AB system, 1H, $^2J_{\text{AB}} = 14.5$ Hz, **H-12**], 4.80 [B part of an AB system, 1H, $^2J_{\text{AB}} = 14.5$ Hz, **H-12**], 7.19 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 5.0$ Hz, **H-8**), 7.24 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 5.0$ Hz, **H-3**), 8.12 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz and $^4J_{\text{HH}} = 2.0$ Hz, **H-7**), 8.19 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 5.0$ Hz, **H-2**), 8.50 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 5.0$ Hz and $^4J_{\text{HH}} = 2.0$ Hz, **H-9**). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, Methanol-D₄): δ 9.5 (**C-14** or **C-15**), 9.9 (**C-14** or **C-15**), 30.6 (**C-13**), 61.6 (**C-12**), 120.5 (**C-3** or **C-8**), 120.8 (**C-3** or **C-8**), 122.2 (**C-6a**), 125.9 (**C-4a**), 141.9 (**C-7**), 144.7 (**C-4**), 145.6 (**C-2**), 153.1 (**C-9**), 155.4 (**C-11a**), 161.7 (**C-10a**), 169.7 (**C-6**).

12-(^{13}C)Hydroxy-Nevirapine (12- ^{13}C)**37**

$\text{C}_{14}^{13}\text{CH}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$

MW = 283.30 g.mol⁻¹

TLC R_f = 0.31 (ethyl acetate); rev: PMA/Ce



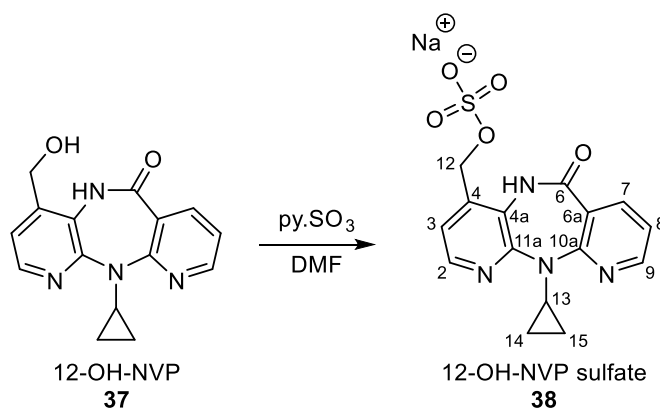
Starting from 12-(^{13}C)Nevirapine 12-(^{13}C)**1** (0.406 g, 1.52 mmol, 1 equiv.) suspended in anhydrous THF (16 mL), 1.25 M LDA (1.4 mL, 1.75 mmol, 1.15 equiv. then 4.2 mL, 5.26 mmol, 3.46 equiv), anhydrous HMPA (1.22 mL, 7.00 mmol, 4.61 equiv.) and MoOPH (0.752 g, 1.73 mmol, 1.14 equiv.) the same procedure as for the synthesis of 12-OH-Nevirapine was repeated to give 12-(^{13}C)OH-Nevirapine 12-(^{13}C)**37** (224 mg, 52%). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, Methanol-D₄): δ 0.44 (m, 2H, **H-14** and **H-15**), 0.94 (m, 2H, **H-14** and **H-15**), 3.74 (m, 1H, **H-13**), 4.68 [A part of an AB system, 1H, $^1J_{\text{CH}} = 143.0$ Hz, $^2J_{\text{AB}} = 14.5$ Hz, **H-12**], 4.80 [B part of an AB system, 1H, $^1J_{\text{CH}} = 143.0$ Hz, $^2J_{\text{AB}} = 14.5$ Hz, **H-12**], 7.19 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 5.0$ Hz, **H-8**), 7.25 (dd, 1H, $^3J_{\text{CH}} = 4.5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 5.0$ Hz, **H-3**), 8.12 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz and $^4J_{\text{HH}} = 2.0$ Hz, **H-7**), 8.19 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 4.5$ Hz, **H-2**), 8.50 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 5.0$ Hz and $^4J_{\text{HH}} = 2.0$ Hz, **H-9**). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, Methanol-D₄): δ 9.5 (**C-14** or **C-15**), 9.9 (**C-14** or **C-15**), 30.6 (**C-13**), 61.6 (^{13}C -**12**), 120.5 (**C-3** or **C-8**), 120.8 (**C-3** or **C-8**), 122.2 (**C-6a**), 125.9 (**C-4a**), 141.9 (**C-7**), 144.8 (d, $^1J_{\text{CC}} = 45.6$ Hz, **C-4**), 145.6 (d, $^3J_{\text{CC}} = 3.4$ Hz, **C-2**), 153.1 (**C-9**),

155.4 (**C-11a**), 161.7 (**C-10a**), 169.7 (**C-6**). Residual 12-(¹³C)Névirapine was detected at 17.9 ppm (¹³C-12).

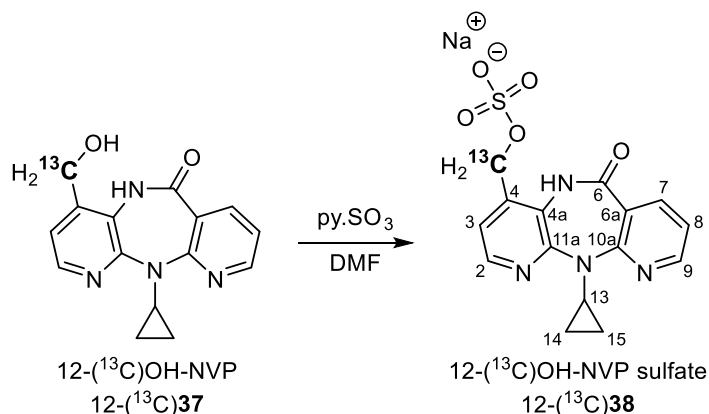
12-OH-Nevirapine sulfate, sodium salt **38**

C₁₅**H**₁₃**N**₄**O**₅**SNa**

MW = 384.34 g.mol⁻¹



A solution of 12-OH-Nevirapine **37** (100 mg, 0.35 mmol, 1 equiv.) in anhydrous dimethylformamide (5 mL) was cooled to 0 °C. Sulfur trioxide pyridine complex (226 mg, 1.42 mmol, 6 equiv.) was added in one portion and the resulting solution was stirred at room temperature for 3 days. The reaction mixture was concentrated to dryness at 50 °C. An aqueous solution of sodium hydrogenocarbonate (5% w/w, 6.5 mL, 325 mg, 11 equiv.) was slowly added at 0 °C and the mixture was evaporated under reduced pressure. The residue was taken up in water (6 mL) and evaporated to give a yellow solid. This procedure was repeated three times. The crude product was taken up in cold ethanol (3 mL) and the suspension was triturated and filtered. The filtrate was evaporated under reduced pressure and dried under vacuum to give 12-OH-Nevirapine sulfate **38** as a yellow solid (80 mg, 59%). ¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ 0.46 (m, 2H, **H-14** and **H-15**), 0.94 (m, 2H, **H-14** and **H-15**), 3.74 (m, 1H, **H-13**), 5.06 [A part of an AB system, 1H, ²J_{AB} = 13.5 Hz, **H-12**], 5.22 [B part of an AB system, 1H, ²J_{AB} = 13.5 Hz, **H-12**], 7.19 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, ³J_{HH} = 4.5 Hz, **H-8**), 7.33 (d, 1H, ³J_{HH} = 5.0 Hz, **H-3**), 8.12 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.5 Hz and ⁴J_{HH} = 2.0 Hz, **H-7**), 8.21 (d, 1H, ³J_{HH} = 5.0 Hz, **H-2**), 8.48 (dd, 1H, ³J_{HH} = 4.5 Hz and ⁴J_{HH} = 1.5 Hz, **H-9**). ¹³C NMR (125 MHz, MeOD): δ 9.5 (**C-14** or **C-15**), 9.8 (**C-14** or **C-15**), 30.5 (**C-13**), 65.9 (**C-12**), 120.8 (**C-3** or **C-8**), 121.4 (**C-3** or **C-8**), 122.4 (**C-6a**), 125.8 (**C-4a**), 140.7 (**C-4**), 141.9 (**C-7**), 145.6 (**C-2**), 152.9 (**C-9**), 155.9 (**C-11a**), 161.6 (**C-10a**), 169.8 (**C-6**). Elementary analysis calcd. for **C**₁₅**H**₁₃**N**₄**O**₅**SNa**: **C** (45.88%), **H** (3.41%), **N** (14.58%); found **C** (45.67%), **H** (3.27%), **N** (14.41%).

12-(¹³C)OH-Nevirapine sulfate, sodium salt 12-(¹³C)38C₁₄¹³CH₁₃N₄O₅SNaMW = 385.34 g.mol⁻¹

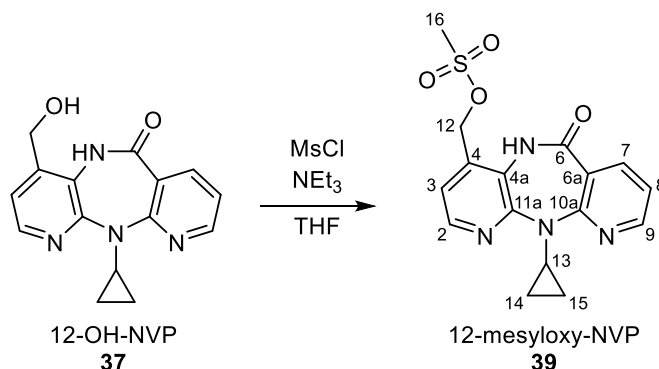
Starting from 12-(¹³C)hydroxy-Nevirapine 12-(¹³C)37 (80 mg, 0.28 mmol, 1 equiv.) in anhydrous dimethylformamide (4 mL) and sulfur trioxide pyridine complex (261 mg, 1.69 mmol, 6 equiv.), the same procedure as for the synthesis of 12-sulfoxy-Nevirapine was repeated to give 12-(¹³C)OH-Nevirapine sulfate 12-(¹³C)38 (50 mg, 46%). ¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ 0.46 (m, 2H, **H-14** and **H-15**), 0.94 (m, 2H, **H-14** and **H-15**), 3.74 (m, 1H, **H-13**), 5.06 [A part of an AB system, 1H, ¹J_{CH} = 147.5 Hz, ²J_{AB} = 13.5 Hz, **H-12**], 5.22 [B part of an AB system, 1H, ¹J_{CH} = 147.5 Hz, ²J_{AB} = 13.5 Hz, **H-12**], 7.19 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.0 Hz, ³J_{HH} = 5.0 Hz, **H-8**), 7.33 (dd, 1H, ³J_{CH} = 5.0 Hz and ³J_{HH} = 5.0 Hz, **H-3**), 8.12 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.5 Hz and ⁴J_{HH} = 2.0 Hz, **H-7**), 8.21 (d, 1H, ³J_{HH} = 5.0 Hz, **H-2**), 8.48 (dd, 1H, ³J_{HH} = 4.5 Hz and ⁴J_{HH} = 2.0 Hz, **H-9**). ¹³C NMR (125 MHz, MeOD): δ 9.5 (**C-14** or **C-15**), 9.8 (**C-14** or **C-15**), 30.5 (**C-13**), 65.9 (**C-12**), 120.8 (**C-3** or **C-8**), 121.5 (**C-3** or **C-8**), 122.4 (**C-6a**), 125.8 (**C-4a**), 140.7 (d, ¹J_{CC} = 48.1 Hz, **C-4**), 141.9 (**C-7**), 145.6 (d, ²J_{CC} = 2.8 Hz, **C-2**), 152.9 (**C-9**), 155.9 (**C-11a**), 161.6 (**C-10a**), 169.8 (**C-6**). Residual 12-(¹³C)Névirapine was detected at 17.9 ppm (¹³C-12).

12-Mesyloxy-Nevirapine **39**

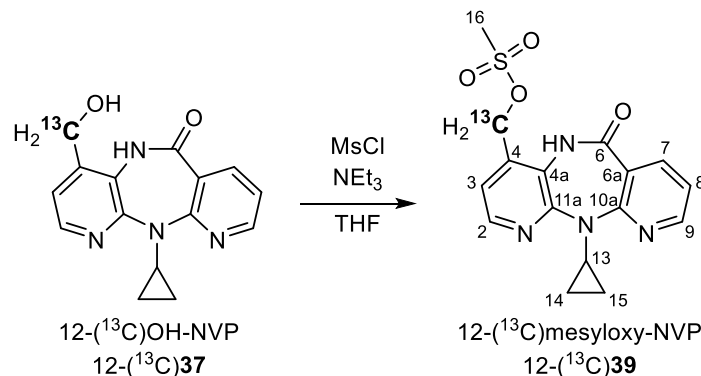
C₁₆**H**₁₆**N**₄**O**₄**S**

MW = 360.39 g.mol⁻¹

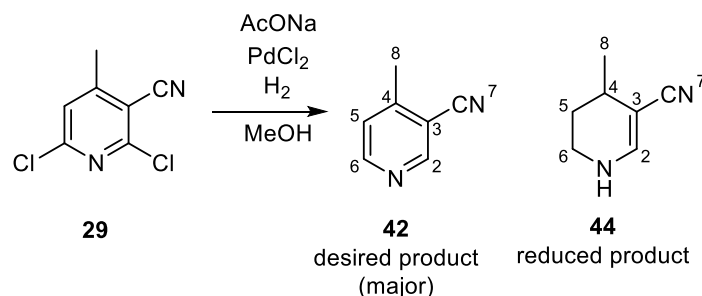
TLC R_f = 0.50 (ethyl acetate); rev: PMA/Ce



To a solution of 12-OH-NVP **37** (175 mg, 0.62 mmol, 1 equiv.) in dry tetrahydrofuran (14.5 mL) cooled at 0 °C was added freshly distilled triethylamine (0.13 mL, 0.93 mmol, 1.5 equiv.). A solution of methanesulfonyl chloride (1.29 M in dry THF, 0.72 mL, 0.93 mmol, 1.5 equiv.) was slowly added just before another portion of triethylamine (0.13 mL, 0.93 mmol, 1.5 equiv.). The reaction mixture was stirred at 0 °C for 45 min. Water (20 mL) was slowly added at 0 °C and the aqueous phase was extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The gathered organic phases were dried over magnesium sulfate, evaporated under reduced pressure and dried under vacuum. The yellow solid residue was purified by column chromatography (dichloromethane/ethyl acetate gradient, 80:20 to 100% ethyl acetate) to give 12-mesyloxy-Nevirapine **39** as a white powder (111 mg, 50%). **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ 0.49 (m, 2H, **H-14** and **H-15**), 0.98 (m, 2H, **H-14** and **H-15**), 3.07 (s, 3H, **H-16**), 3.73 (m, 1H, **H-13**), 5.34 [A part of an AB system, 1H, ²J_{AB} = 12.5 Hz, **H-12**], 5.38 [B part of an AB system, 1H, ²J_{AB} = 12.5 Hz, **H-12**], 7.07 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.0 Hz, ³J_{HH} = 5.0 Hz, **H-8**), 7.12 (d, 1H, ³J_{HH} = 5.0 Hz, **H-3**), 8.12 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.5 Hz and ⁴J_{HH} = 2.0 Hz, **H-7**), 8.30 (d, 1H, ³J_{HH} = 5.0 Hz, **H-2**), 8.53 (dd, 1H, ³J_{HH} = 4.5 Hz and ⁴J_{HH} = 2.0 Hz, **H-9**), 8.76 (s, 1H, **NH**). **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃): δ 9.1 (**C-14** or **C-15**), 9.3 (**C-14** or **C-15**), 30.0 (**C-13**), 38.5 (**C-16**), 66.4 (**C-12**), 119.5 (**C-8**), 120.1 (**C-6a**), 120.3 (**C-3**), 124.5 (**C-4a**), 134.3 (**C-4**), 140.7 (**C-7**), 145.3 (**C-2**), 152.5 (**C-9**), 155.3 (**C-11a**), 160.3 (**C-10a**), 168.8 (**C-6**).

12-(¹³C)Mesyloxy-Nevirapine 12-(¹³C)39C₁₅¹³CH₁₆N₄O₄SMW = 361.39 g.mol⁻¹TLC R_f = 0.50 (ethyl acetate); rev: PMA/Ce

Starting from 12-(¹³C)hydroxy-Nevirapine 12-(¹³C)37 (178 mg, 0.63 mmol, 1 equiv.) in anhydrous THF (14.5 mL), 2 portions of triethylamine (0.13 mL, 0.93 mmol, 1.5 equiv) and methanesulfonyl chloride (1.29 M in dry THF, 0.73 mL, 0.94 mmol, 1.5 equiv.) the same procedure as for the synthesis of 12-mesyloxy-Nevirapine 39 was repeated to give 133 mg of pure 12-(¹³C)mesyloxy-Nevirapine 12-(¹³C)39 (52%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 0.49 (m, 2H, **H-14** and **H-15**), 0.98 (m, 2H, **H-14** and **H-15**), 3.07 (s, 3H, **H-16**), 3.74 (m, 1H, **H-13**), 5.20 [A part of an AB system, 1H, ¹J_{CH} = 132.5 Hz, ²J_{AB} = 13.5 Hz, **H-12**], 5.50 [B part of an AB system, 1H, ¹J_{CH} = 132.5 Hz, ²J_{AB} = 13.5 Hz, **H-12**], 7.08 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, ³J_{HH} = 5.0 Hz, **H-8**), 7.12 (dd, 1H, ³J_{CH} = 5.0 Hz, ³J_{HH} = 5.0 Hz, **H-3**), 8.12 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.5 Hz and ⁴J_{HH} = 2.0 Hz, **H-7**), 8.30 (d, 1H, ³J_{HH} = 4.5 Hz, **H-2**), 8.53 (dd, 1H, ³J_{HH} = 5.0 Hz and ⁴J_{HH} = 2.0 Hz, **H-9**), 8.68 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 9.1 (**C-14** or **C-15**), 9.3 (**C-14** or **C-15**), 30.0 (**C-13**), 38.5 (**C-16**), 66.4 (¹³C-12), 119.5 (**C-8**), 120.1 (**C-6a**), 120.3 (**C-3**), 124.5 (**C-4a**), 134.2 (d, ¹J_{CC} = 48.4 Hz, **C-4**), 140.7 (**C-7**), 145.3 (d, ³J_{CC} = 3.5 Hz, **C-2**), 152.5 (**C-9**), 155.2 (d, ³J_{CC} = 1.4 Hz, **C-11a**), 160.3 (**C-10a**), 168.7 (**C-6**). Residual 12-(¹³C)Névirapine was detected at 17.9 ppm (¹³C-12).

