



HAL
open science

Chimie des systèmes protéiques complexes : étude des interactions entre des allergènes cutanés et respiratoires et des épidermes humains reconstitués par une nouvelle approche associant RMN HRMAS et spectrométrie de masse

Minh Thuong Khong

► **To cite this version:**

Minh Thuong Khong. Chimie des systèmes protéiques complexes : étude des interactions entre des allergènes cutanés et respiratoires et des épidermes humains reconstitués par une nouvelle approche associant RMN HRMAS et spectrométrie de masse. Chimie organique. Université de Strasbourg, 2021. Français. NNT : 2021STRAF011 . tel-03996486

HAL Id: tel-03996486

<https://theses.hal.science/tel-03996486>

Submitted on 20 Feb 2023

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 :

Minh Thuong KHONG

soutenue le : 14 janvier 2021

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

Discipline/ Spécialité : Chimie organique

**Chimie des systèmes protéiques complexes :
Etude des interactions entre des allergènes
cutanés et respiratoires et des épidermes
humains reconstitués par une nouvelle approche
associant RMN HRMAS et spectrométrie de
masse**

THÈSE dirigée par :

M. LEPOITTEVIN Jean-Pierre
Mme BERL-BAUDER Valérie

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

RAPPORTEURS :

Mme BENFODDA Zohra
M. LECOUEY Marc

Maître de conférences, Université de Nîmes
Professeur, Université Sorbonne Paris nord

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. PALLARDY Marc
Mme LEIZE-WAGNER Emmanuelle

Professeur, Université Paris-Saclay
Directeur de recherches, Université de
Strasbourg

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit a été réalisé au laboratoire de Dermatochimie de l'Université de Strasbourg, 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.

Tout d'abord, je voudrais remercier vivement à Jean-Pierre et à Valérie. Merci de m'avoir accueilli au laboratoire et de m'avoir accordé votre confiance pour réaliser une thèse très intéressante. Merci pour m'avoir appris tellement de choses non seulement dans la vie scientifique mais aussi dans la vie quotidienne. J'ai l'impression que vos connaissances sont illimitées. Merci pour vos conseils précieux. Grâce à vous, j'ai grandi jour après jour. Au travers de quelques lignes, je ne peux pas exprimer tous mes remerciements à vous. Encore une fois, un grand merci à vous ! Jean-Pierre, je ne regarde pas encore la série de film Star Wars mais je te promis que je vais la regarder dans l'avenir.

Je voudrais adresser également mes remerciements au Docteur Zohra Benfodda, au Professeur Marc Lecouvey, au Professeur Marc Pallardy, et au Directeur de recherche Emmanuelle Leize-Wagner. 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. Grâce à la riche discussion lors de soutenance, j'ai pu améliorer la qualité de ce manuscrit.

J'aimerais remercier chaleureusement toute l'équipe de Dermatochimie. Elena, pour tes aides, pour ta gentillesse et pour l'esprit optimiste que j'ai appris de toi. Je suis heureux de trouver un grand fan de Barcelone comme moi. Hassan, pour tes aides depuis mes premiers jours au laboratoire, pour tes expériences en RMN HRMAS et pour tes conseils précieux. Un grand merci à toi ! Marion, merci d'avoir appris beaucoup de choses. J'espère que l'on peut revoir un jour au Vietnam. Marie, merci pour tes aides et pour avoir partagé le labo avec moi et surtout pour les belles photos de mon cher Henri. Merci de m'aider à envoyer mes bisous à Henri. Je n'oublie jamais mes amis, passés et présents à notre laboratoire, Fatma, François-Marie, Yannick, Alexis, Arnaud, Claire, etc...

Je voudrais remercier également à l'équipe voisine, Cathérine, Didier, Michel, Paew, Alizée, Guillaume. Merci pour vos gentillesse, merci d'avoir partagé beaucoup de moments inoubliables avec moi (les repas de Noël, les fêtes de galettes jour après jour, etc...).

Merci tout le monde pour vos cadeaux spéciaux que je les aime beaucoup et que je ne les oublie jamais !

J'adresse également mes plus sincères remerciements à Emmanuelle et à Yannis pour m'avoir aidé beaucoup pour mes premiers jours que j'ai touché à la spectrométrie de masse, pour vos conseils, pour l'orientation et pour votre recommandation à l'équipe protéomique à l'IBMC.

Je tiens à remercier vivement à Philippe, Lauriane et Johana de l'équipe protéomique à Strasbourg. Grâce à vous, j'ai pu réaliser une des parties très importante dans mon travail, la partie protéomique. Merci de m'avoir appris beaucoup de nouvelles choses. Merci pour vos analyses, vos explications très claires et faciles à comprendre pour moi, un amateur dans l'analyse protéomique et la spectrométrie de masse. J'admire vos connaissances !

Bien évidemment, je voudrais remercier vivement à Jésus pour les analyses RMN HRMAS. Tu as réalisé les expériences de RMN HRMAS avec toute l'expertise qui te caractérise, en prenant à cœur chaque résultat. Merci pour tes explications. Et surtout pour tes belles photos de bonhommes de neige. Un grand merci à toi !

Je tiens à remercier au personnel du service commun de RMN de la Faculté de Chimie de Strasbourg : Lionel, Bruno et Maurice pour la RMN en phase liquide. Merci à Antoine, George et tous les autres membres de magasin de chimie qui m'ont toujours accueilli chaleureusement pour les courses hebdomadaires. Merci à Delphine Garnier et à Estefania Oliva pour les expériences de LC-MS au sein de la Plateforme d'Analyse Chimique de Strasbourg-Ilkirsch.

Merci à ma famille, ma mère, mes sœurs et mes frères pour m'avoir soutenu durant toute ma vie. Auparavant, c'est toujours difficile pour moi pour exprimer mes sentiments pour ma mère mais de tout mon cœur, je voudrais dire à ma maman : je t'aime beaucoup ! Merci à mes amis. La dernière personne que je voudrais remercier est ma petite amie qui a partagé avec moi mes bons et mauvais jours, qui me croit sans conditions, merci à toi !

Déclaration sur l'honneur *Declaration of Honour*

J'affirme être informé que le plagiat est une faute grave susceptible de mener à des sanctions administratives et disciplinaires pouvant aller jusqu'au renvoi de l'Université de Strasbourg et passible de poursuites devant les tribunaux de la République Française.

Je suis conscient(e) que l'absence de citation claire et transparente d'une source empruntée à un tiers (texte, idée, raisonnement ou autre création) est constitutive de plagiat.

Au vu de ce qui précède, j'atteste sur l'honneur que le travail décrit dans mon manuscrit de thèse est un travail original et que je n'ai pas eu recours au plagiat ou à toute autre forme de fraude.

I affirm that I am aware that plagiarism is a serious misconduct that may lead to administrative and disciplinary sanctions up to dismissal from the University of Strasbourg and liable to prosecution in the courts of the French Republic.

I am aware that the absence of a clear and transparent citation of a source borrowed from a third party (text, idea, reasoning or other creation) is constitutive of plagiarism.

In view of the foregoing, I hereby certify that the work described in my thesis manuscript is original work and that I have not resorted to plagiarism or any other form of fraud.

Nom : KHONG

Prénom : Minh Thuong

Ecole doctorale : Science chimique (ED222)

Laboratoire : Dermatochimie

Date : 12 avril 2021

Signature :

KHONG Minh Thuong

Table des matières

Liste des abréviations	1
Avant-propos	6
Chapitre I : Introduction générale	8
I. Allergie de contact	8
1. La peau	8
1.1. L'épiderme	9
1.2. Le derme	10
1.3. L'hypoderme	10
2. Allergie de contact : base immunologique	10
2.1. Phase de sensibilisation	11
2.2. Phase de révélation.....	13
II. Allergie respiratoire	14
1. L'appareil respiratoire	14
2. Allergie respiratoire : base immunologique.....	15
2.1. Phase de sensibilisation	15
2.2. Phase de révélation.....	17
III. Les allergènes.....	18
1. Liaisons de coordination	19
2. Liaisons covalentes.....	20
IV. Les différentes méthodes d'identification des allergènes	22
1. Méthodes <i>in vivo</i>	22
1.1. Test de Buehler	23
1.2. Test de GPMT (Guinea Pig Maximization Test).....	23
1.3. Test de LLNA (Local Lymph Node Assay).....	23
2. Méthodes alternatives associées aux différents événements clés de la sensibilisation cutanée	25
2.1. Événement clé n°1 (KE1) : réaction, réactivité et métabolisme	27
a) Méthodes <i>in silico</i>	28
b) Méthodes <i>in chemico</i>	29
2.2. Événement clé n°2 (KE2) : l'activation des kératinocytes.....	31
2.3. Événement clé n°3 (KE3) : l'activation des cellules dendritiques	33

2.4. Evénement clé n°4 (KE4) : l'activation, la division et la différenciation des lymphocytes T	34
3. Méthodes d'identification des allergènes respiratoire.....	35
3.1. Profilage des cytokines	35
3.2. Test IgE sérique	35
V. Présentation du sujet de thèse	36
1. Les épidermes humains reconstitués.....	37
2. La RMN HRMAS.....	38
3. L'analyse protéomique.....	39
4. Choix des allergènes et objectif du travail de thèse	39
Chapitre II : Synthèse des allergènes étudiés.....	41
I. Allergène respiratoire - Anhydride phtalique (PA).....	41
1. Généralités	41
2. Choix de la position de substitution au carbone 13.....	42
3. Analyse rétrosynthétique du PA substitué au carbone 13 (¹³ C)-1	43
4. Synthèse du PA substitué au carbone 13 (¹³ C)-1	44
5. Synthèse du PA substitué au carbone 13 : bilan	50
II. Allergène cutané - 2,3-Diphénylcyclopropénone (DCP).....	51
1. Généralités	51
2. Choix de la position de substitution au carbone 13.....	52
3. Analyse rétrosynthétique de la DCP substituée au carbone 13 (¹³ C)-2	53
4. Synthèse de la DCP substituée au carbone 13 (¹³ C)-2	56
5. Synthèse de la DCP substituée au carbone 13 : bilan	63
III. Allergène mixte - les isocyanates	63
1. Le 4,4'-méthylènediphényldiisocyanate (4,4'-MDI).....	65
1.1. Généralité.....	65
1.2. Choix de la position de substitution au carbone 13.....	66
1.3. Analyse rétrosynthétique du 4,4'-MDI substitué au carbone 13 (¹³ C)-3	66
1.4. Synthèse du 4,4'-MDI substitué au carbone 13 (¹³ C)-3.....	71
1.5. Synthèse du 4,4'-MDI substitué au carbone 13 : bilan	85
2. Le <i>p</i> -tolylisocyanate	86
2.1. Généralités	86
2.2. Choix de la position de substitution au carbone 13.....	87
2.3. Analyse rétrosynthétique du <i>p</i> -tolylisocyanate substitué au carbone 13 (¹³ C)-4.....	87