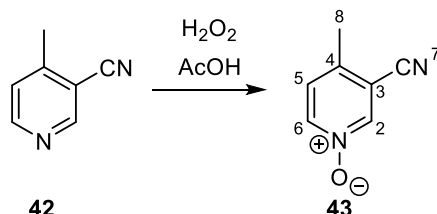
4-Methyl-3-pyridinecarbonitrile 42**C₇H₆N₂****MW** = 118.14 g.mol⁻¹**TLC** R_f = 0.51 (petroleum ether/ethyl acetate, 50:50); rev: PMA/Ce

To a degassed suspension of 2,6-dichloro-4-methyl-3-pyridinecarbonitrile **29** (0.846 g, 4.52 mmol, 1 equiv.) and sodium acetate (0.745 g, 9.08 mmol, 2 equiv.) in methanol (12.5 mL) was added a catalytic quantity of palladium dichloride. The mixture was stirred at room temperature under hydrogen atmosphere (1.2 atm) and monitored by TLC until complete conversion of **29**. The catalyst was filtered on Celite and washed with methanol (3 x 25 mL). The orange filtrate was evaporated under reduced pressure, taken up in water (50 mL) and the pH was adjusted to 8 using solid sodium hydrogenocarbonate. The aqueous phase was extracted with diethyl ether (3 x 50 mL) and the gathered organic phases were washed with a saturated solution of sodium chloride (50 mL), dried over magnesium sulfate, evaporated and dried under vacuum to give a yellow solid (containing the desired molecule **42** as the major product and a more reduced molecule **44**) which was used in the next step without further purification. (411 mg, 77%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): desired product δ 2.43 (s, 3H, **H-8**), 7.20 (d, 1H, ³J_{HH} = 5.0 Hz, **H-5**), 8.51 (d, 1H, ³J_{HH} = 5.5 Hz, **H-6**), 8.64 (s, 1H, **H-2**). reduced product δ 1.01 (d, 3H, ³J_{HH} = 6.5 Hz, **H-8**), 1.36 (m, 1H, **H-5**), 1.73 (m, 1H, **H-5**), 2.31 (m, 1H, **H-4**), 3.09 (m, 2H, **H-6**), 5.01 (br s, 1H, NH), 6.77 (d, 1H, ³J_{HH} = 6.0 Hz, **H-2**). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): desired product δ 20.0 (**C-8**), 110.7 (**C-3** or **C-7**), 115.8 (**C-3** or **C-7**), 124.8 (**C-5**), 150.8 (**C-4**), 152.4 (**C-2** or **C-6**), 152.6 (**C-2** or **C-6**). reduced product δ 20.7 (**C-8**), 26.8 (**C-4**), 28.7 (**C-5**), 38.2 (**C-6**), 79.4 (**C-3**), 123.0 (**C-7**), 144.2 (**C-2**).

4-Methyl-3-pyridinecarbonitrile-1-oxide **43**

C₇H₆N₂O

MW = 134.14 g.mol⁻¹

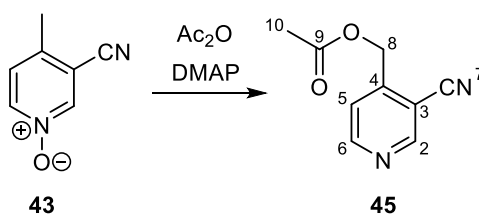


4-Methyl-3-pyridinecarbonitrile **42** (1.166 g, 9.87 mmol, 1 equiv.) was dissolved in glacial acetic acid (5.7 mL, 99.6 mmol, 10.1 equiv.). A solution of 30% hydrogen peroxide (0.97 mL, 9.47 mmol, 0.96 equiv.) was slowly added and the mixture was stirred at 80 °C. After 3h, another portion of 30% hydrogen peroxide (0.69 mL, 0.68 mmol, 0.68 equiv.) was added and the mixture was stirred at 80 °C overnight. After cooling to room temperature, water (15 mL) was added and the pH was adjusted to 7 using a saturated solution of sodium carbonate. The aqueous phase was extracted with chloroform (6 x 100 mL). The organic phase was concentrated to 100 mL before the addition of 3 spatula of Pd/C (5 wt. %). The resulting dark suspension was stirred at room temperature for 1 day, filtered on Celite, and the catalyst was washed with chloroform (200 mL). The filtrate was evaporated and dried under vacuum to give pure 4-methyl-3-pyridinecarbonitrile-1-oxide **43** as a white solid (924 mg, 70%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 2.54 (s, 3H, **H-8**), 7.24 (d, 1H, ³J_{HH} = 6.5 Hz, **H-5**), 8.23 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.0 Hz, and ⁴J_{HH} = 1.5 Hz, **H-6**), 8.37 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.5 Hz, **H-2**). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 19.6 (**C-8**), 113.5 (**C-3** or **C-7**), 113.6 (**C-3** or **C-7**), 128.0 (**C-5**), 139.9 (**C-6**), 141.2 (**C-2**), 142.6 (**C-4**). Mp : 181 °C - 183 °C.

4-[(Acetyloxy)methyl]-3-pyridinecarbonitrile **45**

C₉H₈N₂O₂

MW = 176.17 g.mol⁻¹

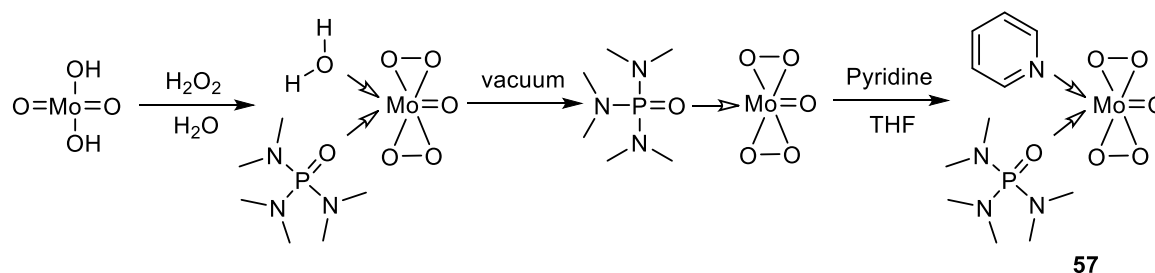
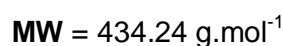


Acetic anhydride (2.0 mL, 1.58 mmol, 13.3 equiv.) was added to **43** (212 mg, 1.58 mmol, 1 equiv.) and dimethylaminopyridine (catalytic quantity). The yellow solution was stirred at 140

°C for 5 min. After cooling to room temperature and then to 0 °C, water (10 mL) was added dropwise and the pH was adjusted to 7-8 using a saturated solution of sodium hydrogenocarbonate. The aqueous phase was extracted with dichloromethane (5 x 60 mL). The gathered organic phases were washed with water (100 mL) and a saturated solution of sodium chloride (100 mL), dried over magnesium sulfate, evaporated and dried under vacuum to give a crude brown oil containing the desired molecule **45** as the major product (239 mg). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 2.19 (s, 3H, **H-10**), 5.29 (s, 2H, **H-8**), 7.44 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 5.5$ Hz, **H-5**), 8.79 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, **H-6**), 8.88 (s, 1H, **H-2**).

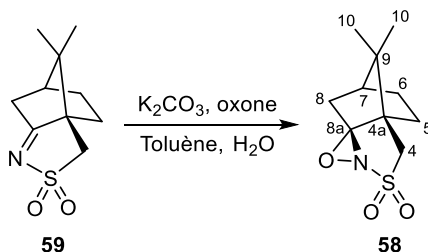
Oxidoperoxymolybdenum(pyridine)-(hexamethylphosphoric triamide)

MoO₅.py.HMPA – MoOPH **57**



A solution of 30% H_2O_2 (200 mL, 1.96 mol, 7.1 equiv.) was slowly added to molybdic acid (44.7 g, 0.276 mol, 1 equiv.), maintaining the temperature below 40 °C. The mixture was stirred at 40 °C for 2 h until the starting slurry became a yellow solution, cooled to 10 °C, before adding HMPA (48 mL, 0.276 mol, 1 equiv.) in one portion. The yellow precipitate of $\text{MoO}_5\cdot\text{HMPA}\cdot\text{H}_2\text{O}$ was filtered, washed with cold water, recrystallized from methanol at 40 °C, and dried over P_2O_5 for 24 h under high vacuum to give $\text{MoO}_5\cdot\text{HMPA}$ (19.4 g, 20%) as a yellow solid (MP: 112 °C - 114 °C).

Dry pyridine (2.7 mL, 33.6 mmol) was added to a solution of $\text{MoO}_5\cdot\text{HMPA}$ (11.9 g, 33.6 mmol, 1 equiv.) in anhydrous THF (50 mL) at 20 °C. The yellow precipitate was filtered on a Schlenck-frit, washed with anhydrous THF (8 mL) and anhydrous Et_2O (3 x 15 mL), and dried under vacuum to give $\text{MoO}_5\cdot\text{py}\cdot\text{HMPA}$ **47** (MoOPH, 11.8 g, 81%). The product was stored at -40 °C under argon, protected from light and humidity. Mp : dec. > 100°C (litt. dec. > 103 °C - 105 °C).

(1R)-(-)-(10-Camphorsulfonyl)oxaziridine 58**C₁₀H₁₅NO₃S****MW = 229,08 g.mol⁻¹****TLC R_f = 0.80 (dichloromethane); rev: PMA/Ce**

A solution of potassium carbonate (34.2 g, 248 mmol, 21 equiv.) in water (52 mL) was added to a solution of (1S)-(-)-camphorsulfonylimine **59** (2.50 g, 11.7 mmol, 1 equiv.) in toluene (46 mL). The biphasic mixture was highly stirred and cooled to 0 °C. A solution of oxone (78.9 g, 257 mmol, 22 equiv.) in water (315 mL) was added dropwise and the mixture was stirred at room temperature overnight. The pink precipitate was filtered. The filtrate was extracted with dichloromethane (3 x 200 mL) and the pink solid was washed with dichloromethane (200 mL). The reunited organic phases were dried over magnesium sulfate, evaporated under reduced pressure and dried under vacuum. The white solid residue was purified by column chromatography (100% dichloromethane) to give (1R)-(-)-(10-camphorsulfonyl)oxaziridine **58** as white needles (2.36 g, 88%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 1.00 (s, 3H, **H-10**), 1.14 (s, 3H, **H-10**), 1.47 - 2.15 (m, 6H, **H-5**, **H-6** and **H-8**), 2.60 (m, 1H, **H-7**), 3.08 [A part of an AB system, 1H, ²J_{AB} = 14.0 Hz, **H-4**], 3.26 [B part of an AB system, 1H, ²J_{AB} = 14.0 Hz, **H-4**]. ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 19.5 (**C-10**), 20.6 (**C-10**), 26.6 (**CH₂**), 28.4 (**CH₂**), 33.7 (**CH₂**), 45.8 (**C-7**), 48.4 (**C-4**), 54.1 (**C-4a**), 98.9 (**C-8a**). Mp : 163 °C - 165 °C (litt. 163 °C - 165 °C).

Reactivity studies in solution

Buffer preparation

Phosphate buffer solution (PBS, 0.1 M, pH = 7.4) was prepared as specified:

40.5 mL of a solution of 0.2 M NaH₂PO₄

9.5 mL of a solution of 0.2 M NaH₂PO₄(H₂O)₂

50 mL of milliq. H₂O

The pH was adjusted to 7.4 if necessary.

NMR acquisition

All nuclear magnetic resonance spectra (¹H and ¹³C) were recorded on a Bruker Avance II (500 MHz (¹H) and 125 MHz (¹³C)) spectrometer in DMSO-d₆ or in a mixture of phosphate buffer (pH 7.4) and CD₃CN. If necessary, adducts formed were identified by HSQC experiments. The solvent residual signals were used as reference values according to **table 1**.

Solvent	δ ¹ H (ppm)	δ ¹³ C (ppm)
CH ₃ CN	1.94	1.32/118.26
DMSO	2.50	39.52

Table 1: Chemical shift references used for NMR spectra calibration

LC/MS

All liquid chromatography-mass spectrometry data were recorded on an Agilent 1200 equipment at 25°C. Mass spectra were recorded on a HCT Ultra Bruker ion trap spectrometer equipped with an electrospray/atmospheric pressure chemical ionization interface (ESI/APCI). The parent ions are quoted [M+H]⁺.

For samples containing CD₃CN/PBS, a Zorbax SB-C18 column (1.8 μm, 2.1 x 50 mm, flow 0.5 mL/min) was used with the following gradient (**table 2**):

t (min)	Water + 0.05% formic acid	Acetonitrile + 0.05% formic acid
0	98	2
4	0	100
8	0	100

Table 2: Gradient used for eluting adducts formed in CD₃CN/PBS

For samples containing DMSO-d₆, a Zorbax SB-C18 column (1.8 μm, 2.1 x 30 mm, flow 0.8 mL/min) was used with the following gradient (**table 3**):

t (min)	Water + 0.05% formic acid	Acetonitrile + 0.05% formic acid
0	98	2
2.5	0	100
5	0	100

Table 3: Gradient used for eluting adducts formed in DMSO-d₆

General procedure for coupling 12-(¹³C)mesyloxy-Nevirapine to amino acids in PBS/CD₃CN

To a solution of *N*-acetylamino acid *N*-Ac-Aa-OR (70 μmol, 10 equiv.) (**Table 4**) in PBS (pH 7.4, 0.1 M, 300 μL) was added a solution of 12-(¹³C)mesyloxy-Nevirapine (2.5 mg, 1 equiv.) in CD₃CN (300 μL). The mixture was transferred into an NMR tube for analysis. After one month, the reaction mixture was analyzed by LC-MS.

Amino acid <i>N</i> -Ac-Aa-OR	Quantity (mg)	Adducts
<i>N</i> -Ac-Cys-OMe	13	12-(¹³ C) 37 , (¹³ C) 61a , (¹³ C) 61b
<i>N</i> -Ac-Cys-OH	12	12-(¹³ C) 37 , (¹³ C) 61c , (¹³ C) 61e Adducts (¹³ C) 61d and (¹³ C) 61f were detected in LC-MS but not in NMR
<i>N</i> -Ac-Lys-OMe.HCl	17	12-(¹³ C) 37 , (¹³ C) 62a
<i>N</i> -Ac-His-OH.H ₂ O	14	12-(¹³ C) 37 , (¹³ C) 63a , (¹³ C) 63b , (¹³ C) 63c
<i>N</i> -Ac-Arg-OMe.HCl	19	12-(¹³ C) 37 , Adducts (¹³ C) 64a and (¹³ C) 64b were detected in NMR but not in LC-MS
<i>N</i> -Ac-Tyr-OH	16	12-(¹³ C) 37 , (¹³ C) 65 (unkown structure)

Table 4: Amino acids, quantity used and adducts detected in PBS/CD₃CN

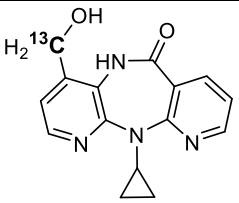
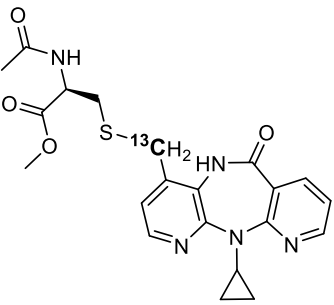
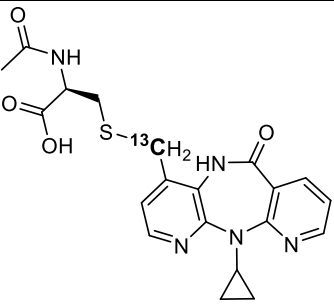
General procedure for coupling 12-(¹³C)mesyloxy-Nevirapine to tyrosine in DMSO-d₆

To a solution of *N*-acetylamino acid *N*-Ac-Aa-OR (70 μmol, 10 equiv.) (**Table 5**) in DMSO-d₆ was added a solution of 12-(¹³C)mesyloxy-Nevirapine (2.5 mg, 1 equiv.) in DMSO-d₆ (300 μL). The mixture was transferred into an NMR tube for analysis. After one month, the reaction mixture was analyzed by LC-MS.

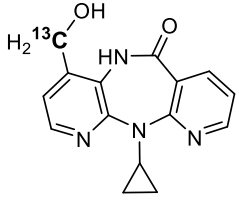
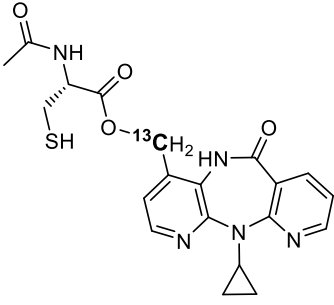
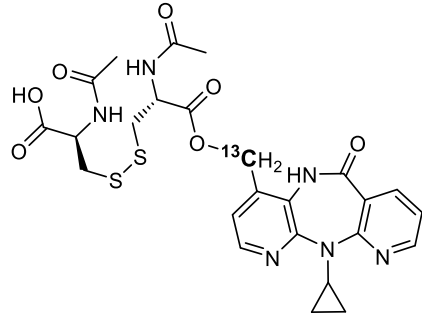
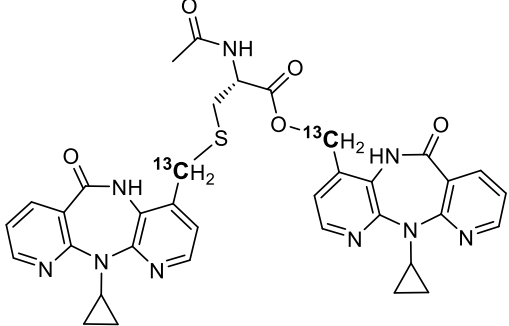
Amino acid <i>N</i> -Ac-Aa-OR	Quantity (mg)	Adducts
<i>N</i> -Ac-Tyr-OH	16	12- ¹³ C 37 , (¹³ C) 66 (unkown structure), 4-(¹³ C) 67
<i>N</i> -Ac-Tyr-OEt.H ₂ O	19	12- ¹³ C 37 , (¹³ C) 66 (unkown structure), 4-(¹³ C) 67

Table 5: Amino acids, quantity used and adducts detected in DMSO-d₆

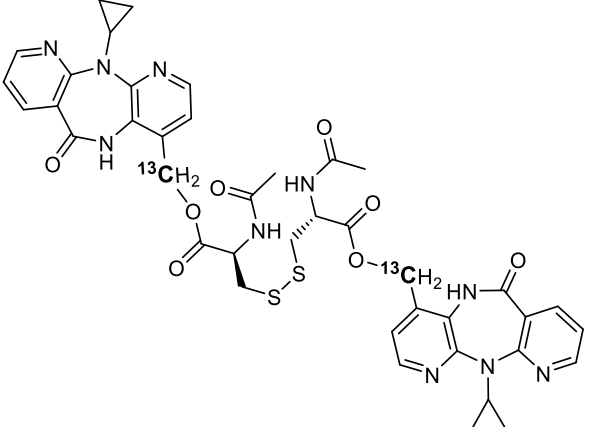
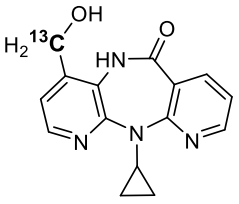
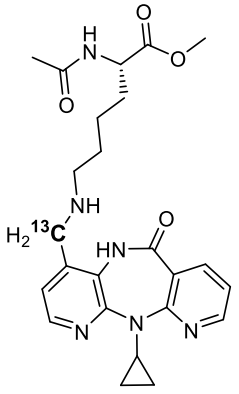
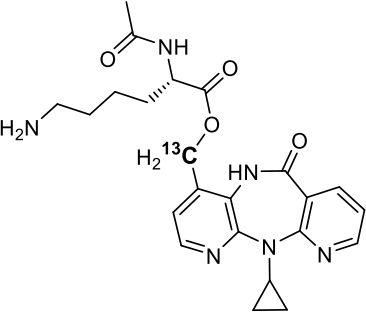
Characterized adducts in PBS/CD₃CN