2.4. Synthèse du <i>p</i> -tolylisocyanate substitué au carbone 13 (¹³ C)-4	87
2.5. Synthèse du <i>p</i> -tolylisocyanate substitué au carbone 13 : bilan.....	89
IV. Conclusion	90
Chapitre III : Etude de la réactivité des allergènes substitués au carbone 13 envers les acides aminés et une protéine modèle.....	91
I. Réactivité des allergènes substitués au carbone 13 envers les acides aminés et le glutathion	91
1. Sélection des acides aminés.....	91
2. Mode opératoire.....	92
3. Résultats.....	93
3.1. Réactivité de l'anhydride phtalique (¹³ C)-1.....	93
a) Réactivité de (¹³ C)-1 vis-à-vis de la <i>N</i> -Ac-Lys.....	93
b) Réactivité de (¹³ C)-1 vis-à-vis du GSH	96
3.2. Réactivité de la 2,3-diphénylcyclopropénone (¹³ C)-2	99
a) Réactivité de (¹³ C)-2 vis-à-vis de la <i>N</i> -Ac-Cys	100
b) Réactivité de (¹³ C)-2 vis-à-vis du GSH	106
c) Réactivité de (¹³ C)-2 vis-à-vis de la <i>N</i> -Ac-His	109
3.3. Réactivité du 4,4'-méthylènediphényldiisocyanate (¹³ C)-3	112
a) Réactivité de (¹³ C)-3 vis-à-vis de la <i>N</i> -Ac-Lys.....	113
b) Réactivité de (¹³ C)-3 vis-à-vis de la <i>N</i> -Ac-Cys	117
c) Réactivité de (¹³ C)-3 vis-à-vis du GSH.....	120
3.4. Réactivité du <i>p</i> -tolylisocyanate (¹³ C)-4.....	123
a) Réactivité de (¹³ C)-4 vis-à-vis de la <i>N</i> -Ac-Lys.....	124
b) Réactivité de (¹³ C)-4 vis-à-vis de la <i>N</i> -Ac-Cys	127
c) Réactivité de (¹³ C)-4 vis-à-vis du GSH.....	130
II. Réactivité des allergènes substitués au carbone 13 envers une protéine modèle ...	134
1. L'albumine sérique bovine (BSA)	134
2. Mode opératoire.....	135
3. Résultats.....	135
3.1. Réactivité de l'anhydride phtalique (¹³ C)-1 envers la BSA.....	135
3.2. Réactivité de la 2,3-diphénylcyclopropénone (¹³ C)-2 envers la BSA.....	137
III. Conclusion	139
Chapitre IV : Etude des interactions des allergènes substitués au carbone 13 avec les épidermes humains reconstitués par RMN HRMAS	140

I. Les épidermes humains reconstitués	140
1. Historique du développement des épidermes humains reconstitués.....	140
2. Les principaux modèles d'épidermes humains reconstitués.....	141
3. Le modèle EpiSkin™ et ses applications	142
II. La RMN HRMAS.....	143
1. Historique.....	143
2. Principe de la RMN HRMAS.....	144
3. Applications.....	145
III. Les épidermes humains reconstitués associés à la RMN HRMAS pour l'étude des interactions haptènes-protéines.....	146
IV. Etude des interactions des allergènes cutanés et respiratoires substitués au carbone 13 vis-à-vis d'épidermes humains reconstitués, modèle EpiSkin™, par RMN HRMAS..	147
1. Mode opératoire.....	147
1.1. Application les allergènes substitués au carbone 13 sur les épidermes humains reconstitués	148
1.2. Préparation des échantillons pour l'analyse par RMN HRMAS	150
a) Préparation d'un insert.....	150
b) Préparation d'un rotor.....	151
1.3. Acquisitions RMN HRMAS.....	152
2. Résultats.....	153
2.1. Réactivité de l'anhydride phtalique substitué au carbone 13, (¹³ C)-1, sur les RHE EpiSkin™	153
2.2. Réactivité de la 2,3-diphénylcyclopropénone substituée au carbone 13, (¹³ C)-2, sur les RHE EpiSkin™	156
2.3. Réactivité du 4,4'-méthylènediphényldiisocyanate substitué au carbone 13, (¹³ C)-3, sur les RHE EpiSkin™	160
2.4. Réactivité du <i>p</i> -tolylisocyanate substitué au carbone 13, (¹³ C)-4, sur les RHE EpiSkin™	161
V. Conclusions.....	164
Chapitre V : Analyse protéomique des épidermes humains reconstitués traités par les allergènes substitués au carbone 13	166
I. Extraction des protéines à partir des épidermes humains reconstitués	166
1. Choix du tampon de lyse.....	166
II. Analyse protéomique	171
1. Séparation des protéines	172

1.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE)	172
1.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide bidimensionnelle (2D-PAGE)	173
1.3. Chromatographie liquide (LC)	173
2. Identification des protéines	174
2.1. Analyse par spectrométrie de masse	175
a) Source d'ionisation : électrospray (ESI)	176
b) Les analyseurs	178
2.2. La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)	181
2.3. Interprétation d'un spectre de fragmentation	184
3. Analyse bioinformatique	186
3.1. Outil bioinformatique	186
3.2. Stratégie d'analyse bioinformatique	187
a) Recherche dans des banques de données	187
b) Validation des données par le taux de faux-positifs (FDR)	188
c) Détermination de l'abondance des protéines	189
d) Extraction des données par Proline	190
4. Stratégie d'analyse protéomique utilisée dans notre étude : « shotgun proteomics »	191
III. Mode opératoire	193
1. Digestion des protéines	193
2. Analyse par la LC-MS/MS	194
3. Recherches dans la base de données	195
4. Traitement des données	196
IV. Résultats	196
1. Modifications de la protéine purifiée (BSA) exposée aux différents allergènes	196
1.1. Modifications de la BSA par l'anhydride phtalique	196
1.2. Modifications de la BSA par la 2,3-diphénylcyclopropénone	198
1.3. Modifications de la BSA par le <i>p</i> -tolylisocyanate	201
2. Etude des changements protéomiques des épidermes humains reconstitués (RHE) exposés aux différents allergènes	202
2.1. Epidermes humains reconstitués « blancs »	203
2.2. Epidermes humains reconstitués exposés à l'anhydride phtalique	204
2.3. Epidermes humains reconstitués exposés à la 2,3-diphénylcyclopropénone	209
2.4. Epidermes humains reconstitués exposés au <i>p</i> -tolylisocyanate	213

V. Conclusions.....	216
Conclusion générale et perspectives	231
I. Problématique de thèse	231
II. Hypothèse de travail et objectifs	232
III. Chimie	233
IV. Résultats obtenus en RMN HRMAS.....	234
V. Résultats obtenus en analyse protéomique	235
VI. Discussion.....	237
Experimental section	240
General informations	240
Chapter II: Synthesis of carbon-13 substituted allergens	241
Chapter III: Reactivity studies in solution	259
Chapter IV: Reactivity studies in EpiSkin™ model by HRMAS NMR	267
Chapter V: Proteomics analysis	269
Formulaire des molécules synthétisées.....	304
Références bibliographiques.....	306

Liste des abréviations

°C	Degré Celsius
µg	Microgramme
µL	Microlitre
µm	Micromètre
µmol	Micromole
1D	Une dimension
2D	Deux dimensions
2D-PAGE	Electrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide
3D	Trois dimensions
4,4'-MDI	4,4'-Méthylènediphényldiisocyanate
Å	Ångström
ACN	Acétonitrile
AcOEt	Acétate d'éthyle
Ac ₂ O	Anhydride acétique
AcOH	Acide acétique
ADN	Acide désoxyribonucléique
AOO	Acetone : Olive Oil
AOP	Adverse Outcome Pathway
APCI	Atmospheric-Pressure Chemical Ionization
APPI	Atmospheric Pressure Photolonization
ARE	Antioxidant Response Element
Arg ou R	Arginine
BCR	Récepteurs des lymphocytes B
br s	Singulet large (broad singlet)
BSA	Bovine Serum Albumin
BTC	Bis(trichlorométhyle) ou triphosgène
cata.	Catalyseur (quantité catalytique)
CA	Charbon actif
CBB	Colloidal Coomassie Blue
CDI	<i>N,N'</i> -Carbonyldiimidazole
CDMT	2-Chloro-4,6-diméthoxy-[1,3,5]triazine
CHAPS	(3-(3-Cholamidopropyldiméthylammonio)-1-propanesulfonate
CL	Cellules de Langerhans
cm ²	Centimètre carré
CMH	Complexe majeur d'hiscompatibilité
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
Cys ou C	Cystéine
d	Doublet

Da	Dalton
DBU	1,8-Diazabicyclo-[5.4.0]undec-7-ène
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichlorométhane
DCP	2,3-Diphénylcyclopropénone
DMAP	4-Diméthylaminopyridine
DMC	Diméthylcarbonate
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMTMM	4-(4,6-Diméthoxy[1,3,5] triazin-2-yl)-4-méthylmorpholinium
DNCB	1-Chloro-2,4-dinitrobenzène
DOS	Sébacate de di-n-octyle
dpppe	1,5-Bis(diphénylphosphino)pentane
DPRA	Direct Peptide Reactivity Assay
DTT	Dithiothréitol
E	Electrophile
EA	Acrylate d'éthyle
ECVAM	Centre Européen de Validation des Méthodes Alternatives
éq	Equivalent
ESI	ElectroSpray Ionization
Et	Ethyle
<i>et al.</i>	Et autres
FcεRI	Récepteur IgE de haute affinité
FDR	False-Discovery Rate
Fe(acac) ₃	Tris(acétylacétonate) de fer(III)
FT-ICR	Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance
FWHM	Full Width at Half Maximum
g	Gramme
g.mol ⁻¹	Gramme par mole
GPMT	Guinea Pig Maximization Test
GSH	Glutathione
h	Heure
HSA	Human Serum Albumin
HCD	Higher-energy collisional dissociation
HDI	Hexaméthylènediisocyanate
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyle)-1-pipérazine éthane sulfonique
HPHA	Anhydride hexahydrophthalique
His ou H	Histidine
HLA	Human Leukocyte Antigen
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMDI	Méthylènedicyclohexyldiisocyanate

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRMAS	High Resolution Magic Angle Spinning
HRMS	High Resolution Masse Spectrometry
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
Hz	Hertz
IAA	Iodoacétamide
IEF	Isoelectric focusing
IgA, IgE, IgG, IGM	Immunoglobuline A, E, G, M
IL	Interleukine
INF- γ	Interférons- γ
IPDI	Isophoronediiisocyanate
J	Constante de couplage scalaire
KE	Key Events
Keap1	Kelch-like ECH-associates protein 1
KJ.mol ⁻¹	Kilojoule par mole
L	Litre
LC	Liquid Chromatography
LC-MS	Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry
LC-MS/MS	Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry
litt.	Littérature
LLNA	Local Lymph Node Assay
Lys ou K	Lysine
M	Molaire (mole par litre)
m	Multiplet
m/z	Rapport masse sur charge
m ²	Mètre carré
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization
mbar	Millibar
MCI	5-Chloro-2-méthyle-4-isothiazol-3-one
MDA	4,4'-Diphénylméthanediamine
MDC	Diméthyle-4,4'-méthylènediphényldicarbamate
Me	Méthyle
mg	Milligramme
MHz	Mégahertz
min	Minute
mL	Millilitre
mm	Millimètre
mmol	Millimole
Mp	Melting point
Mpa	Mégapascal
MPC	Méthyle- <i>N</i> -phénylcarbamate