Adduct	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm) (HSQC ¹ H- ¹³ C)	Proposed structure
12- ¹³ C 37	60.7	4.57 - 4.75	 <p>ESI/APCI: m/z 284 [12-¹³C37 + H]⁺</p>
(¹³ C) 61a	32.1 32.3*	3.55 - 4.12	 <p>ESI/APCI: m/z 443 [(¹³C)61a + H]⁺</p>
(¹³ C) 61b	32.4	Not detected	 <p>ESI/APCI: m/z 429 [(¹³C)61b + H]⁺</p>

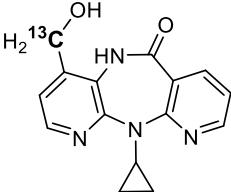
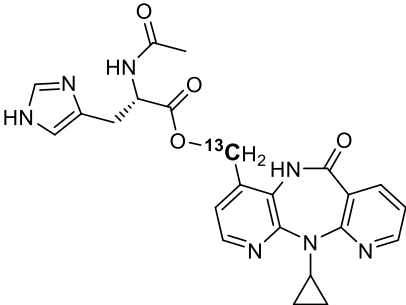
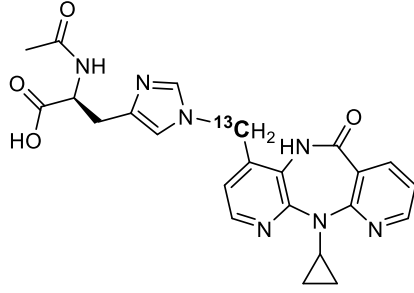
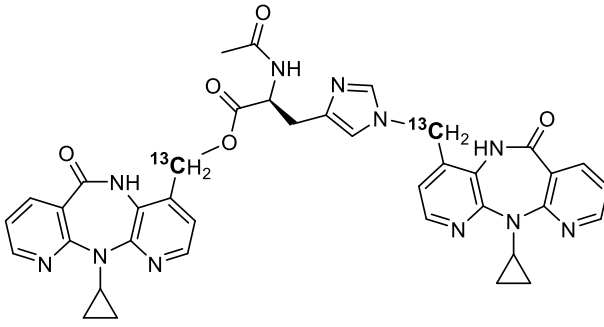
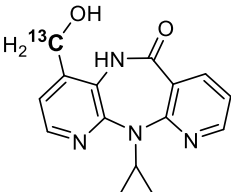
*2 conformers

	Adduct	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm) (HSQC ^1H - ^{13}C)	Proposed structure
N-Ac-Cys-OH	12- $(^{13}\text{C})\mathbf{37}$	60.9	4.57 - 4.75	 <p>ESI/APCI: m/z 284 [$12\text{-}(^{13}\text{C})\mathbf{37} + \text{H}$]⁺</p>
	$(^{13}\text{C})\mathbf{61c}$	63.3 63.4*	5.18 - 5.28	 <p>ESI/APCI: m/z 429 [$(^{13}\text{C})\mathbf{61c} + \text{H}$]⁺</p>
	$(^{13}\text{C})\mathbf{61d}$	Not detected in NMR		 <p>ESI/APCI: m/z 590 [$(^{13}\text{C})\mathbf{61d} + \text{H}$]⁺</p>
	$(^{13}\text{C})\mathbf{61e}$	32,2 32,4*	3.69 - 3.95	 <p>ESI/APCI: m/z 694 [$(^{13}\text{C})\mathbf{61e} + \text{H}$]⁺</p>

*2 conformers

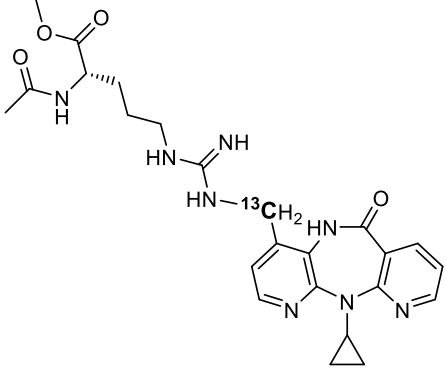
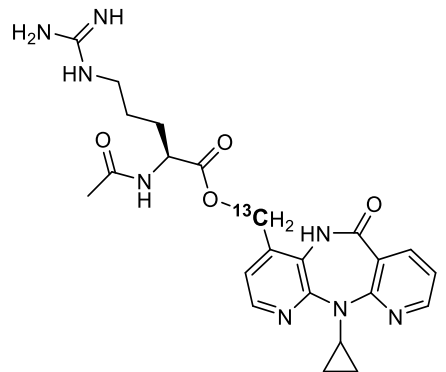
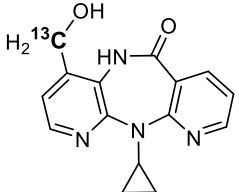
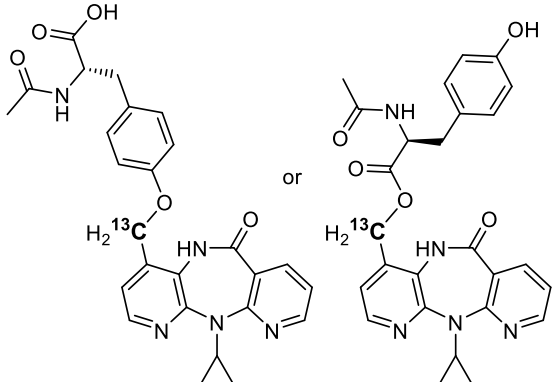
	Adduct	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm) (HSQC ^1H - ^{13}C)	Proposed structure
N-Ac-Cys-OH	$(^{13}\text{C})\mathbf{61f}$	Not detected in NMR		 <p>ESI/APCI: m/z 855 [$(^{13}\text{C})\mathbf{61f} + \text{H}$]⁺</p>
N-Ac-Lys-OMe	12- $(^{13}\text{C})\mathbf{37}$	61.0	4.57 - 4.75	 <p>ESI/APCI: m/z 284 [12-$(^{13}\text{C})\mathbf{37} + \text{H}$]⁺</p>
	$(^{13}\text{C})\mathbf{62a}$	41.8	4.58 - 4.88	 <p>ESI/APCI: m/z 468 [$(^{13}\text{C})\mathbf{62a} + \text{H}$]⁺</p>
	$(^{13}\text{C})\mathbf{62b}$	62,7 62,8*	4,78 - 4,97	 <p>Not detected in LC-MS</p>

*2 conformers

Adduct	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm) (HSQC ^1H - ^{13}C)	Proposed structure
N-Ac-His-OH	12- $(^{13}\text{C})\mathbf{37}$	61.0	4.57 - 4.75  ESI/APCI: m/z 284 [$12\text{-}(^{13}\text{C})\mathbf{37} + \text{H}$] ⁺
	$(^{13}\text{C})\mathbf{63a}$	63.1	5.09 - 5.28  ESI/APCI: m/z 463 [$(^{13}\text{C})\mathbf{63a} + \text{H}$] ^{***}
	$(^{13}\text{C})\mathbf{63b}$	47.0 47.1*	5.15 - 5.38  ESI/APCI: m/z 463 [$(^{13}\text{C})\mathbf{63b} + \text{H}$] ^{***}
	$(^{13}\text{C})\mathbf{63c}$	46.95 47.02* 62.99 63.03*	Not detectable  ESI/APCI: m/z 728 [$(^{13}\text{C})\mathbf{63c} + \text{H}$] ⁺
N-Ac-Arg-OMe	12- $(^{13}\text{C})\mathbf{37}$	61.0	4.57 - 4.75  ESI/APCI: m/z 284 [$12\text{-}(^{13}\text{C})\mathbf{37} + \text{H}$] ⁺

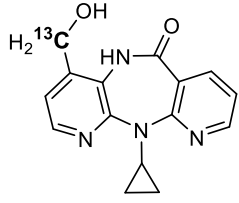
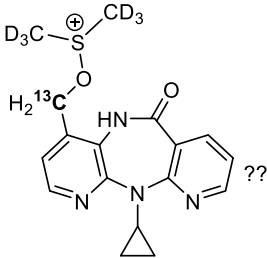
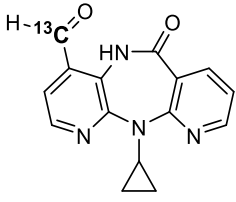
*2 conformers

**Only one of the two adducts molecular ions [$(^{13}\text{C})\mathbf{63a} + \text{H}$]⁺ or 463 [$(^{13}\text{C})\mathbf{63b} + \text{H}$]⁺ was detected in LC-MS

	Adduct	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm) (HSQC ^1H - ^{13}C)	Proposed structure
N-Ac-Arg-OMe	$(^{13}\text{C})\mathbf{64a}$	41,7	4,55 - 4,90	 <p>Not detected in LC-MS</p>
	$(^{13}\text{C})\mathbf{64b}$	62,6 62,7*	4,63 - 4,95	 <p>Not detected in LC-MS</p>
N-Ac-Tyr-OH	12- $(^{13}\text{C})\mathbf{37}$	61.0	4.57 - 4.75	 <p>ESI/APCI: m/z 284 [12-$(^{13}\text{C})\mathbf{37}$ + H]⁺</p>
	$(^{13}\text{C})\mathbf{65}$	62,8 62,9*	5,00 - 5,27	 <p>ESI/APCI: m/z 489 [($^{13}\text{C})\mathbf{65}$ + H]⁺</p>

*2 conformers

Characterized adducts in DMSO-d6

	Adduct	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm) (HSQC ^1H - ^{13}C)	Proposed structure
N-Ac-Tyr-OH or N-Ac-Tyr-OEt	12- (^{13}C) 37	58.9	4.50 - 4.79	 <p>ESI/APCI: m/z 284 [12-(^{13}C)37 + H]$^+$</p>
	4- (^{13}C) 66	71.8	Not detected	 <p>Not detected in LC-MS</p>
	4- (^{13}C) 67	190.7	10.67	 <p>ESI/APCI: m/z 282 [4-(^{13}C)67 + H]$^+$</p>

Reactivity studies in EpiSkin[®] model

Epidermis preparation: arrival in the laboratory and maintenance period

EpiSkin[®] reconstructed human epidermis were delivered after a culture period of 13 days. Maintenance medium was shipped along with the EpiSkin[®] models. EpiSkin[®] kit consisted of 12 reconstructed epidermis units (1.07 cm²) made of type I collagen matrix surfaced with a film of type IV collagen, upon which was laid a stratified and differentiated epidermis derived from human keratinocytes. Reconstructed human epidermis were packed in a multi-well plate filled with an agarose-nutrient gel in which they were embedded (**Figure 1**).



Figure 1: Multi-well plate containing agarose upon which are embedded reconstructed human epidermis

The plates were handled in a laminar flow hood under sterile conditions.

A new plate was prepared by filling each well with maintenance medium (2 mL) and avoiding the introduction of air bubbles (**Figure 2**). Maintenance medium should be used at room temperature and stored in the dark at 2 - 8 °C.

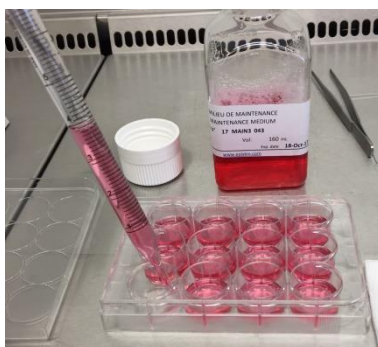


Figure 2: Multi-well plate filled with maintenance medium

Each insert containing the epidermis was carefully taken out. Any remaining agarose adhering to the outer sides of the insert was removed using a gauze compress. The insert was immediately placed in new well filled with maintenance medium. This step was executed

quickly as the tissue cultures dry out rapidly when not in contact with medium, and no air bubbles must form underneath the insert (**Figure 3**).

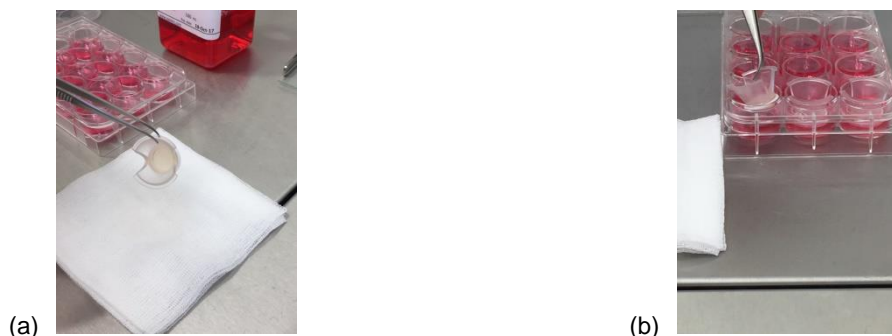


Figure 3: Removing excess agarose on a gauze compress (a) before placing the insert in a new well filled with maintenance medium (b)

Culture plates were placed in an incubator at 37 °C, 5% CO₂, and saturated humidity. Testing started after 24 hours, in order to reinitiate cell growth after shipping.

Topical application of the molecules and incubation period

After 24 hours in the incubator, ¹³C-substituted molecules were applied at the surface of the epidermis. Haptens and pro-haptens are usually applied in solution using acetone as the vehicle. Acetone allows a good penetration through the epidermis and is easily eliminated by evaporation during the incubation period. However, except from 12-(¹³C)mesyloxy-Névirapine, Nevirapine and its derivatives are not soluble in acetone. For this reason, 12-(¹³C)Nevirapine, 12-(¹³C)OH-Nevirapine and 12-(¹³C)OH-Nevirapine sulfate were applied in DMSO.

Solutions of ¹³C-substituted molecules in DMSO (30 µL, 0.4 M) were applied topically on the epidermis, spreading the product all over the surface to make the penetration as homogeneous as possible. Controle samples were prepared by keeping an epidermis untreated (“blank”) and by treating another one with DMSO (30 µL) only. In order to obtain enough material for the preparation of one HRMS NMR insert, two 1,07 cm² reconstructed human epidermis are needed. The plates were placed in the incubator again after application.

Each ¹³C-substituted molecule was applied separately on several epidermis samples and different incubation periods were chosen to get a kinetic monitoring of the transformations occurring in the epidermis. Reconstructed human epidermis were incubated from 1 hour to 48 hours, depending on the studied molecule. When the incubation time exceeded 24 hours, the maintenance medium was replaced with fresh medium.

After incubation, multi-well plates were taken out of the CO₂ incubator. The supports containing the epidermis were grasped with tweezers (**Figure 4a**). To detach the sample, the white circle maintaining the collagen “sock” under the epidermis was first removed (**Figure 4b**). The collagen matrix was then carefully pulled out (**Figure 4c**), leaving the epidermis alone on the support (**Figure 4d**). The sample was gently detached from the support (**Figure 4e**). Since DMSO was used as the vehicle, the epidermis was rinsed thoroughly with ultrapure water (Figure 4f). Reconstructed human epidermis were transferred in eppendorf tubes and deep-frozen at -80 °C. This freezing step stops the reaction between the hapten or the pro-hapten and the epidermis.

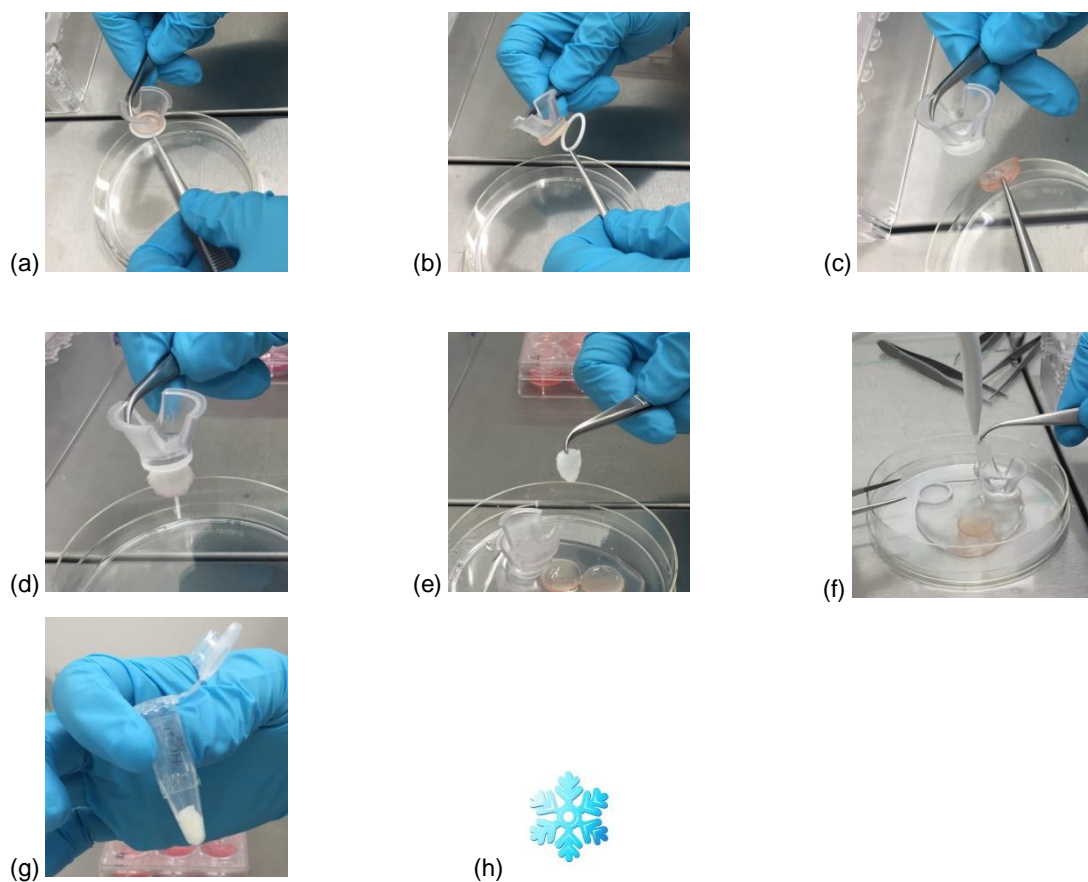


Figure 4 : Reconstructed human epidermis manipulation after incubation with ¹³C-substituted molecules

Deep-frozen samples were ready for the preparation of HRMAS NMR inserts after a minimum period of 8 hours at -80 °C.

HRMAS NMR insert preparation

Epidermis was taken out of the surgelator and placed at $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Using a 2 mm skin biopsy punch (**Figure 5**), a frozen fragment was removed from the epidermis.



Figure IV-5 : Biopsy punch

The epidermis fragment (15 to 20 mg) was introduced in a PCTFE (polychlorotrifluoroethylene) disposable insert by a piston system (**Figure 6a**). A small volume of D_2O (8 μL) was quickly added to insure the “lock” during NMR acquisition (**Figure 6b**). A conical plug was then added to hermetically seal the insert. (**Figure 6c**). The insert insures that the entire sample is detected by the radio-frequency coil of the probe and that no leak occurs during the analysis. Inserts can be stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

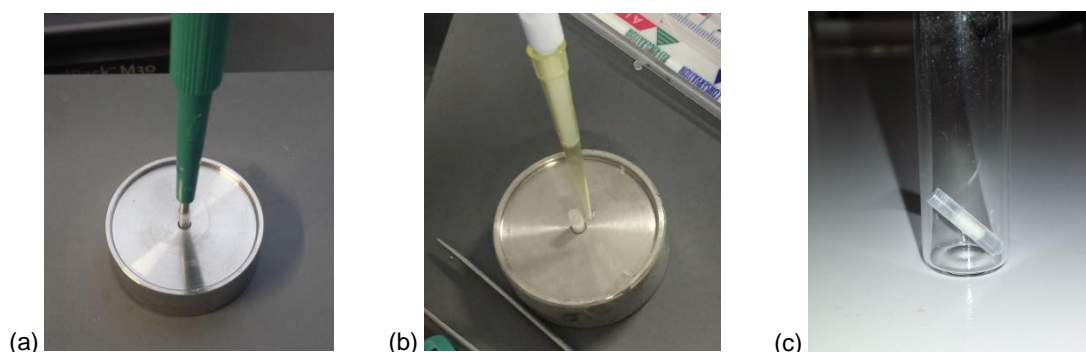


Figure 6: Introduction of an epidermis fragment into a disposable insert (a) before adding D_2O (b), and insert containing the sample (c)

Rotor preparation

Shortly before the HRMAS analysis, the insert was placed into a standard 4 mm ZrO_2 rotor closed with a cap. The ensemble was then inserted into the HRMAS probe pre-cooled at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. All experiments were performed at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ and were started immediately after the temperature inside the probe reached the equilibrium condition (5 min). Upon completion of the HRMAS analysis, the insert was taken out of the rotor and stored back to $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Therefore, complementary NMR analysis can be performed at a later stage of any of the stored sample inserts.

HRMAS NMR: data acquisition

HRMAS spectra were recorded on a Bruker Avance spectrometer (Faculté de Chimie, Strasbourg) operating at a proton frequency of 500.13 MHz. The spectrometer was equipped with a 4 mm triple resonance (^1H , ^{13}C and ^{31}P) gradient HRMAS probe. A Bruker colling unit (BCU) was used to regulate the temperature at 4 °C by cooling down the bearing air flowing into the probe. All NMR experiments were conducted on samples spinning at 3502 Hz to keep the rotation sidebands out of the spectral region of interest. Shimming procedure of HRMAS is realized according to the method described by Piotto *et al.*^[292]. For each sample, a one-dimensional proton spectrum using a standard one-pulse and a Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) pulse sequences were acquired (Bruker *cpmgpr1d* pulse sequence). Both sequences were coupled with water suppression/presaturation. CPMG sequence allows a better observation of signals by reducing the intensity of those macromolecules and lipids in the spectrum. The inter-pulse delay between the 180° pulses of the CPMG pulse train was synchronized with the sample rotation and set to 285 ms ($1/\omega_r = 1/3502 = 285 \mu\text{s}$) in order to eliminate signal losses to B_1 field inhomogeneities. The number of loops was set to 328 giving the CPMG pulse train a total length of 93 ms.

One-pulse and CPMG experiments were acquired with the following parameters: spectral width 14.0 ppm, number of points 32 k, relaxation delay 2 s, acquisition time 2.3 s. A total of 256 FID were acquired resulting in an acquisition time of 19 min. All spectra were recorded in such a manner that only a zero phase order correction was necessary to properly phase the spectrum. The FID was multiplied by an exponential weighing function corresponding to a line broadening of 0.3 Hz prior to Fourier transformation. All spectra were processed using automatic base line correction routines. Spectra were referenced by setting the lactate doublet chemical shift to 1.33 ppm in ^1H and 22.7 ppm in ^{13}C .

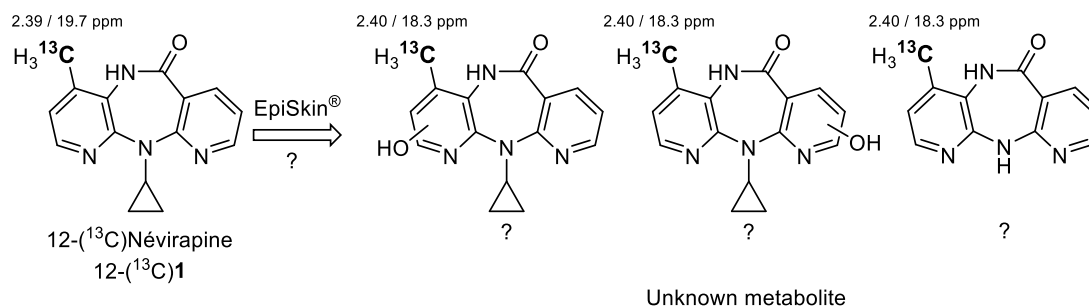
Two-dimensional heteronuclear ^1H - ^{13}C g-HSQC experiments using echo-antiecho gradient selection for phase-sensitive detection were acquired using a 46 ms acquisition time with GARP ^{13}C decoupling and a 1.5 s relaxation delay. A total of 182 transients were averaged for each of 256 t_1 increments, corresponding approximately to a total acquisition time of 21.5 h. Two 1 ms sine-shaped gradient pulses of strength 40 and 10.05 G/cm were used in the experiment. Data were zero-filled to a 2k * 1k matrix and weighted with a shifted square sine bell function before Fourier transformation.

Coupling of 12-(¹³C)Névirapine to EpiSkin®

12-(¹³C)Névirapine was applied in DMSO (0.4 M, 30 µL).

¹H-¹³C HSQC experiment showed a new correlation.

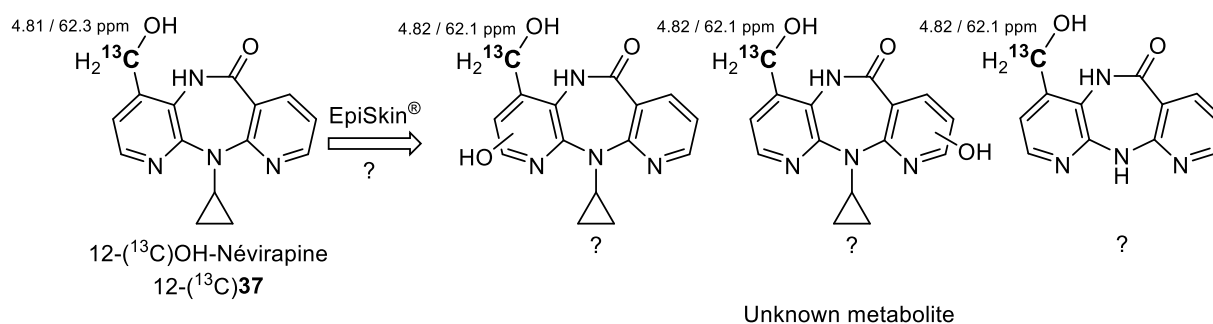
The substituted position was not modified. A metabolic transformation could have occurred somewhere else.



Coupling of 12-(¹³C)OH-Névirapine to EpiSkin®

12-(¹³C)OH-Névirapine was applied in DMSO (0.4 M, 30 µL).

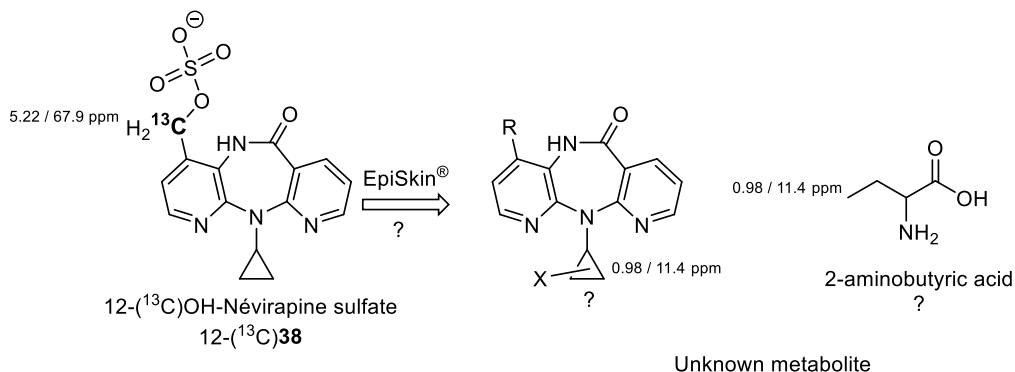
¹H-¹³C HSQC experiment showed one new correlation.



Coupling of 12-(¹³C)OH-Névirapine sulfate to EpiSkin®

12-(¹³C)OH-Névirapine sulfate was applied in DMSO (0.4 M, 30 µL).

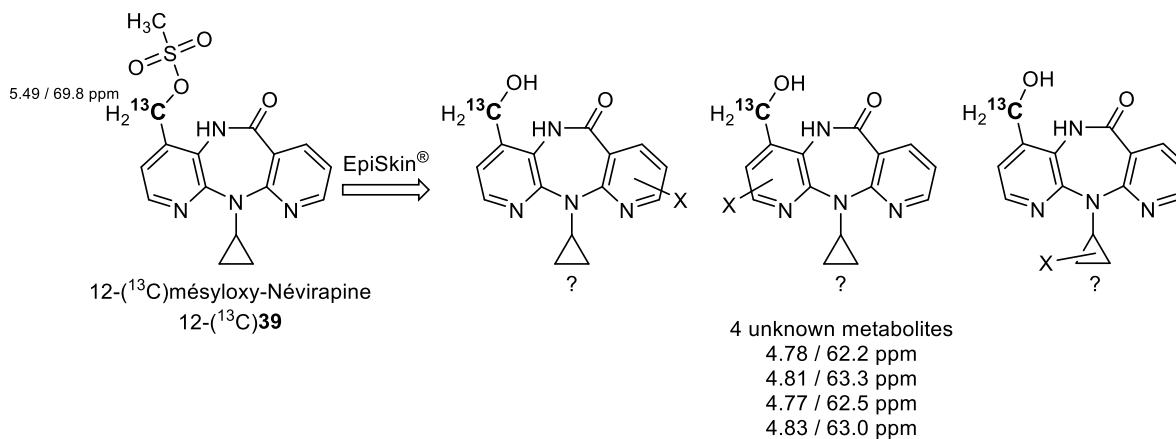
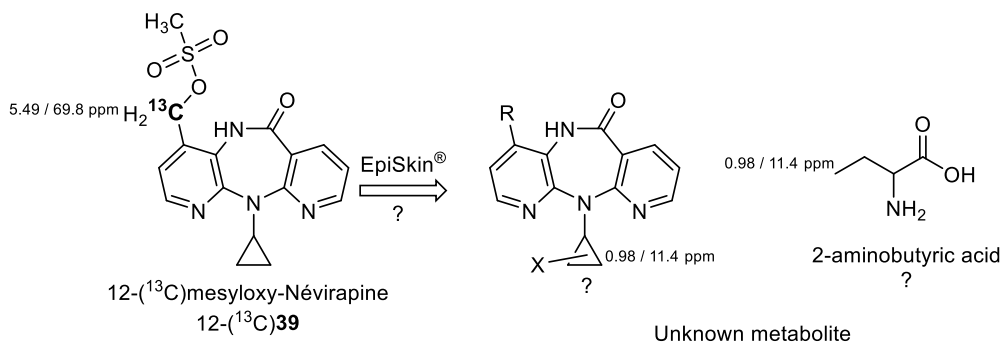
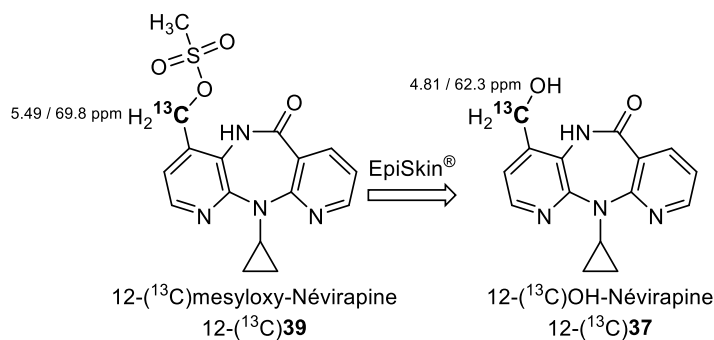
¹H-¹³C HSQC experiment showed one new correlation.

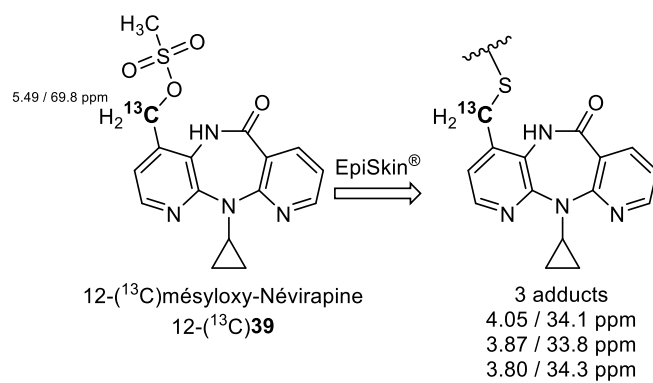


Coupling of 12-(^{13}C)mesyloxy-Névirapine to EpiSkin®

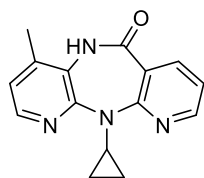
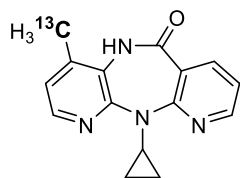
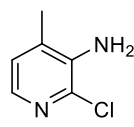
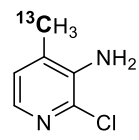
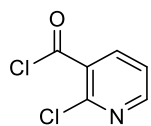
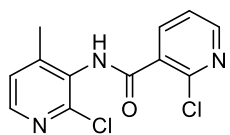
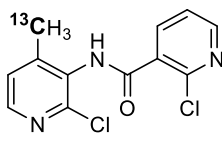
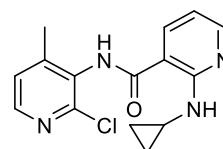
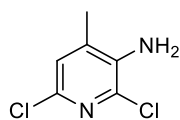
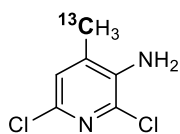
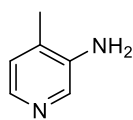
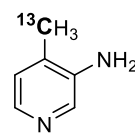
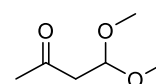
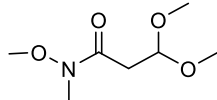
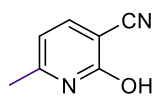
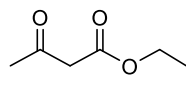
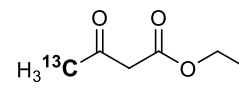
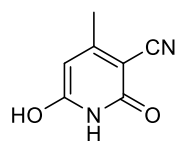
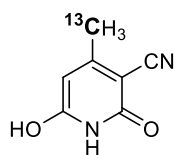
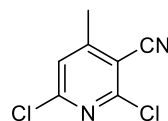
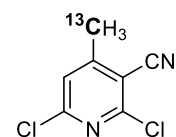
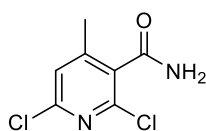
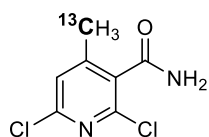
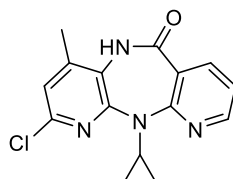
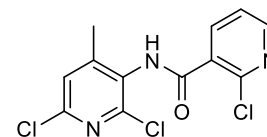
12-(^{13}C)mesyloxy-Névirapine was applied in acetone / DMSO (9 / 1, 0.4 M, 30 μ L).

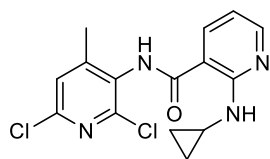
1H - ^{13}C HSQC experiment showed eight new correlations.



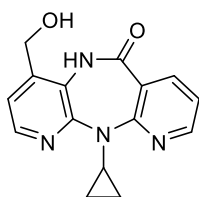


Formulaire des molécules caractérisées

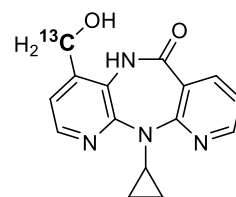
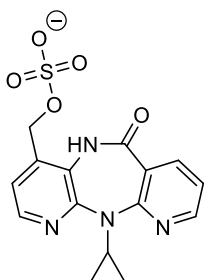
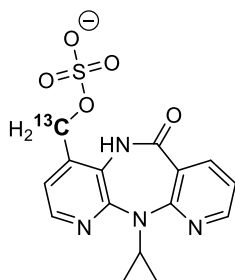
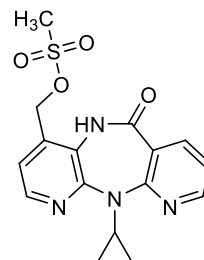
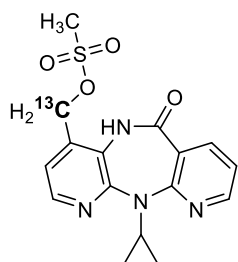
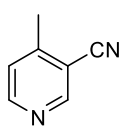
Névirapine **1**12-(¹³C)Névirapine
12-(¹³C)**1**CAPIC **6**4-(¹³C)CAPIC
4-(¹³C)**6****7****8**4-(¹³C)**8****9****13**4-(¹³C)**13****14**4-(¹³C)**14****17****21****26**Acétoacétate d'éthyle
274-(¹³C)Acétoacétate d'éthyle
4-(¹³C)**27****28**4-(¹³C)**28****29**4-(¹³C)**29****30**4-(¹³C)**30**2-chloro-Névirapine **33****34**



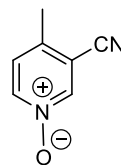
35



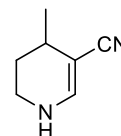
12-OH-Névirapine 37

12-(¹³C)OH-Névirapine
12-(¹³C)3712-OH-Névirapine sulfate
3812-(¹³C)OH-Névirapine sulfate
12-(¹³C)3812-OMs-Névirapine
3912-(¹³C)OMs-Névirapine
12-(¹³C)39

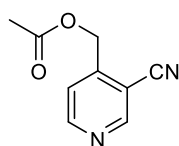
42



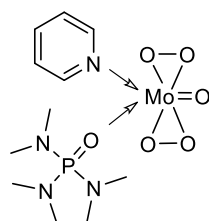
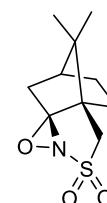
43