MS	Mass Spectrometry
MW	Molecular Weight
<i>N</i> -Ac-Cys	<i>N</i> -acétyl-cystéine
<i>N</i> -Ac-His	<i>N</i> -acétyl-histidine
<i>N</i> -Ac-Lys	<i>N</i> -acétyl-lysine
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NBA	<i>N</i> -Bromoacétamide
NBS	<i>N</i> -Bromosuccinimide
ng	Nanogramme
nm	Nanomètre
Nrf2	Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2
Nu	Nucléophile
OECD	Organisation de Coopération et de Développement Economiques
PA	Anhydride phtalique
PAI	Protein Abundance Index
PBS	Phosphate Buffer Solution
PCTFE	Polychlorotrifluoroéthylène
pH	Potentiel hydrogène
<i>p</i> /	Point isoélectrique
PMA/Ce	Cerium phosphomolybdic acid
PPA/NMM	Anhydride propylphosphonique/ <i>N</i> -méthylmorpholine
ppm	Partie par million
PPRA	Peroxidase Peptide Reactivity Assay
Pr	Propyle
PSM	Peptide-Spectrum Match
PTH	Phénylthiohydantoïne
pTLI	<i>p</i> -Tolylisocyanate
<i>p</i> -TsOH	Acide paratoluènesulfonique
PVC	Polyvinyl chloride
PVDF	Polyvinylidène difluorure
QSAR	Quantitative Structure-Activity Relationship
rdt	Rendement
REACH	Registration, Evaluation, Authorization, and restriction of Chemicals
<i>R_f</i>	Rapport frontal
RHE	Reconstructed Human Epidermis
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RPLC	Reversed Phase Liquid Chromatography
rpm	Rotation per minute
rps	Rotation per second
s	Singulet
SDS	Dodécylsulfate de sodium

SDS-PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
S _N 2	Substitution nucléophile de type 2
S _N Ar	Substitution nucléophile aromatique
t.a.	Température ambiante
<i>t</i> -BuOK	<i>tert</i> -Butoxyde de potassium
TCA	Trichloroacétonitrile
TCCA	Acide trichloroisocyanurique
TCR	Récepteur des lymphocytes T
TDI	Toluènediisocyanate
Th0	Lymphocyte T-helper naïf
Th1	Lymphocyte T-helper 1
Th2	Lymphocyte T-helper 2
THF	Tétrahydrofurane
TLC	Thin Layer Chromatography
TLR4	Récepteur humain de type Toll 4
TMEDA	<i>N,N,N',N'</i> -Tétraméthyléthylènediamine
TNF-β	Facteur de nécrose tumorale-β
TOF	Time-of-flight
TPP	Triphénylphosphine
Tris-HCl	Tris(hydroxyméthyle)aminométhane HCl
TsNBr ₂	<i>N,N</i> -Dibromo- <i>p</i> -toluènesulfonamide
Tyr ou Y	Tyrosine
UV	Ultraviolet
v/v	Volume/volume
w/v	Weight/volume
δ	Déplacement chimique

Avant-propos

Avant-propos

Première barrière importante de protection de l'organisme, la peau est en contact permanent avec les molécules de l'environnement. Au contact de la peau, certains produits chimiques peuvent induire des réactions allergiques, principalement cutanées mais parfois respiratoires. L'allergie est aujourd'hui une pathologie qui touche de nombreuses personnes dans le monde et devient un problème majeur de santé publique.

L'allergie de contact est définie comme une réaction d'hypersensibilité retardée de type IV qui s'exprime par une réaction inflammatoire de la peau sous forme d'eczéma, de gonflements (œdèmes), de rougeurs (érythèmes) ou de prurits (démangeaisons). En Europe, l'allergie de contact touche environ 10% à 20% de la population^[1]. L'allergie respiratoire, quant à elle, est une réaction d'hypersensibilité immédiate de type I qui se manifeste principalement sous forme d'asthme et de rhinite allergique. Aux États-Unis, l'asthme professionnel est considéré comme la maladie pulmonaire la plus courante avec de 9% à 15% de tous les cas d'asthme chez l'adulte^[2]. Ce pourcentage ne cesse d'augmenter en raison du nombre croissant de produits chimiques mis sur le marché.

La chimie joue un rôle prédominant dans l'étude des phénomènes qui conduisent à l'allergie cutanée/respiratoire. En effet, les allergènes chimiques sont des molécules de faible poids moléculaire (<1000 Daltons), appelées haptènes, incapables d'activer directement le système immunitaire. Ils doivent se lier de manière covalente à des protéines endogènes pour former des structures immunogènes qui activent, après traitement par des cellules présentatrices d'antigènes, les lymphocytes T. À cet égard, les sensibilisants cutanés favorisent principalement l'activation des lymphocytes Th1 (T-helper 1) induisant la réponse immunitaire à médiation cellulaire. Les sensibilisants respiratoires, quant à eux, induisent principalement l'activation des lymphocytes Th2 induisant la réponse immunitaire humorale associée à la production d'immunoglobulines E (IgE)^[3]. Un grand nombre de produits chimiques, y compris les sensibilisants cutanés et respiratoires, ont été évalués pour leur capacité à réagir avec des peptides contenant un résidu soit lysine soit cystéine^[4, 5]. De façon très intéressante, il a été observé que les sensibilisants respiratoires réagissaient principalement avec les résidus lysines tandis que les sensibilisants cutanés réagissaient

principalement avec les résidus cystéines^[3]. Néanmoins, le lien entre cette sélectivité chimique et l'orientation immunitaire (réponse Th1/Th2) n'est pas encore compris.

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit s'inscrit dans l'étude des mécanismes menant aux réactions allergiques qui pourraient permettre de fournir une meilleure compréhension de la façon dont les allergènes cutanés et respiratoires interagissent avec les protéines épidermiques dans un environnement vivant complexe, et comment cela pourrait orienter différemment la réponse du système immunitaire. Ce travail est basé sur l'utilisation des épidermes humains reconstitués, hautement similaires aux épidermes humains en termes de structure, de composition et d'activité métabolique. Nous proposons de combiner la technique d'analyse par la résonance magnétique nucléaire à haute résolution en rotation à l'angle magique (RMN HRMAS) et l'analyse protéomique par la spectrométrie de masse pour identifier, au niveau moléculaire, des protéines et des sites modifiés dans les épidermes humains reconstitués exposés aux allergènes cutanés et respiratoires.

Le premier chapitre qui suit aborde l'introduction générale de l'allergie de contact et l'allergie respiratoire sous d'un point de vue chimique et immunologique. Puis, nous évoquerons les différentes méthodes d'identification des allergènes. Enfin, le sujet de ce travail de thèse sera présenté.

Chapitre I

Introduction générale

Chapitre I : Introduction générale

Décrite pour la première fois en 1906 par von Pirquet, l'allergie est aujourd'hui un problème de santé qui touche de nombreuses personnes dans le monde. Parmi les différents types d'allergie, l'allergie de contact et l'allergie respiratoire sont les deux formes rencontrées majoritairement dans la vie courante et dans le monde professionnel. Les molécules sensibilisantes, appelées allergènes, peuvent avoir une origine naturelle^[6] ou synthétique^[7] et entrer en contact avec l'organisme par inhalation, ingestion ou contact avec la peau. L'allergie peut se manifester au niveau de différentes parties du corps telles que les yeux, la peau, les voies respiratoires ou encore les voies digestives.

L'allergie devient actuellement un problème majeur de santé publique qui influence gravement la vie quotidienne et professionnelle des patients. Ainsi, la compréhension profonde des mécanismes menant aux réactions allergiques peut permettre d'évaluer les risques liés aux composés chimiques en général et aux composés allergisants en particulier.

I. Allergie de contact

En 1963, Gell et Coombs ont classé pour la première fois les réactions d'hypersensibilité en quatre types^[8]. D'après ces travaux, l'allergie de contact est une réaction d'hypersensibilité retardée ou de type IV. Il s'agit d'une réaction immunitaire à médiation cellulaire, dépendante des lymphocytes T. Elle se manifeste localement sur la peau sous forme d'eczéma, de gonflements, de rougeurs ou de prurits (**Figure I-1**).

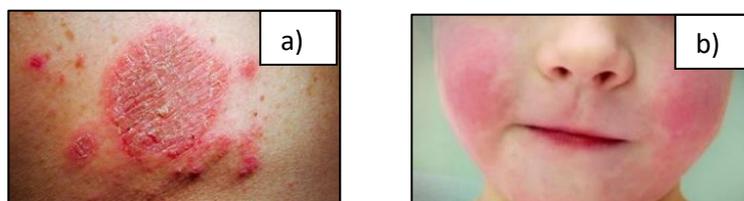


Figure I-1. Exemples d'allergie de contact : a) eczéma, b) rougeurs

1. La peau

La peau représente environ 16% du poids corporel total et constitue donc le plus grand organe

du corps humain^[9]. Avec sa surface de près de 2 m², elle recouvre toute la surface du corps et joue plusieurs rôles dont le plus important est de former une barrière efficace entre « l'intérieur » et « l'extérieur » de l'organisme^[10]. En effet, la peau prévient la diffusion d'eau et d'autres composants du corps vers l'environnement. De plus, la peau aide à réguler la température corporelle, participe à la synthèse de la vitamine D sous l'action des UV^[9, 11]. En tant qu'interface avec l'extérieur, la peau constitue également une première barrière protectrice contre les facteurs exogènes tels que les médicaments, les cosmétiques, les ultraviolets, les micro-organismes, etc... Néanmoins, la peau n'est pas une barrière infranchissable. Au contact de la peau, certains composés peuvent entraîner des effets indésirables, tels que des allergies, des phototoxicités ou le développement de cancers.

Basé sur les différentes spécificités, la peau est divisée en trois couches principales : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (**Figure I-2**).

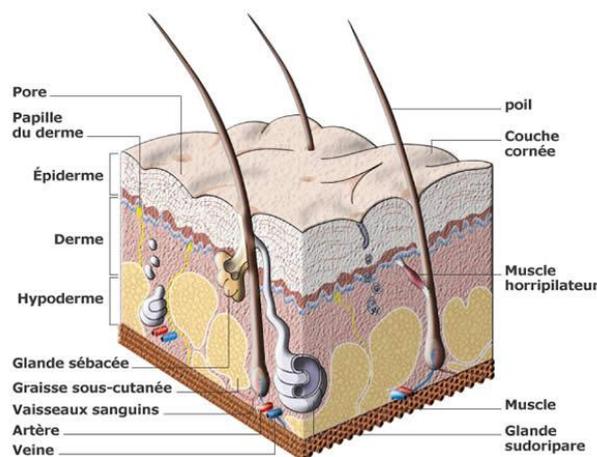


Figure I-2. Représentation d'une coupe schématique de la peau

1.1. L'épiderme

L'épiderme est la couche la plus externe de la peau. Il est constitué majoritairement de kératinocytes qui représentent environ 80% des cellules épidermiques^[11]. Les kératinocytes sont produits dans la couche basale plus interne, puis ils migrent vers la surface de l'épiderme par différenciation cellulaire jusqu'à former une couche de cellules mortes ou couche cornée^[9, 10]. La couche cornée (10-20 µm d'épaisseur) est la première barrière qui empêche la pénétration percutanée des produits chimiques et des microorganismes et qui est capable

de résister aux forces mécaniques. Elle joue également un rôle de la régulation dans la libération d'eau par l'organisme, connue sous le nom de perte d'eau transépidermique. L'épiderme contient également des mélanocytes, des cellules de Langerhans et des cellules de Merkel. Les mélanocytes ont la fonction importante de protéger la peau des ultraviolets. Ils gèrent également la couleur de la peau et des cheveux en produisant de la mélanine. Les cellules de Langerhans sont des cellules immunitaires dendritiques. Elles sont importantes pour la barrière immunitaire de l'épiderme et participent ainsi au mécanisme de l'allergie de contact^[12, 13]. Les cellules de Merkel participent, quant à elles, à la constitution du système nerveux sensoriel de la peau^[11, 14].