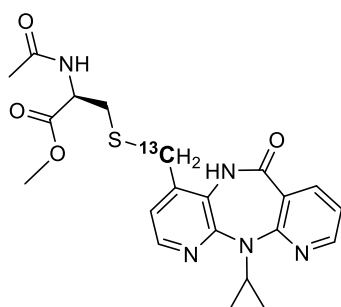
44



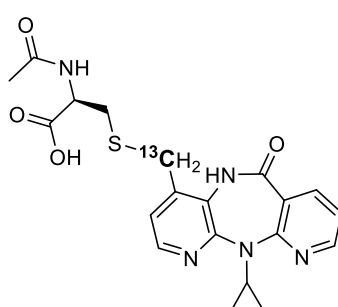
45

MoO₃.pyridine.HMPA
MoOPH
57

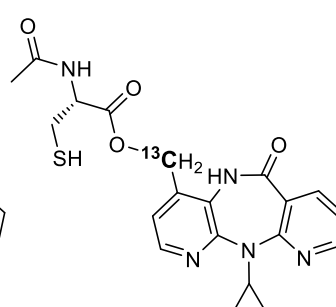
58



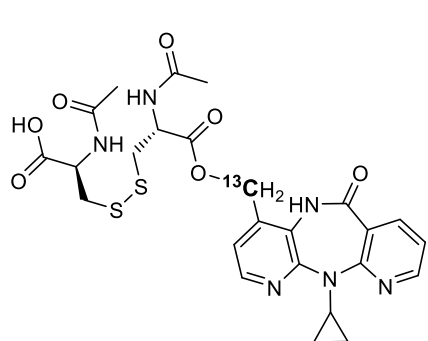
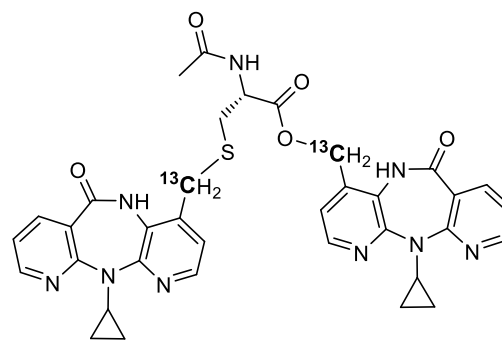
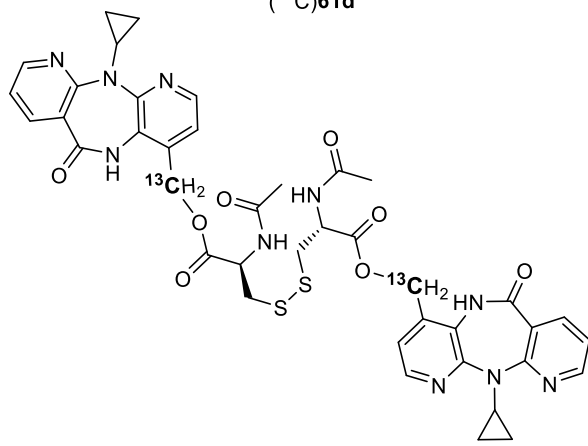
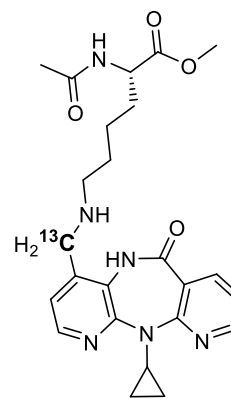
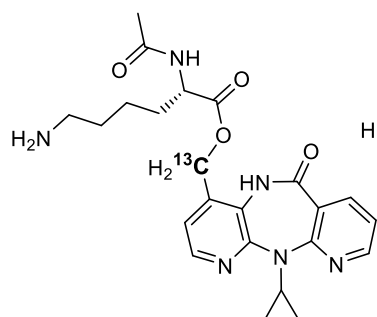
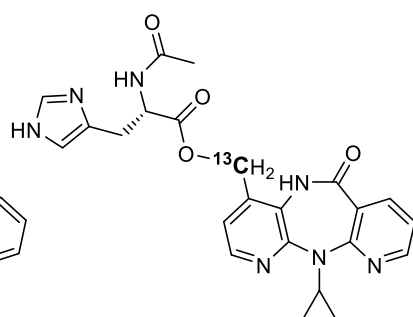
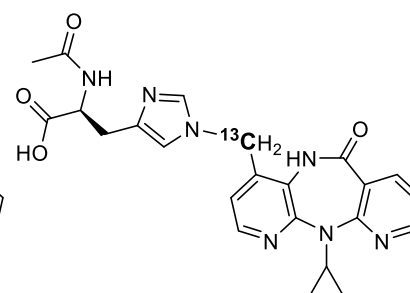
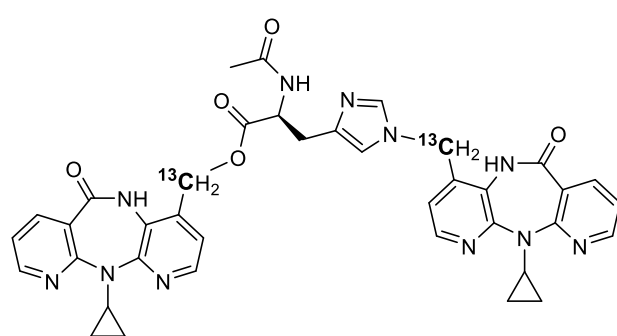
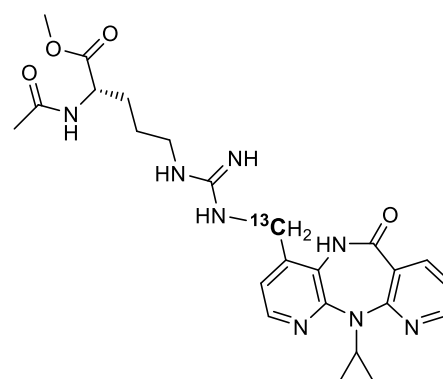
(13C)61a

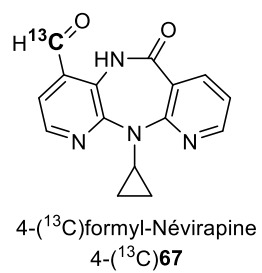
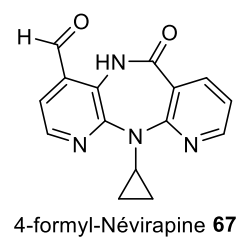
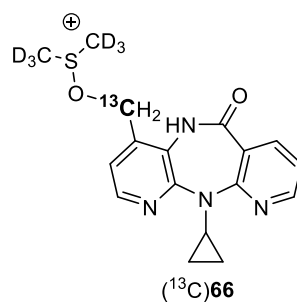
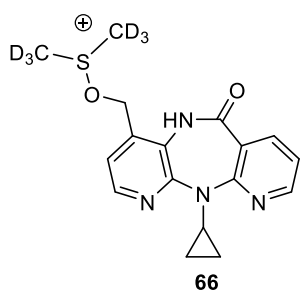
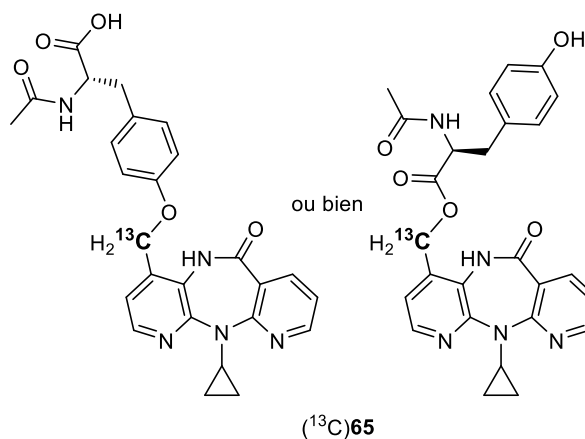
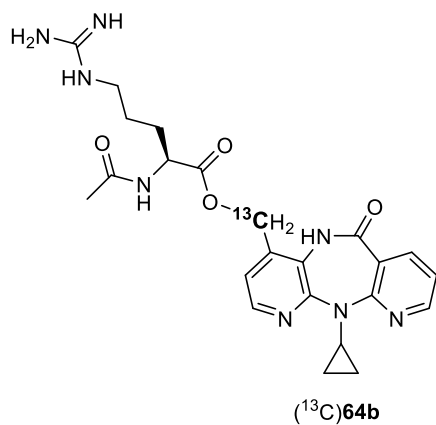


(13C)61b



(13C)61c

**(¹³C)61d****(¹³C)61e****(¹³C)61f****(¹³C)62a****(¹³C)62b****(¹³C)63a****(¹³C)63b****(¹³C)63c****(¹³C)64a**



Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] Bénard-Larivière, A.; Miremont-Salamé, G.; Pérault-Pochat, M.-C.; Noize, P.; Haramburu, F.; EMIR Study Group on behalf of the French network of pharmacovigilance centres. Incidence of hospital admissions due to adverse drug reactions in France: the EMIR study. *Fund. Clin. Pharmacol.* **2015**, *29*, 106–111.
- [2] Barbaud, A. Prise en charge globale des toxidermies. *Ann Dermatol Venereol* **2007**, *134*, 391–401.
- [3] Uetrecht, J.; Naisbitt, D.J. Idiosyncratic adverse drug reactions: current concepts. *Pharmacol. Rev.* **2013**, *65*, 779–808.
- [4] Elbayed, K.; Berl, V.; Debeuckelaere, C.; Moussallieh, F.-M.; Piotta, M.; Namer, I.-J.; Lepoittevin, J.-P. HR-MAS NMR spectroscopy of reconstructed human epidermis: potential for the *in situ* investigation of the chemical interactions between skin allergens and nucleophilic amino acids. *Chem. Res. Toxicol.* **2013**, *26*, 136–145.
- [5] Debeuckelaere, C.; Moussallieh, F.-M.; Elbayed, K.; Namer, I.-J.; Berl, V.; Giménez-Arnau, E.; Lepoittevin, J.-P. *In situ* chemical behaviour of methylisothiazolinone (MI) and methylchloroisothiazolinone (MCI) in reconstructed human epidermis: a new approach to the cross-reactivity issue. *Contact Dermatitis* **2016**, *74*, 159–167.
- [6] Moss, E.; Debeuckelaere, C.; Berl, V.; Elbayed, K.; Moussallieh, F.-M.; Namer, I.-J.; Lepoittevin, J.-P. *In situ* metabolism of cinnamyl alcohol in reconstructed human epidermis: new insights into the activation of this fragrance skin sensitizer. *Chem. Res. Toxicol.* **2016**, *29*, 1172–1178.
- [7] Mockenhaupt, M. The current understanding of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **2011**, *7*, 803–813.
- [8] Bensouilah, J.; Buck, P. Skin structure and fonction. In *Aromadermatology: aromatherapy in the treatment and care of common skin conditions*; Bensouilah, J., Buck, P. (Eds) Radcliffe Publishing, 2006; 1–11.
- [9] Dréno, B. Anatomie et physiologie de la peau et de ses annexes. *Ann. Dermatol. Venereol.* **2009**, *136*, S247–S251.
- [10] CNRS. Dossier SagaScience - Chimie et Beauté.
<http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/doschim/imgArt/peau/derme01.html>
- [11] Prost-Squarcioni, C.; Heller, M.; Fraitag, S. Histologie et histophysiologie de la peau et de ses annexes : Structure de la peau. *Ann. Dermatol. Venereol.* **2005**, *132*, 8S7-8S32.
- [12] Lepoittevin, J.-P. Métabolisme cutané. In *Diagnostic de l'allergie aux médicaments: tests cutanés.*; GERDA, John Libbey Eurotex, Paris, 2005; 31–42.
- [13] Parkinson, A.; Ogilvie, B.W. Biotransformation of xenobiotics. In *Casarett & Doull's Toxicology: the basic science of poisons, Seventh Edition*; Klaassen, C.D. (Ed.) McGraw Hill Professional, New York Chicago San Francisco Lisbon London Madrid Mexico City New Delhi San Juan Seoul Singapore Sydney Toronto, 2008; 161–304.
- [14] Mukhtar, H.; Khan, W.A. Cutaneous cytochrome P-450. *Drug Metab. Rev.* **1989**, *20*, 657–673.
- [15] Janmohamed, A.; Dolphin, C.T.; Phillips, I.R.; Shephard, E.A. Quantification and cellular localization of expression in human skin of genes encoding flavin-containing monooxygenases and cytochromes P450. *Biochem. Pharmacol.* **2001**, *62*, 777–786.
- [16] Oesch, F.; Fabian, E.; Guth, K.; Landsiedel, R. Xenobiotic-metabolizing enzymes in the skin of rat, mouse, pig, guinea pig, man, and in human skin models. *Arch. Toxicol.* **2014**, *88*, 2135–2190.

- [17] Anzenbacher, P.; Anzenbacherová, E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 737–747.
- [18] Van Pelt, F.N.A.M.; Olde Meierink, Y.J.M.; Blaauboer, B.J.; Weterings, P.J.J.M. Immunohistochemical detection of cytochrome P450 isoenzymes in cultured human epidermal cells. *J. Histochem. Cytochem.* **1990**, *38*, 1847–1851.
- [19] Krueger, S.K.; Williams, D.E. Mammalian flavin-containing monooxygenases: structure/function, genetic polymorphisms and role in drug metabolism. *Pharmacol. Ther.* **2005**, *106*, 357–387.
- [20] Oesch, F.; Fabian, E.; Oesch-Bartlomowicz, B.; Werner, C.; Landsiedel, R. Drug-metabolizing enzymes in the skin of man, rat, and pig. *Drug Metab. Rev.* **2007**, *39*, 659–698.
- [21] Cheung, C.; Smith, C.K.; Hoog, J.-O.; Hotchkiss, S.A. Expression and localization of human alcohol and aldehyde dehydrogenase enzymes in skin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *261*, 100–107.
- [22] Shih, J.C.; Chen, K.; Ridd, M.J. Monoamine oxidase: from genes to behavior. *Annu. Rev. Neurosci.* **1999**, *22*, 197–217.
- [23] Davies, M.J.; Hawkins, C.L.; Pattison, D.I.; Rees, M.D. Mammalian heme peroxidases: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid. Redox Signal.* **2008**, *10*, 1199–1234.
- [24] Pillai, O.; Hamad, M.O.; Crooks, P.A.; Stinchcomb, A.L. Physicochemical evaluation, *in vitro* human skin diffusion, and concurrent biotransformation of 3-O-alkyl carbonate prodrugs of naltrexone. *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 1146–1152.
- [25] Rittirod, T.; Hatanaka, T.; Uraki, A.; Hino, K.; Katayama, K.; Koizumi, T. Species difference in simultaneous transport and metabolism of ethyl nicotinate in skin. *Int. J. Pharm.* **1999**, *178*, 161–169.
- [26] Levine, W.G. Metabolism of azo dyes: implication for detoxication and activation. *Drug Metab. Rev.* **1991**, *23*, 253–309.
- [27] Merk, H.F. Skin metabolism. In *Allergic contact dermatitis: the molecular basis*; Lepoittevin, J.-P., Basketter, D.A., Goossens, A., Karlberg, A.-T. (Eds.) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1997; 68–80.
- [28] Tukey, R.H.; Strassburg, C.P. Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2000**, *40*, 581–616.
- [29] Moss, T.; Howes, D.; Williams, F.M. Percutaneous penetration and dermal metabolism of triclosan (2,4, 4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether). *Food Chem. Toxicol.* **2000**, *38*, 361–370.
- [30] Kawakubo, Y.; Merk, H.F.; Masaoudi, T.A.; Sieben, S.; Blömeke, B. *N*-Acetylation of paraphenylenediamine in human skin and keratinocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *292*, 150–155.
- [31] Coughtrie, M.W.H.; Sharp, S.; Maxwell, K.; Innes, N.P. Biology and function of the reversible sulfation pathway catalysed by human sulfotransferases and sulfatases. *Chem. Biol. Interact.* **1998**, *109*, 3–27.
- [32] Jetten, A.M.; George, M.A.; Nervi, C.; Boone, L.R.; Rearick, J.I. Increased cholesterol sulfate and cholesterol sulfotransferase activity in relation to the multi-step process of differentiation in human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **1989**, *92*, 203–209.
- [33] Anderson, R.J.; Kudlacek, P.E.; Clemens, D.L. Sulfation of minoxidil by multiple human cytosolic sulfotransferases. *Chem. Biol. Interact.* **1998**, *109*, 53–67.
- [34] Lepoittevin, J.-P. Les bases chimiques de l'allergie de contact. *Rev. Fr. Allergol.* **2011**, *51*, 208–211.

- [35] Berard, F.; Marty, J.-P.; Nicolas, J.-F. Allergen penetration through the skin. *Eur. J. Dermatol.* **2003**, *13*, 324–330.
- [36] Thyssen, J.P.; Menné, T. Metal allergy - a review on exposures, penetration, genetics, prevalence, and clinical implications. *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23*, 309–318.
- [37] Divkovic, M.; Pease, C.K.; Gerberick, G.F.; Basketter, D.A. Hapten-protein binding: from theory to practical application in the *in vitro* prediction of skin sensitization. *Contact Dermatitis* **2005**, *53*, 189–200.
- [38] 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.
- [39] Lepoittevin, J.-P. Metabolism *versus* chemical transformation or pro- *versus* prehaptens? *Contact Dermatitis* **2006**, *54*, 73–74.
- [40] Lepoittevin, J.-P. Molecular aspects of allergic contact dermatitis. In *Contact Dermatitis, Fifth Edition*; Johansen, J.D., Frosch, P.J., Lepoittevin, J.-P. (Eds.) Springer, Heidelberg Dordrecht London New York, 2011; 91–110.
- [41] Naisbitt, D.J.; Hough, S.J.; Gill, H.J.; Pirmohamed, M.; Kitteringham, N.R.; Park, B.K. Cellular disposition of sulphamethoxazole and its metabolites: implications for hypersensitivity. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *126*, 1393–1407.
- [42] Bhaiya, P.; Roychowdhury, S.; Vyas, P.M.; Doll, M.A.; Hein, D.W.; Svensson, C.K. Bioactivation, protein haptentation, and toxicity of sulfamethoxazole and dapsone in normal human dermal fibroblasts. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2006**, *215*, 158–167.
- [43] Wolkenstein, P.; Carrière, V.; Charue, D.; Bastuji-Garin, S.; Revuz, J.; Roujeau, J.C.; Beaune, P.; Bagot, M. A slow acetylator genotype is a risk factor for sulphonamide-induced toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome. *Pharmacogenetics* **1995**, *5*, 255–258.
- [44] Coombs, R.R.A.; Gell, P.G.H. Classification of allergic reaction for clinical hypersensitivity disease. In *Clinical aspects of immunology*; Gell, P.G.H., Coombs, R.R.A., Lachman, P.J. (Eds) Oxford Blackwell Scientific, London, 1975; 761–781.
- [45] Thyssen, J.P.; Linneberg, A.; Menné, T.; Duus Johansen, J. The epidemiology of contact allergy in the general population-prevalence and main findings. *Contact Dermatitis* **2007**, *57*, 287–299.
- [46] González-Muñoz, P.; Conde-Salazar, L.; Vañó-Galván, S. Allergic contact dermatitis caused by cosmetic products. *Actas Dermosifiliogr.* **2014**, *105*, 822–832.
- [47] Rawlins, M.D.; Thompson, J.W. Pathogenesis of adverse drug reactions. In *Textbook of adverse drug reactions, First Edition*; Davies D.M. (Ed) Oxford University Press, 1977; 10–31.
- [48] Edwards, I.R.; Aronson, J.K. Adverse drug reactions: definitions, diagnosis, and management. *Lancet* **2000**, *356*, 1255–1259.
- [49] Roujeau, J.C.; Stern, R.S. Severe adverse cutaneous reactions to drugs. *N. Engl. J. Med.* **1994**, *331*, 1272–1285.
- [50] Uetrecht, J. Idiosyncratic drug reactions: current understanding. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2007**, *47*, 513–539.
- [51] Doutre, M.-S. Le système immunitaire cutané. *Ann. Dermatol. Venereol.* **2009**, *136*, S257–S262.
- [52] Elbe-Bürger, A.; Stingl, G. Rôle des cellules dendritiques dans l'immunité. Utilisation clinique possible. *Ann. Dermatol. Venereol.* **2004**, *131*, 93–103.

- [53] Lanzavecchia, A. Mechanisms of antigen uptake for presentation. *Curr. Opin. Immunol.* **1996**, *8*, 348–354.
- [54] Authier, F.; Posner, B.I.; Bergeron, J.J.M. Endosomal proteolysis of internalized proteins. *FEBS Lett.* **1996**, *389*, 55–60.
- [55] Cumberbatch, M.; Dearman, R.J.; Griffiths, C.E.M.; Kimber, I. Langerhans cell migration. *Clin. Exp. Dermatol.* **2000**, *25*, 413–418.
- [56] Sallusto, F.; Geginat, J.; Lanzavecchia, A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* **2004**, *22*, 745–763.
- [57] Grabbe, S.; Schwarz, T. Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Am. J. Contact Dermat.* **1996**, *7*, 238–246.
- [58] Matzinger, P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* **1994**, *12*, 991–1045.
- [59] Zanni, M.P.; Greyerz, S. von; Schnyder, B.; Brander, K.A.; Frutig, K.; Hari, Y.; Valitutti, S.; Pichler, W.J. HLA-restricted, processing- and metabolism-independent pathway of drug recognition by human *alpha beta* T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* **1998**, *102*, 1591–1598.
- [60] Pichler, W.J. Pharmacological interaction of drugs with antigen-specific immune receptors: the p-i concept. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **2002**, *2*, 301–305.
- [61] Drugs@FDA: FDA Approved Drug Products.
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&AppNo=020636>
- [62] Guay, L.A.; Musoke, P.; Fleming, T.; Bagenda, D.; Allen, M.; Nakabiito, C.; Sherman, J.; Bakaki, P.; Ducar, C.; Deseyve, M.; Emel, L.; Mirochnick, M.; Fowler, M.G.; Mofenson, L.; Miotti, P.; Dransfield, K.; Bray, D.; Mmiro, F.; Jackson, J.B. Intrapartum and neonatal single-dose nevirapine compared with zidovudine for prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 in Kampala, Uganda: HIVNET 012 randomised trial. *Lancet* **1999**, *354*, 795–802.
- [63] Pollard, R.B.; Robinson, P.; Dransfield, K. Safety profile of nevirapine, a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor for the treatment of human immunodeficiency virus infection. *Clin. Ther.* **1998**, *20*, 1071–1092.
- [64] U.S. Food & Drug Administration. Safety alerts for human medical products - Viramune (nevirapine).
<http://wayback.archive-it.org/7993/20170113165324/http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/SafetyAlertsforHumanMedicalProducts/ucm175766.htm>
- [65] European Medicines Agency. Public statement on Viramune (nevirapine) - Severe and life-threatening cutaneous and hepatic reactions.
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2010/08/news_detail_01096.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1
- [66] Riska, P.S.; Joseph, D.P.; Dinallo, R.M.; Davidson, W.C.; Keirns, J.J.; Hattox, S.E. Biotransformation of nevirapine, a non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitor, in mice, rats, rabbits, dogs, monkeys, and chimpanzees. *Drug Metab. Dispos.* **1999**, *27*, 1434–1447.
- [67] Riska, P.; Lamson, M.; MacGregor, T.; Sabo, J.; Hattox, S.; Pav, J.; Keirns, J. Disposition and biotransformation of the antiretroviral drug nevirapine in humans. *Drug Metab. Dispos.* **1999**, *27*, 895–901.

- [68] Erickson, D.A.; Mather, G.; Trager, W.F.; Levy, R.H.; Keirns, J.J. Characterization of the *in vitro* biotransformation of the HIV-1 reverse transcriptase inhibitor nevirapine by human hepatic cytochromes P-450. *Drug Metab. Dispos.* **1999**, *27*, 1488–1495.
- [69] Uetrecht, J. Immune-mediated adverse drug reactions. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 24–34.
- [70] Takakusa, H.; Masumoto, H.; Yukinaga, H.; Makino, C.; Nakayama, S.; Okazaki, O.; Sudo, K. Covalent binding and tissue distribution/retention assessment of drugs associated with idiosyncratic drug toxicity. *Drug Metab. Dispos.* **2008**, *36*, 1770–1779.
- [71] Srivastava, A.; Lian, L.-Y.; Maggs, J.L.; Chaponda, M.; Pirmohamed, M.; Williams, D.P.; Park, B.K. Quantifying the metabolic activation of nevirapine in patients by integrated applications of NMR and mass spectrometries. *Drug Metab. Dispos.* **2010**, *38*, 122–132.
- [72] Caixas, U.; Antunes, A.M.M.; Marinho, A.T.; Godinho, A.L.A.; Grilo, N.M.; Marques, M.M.; Oliveira, M.C.; Branco, T.; Monteiro, E.C.; Pereira, S.A. Evidence for nevirapine bioactivation in man: searching for the first step in the mechanism of nevirapine toxicity. *Toxicology* **2012**, *301*, 33–39.
- [73] Claes, P.; Wintzen, M.; Allard, S.; Simons, P.; De Coninck, A.; Lacor, P. Nevirapine-induced toxic epidermal necrolysis and toxic hepatitis treated successfully with a combination of intravenous immunoglobulins and *N*-acetylcysteine. *Eur. J. Intern. Med.* **2004**, *15*, 255–258.
- [74] Kalgutkar, A.S.; Gardner, I.; Obach, R.S.; Shaffer, C.L.; Callegari, E.; Henne, K.R.; Mutlib, A.E.; Dalvie, D.K.; Lee, J.S.; Nakai, Y.; O'Donnell, J.P.; Boer, J.; Harriman, S.P. A comprehensive listing of bioactivation pathways of organic functional groups. *Curr. Drug Metab.* **2005**, *6*, 161–225.
- [75] Li, D.; Wang, Y.; Yang, C.; Han, K. Theoretical study of *N*-dealkylation of *N*-cyclopropyl-*N*-methylaniline catalyzed by cytochrome P450: insight into the origin of the regioselectivity. *Dalton Trans.* **2009**, 291–297.
- [76] Shaffer, C.L.; Morton, M.D.; Hanzlik, R.P. *N*-dealkylation of an *N*-cyclopropylamine by horseradish peroxidase. Fate of the cyclopropyl group. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8502–8508.
- [77] Vazquez, M.L.; Silverman, R.B. Revised mechanism for inactivation of mitochondrial monoamine oxidase by *N*-cyclopropylbenzylamine. *Biochemistry (Mosc.)* **1985**, *24*, 6538–6543.
- [78] Silverman, R.B. Effect of α -methylation on inactivation of monoamine oxidase by *N*-cyclopropylbenzylamine. *Biochemistry (Mosc.)* **1984**, *23*, 5206–5213.
- [79] Chen, J.; Mannargudi, B.M.; Xu, L.; Uetrecht, J. Demonstration of the metabolic pathway responsible for nevirapine-induced skin rash. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 1862–1870.
- [80] Antunes, A.M.M.; Novais, D.A.; Da Silva, J.L.F.; Santos, P.P.; Oliveira, M.C.; Beland, F.A.; Marques, M.M. Synthesis and oxidation of 2-hydroxynevirapine, a metabolite of the HIV reverse transcriptase inhibitor nevirapine. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 7822–7835.
- [81] Harjivan, S.G.; Pinheiro, P.F.; Martins, I.L.; Godinho, A.L.; Wanke, R.; Santos, P.P.; Pereira, S.A.; Beland, F.A.; Marques, M.M.; Antunes, A.M.M. Quinoid derivatives of the nevirapine metabolites 2-hydroxy- and 3-hydroxy-nevirapine: activation pathway to amino acid adducts. *Toxicol. Res.* **2015**, *4*, 1565–1577.
- [82] Spahn-Langguth, H.; Benet, L.Z. Acyl glucuronides revisited: is the glucuronidation process a toxification as well as a detoxification mechanism? *Drug Metab. Rev.* **1992**, *24*, 5–48.
- [83] Sharma, A.M.; Novalen, M.; Tanino, T.; Uetrecht, J.P. 12-OH-nevirapine sulfate, formed in the skin, is responsible for nevirapine-induced skin rash. *Chem. Res. Toxicol.* **2013**, *26*, 817–827.
- [84] Sharma, A.M.; Klarskov, K.; Uetrecht, J. Nevirapine bioactivation and covalent binding in the skin. *Chem. Res. Toxicol.* **2013**, *26*, 410–421.

- [85] Rheinwald, J.G.; Green, H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* **1975**, *6*, 331–344.
- [86] Dumez, J.-N. La cristallographie par RMN. *Actual. Chim.* **2012**, *364–365*, 90–96.
- [87] Meschkat, E.; Barratt, M.D.; Lepoittevin, J. Studies of the chemical selectivity of hapten, reactivity, and skin sensitization potency. 2. NMR studies of the covalent binding of the ¹³C-labeled skin sensitizers 2-[¹³C]- and 3-[¹³C]hex-1-ene- and 3-[¹³C]hexane-1,3-sultones to human serum albumin. *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14*, 118–126.
- [88] Eilstein, J.; Giménez-Arnau, E.; Duché, D.; Rousset, F.; Lepoittevin, J.-P. Synthesis and reactivity toward nucleophilic amino acids of 2,5-[¹³C]-dimethyl-p-benzoquinonediimine. *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, *19*, 1248–1256.
- [89] Altman, L.K. Rare cancer seen in 41 homosexuals. *The New York Times*. , July 3, 1981. .
- [90] Bouharb, F.; Glatt, A.E.; Squires, K.; Miller, C.T.; Marais, S.; Meintjes, G.; Ogedegbe, A.; Glesby, M.J.; Baranoski, A.S.; Jacobson, J.M. Part XII. HIV. In *Clinical Infectious Disease, Second Edition*; Schlossberg, D. (Ed.) Cambridge University Press, 2015; 638–697.
- [91] VIH et sida. <https://www.inserm.fr/thematiques/immunologie-inflammation-infectiologie-et-microbiologie/dossiers-d-information/vih-et-sida> .
- [92] Mitsuya, H.; Weinhold, K.J.; Furman, P.A.; St Clair, M.H.; Lehrman, S.N.; Gallo, R.C.; Bolognesi, D.; Barry, D.W.; Broder, S. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1985**, *82*, 7096–7100.
- [93] Hargrave, K.D.; Proudfoot, J.R.; Grozinger, K.G.; Cullen, E.; Kapadia, S.R.; Patel, U.R.; Fuchs, V.U.; Mauldin, S.C.; Vitous, J.; Behnke, M.L.; Klunder, J.M.; Pal, K.; Skiles, J.W.; McNeil, D.W.; Rose, J.M.; Chow, G.C.; Skoog, M.T.; Wu, J.C.; Schmidt, G.; Engel, W.W.; Eberlein, W.G.; Saboe, T.D.; Campbell, S.J.; Rosenthal, A.S.; Adams, J. Novel non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. 1. Tricyclic pyridobenzo- and dipyridodiazepinones. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2231–2241.
- [94] Burton, A.G.; Halls, P.J.; Katritzky, A.R. The selective 3- and 5-nitration of 2-pyridones. *Tetrahedron Lett.* **1971**, *12*, 2211–2212.
- [95] Grozinger, K.G.; Fuchs, V.; Hargrave, K.D.; Mauldin, S.; Vitous, J.; Campbell, S.; Adams, J. Synthesis of nevirapine and its major metabolite. *J. Heterocycl. Chem.* **1995**, *32*, 259–263.
- [96] Hargrave, K.D.; Proudfoot, J.R.; Adams, J.; Grozinger, K.G.; Gunther, S.; Engel, W.; Trummelitz, G.; Eberlein, W. 5,11-dihydro-6H-dipyrido(3,2-b:2',3'-e)(1,4)diazepines and their use in the prevention or treatment of HIV infection. US patent 5366972, 24 pages. 1994.
- [97] Schneider, H. Method for preparing 3-amino-2-chloro-4-alkylpyridine or-4-arylpyridine. US patent 5686618, 4 pages. 1997.
- [98] Boswell, R.F.; Gupton, B.F.; Lo, Y.S. Method for making nevirapine. US patent 6680383, 7 pages. 2004.
- [99] Ge, X.; Chen, H.-G.; Cao, C.-H.; Liu, J.-Q.; Qian, C.; Chen, X.-Z. A concise synthesis of 2-chloro-3-amino-4-methylpyridine. *Res. Chem. Intermed.* **2011**, *37*, 599–604.
- [100] Zhao, Q.; Chen, H.-G.; Qian, C.; Chen, X.-Z. Improved synthesis of 2-chloro-3-amino-4-methylpyridine. *J. Heterocycl. Chem.* **2013**, *50*, 145–148.
- [101] Nahm, S.; Weinreb, S.M. *N*-methoxy-*N*-methylamides as effective acylating agents. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 3815–3818.

- [102] Greshock, T.J.; Johns, D.M.; Noguchi, Y.; Williams, R.M. Improved total synthesis of the potent HDAC inhibitor FK228 (FR-901228). *Org. Lett.* **2008**, *10*, 613–616.
- [103] Nugiel, D.A.; Jacobs, K.; Worley, T.; Patel, M.; Kaltenbach, R.F.; Meyer, D.T.; Jadhav, P.K.; De Lucca, G.V.; Smyser, T.E.; Klabe, R.M.; Bacheler, L.T.; Rayner, M.M.; Seitz, S.P. Preparation and structure–activity relationship of novel P1/P1'-substituted cyclic urea-based human immunodeficiency virus type-1 protease inhibitors. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 2156–2169.
- [104] Fischer, C.B.; Polborn, K.; Steininger, H.; Zipse, H. Synthesis and solid-state structures of alkyl-substituted 3-cyano-2-pyridones. *Z Naturforsch B* **2004**, *59b*, 1121–1131.
- [105] Kim, M.S.; Ryu, H.; Kang, D.W.; Cho, S.-H.; Seo, S.; Park, Y.S.; Kim, M.-Y.; Kwak, E.J.; Kim, Y.S.; Bhondwe, R.S.; Kim, H.S.; Park, S.; Son, K.; Choi, S.; DeAndrea-Lazarus, I.A.; Pearce, L.V.; Blumberg, P.M.; Frank, R.; Bahrenberg, G.; Stockhausen, H.; Kögel, B.Y.; Schiene, K.; Christoph, T.; Lee, J. 2-(3-Fluoro-4-methylsulfonylamino-phenyl)propanamides as potent transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) antagonists: structure–activity relationships of 2-amino derivatives in the *N*-(6-trifluoromethylpyridin-3-ylmethyl) C-region. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 8392–8408.
- [106] Claisen, L.; Claparède, A. Condensationen von Ketonen mit Aldehyden. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1881**, *14*, 2460–2468.
- [107] Inglis, J.K.; Roberts, K.C. Ethyl acetoacetate. *Org. Synth.* **1926**, *6*, 36.
- [108] McElvain, S.M. Some observations on the acetoacetic ester condensation. *J. Am. Chem. Soc.* **1929**, *51*, 3124–3130.
- [109] Yoshizawa, K.; Toyota, S.; Toda, F. Solvent-free Claisen and Cannizzaro reactions. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7983–7985.
- [110] Shin, H.; Choi, B.S.; Lee, K.K.; Choi, H.-W.; Chang, J.H.; Kyu Woong Lee; Do Hyun Nam; No-Soo Kim. Efficient activation of zinc: application of the Blaise reaction to an expedient synthesis of a statin Intermediate. *Synthesis* **2004**, 2629–2632.
- [111] Rao, H.S.P.; Padmavathy, K.; Vasantham, K.; Rafi, S. Novel synthesis of methyl ketones based on the Blaise reaction. *Synth. Commun.* **2009**, *39*, 1825–1834.
- [112] Pollet, P.L. 3-Ketoesters by malonic synthesis. *J. Chem. Educ.* **1983**, *60*, 244.
- [113] Ireland, R.E.; Marshall, J.A. A new synthetic method for the preparation of α -substituted β -ketoesters. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 2907–2908.
- [114] Brooks, D.W.; Lu, L.D.-L.; Masamune, S. *C*-Acylation under virtually neutral conditions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1979**, *18*, 72–74.
- [115] Matsuo, K.; Kitaguchi, I.; Takata, Y.; Tanaka, K. Structure-activity relationships in tetramic acids and their copper (II) complexes. *Chem. Pharm. Bull.* **1980**, *28*, 2494–2502.
- [116] Wirtz, L.; Kazmaier, U. A mild titanium-catalyzed synthesis of functionalized amino coumarins as fluorescence labels. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011*, 7062–7065.
- [117] Carey, J.S.; Laffan, D.; Thomson, C.; Williams, M.T. Analysis of the reactions used for the preparation of drug candidate molecules. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2337–2347.
- [118] Hantzsch, A. Ueber die Synthese pyridinartiger Verbindungen aus Acetessigäther und Aldehydammoniak. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1882**, *215*, 1–82.
- [119] Zhou, K.; Wang, X.-M.; Zhao, Y.-Z.; Cao, Y.-X.; Fu, Q.; Zhang, S.-Q. Synthesis and antihypertensive activity evaluation in spontaneously hypertensive rats of nitrendipine analogues. *Med. Chem. Res.* **2011**, *20*, 1325–1330.

- [120] Ghosh, P.P.; Mukherjee, P.; Das, A.R. Triton-X-100 catalyzed synthesis of 1,4-dihydropyridines and their aromatization to pyridines and a new one pot synthesis of pyridines using visible light in aqueous media. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 8220–8226.
- [121] Baraldi, P.T.; Noël, T.; Wang, Q.; Hessel, V. The accelerated preparation of 1,4-dihydropyridines using microflow reactors. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 2090–2092.
- [122] Zheng, C.; You, S.-L. Transfer hydrogenation with Hantzsch esters and related organic hydride donors. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2498–2518.
- [123] Basetti, V.; Palapati, R.; Hosahalli, S.; Potluri, V. A facile synthesis of tetracyclic benzo-pyridonaphthyridines by domino reaction. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 2014–2017.
- [124] Mijin, D.; Marinković, A. Synthesis of *N*-substituted 4,6-dimethyl-3-cyano-2-pyridones under microwave irradiation. *Synth. Commun.* **2006**, *36*, 193–198.
- [125] Blomberg, D.; Brickmann, K.; Kihlberg, J. Synthesis of a β -strand mimetic based on a pyridine scaffold. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 10937–10944.
- [126] Strayer, T.A.; Culy, C.C.; Bunner, M.H.; Frank, A.R.; Albinak, P.A. *In situ* synthesis of 2-allyloxy-1-methylpyridinium triflate for the allylation of carboxylic acids. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 6807–6809.
- [127] Bhagwat, A.; Campi, E.M.; Potdar, M.K.; Jackson, W.R.; Hearn, M.T.W. Efficient nucleophilic substitution of halopyridines using ethanol as solvent with microwave heating: synthesis of 2-aminoethylsulfanylpyridines. *Green Chem. Lett. Rev.* **2012**, *5*, 595–601.
- [128] Xin, B.; Zhang, Y.; Cheng, K. Phosphine-free cross-coupling reaction of arylboronic acids with carboxylic anhydrides or acyl chlorides in aqueous media. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 5725–5731.
- [129] Phuan, P.-W.; Kozlowski, M.C. Convenient preparation of naphthyridines from halopyridines: sequential Heck coupling and cyclization. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 3963–3965.
- [130] Heller, M.; Schubert, U.S. Multi-functionalized 2,2':6',2''-terpyridines. *Synlett* **2002**, 751–754.
- [131] Usuki, T.; Yanuma, H.; Hayashi, T.; Yamada, H.; Suzuki, N.; Masuyama, Y. Improved Negishi cross-coupling reactions of an organozinc reagent derived from *L*-aspartic acid with monohalopyridines. *J. Heterocycl. Chem.* **2014**, *51*(1), 269–273.
- [132] Purificação, S.I.; Pires, M.J.D.; Rippel, R.; Santos, A.S.; Marques, M.M.B. One-pot synthesis of 1,2-disubstituted 4-, 5-, 6-, and 7-azaindoles from amino-*o*-halopyridines via *N*-arylation/Sonogashira/cyclization reaction. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 5118–5121.
- [133] Youngdale, G.A.; Oglia, T.F. 1,2-Dihydro-2-oxo-6-(2,2-dimethylpropyl)-3-pyridinecarboxylic acid, analogs, and derivatives. A new class of oral hypoglycemic agents. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 1790–1796.
- [134] Ming Yu; Jian Zhang; Yingcai Wang; Jiang Zhu; Frank Kayser; Julio C. Medina; Karen Siegler; Marion Conn; Bei Shan; Mark P. Grillo; Peter Coward; Jiwen Liu. Discovery and optimization of *N*-(3-(1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-pyrrolo[3,4-c]pyridin-4-yloxy)phenyl)benzenesulfonamides as novel GPR119 agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 156–160.
- [135] Kiselev, E.; Agama, K.; Pommier, Y.; Cushman, M. Azaindenoisoquinolines as topoisomerase I inhibitors and potential anticancer agents: a systematic study of structure–activity relationships. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 1682–1697.
- [136] Anwer, M.K.; Spatola, A.F. Applications of ammonium formate catalytic transfer hydrogenolysis - IV¹: a facile method for dehalogenation of aromatic chlorocarbons. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 1381–1384.