1.2. Le derme

Le derme est une couche de tissu conjonctif qui comprend des fibres de collagène, d'élastine et un grand nombre de vaisseaux sanguins. Il contient de nombreuses cellules, dont des fibroblastes et des macrophages. Les fibroblastes sont responsables de la synthèse de la matrice extracellulaire, tandis que les macrophages contribuent à éliminer des particules étrangères et des tissus endommagés^[11, 14].

1.3. L'hypoderme

La couche la plus interne de la peau, l'hypoderme est principalement constitué de cellules graisseuses. Cette couche permet d'amortir les chocs mécaniques, d'isoler le corps contre la chaleur et le froid externe et de stocker l'énergie^[11, 14].

2. Allergie de contact : base immunologique

D'un point de vue immunologique, le processus de l'allergie de contact se déroule en deux phases. La première phase, dite de sensibilisation, a lieu dès que l'allergène rencontre, pour la première fois, le système immunitaire. Cette phase dure de quatre jours à plusieurs semaines^[15]. Elle permet de créer une mémoire immunologique mais aucun signe clinique n'est détecté. La deuxième phase, appelée phase de révélation, se déroule lors d'un deuxième contact entre l'allergène et le système immunitaire préalablement activé. Cette phase dure entre 24 à 72 heures et conduit aux signes cliniques de l'allergie de contact : eczéma, rougeur, gonflement, démangeaisons^[15].

2.1. Phase de sensibilisation

La phase de sensibilisation résulte du premier contact entre le sensibilisant et le système immunitaire. Elle débute par la pénétration des molécules allergisantes, aussi appelées haptènes, dans l'épiderme. Les haptènes, décrits pour la première fois en 1935 par Landsteiner et Jacobs^[16], sont des molécules de faible poids moléculaire (< 1000 Da) avec un caractère lipophile approprié ($\log P \sim 2$) leur permettant de traverser la couche cornée et pénétrer dans l'épiderme^[17, 18]. Trop petits pour être directement pris en charge par le système immunitaire, ils doivent réagir avec les protéines de l'épiderme pour former un complexe antigénique haptène-protéine. La formation du complexe haptène-protéine conduit à la modification de la structure initiale de la protéine. Par conséquent, le système immunitaire reconnaîtra celui-ci comme étant étranger à l'organisme. Ce complexe est alors pris en charge par les cellules de Langerhans et est internalisé en présence d'endopeptidases pour former des peptides^[19]. Certains de ces peptides portant la modification chimique par l'haptène, autrement dit, les antigènes hapténisés, ou les épitopes, se lieront ensuite aux protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) pour former un nouveau complexe ternaire haptène-peptide-CMH. Ce complexe ternaire sera alors externalisé à la surface des cellules de Langerhans. Parallèlement, ces cellules de Langerhans migrent vers le ganglion lymphatique proximal et présentent le complexe antigénique aux lymphocytes T naïfs, Th0. Cette présentation conduit à l'apparition d'une combinaison de trois signaux qui sont nécessaires à l'activation et à la différenciation des lymphocytes Th0^[20]. Le premier signal est la présentation d'un complexe antigénique haptène-peptide-CMH II au récepteur TCR des lymphocytes T. Le deuxième signal est l'interaction entre des molécules de costimulation (CD80, CD86) et son ligand CD28. Le troisième signal est la sécrétion des cytokines par les cellules de Langerhans. En effet, l'interaction entre le récepteur TCR des lymphocytes Th0 et le CMH II des cellules de Langerhans induit la surexpression des molécules de costimulation (CD80 et CD86) sur les cellules de Langerhans. Ces molécules se lient et font augmenter l'expression de son ligand CD28 sur les lymphocytes Th0. Cette interaction CD80/CD86 – CD28 provoque une amplification de l'interaction CD40 – CD154 impliquée dans la production des cytokines par les cellules de Langerhans. La formation de différentes cytokines va orienter la différenciation des lymphocytes Th0 en lymphocytes Th1 ou Th2. En effet, les interleukines 2 (IL-2) favorisent la différenciation des cellules Th0 en cellules Th1

alors que les IL-4 favorisent le développement des cellules Th2 (**Figure I-3**).

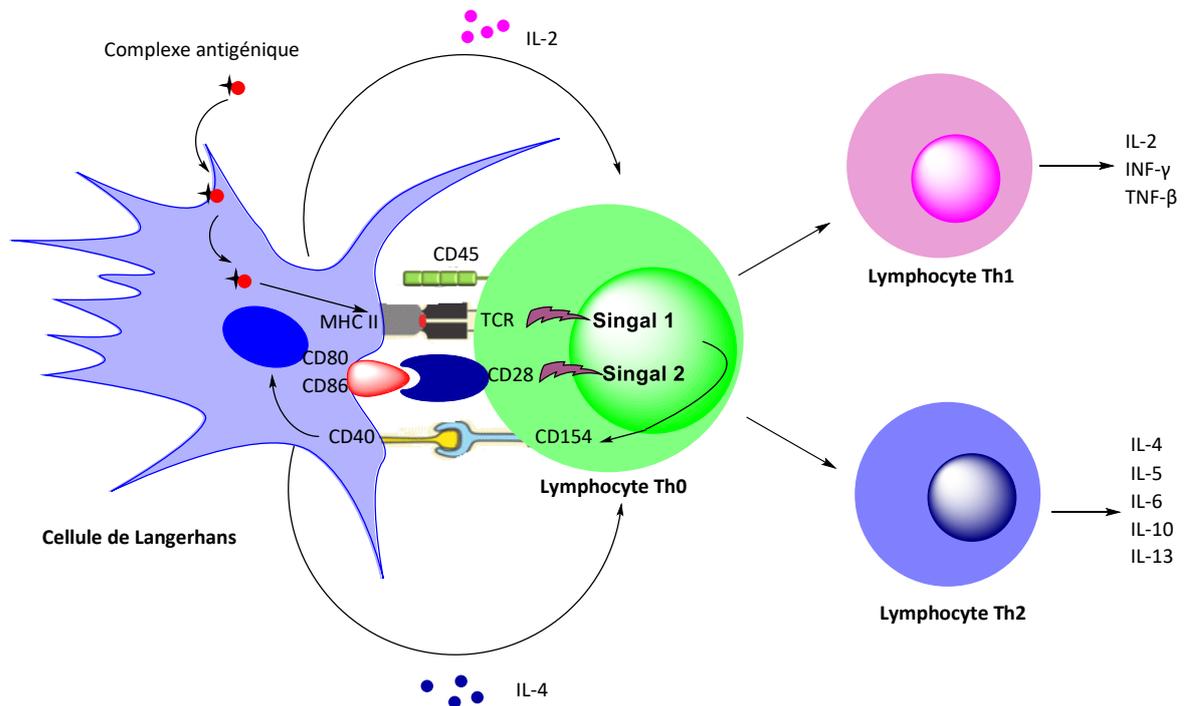


Figure I-3. Activation et différenciation des lymphocytes Th0

Dans le cas de l'allergie de contact, les cellules Th0 se différencient en cellules Th1. Dès que les lymphocytes Th1 sont formés, ils sécrètent un grand nombre des substances pro-inflammatoires dirigées contre l'antigène telles que les IL-2, les interférons- γ (INF- γ) et le facteur de nécrose tumorale- β (TNF- β). Les lymphocytes Th1 vont ensuite quitter les ganglions lymphatiques et migrer vers le derme et l'épiderme. L'individu est alors sensibilisé à l'allergène et son système immunitaire est activé mais aucun signe clinique n'a lieu jusqu'à un prochain contact avec le même allergène (**Figure I-4**).

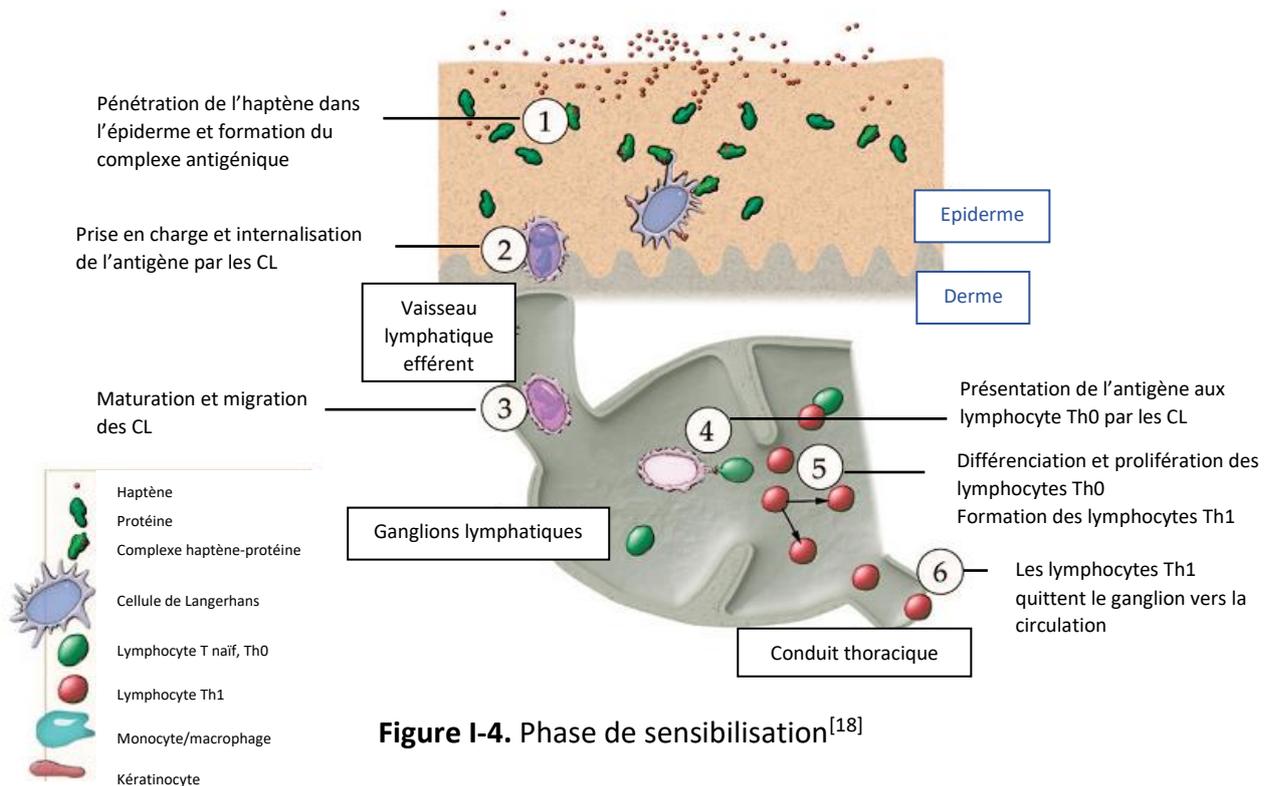


Figure I-4. Phase de sensibilisation^[18]

2.2. Phase de révélation

Lors d'un deuxième contact, l'allergène pénètre dans l'épiderme et forme un complexe antigénique haptène-protéine. Ce complexe est pris en charge d'une manière identique à celle de la phase de sensibilisation par les cellules dendritiques. Ces cellules présentent alors les peptides modifiés aux lymphocytes Th1 qui ont été générés lors de la phase de sensibilisation. Les lymphocytes Th1 reconnaissent l'antigène et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires permettant d'attirer d'autres lymphocytes et de sécréter d'autres cytokines et chimiokines inflammatoires. Cette exploitation des cytokines et des chimiokines va provoquer l'apparition des premiers symptômes cliniques de l'allergie de contact (rougeurs, œdèmes, prurits, etc...) (**Figure I-5**). Ces signes cliniques apparaissent un à quatre jours après le second contact avec l'allergène^[15].

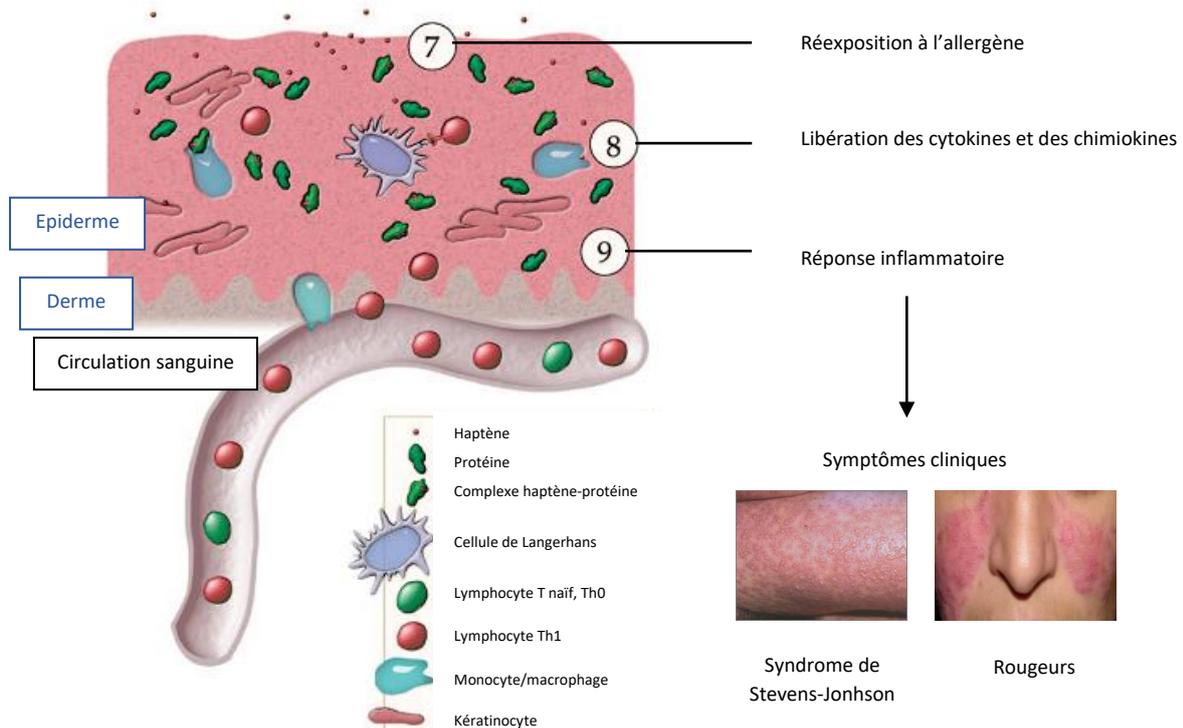


Figure I-5. Phase de révélation^[18]

II. Allergie respiratoire

D'après la classification de Gell et Coombs, l'allergie respiratoire est une réaction d'hypersensibilité immédiate de type I, associée majoritairement à la rhinite allergique et à l'asthme. Il s'agit d'une réaction immunitaire humorale, dépendante des immunoglobulines E. Cette maladie demeure un important problème de santé au travail avec de graves conséquences cliniques^[21, 22]. Contrairement à l'allergie de contact, l'allergie respiratoire se déroule immédiatement, dans les quelques minutes à quelques heures après l'exposition à l'allergène chez un sujet préalablement sensibilisé.

1. L'appareil respiratoire

L'appareil respiratoire est un système important permettant à notre organisme d'échanger les gaz (oxygène et dioxyde de carbone) avec l'environnement extérieur. Il est constitué par plusieurs organes tels que le nez, le pharynx, le larynx, la trachée et les poumons. Nous inspirons l'air par le nez, puis l'air traverse consécutivement le pharynx, le larynx, la trachée pour arriver aux poumons. L'échange de gaz dans les poumons se produit dans les alvéoles qui ont un système sanguin très riche permettant ainsi d'amener l'air en contact avec le sang.

Le sang circule ensuite dans le corps pour fournir l'oxygène et récupérer le dioxyde de carbone dans les organes.

Les différents organes de l'appareil respiratoire sont recouverts par les cellules ciliées et le mucus participant à la protection de l'organisme face aux agents extérieurs tels que des poussières, des particules ou encore des bactéries. La majorité de ces agents extérieurs entrant dans l'organisme sont piégés par le mucus et les cellules ciliées mais comme dans le cas de l'allergie de contact, cette protection n'est pas totale. Ainsi, des allergènes respiratoires peuvent entrer dans l'organisme et déclencher des réactions allergiques. Les allergènes respiratoires de haut poids moléculaire sont reconnus par l'organisme comme des antigènes. En revanche, les molécules allergisantes de faibles poids moléculaire ne peuvent pas provoquer directement une réaction allergique. Elles doivent se lier à une protéine épithéliale pour former un complexe antigénique haptène-protéine.

2. Allergie respiratoire : base immunologique

Comme l'allergie de contact, le processus de l'allergie respiratoire se déroule, d'un point de vue immunologique, en deux phases : une phase de sensibilisation et une phase de révélation.

2.1. Phase de sensibilisation

Possédant de nombreuses étapes communes avec la phase de sensibilisation de l'allergie cutanée, l'allergie respiratoire débute également par la pénétration des allergènes de faible poids moléculaire dans la muqueuse respiratoire. Les allergènes interagissent ensuite avec des protéines présentes dans l'épithélium respiratoire pour former un complexe antigénique haptène-protéine. Ce complexe antigénique est pris en charge et digéré par les cellules dendritiques formant des fragments peptidiques. Parmi eux, les peptides chimiquement modifiés se lieront aux protéines du CMH II afin de former un nouveau complexe haptène-peptide-CMH (antigène) qui est ensuite présenté à la surface des cellules de Langerhans. Ces cellules de Langerhans migrent vers les ganglions lymphatiques régionaux et présentent l'antigène aux lymphocytes Th0. Cette présentation permet d'activer et de différencier des lymphocytes Th0 en lymphocytes Th2 impliqués dans la libération des interleukines IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et IL-13 (**Figure I-3**)^[3, 23-28].

Les lymphocytes Th2 et les cytokines associées jouent un rôle important dans l'activation et la différenciation des lymphocytes B (**Figure I-6**). Effectivement, en même temps que l'activation et la différenciation des lymphocytes T, les lymphocytes B, issus de la moëlle osseuse, captent les complexes haptène-protéines antigéniques via les récepteurs des lymphocytes B (BCR). Ces complexes antigéniques sont également internalisés en peptides hapténisés, qui sont ensuite externalisés à la surface des lymphocytes B via le CMH II. Le complexe haptène-peptide-CMH est spécifiquement reconnu par le récepteur des lymphocytes Th2 (TCR). Le contact entre le lymphocyte Th2 et le lymphocyte B implique l'interaction entre la molécule CD40 exprimée sur la cellule B et son ligand, CD40L ou CD154, qui s'exprime sur la cellule T activée. Grâce à l'interaction importante CD40-CD40L et aux cytokines IL-4, IL-13, les lymphocytes B sont activés et différenciés en plasmocytes et en cellules B mémoires^[29-32].

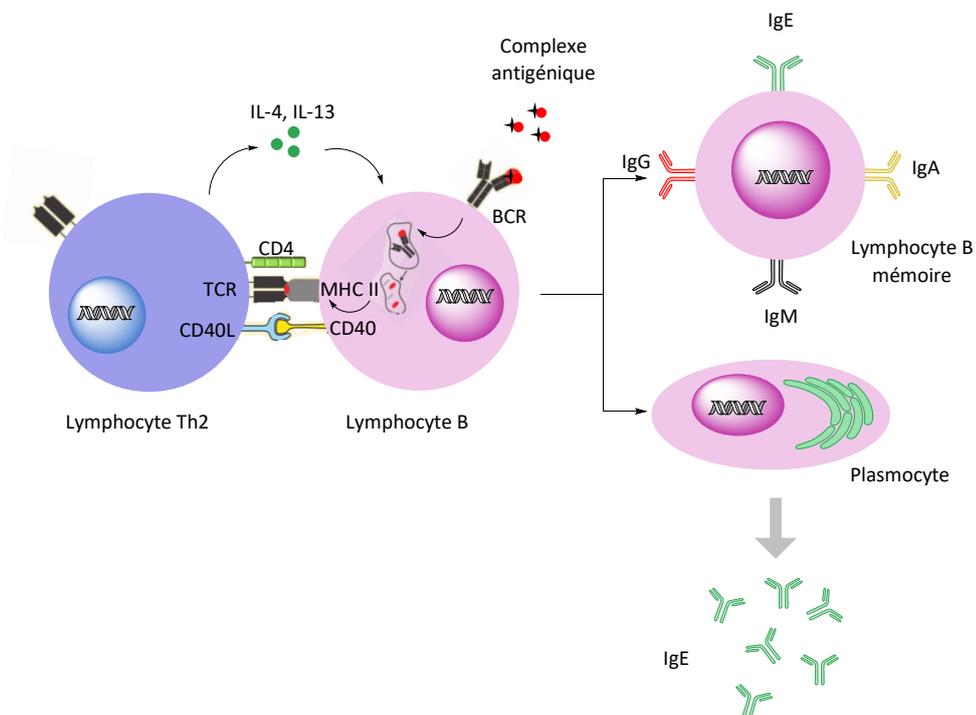


Figure I-6. Activation et différenciation des lymphocytes B

Les cellules B mémoires se distinguent fonctionnellement et physiquement des cellules B naïves et ont souvent des IgG, IgA, IgM ou IgE liées à la membrane. Elles sont également capables d'une recirculation et expansion clonale supplémentaire lors de la réexposition à l'allergène^[30]. Les plasmocytes sont des cellules à durée de vie courte qui ne se divisent plus ou ne répondent plus à l'antigène. Ils produisent des immunoglobulines E qui jouent un rôle

crucial dans la réaction d'hypersensibilité de type I^[30]. En effet, les IgE se lient, via les récepteurs FcεRI à haute affinité, à la surface des mastocytes et des basophiles présents essentiellement au niveau des bronches^[29]. Ainsi, l'organisme est sensibilisé à l'allergène et son système immunitaire est prêt à déclencher un processus d'allergie respiratoire. Mais, comme dans le cas de l'allergie de contact, aucun signe clinique n'est détecté dans cette phase.

2.2. Phase de révélation

Lors du second contact des haptènes avec l'organisme, un complexe haptène-protéine antigénique est formé. Ce complexe est ensuite pris en charge par les cellules de Langerhans et externalisé à leur surface via une protéine CMH II. Cet antigène va être reconnu par les IgE spécifiques sur la surface des mastocytes et des basophiles conduisant à l'activation et à la dégranulation de ces cellules afin de libérer des médiateurs inflammatoires (histamine) responsables des manifestations pathologiques. Ce processus de libération des médiateurs inflammatoires conduit à la réaction allergique respiratoire sous les symptômes cliniques tels que la gêne respiratoire, l'essoufflement, la toux sèche, l'éternuement ou l'irritation des yeux (**Figure I-7**).