- [137] Modak, A.; Maiti, D. Metal catalyzed defunctionalization reactions. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 21–35.
- [138] Bakke, J.M.; Riha, J. Preparation of 4-substituted 3-amino-2-chloropyridines, synthesis of a nevirapine analogue. *J. Heterocycl. Chem.* **2001**, *38*, 99–104.
- [139] Gharpure, M.M.; Bhawal, B.M.; Govenkar, M.B.; Rane, D.R.; Mehta, S.R. An improved process for industrial manufacture of Nevirapine. Patent WO2007010352, 36 pages. 2007.
- [140] Gant, T.G.; Sarshar, S. Preparation and utility of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. Patent WO2008103899, 113 pages. 2008.
- [141] Chava, S.; Gorantla, S.R.; Indukuri, V.S.K.; Simhadri, S.; Mohammed, Y. A Process for Preparation of Nevirapine. Patent WO2012168949, 19 pages. 2012.
- [142] Simoneau, B. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. Patent WO0196338, 76 pages. 2001.
- [143] Monge, A.; Martinez-Merino, V.; Fernández-Alvarez, E. Synthesis of pyrido[2,3-d]pyrimidin-4-one derivatives. *J. Heterocycl. Chem.* **1986**, *23*, 509–512.
- [144] Sanapureddy, J.M.R.; Dandala, R.; Meenakshisunderam, S. An improved process for preparing Nevirapine. Patent WO2008142528, 4 pages. 2009.
- [145] Norman, M.H.; Minick, D.J.; Martin, G.E. Structural elucidation of an oxazolo[5,4-b]pyridine: An alternative cyclization product related to nevirapine. *J. Heterocycl. Chem.* **1993**, *30*, 771–779.
- [146] Wollinger, W.; Da Motta Lessa, B.; Da Nobrega, A.B.; Riente, R.R.; Lopes, R.S.C.; Lopes, C.C.; Boechat, N.; Slana, G.B.C.A. Simultaneous determination of assay and related substances in Nevirapine suspension by HPLC. *Chromatographia* **2012**, *75*, 893–901.
- [147] Grozinger, K.G.; Byrne, D.P.; Nummy, L.J.; Ridges, M.D.; Salvagno, A. Synthesis of five nevirapine metabolites. *J. Heterocycl. Chem.* **2000**, *37*, 229–239.
- [148] Li, F.; Frett, B.; Li, H.-Y. Selective reduction of halogenated nitroarenes with hydrazine hydrate in the presence of Pd/C. *Synlett* **2014**, *25*, 1403–1408.
- [149] Meisenheimer, J. Über Pyridin-, Chinolin- und Isochinolin-*N*-oxyd. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1926**, *59*, 1848–1853.
- [150] Shaker, Y. Recent trends in the chemistry of pyridine *N*-oxides. *ARKIVOC* **2001**, 242–268.
- [151] Bull, J.A.; Mousseau, J.J.; Pelletier, G.; Charette, A.B. Synthesis of pyridine and dihydropyridine derivatives by regio- and stereoselective addition to *N*-activated pyridines. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 2642–2713.
- [152] Chen, D.X.; Ho, C.M.; Wu, Q.Y.R.; Wu, P.R.; Wong, F.M.; Wu, W. Convenient oxidation of benzylic and allylic halides to aldehydes and ketones. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 4147–4148.
- [153] Binyamin, I.; Pailloux, S.; Hay, B.P.; Rapko, B.M.; Duesler, E.N.; Paine, R.T. Synthesis of propionamide pyridine and pyridine *N*-oxide ligands. *J. Heterocycl. Chem.* **2007**, *44*, 99–103.
- [154] Liang, L.; Li, Z.; Zhou, X. Pyridine *N*-oxides as ligands in Cu-catalyzed *N*-arylation of imidazoles in water. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3294–3297.
- [155] Kang, L.; Lynch, G.; Lynch, W.; Padgett, C. Manganese(II) chloride complexes with pyridine *N*-oxide (PNO) derivatives and their solid-state structures. *Acta Crystallogr.* **2017**, *73*, 1434–1438.
- [156] Mfuh, A.M.; Larionov, O.V. Heterocyclic *N*-oxides - an emerging class of therapeutic agents. *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22*, 2819–2857.

- [157] Lumeras, W.; Vidal, L.; Vidal, B.; Balagué, C.; Orellana, A.; Maldonado, M.; Domínguez, M.; Segarra, V.; Caturla, F. 1,7-Naphthyridine 1-oxides as novel potent and selective inhibitors of p38 mitogen activated protein kinase. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 7899–7910.
- [158] O'Donnell, G.; Poeschl, R.; Zimhony, O.; Gunaratnam, M.; Moreira, J.B.C.; Neidle, S.; Evangelopoulos, D.; Bhakta, S.; Malkinson, J.P.; Boshoff, H.I.; Lenaerts, A.; Gibbons, S. Bioactive pyridine-*N*-oxide disulfides from *Allium stipitatum*. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 360–365.
- [159] Kokatla, H.P.; Thomson, P.F.; Bae, S.; Doddi, V.R.; Lakshman, M.K. Reduction of amine *N*-oxides by diboron reagents. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 7842–7848.
- [160] Mosher, H.S.; Turner, L.; Carlsmith, A. Pyridine *N*-oxide. *Org. Synth.* **1953**, *33*, 79–81.
- [161] Diemer, V.; Chaumeil, H.; Defoin, A.; Fort, A.; Boeglin, A.; Carré, C. Syntheses of sterically hindered zwitterionic pyridinium phenolates as model compounds in nonlinear optics. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 1767–1776.
- [162] Winkeljohn, W.R.; Vasquez, P.C.; Streckowski, L.; Baumstark, A.L. Oxidation of substituted pyridines by dimethyldioxirane: kinetics and solvent effects. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 8295–8297.
- [163] R. Katritzky, A.; N. Lam, J. Heterocyclic *N*-oxides and *N*-imides. *Heterocycles* **1992**, *33*, 1011–1049.
- [164] Liu, K.; Yao, Z.; Miras, H.N.; Song, Y.-F. Facile immobilization of a Lewis acid polyoxometalate onto layered double hydroxides for highly efficient *N*-oxidation of pyridine-based derivatives and denitrogenation. *ChemCatChem* **2015**, *7*, 3903–3910.
- [165] Nojima, S.; Kamata, K.; Suzuki, K.; Yamaguchi, K.; Mizuno, N. Selective oxidation with aqueous hydrogen peroxide by $[\text{PO}_4\{\text{WO}(\text{O}_2)_2\}_4]^{3-}$ supported on zinc-modified tin dioxide. *ChemCatChem* **2015**, *7*, 1097–1104.
- [166] Li, Q.-F.; Luo, W.; Lu, W.; Wang, Z. Heterogeneous catalytic oxidation of pyridines to *N*-oxides under mild conditions using tungsten-loaded TiO_2 . *React. Kinet. Mech. Catal.* **2016**, *119*, 235–243.
- [167] Si, T.K.; Chowdhury, K.; Mukherjee, M.; Bera, D.C.; Bhattacharyya, R. Homogeneous selective peroxidic oxidation of hydrocarbons using an oxovanadium based catalyst. *J. Mol. Catal. A-Chem.* **2004**, *219*, 241–247.
- [168] Thellend, A.; Battioni, P.; Sanderson, W.; Mansuy, D. Oxidation of *N*-heterocycles by H_2O_2 catalyzed by a Mn-porphyrin: an easy access to *N*-oxides under mild conditions. *Synthesis* **1997**, 1997, 1387–1388.
- [169] Khatri, P.K.; Choudhary, S.; Singh, R.; Jain, S.L.; Khatri, O.P. Grafting of a rhenium-oxo complex on Schiff base functionalized graphene oxide: an efficient catalyst for the oxidation of amines. *Dalton Trans.* **2014**, *43*, 8054–8061.
- [170] Copéret, C.; Adolfsson, H.; Khuong, T.-A.V.; Yudin, A.K.; Sharpless, K.B. A simple and efficient method for the preparation of pyridine *N*-oxides. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1740–1741.
- [171] Chucholowski, A.; Uhlendorf, S. Base catalyzed rearrangement of 5-cyanomethyl-2-isoxazolines; novel pathway for the formation of 2-aminopyridine *N*-oxides. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1949–1952.
- [172] Kim, H.Y.; Kim, S.H.; Nam, G.; Son, H.; Park, T.J.; Lee, S.J.; Kang, J.; Kim, J.H. New efficient synthesis of ethyl 2,3-cycloalkenopyridine-4-carboxylate. *Heterocycles* **1998**, *48*, 1237–1248.
- [173] Pedersen, C.L.; Harrit, N.; Buchardt, O. Pirylium salts and hydroxylamine in acid medium. Synthesis of pyridine *N*-oxides from pyrylium salts. *Acta Chem. Scand.* **1970**, *24*, 3435–3443.

- [174] Katritzky, A.R.; Monro, A.M. *N*-oxides and related compounds. Part X. The hydrogenation of some pyridine 1-oxides. *J. Chem. Soc.* **1958**, 1263–1266.
- [175] Chandrasekhar, S.; Reddy, C.R.; Rao, R.J.; Rao, J.M. Efficient and chemoselective deoxygenation of amine *N*-oxides using polymethylhydrosiloxane. *Synlett* **2002**, 349–351.
- [176] Campeau, L.-C.; Rousseaux, S.; Fagnou, K. A solution to the 2-pyridyl organometallic cross-coupling problem: regioselective catalytic direct arylation of pyridine *N*-oxides. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 18020–18021.
- [177] Aoyagi, Y.; Abe, T.; Ohta, A. Facile and efficient deoxygenation of aromatic *N*-oxides with zinc and aqueous ammonium chloride. *Synthesis* **1997**, 891–894.
- [178] Saini, A.; Kumar, S.; Sandhu, J. An efficient and general method for the deoxygenation of organic *N*-oxides using Zn(OTf)₂ and Cu(OTf)₂. *Synlett* **2006**, 395–398.
- [179] Essery, J.M.; Schofield, K. Some derivatives of 4-amino- and 4-nitro-pyridine. *J. Chem. Soc.* **1960**, 4953–4959.
- [180] Balicki, R.; Kaczmarek, L.; Malinowski, M. Selective reduction of the N-O bond in heteroaromatic *N*-oxides by TiCl₄/SnCl₂. *Synth. Commun.* **1989**, *19*, 897–900.
- [181] Konwar, D.; Boruah, R.C.; Sandhu, J.S. An efficient general method for the deoxygenation of *N*-arylnitrones, azoxybenzenes, and *N*-heteroarene *N*-oxides. *Synthesis* **1990**, *1990*, 337–339.
- [182] Sanz, R.; Escribano, J.; Fernández, Y.; Aguado, R.; Pedrosa, M.R.; Arnáiz, F.J. Deoxygenation of *N*-oxides with triphenylphosphine, catalyzed by dichlorodioxomolybdenum(VI). *Synlett* **2005**, 1389–1392.
- [183] Howard, E.; Olszewski, W.F. The reaction of triphenylphosphine with some aromatic amine oxides. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 1483–1484.
- [184] Singh, B.; Leshner, G.Y.; Pennock, P.O. A convenient large scale synthesis of 2,6-dimethyl-4-(trimethylstannyl)pyridine. *J. Heterocycl. Chem.* **1990**, *27*, 1841–1842.
- [185] Deng, G.; Ueda, K.; Yanagisawa, S.; Itami, K.; Li, C.-J. Coupling of nitrogen heteroaromatics and alkanes without transition metals: a new oxidative cross-coupling at C-H/C-H Bonds. *Chem.-Eur. J.* **2009**, *15*, 333–337.
- [186] Hisano, T.; Harano, K.; Matsuoka, T.; Suzuki, T.; Murayama, Y. Reaction of aromatic *N*-oxides with dipolarophiles. XIV. Inverse-type cycloaddition of pyridine *N*-oxides with 1, 4-epoxy-1, 4-dihydronaphthalene and its mechanistic aspects. *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 605–611.
- [187] Loska, R.; Małosza, M. New synthesis of 2-heteroarylperfluoropropionic acids derivatives by reaction of azine *N*-oxides with hexafluoropropene. *Chem.-Eur. J.* **2008**, *14*, 2577–2589.
- [188] Schipper, D.J.; Campeau, L.-C.; Fagnou, K. Catalyst and base controlled site-selective sp² and sp³ direct arylation of azine *N*-oxides. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 3155–3164.
- [189] Kanyiva, K.S.; Nakao, Y.; Hiyama, T. Nickel-catalyzed addition of pyridine-*N*-oxides across alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8872–8874.
- [190] Fife, W.K. Regioselective cyanation of pyridine 1-oxides with trimethylsilylcarbonitrile: a modified Reissert-Henze reaction. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 1375–1377.
- [191] Yamanaka, H.; Araki, T.; Sakamoto, T. Site-selectivity in the reaction of 3-substituted pyridine 1-oxides with phosphoryl chloride. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 2244–2247.
- [192] Yin, J.; Xiang, B.; Huffman, M.A.; Raab, C.E.; Davies, I.W. A general and efficient 2-amination of pyridines and quinolines. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 4554–4557.

- [193] Boekelheide, V.; Linn, W.J. Rearrangements of *N*-oxides. A novel synthesis of pyridyl carbinols and aldehydes. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 1286–1291.
- [194] Kozuka, S.; Tamagaki, S.; Negoro, T.; Oae, S. Uneven distribution of ¹⁸O in the resulting esters formed in the reaction of 2-picoline, 2,6-lutidine and quinaldine *N*-oxide with acetic anhydride. *Tetrahedron Lett.* **1968**, *9*, 923–926.
- [195] Fontenas, C.; Bejan, E.; Haddou, H.A.; Balavoine, G.G.A. The Boekelheide reaction: trifluoroacetic anhydride as a convenient acylating agent. *Synth. Commun.* **1995**, *25*, 629–633.
- [196] Reimann, E.; Benend, H. Protoberberine aus Reissert-Verbindungen, 3. Mitt.: Synthese und Umsetzungsversuche von 8*H*-Isochino [2,1-*b*][2,7]naphthyridin-8-on. Protoberberines from Reissert compounds, III: Synthesis and attempted reactions of 8*H*-isoquino[2,1-*b*][2,7]naphthyridin-8-one. *Arch. Pharm.* **1994**, *327*, 539–541.
- [197] Zhang, A.; Ding, C.; Cheng, C.; Yao, Q. Convenient synthesis of 2,7-naphthyridine lophocladines A and B and their analogues. *J. Comb. Chem.* **2007**, *9*, 916–919.
- [198] Patel, U.R.; Proudfoot, J.R. The synthesis of 11-cyclopropyl-5,11-dihydro-4-(hydroxymethyl)-6*H*-dipyrido[3,2-*b*:2',3'-*e*][1,4]diazepin-6-one, a putative metabolite of the HIV-1 reverse transcriptase inhibitor Nevirapine. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4023–4025.
- [199] Vedejs, E. Method for direct hydroxylation of enolates. Transition metal peroxide reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 5944–5946.
- [200] Mimoun, H.; Seree de Roch, I.; Sajus, L. Nouveaux complexes peroxydiques covalents du molybdène et du tungstène avec les bases organiques. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1969**, 1481–1492.
- [201] Mimoun, H.; Seree de Roch, I.; Sajus, L. Epoxydation des olefines par les complexes peroxydiques covalents du molybdene - VI. *Tetrahedron* **1970**, *26*, 37–50.
- [202] Tanis, S.P.; Nakanishi, K. Stereospecific total synthesis of (±)-warburganal and related compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 4398–4400.
- [203] Nishikimi, Y.; Imori, T.; Sodeoka, M.; Shibasaki, M. Synthetic studies of azadirachtin. Synthesis of the cyclic acetal intermediate in the naturally occurring form. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 3354–3359.
- [204] Gamboni, R.; Tamm, C. Asymmetric synthesis of α-hydroxy-esters via ester enolates with very high diastereoselectivity. *Helv. Chim. Acta* **1986**, *69*, 615–620.
- [205] Krohn, K.; Rieger, H.; Hopf, H.; Barrett, D.; Jones, P.J.; Döring, D. Transition metal catalyzed oxidations, 3. Reaction of 4-hydroxy[2.2]paracyclophane with the Mimoun molybdenum oxodiperoxo complex [Mo(O₂)₂O]·Py·HMPT. *Chem. Ber.* **1990**, *123*, 1729–1732.
- [206] Williams, R.M. Bicyclomycin synthetic studies: utilization of bridgehead carbanions. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 2341–2344.
- [207] Vedejs, E.; Larsen, S. Hydroxylation of enolates with oxodiperoxymolybdenum(pyridine)(hexamethylphosphoric triamide), MoO₅·Py·HMPA (MoOPH): 3-hydroxy-1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-one. *Org. Synth.* **1986**, *64*, 127–132.
- [208] Daniewski, A.R.; Wojciechowska, W. Facile preparation of oxodiperoxymolybdenum(pyridine)(hexamethylphosphoric triamide) (MoOPH). *Synth. Commun.* **1986**, *16*, 535–536.
- [209] Davis, F.A.; Nadir, U.K.; Kluger, E.W. 2-Arylsulphonyl-3-phenyloxaziridines: a new class of stable oxaziridine derivatives. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1977**, 25–26.
- [210] Davis, F.A.; Lamendola, J.; Nadir, U.; Kluger, E.W.; Sedergran, T.C.; Panunto, T.W.; Billmers, R.; Jenkins, R.; Turchi, I.J.; Watson, W.H.; Shyong Chen, J.; Kimura, M. Chemistry of oxaziridines. 1.

Synthesis and structure of 2-arenesulfonyl-3-aryloxaziridines. A new class of oxaziridines. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 2000–2005.

[211] Davis, F.A.; Stringer, O.D. Chemistry of oxaziridines. 2. Improved synthesis of 2-sulfonyloxaziridines. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 1774–1775.

[212] Williamson, K.S.; Michaelis, D.J.; Yoon, T.P. Advances in the chemistry of oxaziridines. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 8016–8036.

[213] Holton, R.A.; Somoza, C.; Kim, H.-B.; Liang, F.; Biediger, R.J.; Boatman, P.D.; Shindo, M.; Smith, C.C.; Kim, S.; Nadizadeh, H.; Suzuki, Y.; Tao, C.; Vu, P.; Tang, S.; Zhang, P.; Murthi, K.K.; Gentile, L.N.; Liu, J.H. First total synthesis of taxol. 1. Functionalization of the B ring. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1597–1598.

[214] Davis, F.A.; Chattopadhyay, S.; Towson, J.C.; Lal, S.; Reddy, T. Chemistry of oxaziridines. 9. Synthesis of 2-sulfonyl- and 2-sulfamyloxaziridines using potassium peroxymonosulfate (oxone). *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2087–2089.

[215] Antunes, A.M.M.; Duarte, M.P.; Santos, P.P.; Gamboa da Costa, G.; Heinze, T.M.; Beland, F.A.; Marques, M.M. Synthesis and characterization of DNA adducts from the HIV reverse transcriptase inhibitor Nevirapine. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 1443–1456.

[216] Dekker, S.J.; Zhang, Y.; Vos, J.C.; Vermeulen, N.P.E.; Commandeur, J.N.M. Different reactive metabolites of Nevirapine require distinct glutathione S-transferase isoforms for bioinactivation. *Chem. Res. Toxicol.* **2016**, *29*, 2136–2144.

[217] Meng, X.; Howarth, A.; Earnshaw, C.J.; Jenkins, R.E.; French, N.S.; Back, D.J.; Naisbitt, D.J.; Park, B.K. Detection of drug bioactivation *in vivo*: mechanism of Nevirapine–albumin conjugate formation in patients. *Chem. Res. Toxicol.* **2013**, *26*, 575–583.

[218] Landsteiner, K.; Jacobs, J. Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. II. *J. Exp. Med.* **1936**, *64*, 625–639.

[219] Landsteiner, K.; Jacobs, J. Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. J. *Exp. Med.* **1935**, *61*, 643–657.

[220] Wang, X.; Tabor, M. Studies of the reactivity of morpholine, 2-mercaptobenzothiazole and 2 of their derivatives with selected amino acids. *Contact Dermatitis* **1988**, *19*, 16–21.

[221] Talaga, P.; Schaeffer, M.; Mattes, H.; Benezra, C.; Stampf, J.-L. Synthesis of Boc-Cys-Ala-OMe and its stereoselective addition to α -methylene- γ -butyrolactones. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 5029–5038.

[222] Franot, C.; Benezra, C.; Lepoittevin, J.P. Synthesis and interaction studies of ^{13}C labeled lactone derivatives with a model protein using ^{13}C NMR. *Bioorg. Med. Chem.* **1993**, *1*, 389–397.

[223] Pruniéras, M.; Delescluse, C.; Regnier, M. The culture of skin. A review of theories and experimental methods. *J. Invest. Dermatol.* **1976**, *67*, 58–65.

[224] Pruniéras, M.; Régnier, M.; Woodley, D. Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *J. Invest. Dermatol.* **1983**, *81*, 28s-33s.

[225] Berking, C.; Herlyn, M. Human skin reconstruct models: a new application for studies of melanocyte and melanoma biology. *Histol. Histopathol.* **2001**, *16*, 669–674.

[226] Todd, C.; Hewitt, S.D.; Kempenaar, J.; Noz, K.; Thody, A.J.; Ponc, M. Co-culture of human melanocytes and keratinocytes in a skin equivalent model: effect of ultraviolet radiation. *Arch. Dermatol. Res.* **1993**, *285*, 455–459.

[227] Régnier, M.; Staquet, M.J.; Schmitt, D.; Schmidt, R. Integration of Langerhans cells into a pigmented reconstructed human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **1997**, *109*, 510–512.

- [228] Régnier, M.; Patwardhan, A.; Scheynius, A.; Schmidt, R. Reconstructed human epidermis composed of keratinocytes, melanocytes and Langerhans cells. *Med. Biol. Eng. Comput.* **1998**, *36*, 821–824.
- [229] Poumay, Y.; Dupont, F.; Marcoux, S.; Leclercq-Smekens, M.; Hérin, M.; Coquette, A. A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in *in vitro* studies. *Arch. Dermatol. Res.* **2004**, *296*, 203–211.
- [230] Directive 2003/15/EC of the European parliament and of the council of 27 February 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products. *Off. J. Eur. Union* **2003**, *L66*, 26–35.
- [231] Shevchenko, R.V.; James, S.L.; James, S.E. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *J. R. Soc. Interface* **2010**, *7*, 229–258.
- [232] Boelsma, E.; Gibbs, S.; Faller, C.; Ponc, M. Characterization and comparison of reconstructed skin models: morphological and immunohistochemical evaluation. *Acta Derm. Venereol.* **2000**, *80*, 82–88.
- [233] Debeuckelaere, C. Synthèse d'allergènes marqués au carbone 13 et études par RMN HRMAS de leurs interactions avec des épidermes reconstruits, Université de Strasbourg, **2012**.
- [234] Moss, E. Etude *in situ* par RMN HRMAS sur des épidermes reconstruits du métabolisme et de la réactivité de xénobiotiques allergisants, Université de Strasbourg, **2015**.
- [235] 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.
- [236] Spielmann, H.; Hoffmann, S.; Liebsch, M.; Botham, P.; Fentem, J.H.; Eskes, C.; Roguet, R.; Cotovio, J.; Cole, T.; Worth, A.; Heylings, J.; Jones, P.; Robles, C.; Kandárová, H.; Gamer, A.; Remmele, M.; Curren, R.; Raabe, H.; Cockshott, A.; Gerner, I.; Zuang, V. The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: report on the validity of the EpiSKIN and EpiDerm assays and on the Skin Integrity Function Test. *Altern. Lab. Anim.* **2007**, *35*, 559–601.
- [237] Alépée, N.; Grandidier, M.H.; Cotovio, J.; Organisation for Economic Co-operation and Development. Sub-categorisation of skin corrosive chemicals by the EpiSkin™ reconstructed human epidermis skin corrosion test method according to UN GHS: revision of OECD Test Guideline 431. *Toxicol. In Vitro* **2014**, *28*, 131–145.
- [238] Lelièvre, D.; Justine, P.; Christiaens, F.; Bonaventure, N.; Coutet, J.; Marrot, L.; Cotovio, J. The EpiSkin phototoxicity assay (EPA): development of an *in vitro* tiered strategy using 17 reference chemicals to predict phototoxic potency. *Toxicol. In Vitro* **2007**, *21*, 977–995.
- [239] Luu-The, V.; Duche, D.; Ferraris, C.; Meunier, J.-R.; Leclaire, J.; Labrie, F. Expression profiles of phases 1 and 2 metabolizing enzymes in human skin and the reconstructed skin models EpiSkin™ and full thickness model from EpiSkin™. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2009**, *116*, 178–186.
- [240] Andrew, E.R.; Bradbury, A.; Eades, R.G. Removal of dipolar broadening of nuclear magnetic resonance spectra of solids by specimen rotation. *Nature* **1959**, *183*, 1802–1803.
- [241] Lowe, I.J. Free induction decays of rotating solids. *Phys. Rev. Lett.* **1959**, *2*, 285–287.
- [242] Doskočilová, D.; Tao, D.D.; Schneider, B. Effects of macroscopic spinning upon linewidth of NMR signals of liquid in magnetically inhomogeneous systems. *Czechoslov. J. Phys. B* **1975**, *25*, 202–209.
- [243] Stöver, H.D.H.; Fréchet, J.M.J. Direct polarization ^{13}C and ^1H magic angle spinning NMR in the characterization of solvent-swollen gels. *Macromolecules* **1989**, *22*, 1574–1576.

- [244] Fitch, W.L.; Detre, G.; Holmes, C.P.; Shoolery, J.N.; Keifer, P.A. High-resolution ^1H NMR in solid-phase organic synthesis. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7955–7956.
- [245] Keifer, P.A.; Baltusis, L.; Rice, D.M.; Tymiak, A.A.; Shoolery, J.N. A comparison of NMR spectra obtained for solid-phase-synthesis resins using conventional high-resolution, magic-angle-spinning, and high-resolution magic-angle-spinning probes. *J. Magn. Reson. A* **1996**, *119*, 65–75.
- [246] Posset, T.; Guenther, J.; Pope, J.; Oeser, T.; Blümel, J. Immobilized Sonogashira catalyst systems: new insights by multinuclear HRMAS NMR studies. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2059–2061.
- [247] Haberkorn, R.A.; Herzfeld, J.; Griffin, R.G. High resolution phosphorus-31 and carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of unsonicated model membranes. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 1296–1298.
- [248] Zhou, Z.; Sayer, B.G.; Stark, R.E.; Eppard, R.M. High-resolution magic-angle spinning ^1H nuclear magnetic resonance studies of lipid dispersions using spherical glass ampoules. *Chem. Phys. Lipids* **1997**, *90*, 45–53.
- [249] Szymanski, C.M.; Michael, F.S.; Jarrell, H.C.; Li, J.; Gilbert, M.; Larocque, S.; Vinogradov, E.; Brisson, J.-R. Detection of conserved *N*-linked glycans and phase-variable lipooligosaccharides and capsules from campylobacter cells by mass spectrometry and high resolution magic angle spinning NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 24509–24520.
- [250] Dag, S.; Niedziela, T.; Dzieciatkowska, M.; Lukasiewicz, J.; Jachymek, W.; Lugowski, C.; Kenne, L. The *O*-acetylation patterns in the *O*-antigens of *Hafnia alvei* strains PCM 1200 and 1203, serologically closely related to PCM 1205. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 2521–2527.
- [251] Li, W. Multidimensional HRMAS NMR: a platform for *in vivo* studies using intact bacterial cells. *Analyst* **2006**, *131*, 777–781.
- [252] Griffin, J.L.; Bollard, M.; Nicholson, J.K.; Bhakoo, K. Spectral profiles of cultured neuronal and glial cells derived from HRMAS ^1H NMR spectroscopy. *NMR Biomed.* **2002**, *15*, 375–384.
- [253] Humpfer, E.; Spraul, M.; Nicholls, A.W.; Nicholson, J.K.; Lindon, J.C. Direct observation of resolved intracellular and extracellular water signals in intact human red blood cells using ^1H MAS NMR spectroscopy. *Magn. Reson. Med.* **1997**, *38*, 334–336.
- [254] Cheng, L.L.; Lean, C.L.; Bogdanova, A.; Wright, S.C.; Ackerman, J.L.; Brady, T.J.; Garrido, L. Enhanced resolution of proton NMR spectra of malignant lymph nodes using magic-angle spinning. *Magn. Reson. Med.* **1996**, *36*, 653–658.
- [255] Cheng, L.L.; Ma, M.J.; Becerra, L.; Ptak, T.; Tracey, I.; Lackner, A.; González, R.G. Quantitative neuropathology by high resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 6408–6413.
- [256] Beckonert, O.; Coen, M.; Keun, H.C.; Wang, Y.; Ebbels, T.M.D.; Holmes, E.; Lindon, J.C.; Nicholson, J.K. High-resolution magic-angle-spinning NMR spectroscopy for metabolic profiling of intact tissues. *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 1019–1032.
- [257] Patti, G.J.; Yanes, O.; Siuzdak, G. Metabolomics: the apogee of the omic trilogy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 263–269.
- [258] Spratlin, J.L.; Serkova, N.J.; Eckhardt, S.G. Clinical applications of metabolomics in oncology: a review. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 431–440.
- [259] Beger, R.D. A review of applications of metabolomics in cancer. *Metabolites* **2013**, *3*, 552–574.

- [260] Rocha, C.M.; Barros, A.S.; Gil, A.M.; Goodfellow, B.J.; Humpfer, E.; Spraul, M.; Carreira, I.M.; Melo, J.B.; Bernardo, J.; Gomes, A.; Sousa, V.; Carvalho, L.; Duarte, I.F. Metabolic profiling of human lung cancer tissue by ^1H high resolution magic angle spinning (HRMAS) NMR spectroscopy. *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 319–332.
- [261] Ben Sellem, D.; Elbayed, K.; Neuville, A.; Moussallieh, F.-M.; Lang-Averous, G.; Piotto, M.; Bellocq, J.-P.; Namer, I.J. Metabolomic characterization of ovarian epithelial carcinomas by HRMAS-NMR spectroscopy. *J. Oncol.* **2011**, ID 174019, 9 pages.
- [262] Rutar, V. Magic angle sample spinning NMR spectroscopy of liquids as a nondestructive method for studies of plant seeds. *J. Agric. Food Chem.* **1989**, *37*, 67–70.
- [263] Brescia, M.A.; Sacco, D.; Sgaramella, A.; Pasqualone, A.; Simeone, R.; Peri, G.; Sacco, A. Characterisation of different typical Italian breads by means of traditional, spectroscopic and image analyses. *Food Chem.* **2007**, *104*, 429–438.
- [264] Larsen, F.H.; Blennow, A.; Engelsen, S.B. Starch granule hydration - A MAS NMR investigation. *Food Biophys.* **2008**, *3*, 25–32.
- [265] Sacco, D.; Brescia, M.A.; Buccolieri, A.; Caputi Jambrenghi, A. Geographical origin and breed discrimination of apulian lamb meat samples by means of analytical and spectroscopic determinations. *Meat Sci.* **2005**, *71*, 542–548.
- [266] Ritota, M.; Casciani, L.; Failla, S.; Valentini, M. HRMAS-NMR spectroscopy and multivariate analysis meat characterisation. *Meat Sci.* **2012**, *92*, 754–761.
- [267] Villa, P.; Castejón, D.; Herraiz, M.; Herrera, A. ^1H -HRMAS NMR study of cold smoked atlantic salmon (*salmo salar*) treated with E-beam. *Magn. Reson. Chem.* **2013**, *51*, 350–357.
- [268] Shintu, L.; Caldarelli, S. High-resolution MAS NMR and chemometrics: characterization of the ripening of Parmigiano Reggiano cheese. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4026–4031.
- [269] Mazzei, P.; Piccolo, A. ^1H HRMAS-NMR metabolomic to assess quality and traceability of mozzarella cheese from Campania buffalo milk. *Food Chem.* **2012**, *132*, 1620–1627.
- [270] Gil, A.M.; Duarte, I.F.; Delgadillo, I.; Colquhoun, I.J.; Casascelli, F.; Humpfer, E.; Spraul, M. Study of the compositional changes of mango during ripening by use of nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1524–1536.
- [271] Combourieu, B.; Inacio, J.; Delort, A.M.; Forano, C. Differentiation of mobile and immobile pesticides on anionic clays by ^1H HR MAS NMR spectroscopy. *Chem. Commun.* **2001**, 2214–2215.
- [272] Bon, D.; Gilard, V.; Massou, S.; Pérès, G.; Malet-Martino, M.; Martino, R.; Desmoulin, F. *In vivo* ^{31}P and ^1H HR-MAS NMR spectroscopy analysis of the unstarved *Aporrectodea caliginosa* (*Lumbricidae*). *Biol. Fertil. Soils* **2006**, *43*, 191–198.
- [273] Opstad, K.S.; Bell, B.A.; Griffiths, J.R.; Howe, F.A. An assessment of the effects of sample ischaemia and spinning time on the metabolic profile of brain tumour biopsy specimens as determined by high-resolution magic angle spinning ^1H NMR. *NMR Biomed.* **2008**, *21*, 1138–1147.
- [274] Detour, J.; Elbayed, K.; Piotto, M.; Moussallieh, F.-M.; Nehlig, A.; Namer, I.J. Ultra fast *in vivo* microwave irradiation for enhanced metabolic stability of brain biopsy samples during HRMAS NMR analysis. *J. Neurosci. Methods* **2011**, *201*, 89–97.
- [275] Antunes, A.M.M.; Godinho, A.L.A.; Martins, I.L.; Justino, G.C.; Beland, F.A.; Marques, M.M. Amino acid adduct formation by the Nevirapine metabolite, 12-hydroxynevirapine - A possible factor in Nevirapine toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23*, 888–899.
- [276] Scheuplein, R.J.; Blank, I.H. Permeability of the skin. *Physiol. Rev.* **1971**, *51*, 702–747.

- [277] Hu, T.; Bailey, R.E.; Morrall, S.W.; Aardema, M.J.; Stanley, L.A.; Skare, J.A. Dermal penetration and metabolism of *p*-aminophenol and *p*-phenylenediamine: Application of the EpiDerm™ human reconstructed epidermis model. *Toxicol. Lett.* **2009**, *188*, 119–129.
- [278] Gibbs, S.; Corsini, E.; Spiekstra, S.W.; Galbiati, V.; Fuchs, H.W.; DeGeorge, G.; Troese, M.; Hayden, P.; Deng, W.; Roggen, E. An epidermal equivalent assay for identification and ranking potency of contact sensitizers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2013**, *272*, 529–541.
- [279] Scheuplin, R.; Ross, L. Effects of surfactants and solvents on the permeability of epidermis. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **1970**, *21*, 853–873.
- [280] Klunder, J.M. Sommelet-hauser rearrangement of an ammonium ylide derived from the HIV-1 reverse transcriptase inhibitor nevirapine. *J. Heterocycl. Chem.* **1995**, *32*, 1687–1691.
- [281] Cerny, M.A.; Hanzlik, R.P. Cyclopropylamine inactivation of cytochromes P450: role of metabolic intermediate complexes. *Arch. Biochem. Biophys.* **2005**, *436*, 265–275.
- [282] Sun, Q.; Zhu, R.; Foss, F.W.; Macdonald, T.L. *In vitro* metabolism of a model cyclopropylamine to reactive intermediate: insights into trovafloxacin-induced hepatotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 711–719.
- [283] Shaffer, C.L.; Harriman, S.; Koen, Y.M.; Hanzlik, R.P. Formation of cyclopropanone during cytochrome P450-catalyzed *N*-dealkylation of a cyclopropylamine. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8268–8274.
- [284] Bernard, S.; Defoy, D.; Dory, Y.L.; Klarskov, K. Efficient synthesis of nevirapine analogs to study its metabolic profile by click fishing. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6127–6130.
- [285] The Human Metabolomic Database (HMDB). <http://www.hmdb.ca>
- [286] Biological Magnetic Resonance Database (BMRB). <http://www.bmrb.wisc.edu>
- [287] Mannargudi, M.B. Involvement of reactive metabolites in idiosyncratic drug reactions, University of Toronto, **2009**.
- [288] Shenton, J.M.; Teranishi, M.; Abu-Asab, M.S.; Yager, J.A.; Uetrecht, J.P. Characterization of a potential animal model of an idiosyncratic drug reaction: nevirapine-induced skin rash in the rat. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16*, 1078–1089.
- [289] Prasertvit, P.; Chareonyingwattana, A.; Wattanakrai, P. Nevirapine patch testing in Thai human immunodeficiency virus infected patients with nevirapine drug hypersensitivity. *Contact Dermatitis* **2017**, *77*, 379–384.
- [290] Bergmann, M.; Villard, J.; Caubet, J.-C.R.J.-P. Prédispositions génétiques dans l'allergie médicamenteuse : importance du HLA. *Rev. Med. Suisse* **2014**, *10*, 864–868.
- [291] Suffert, J. Simple direct titration of organolithium reagents using *N*-pivaloyl-*o*-toluidine and/or *N*-pivaloyl-*o*-benzylaniline. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 509–510.
- [292] Piotto, M.; Elbayed, K.; Wieruszeski, J.-M.; Lippens, G. Practical aspects of shimming a high resolution magic angle spinning probe. *J. Magn. Reson.* **2005**, *173*, 84–89.