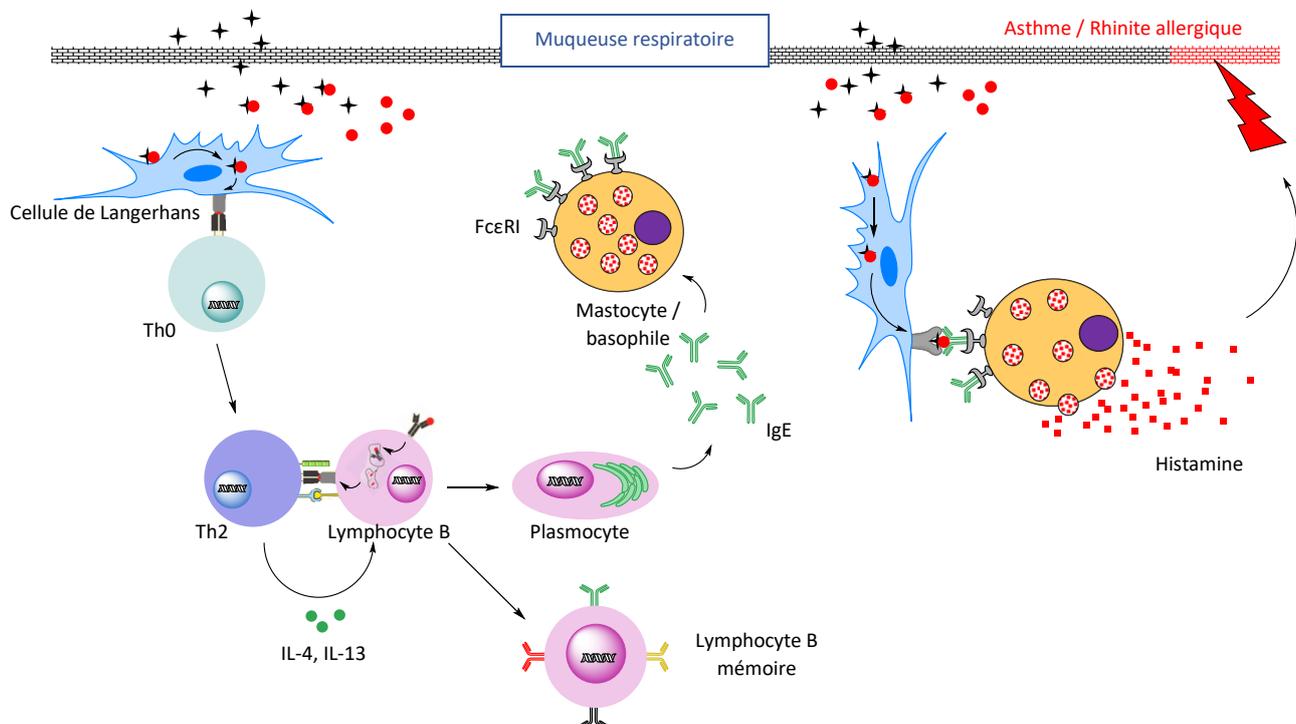


Figure I-7. Allergie respiratoire : phase de sensibilisation et phase de révélation

III. Les allergènes

Les allergènes sont présents dans notre environnement. En entrant dans notre organisme par inhalation ou contact avec la peau, ils peuvent provoquer des sensibilisations respiratoires ou cutanées.

Actuellement, plus de 500 sensibilisants cutanés ont été reconnus^[33, 34]. Ce sont de petites molécules, avec un poids moléculaire inférieur à 500 Da, qui ont les propriétés physico-chimiques leur permettant de traverser la couche cornée de la peau^[35]. Trop petits pour provoquer directement une réponse immunologique, les allergènes de contact réagissent tout d'abord avec une protéine cutanée pour former un complexe antigénique. En effet, les allergènes de contact contiennent souvent des centres réactionnels électrophiles leur permettant de réagir avec des centres nucléophiles des protéines en formant des liaisons covalentes. Dans le cas des allergènes métalliques, tels que le nickel, le cobalt ou le chrome, ce sont des complexes chélates métal-protéine stables par des liaisons de coordination qui se forment.

Dans une revue en 2013, Baur a recensé 372 allergènes différents provoquant un asthme professionnel chez l'Homme^[36]. Ces allergènes respiratoires sont classés en deux groupes : les molécules de haut poids moléculaire, supérieurs à 1000 Da et les molécules de bas poids moléculaire, moins de 1000 Da^[3]. Les composés de haut poids moléculaire sont capables de réagir directement avec le système immunitaire pour provoquer une réponse. Il s'agit des composés rencontrés dans l'environnement telles que les protéines, les pollens, les squames ou les poils des animaux^[37]. En revanche, les allergènes de faible poids moléculaire, trop petits pour être reconnus directement par le système immunitaire, doivent réagir avec une protéine pour former un complexe antigénique pouvant provoquer une réponse immunitaire. À l'heure actuelle, il y a approximativement 40 sensibilisants respiratoires de faible poids moléculaire reconnus^[33, 34]. La plupart d'entre eux sont des isocyanates, des anhydrides d'acides, des sels de chloroplatinate et des colorants. Dans ce manuscrit, nous ne présenterons que le cas des allergènes respiratoires de faible poids moléculaire.

La plupart des allergènes présentent des fonctions chimiques capables de réagir directement avec des protéines, auquel cas il s'agit d'haptènes « vrais ». En outre, il existe également des

allergènes qui doivent passer par une étape de métabolisation ou d'oxydation afin de devenir réactifs, dans ce cas, il s'agit des « pro-haptènes » et des « pré-haptènes », respectivement. Dans ce travail de thèse, nous étudions le cas des haptènes « vrais » électrophiles qui forment directement des complexes stables avec des protéines par des interactions de type nucléophiles-électrophiles.

Comme décrit précédemment, le processus de l'allergie commence par la formation d'un complexe antigénique entre un haptène et une protéine cutanée ou bronchique. C'est une étape clé dans la réaction allergique^[38]. Ainsi, le rôle de la chimie est prédominant dans l'allergie cutanée/respiratoire. Actuellement, il y a un débat sur le rôle des interactions faibles entre des haptènes et des protéines dans le processus d'allergie. En effet, Pichler et ses collègues ont démontré que certains produits chimiques seraient capables de stimuler la prolifération des lymphocytes T spécifiques sans modification covalente des protéines ou des peptides^[39]. De plus, il a été montré que le sulfaméthoxazole est capable de se lier de manière non-covalente avec les HLA (Human Leukocyte Antigen) conduisant à la stimulation des lymphocytes T spécifiques^[40]. Cependant, dans la majorité des cas, la réaction haptène-protéine fait intervenir la formation de liaisons fortes (covalente ou de coordination) difficilement réversibles.

1. Liaisons de coordination

La prévalence de l'allergie aux métaux est élevée dans le monde. Traditionnellement, le nickel, le cobalt et le chrome sont les principaux métaux impliqués dans les allergies de contact. Ils sont présents dans les bijoux, les attaches pour vêtements, les téléphones portables ou même dans le cuir^[41]. Les sels de métaux réagissent avec les protéines épidermiques en formant les liaisons de coordination. Ces liaisons de coordination sont formées entre des métaux pauvres en électrons et des atomes riches en électrons (azote, oxygène, soufre) des chaînes latérales des acides aminés dans les protéines cutanées. Cette interaction, avec une énergie de liaison de 200 KJ.mol⁻¹ à 400 KJ.mol⁻¹ (**Figure I-8**), est moins forte que la liaison covalente. Cependant, elle permet de former des édifices assez stables dans la modification des protéines épidermiques démarrant un processus de l'allergie^[42].

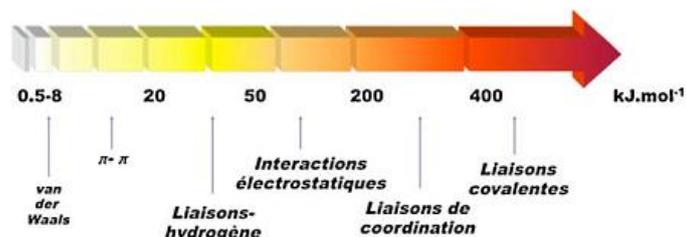


Figure I-8. Niveau d'énergie des différentes liaisons chimiques^[42]

Les complexes de coordination se caractérisent par le nombre de ligands autour du métal et la géométrie du complexe qui dépendent du métal et de son degré d'oxydation. Ainsi, le cobalt (II) interagit avec quatre ligands pour former un complexe tétraédrique. Le nickel (II), quant à lui, forme principalement des édifices plan-carrés avec quatre ligands. Alors que le chrome (III) forme préférentiellement des structures octaédriques avec six ligands (**Figure I-9**)^[42].

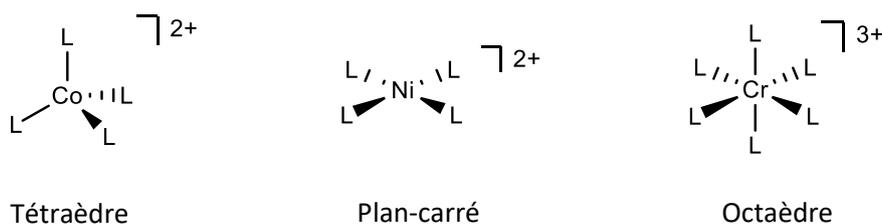


Figure I-9. Exemples des complexes de coordination formés entre un métal et des ligands

^[42]

2. Liaisons covalentes

Les liaisons covalentes sont classées dans un groupe des liaisons fortes dont l'énergie est supérieure à 400 kJ.mol⁻¹ (**Figure I-8**).

Elles se forment lorsque deux atomes partagent une paire d'électrons. Les deux électrons nécessaires à la formation de liaisons peuvent être apportés par les deux partenaires, auquel cas il s'agit d'une réaction radicalaire, ou peuvent être fournis par l'un des atomes, qui est particulièrement riche en électrons, et partagé avec l'atome pauvre en électrons. Dans ce cas, il s'agit d'une réaction entre un nucléophile (riche en électrons) et un électrophile (pauvre en électrons) (**Figure I-10**).

Réaction radicalaire



Réaction nucléophile-électrophile

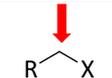
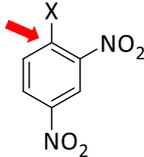
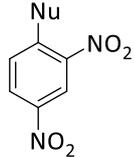
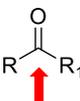
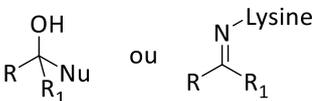
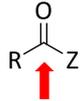
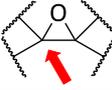
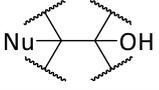
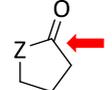
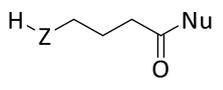


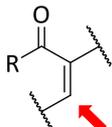
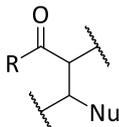
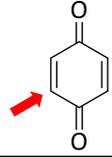
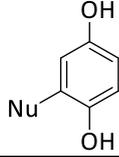
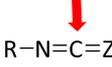
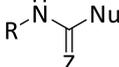
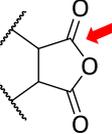
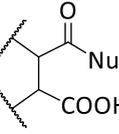
Figure I-10. Formation de liaisons covalentes

De nombreux allergènes ont des propriétés électrophiles et sont capables de réagir avec les chaînes latérales nucléophiles des acides aminés dans les protéines pour former des complexes antigéniques. Parmi les acides aminés, la lysine et la cystéine sont les sites nucléophiles les plus souvent cités, mais d'autres acides aminés comme l'histidine, l'arginine ou la tyrosine peuvent également réagir avec les allergènes électrophiles^[43].

Le **Tableau I-1** montre les groupements chimiques électrophiles les plus fréquemment trouvés dans les allergènes cutanés et respiratoires^[43].

Tableau I-1 : Principaux groupements électrophiles observés dans l'allergie de contact et respiratoires ( : site réactif, Nu : résidu nucléophile des acides aminés)

Groupe	Nom	Mécanisme réactionnel	Produit
	Halogénure d'alkyle X = Cl, Br, I	Substitution nucléophile de type 2 (S _N 2)	R-CH ₂ -Nu
	Halogénure d'aryle X = F, Cl, Br, I	Substitution nucléophile aromatique (S _N Ar)	
	Aldéhyde : R = H Cétone : R ₁ = alkyle/aryle	Addition nucléophile/ Formation de bases de Schiff	
	Ester : Z = OR ₁ Amide : Z = NHR ₁	Addition-Elimination	
	Époxyde	Substitution nucléophile de type 2 (S _N 2)	
	Lactone : Z = O Lactame : Z = NH	Addition-Elimination	

	Aldéhyde, cétone ou ester α,β -insaturés $R = H, R_1$ ou OR_1	Addition nucléophile de type 1,4 ou Michael	
	Quinone	Addition nucléophile de type 1,4 ou Michael	
 $R-N=C=Z$	Isocyanate : $Z = O$ Isothiocyanate : $Z = S$	Addition nucléophile	
	Anhydride d'acides	Addition-Elimination	

Il existe essentiellement cinq types de réactions de base dans la formation de liaisons covalentes dans le cadre de l'interaction haptène-protéine : la substitution nucléophile de type 2 (S_N2), la substitution nucléophile aromatique (S_NAr), la formation de bases de Schiff, l'addition nucléophile de type Michael et l'addition-élimination. Les halogénures d'alkyle et les époxydes subissent facilement des réactions S_N2 . Les aldéhydes aliphatiques et certains dicétones peuvent former des bases de Schiff avec les groupements amines primaires de la chaîne latérale de la lysine. Une variété d'aldéhydes, de cétones et d'esters α,β -insaturés sont impliqués dans les additions nucléophiles de type Michael. Les anhydrides d'acides, les isocyanates et les isothiocyanates peuvent réagir avec les résidus nucléophiles par les réactions d'addition nucléophile ou d'addition-élimination^[18].

IV. Les différentes méthodes d'identification des allergènes

De nos jours, les allergènes sont présents partout dans l'environnement et influence gravement la vie des patients. Il est ainsi nécessaire de les identifier afin de pouvoir contrôler leurs présences dans les produits de consommation. Dans cet objectif, de nombreuses méthodes ont été développées pour déterminer le potentiel sensibilisant des substances chimiques avant leur commercialisation. D'un point de vue historique, les tests *in vivo* sur les animaux sont les premières méthodes développées afin d'évaluer des produits allergisants.

1. Méthodes *in vivo*

Les méthodes *in vivo* sont les méthodes les plus anciennes d'identification des allergènes

cutanés. En 1935, les premiers tests des allergènes ont été réalisés sur les cochons d'Inde^[16]. Dans cette étude, les cochons d'Inde sont exposés aux produits chimiques par injection intradermique. Les symptômes cliniques (rougeurs, érythèmes, etc...) sont observés, après deux semaines d'exposition, sur la peau autour de la position d'injection. Depuis ce test, le test de maximisation chez le cochon d'Inde ou GPMT (Guinea Pig Maximization Test)^[44] et le test de Buehler^[45] ont été développés et utilisés comme méthodes de référence pour l'évaluation de la sensibilisation cutanée durant de nombreuses décennies. Ce sont des tests mesurant la phase de révélation.

1.1. Test de Buehler

Dans le test de Buehler, les cochons d'Inde sont exposés à la substance par application topique. Après 12 jours, temps nécessaire pour la phase de sensibilisation, la substance est réappliquée. Les symptômes cliniques à cette nouvelle exposition sont observés et comparés à ceux obtenus chez les groupes de contrôle. S'il y a plus de 15% des cochons d'Inde, par rapport aux groupes de contrôle, ayant les symptômes cliniques, le pouvoir sensibilisant de la molécule testée est confirmé. Il faut avoir un minimum de 20 animaux pour le groupe de test et de 10 animaux pour le témoin. Ce test dure de 30 à 32 jours.

1.2. Test de GPMT (Guinea Pig Maximization Test)

Le test de GPMT est réalisé également sur les cochons d'Inde et repose sur le même principe du test de Buehler. Cependant, dans ce test, la molécule testée est injectée par voie intradermique. Il faut utiliser un minimum de 10 animaux pour le groupe de test et de 5 animaux pour le groupe de contrôle. Ce test dure de 23 à 25 jours.

1.3. Test de LLNA (Local Lymph Node Assay)

Une nouvelle méthode a été développée par Kimber et Basketter dans les années 1990s : l'essai des ganglions lymphatiques locaux ou LLNA (Local Lymph Node Assay)^[46]. Cette méthode est réalisée sur les souris. Elle est basée sur la capacité des sensibilisants cutanés à provoquer une prolifération lymphocytaire dans les ganglions lymphatiques drainant le site d'application des allergènes^[47, 48]. Elle repose donc sur la mesure des événements induits durant la phase de sensibilisation, contrairement à la méthode de Buehler et à la méthode de

GPMT, décrites précédemment, qui reposent sur la phase de révélation.

En pratique, la molécule à tester est appliquée par voie topique une fois par jour pendant trois jours consécutifs sur le dos de l'oreille des souris. Puis, les souris sont laissées au repos pendant deux jours complets. Au bout du sixième jour, la thymidine tritiée (^3H -thymidine), un nucléoside radioactif utilisé pour mesurer la prolifération des lymphocytes par son incorporation dans l'ADN de la cellule en division, est injectée par la voie intraveineuse à l'animal. Cinq heures plus tard, ces animaux sont sacrifiés et les ganglions lymphatiques proximaux de l'oreille des souris sont prélevés. L'incorporation de thymidine tritiée correspondant à la prolifération lymphocytaire est mesurée par un compteur à β -scintillation (Figure I-11).

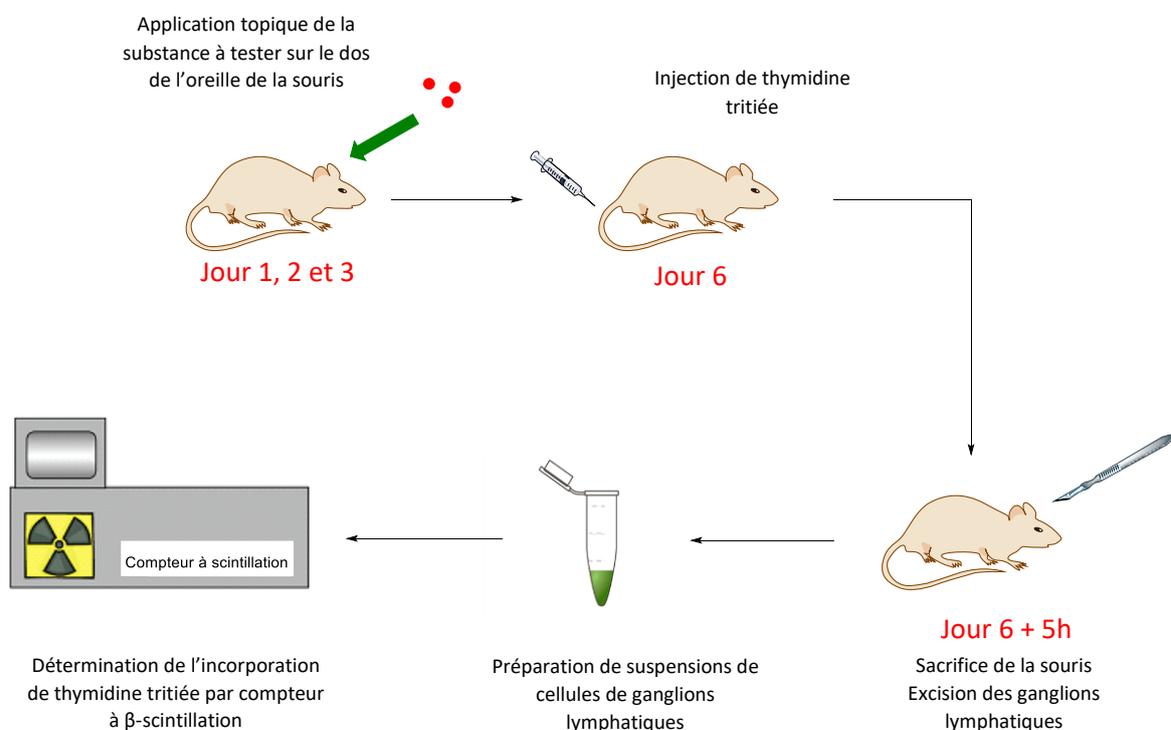


Figure I-11. Protocole expérimental du LLNA

L'interprétation des données LLNA est basée sur l'utilisation d'un index de stimulation (Stimulation Index, SI) qui est égal au rapport de la thymidine tritiée incorporée dans les ganglions de la souris exposée à la substance testée sur celle incorporée dans les ganglions de la souris traitée avec le véhicule seul. Un composé sera classé comme sensibilisant cutané s'il est capable d'induire, à une ou plusieurs concentrations, une augmentation de 3 fois ou plus de l'activité proliférative dans la cellule de ganglion lymphatique par rapport au témoin

simultanément traité avec un véhicule ($SI \geq 3$). La concentration nécessaire pour provoquer la stimulation de trois fois est appelée EC3^[49]. Cette valeur EC3, déterminée en établissant une courbe effet-dose, permet de classer les composés testés en fonction de leur puissance allergisante (**Tableau I-2**)^[50-52].

Tableau I-2 : Classification du potentiel sensibilisant des composés chimiques en utilisant les valeurs EC3 du LLNA

Valeur de EC3 (%)	Potentiel sensibilisant
$10 \leq EC3 \leq 100$	Faible
$1 \leq EC3 \leq 10$	Modéré
$0.1 \leq EC3 \leq 1$	Fort
$EC3 < 0.1$	Extrême

2. Méthodes alternatives associées aux différents événements clés de la sensibilisation cutanée

Ces tests *in vivo*, notamment le LLNA qui prédit le potentiel sensibilisant d'une molécule, permettraient de garantir l'innocuité et d'évaluer le risque des produits cosmétiques avant de les mettre sur le marché. Cependant, avec la tendance mondiale de réduction ou de remplacement des tests sur les animaux, en 2006, le règlement européen sur les produits chimiques (REACH: Registration, Evaluation, Authorization, and restriction of CHemicals) a prescrit l'utilisation de méthodes alternatives aux tests sur les animaux^[53]. Puis, en 2013 le septième amendement à la Directive Européenne sur les produits cosmétiques 76/768/CEE^[54] ainsi que le nouveau règlement sur les produits cosmétiques n°1223/2009^[55] décrètent une interdiction totale de l'utilisation des animaux dans les tests des produits cosmétiques, y compris les produits finis et leurs ingrédients. A cause de cette interdiction, des méthodes alternatives ont été développées. Ces méthodes reposent sur les différents événements clés (Key Events, KE), qui sont définis par l'Adverse Outcome Pathway (AOP), conduisant à la sensibilisation cutanée. Ainsi, dans la prochaine partie, après une introduction de l'AOP et des KE, nous présenterons des méthodes alternatives pour évaluer la sensibilisation cutanée.

Au cours des dernières années, le concept de l'AOP a attiré un intérêt considérable des toxicologues en tant que base pour définir les étapes clés menant à un résultat défavorable pour la santé. L'AOP est un concept qui représente les connaissances concernant le lien entre

des différents événements au niveau moléculaire et un effet indésirable sur l'organisme. L'AOP commence par un événement initial où un produit chimique interagit avec une cible biologique. Cette interaction implique une série de différents événements puis conduit à un effet indésirable. L'AOP permet donc de répertorier les informations des produits chimiques et de favoriser les méthodes d'évaluation des dangers.

En 2012, l'OECD (Organisation de Coopération et de Développement Economiques) a publié l'Adverse Outcome Pathway qui décrit de manière exhaustive les étapes de sensibilisation cutanée^[56]. A partir de ces étapes, l'AOP identifie quatre événements clés qui sont considérés comme essentiels dans le développement de la sensibilisation.

- Le KE1 (événement moléculaire initiateur) est la formation d'un complexe antigénique haptène-protéine stable.
- Le KE2 concerne l'activation des kératinocytes conduisant à la libération des cytokines pro-inflammatoires et à l'induction de voies cyto-protectrices.
- Le KE3 est l'activation des cellules dendritiques.
- Le KE4 repose sur l'activation, la division et la différenciation des lymphocytes T entraînant une sensibilisation cutanée.

Basé sur la connaissance envers ces différents événements d'un processus d'allergie, de nombreux tests alternatifs à l'expérimentation animale ont été développés afin d'évaluer le potentiel allergisant des produits chimiques (**Figure I-12**).

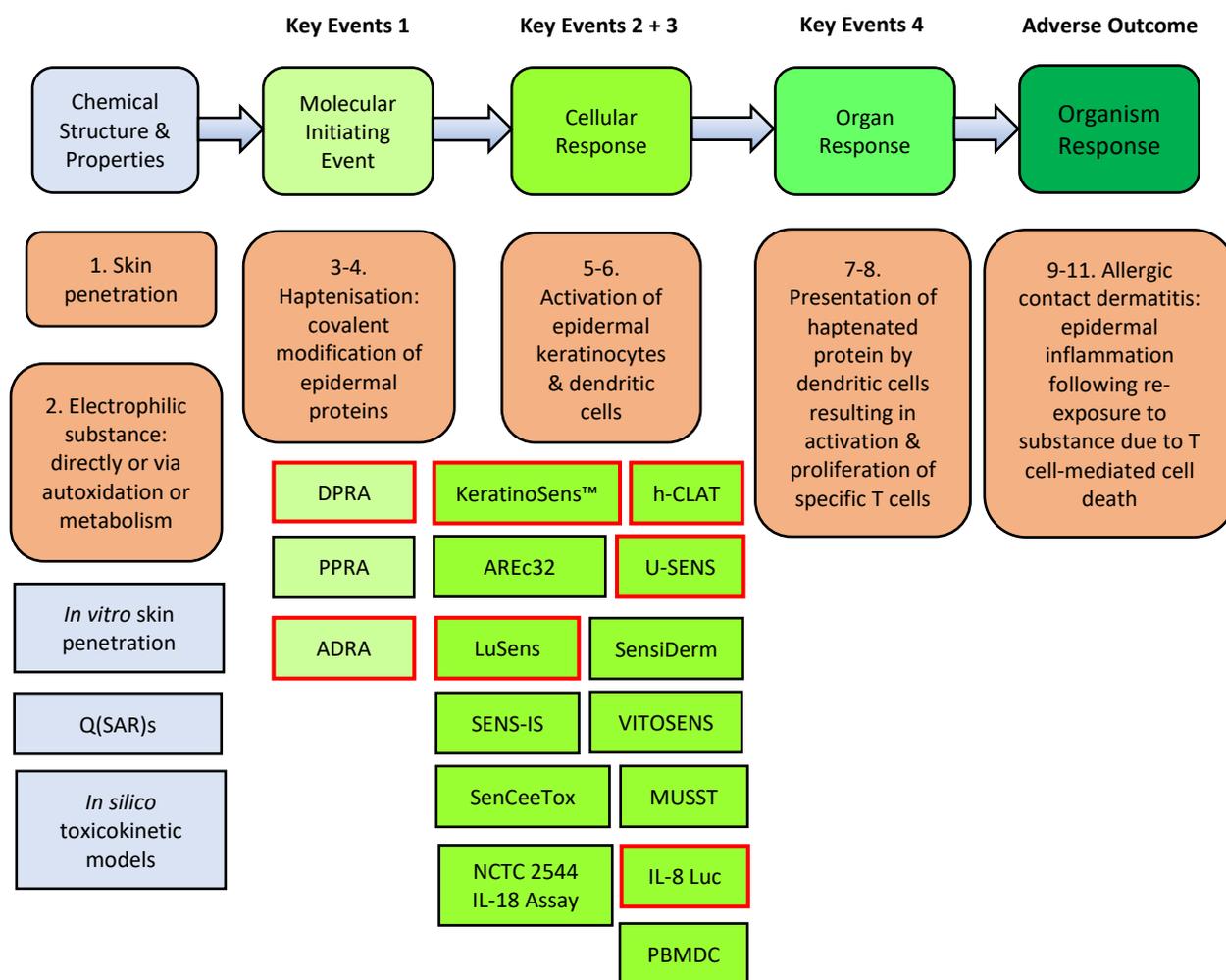


Figure I-12. Méthodes alternatives à l'expérimentation animale et leur correspondance à l'AOP de la sensibilisation cutanée (les méthodes présentées dans les cadres rouges représentent celles actuellement validées par l'OCDE)^[57]

2.1. Événement clé n°1 (KE1) : réaction, réactivité et métabolisme

L'AOP de la sensibilisation cutanée commence par la pénétration d'un allergène dans l'épiderme et passe par une série d'événements intermédiaires jusqu'à l'apparition des effets indésirables sur l'organisme, l'allergie de contact. Pour pouvoir traverser la couche cornée et pénétrer dans l'épiderme, les allergènes doivent avoir le poids moléculaire relativement faible et un caractère lipophile approprié. Dès la pénétration des allergènes dans l'épiderme, ils peuvent réagir directement avec les protéines endogènes ou passer par une étape d'oxydation ou de métabolisation pour devenir réactifs. Ainsi, une possibilité pour prédire la sensibilisation cutanée est le développement des méthodes *in silico* afin de caractériser les

propriétés pharmacocinétiques ou d'identifier les métabolites des produits chimiques.

Comme décrit précédemment, la majorité des allergènes possèdent un ou plusieurs centres électrophiles qui sont capables de réagir avec divers nucléophiles des chaînes latérales des protéines pour former un complexe antigénique. Etant donné que la formation d'un complexe antigénique entre l'haptène et la protéine épidermique est une étape cruciale dans l'induction de sensibilisation cutanée^[38], il a été émis l'hypothèse que cette réactivité pourrait être utilisée afin d'évaluer le potentiel sensibilisant des produits chimiques. Ainsi, en 2004, Gerberick et ses collaborateurs ont développé un test *in chemico* basé sur la réactivité peptidique, nommé Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)^[4].

Dans la partie suivante, nous présenterons tout d'abord des méthodes *in silico*. Puis, nous parlerons du test *in chemico* du DPRA qui est suivi par son dérivé, le test de Peroxidase Peptide Reactivity Assay (PPRA).

a) Méthodes *in silico*

Les méthodes *in silico* utilisent des outils informatiques pour établir les relations de structure – activité des produits chimiques. Les méthodes *in silico* combinent la collection de bases de données sur les pouvoirs sensibilisants des allergènes, le développement de systèmes informatiques dits « experts » et la construction de méthodes quantitatives basées sur la relation structure – activité (Quantitative Structure-Activity Relationship, QSAR).

Les bases de données sont recueillies à partir de nombreux cas d'allergie signalés dans les différents hôpitaux. Une autre base de données provient de travail de Benezra et ses collègues et regroupe toutes les observations issues du journal *Contact Dermatitis* de 1975 à 1982^[58].

Parallèlement à la collection de bases de données, des systèmes informatiques dits « experts » (computer-based Expert Systems) ont été développés dans le but de prédire la sensibilisation des composés chimiques. Certains sont des systèmes basés sur le savoir, tels que DEREK (Deductive Estimation of Risk from Existing Knowledge) qui est basé sur les résultats de 294 allergènes classés par le test GPMT^[59]. D'autres sont des systèmes statistiques (Leadscope, MultiCase). Enfin il existe également le logiciel TOPKAT (TOxicity

Prediction by Komputer Assisted Technology) qui est basé sur les résultats du test GPMT^[60]. Ce logiciel permet de classer la puissance des allergènes comme étant faible, modérée ou forte.

Le QSAR ou relation quantitative structure – activité permet de corréler la structure chimique et l'activité biologique des composés de manière quantitative. Les modèles QSAR peuvent être divisés en modèles globaux qui visent à couvrir tous les sensibilisants ou en modèles locaux qui visent à couvrir uniquement un certain groupe de composés. De plus, le QSAR peut également être divisé en modèles mécanistiques visant à prédire la sensibilisation en fonction des mécanismes réactionnels et en modèles empiriques visant à prédire la sensibilisation d'après le point de vue statistique. Les mécanismes réactionnels entre les allergènes et les protéines sont appliqués dans le modèle QSAR afin de prédire la sensibilisation cutanée : les réactions de substitution nucléophile, les réactions de substitution aromatique, les réactions d'addition-élimination, les réactions de type Michael et la formation des bases de Schiff^[61, 62].

b) Méthodes *in chemico*

Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)

Lors du développement du DPRA, 38 composés ayant différentes valeurs EC3 obtenues en LLNA ont été évalués pour leur capacité à réagir avec le glutathion (GSH) ou trois peptides synthétiques. La séquence des peptides synthétiques était Ac-RFAAXAACOOH, avec X représentant la lysine, la cystéine ou l'histidine. Le ratio de concentration peptide (GSH)/molécule pour ce test est 1 : 100 (GSH), 1 : 50 (Pep-Lys, Pep-His) et 1 : 10 (Pep-Cys). Les composés testés sont incubés avec le GSH (15 minutes), ou les peptides synthétique (24 heures) à 22,5-30 °C. La déplétion du GSH ou du peptide est mesurée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplée à une détection UV à 220 nm. Une déplétion de peptide supérieure à 10% indique que le produit chimique a réagi avec le peptide de départ. Les résultats ont démontré qu'il existe une corrélation significative entre la puissance allergénique et la déplétion du glutathion, de la lysine ou de la cystéine, mais pas de l'histidine. Le peptide histidine a été donc retiré du test.

En résumé, le DPRA est réalisé en deux étapes principales : les produits chimiques sont incubés avec les peptides synthétiques (Pep-Cys et Pep-Lys) pendant 24 heures. Les

échantillons sont ensuite analysés par HPLC couplée à une détection UV permettant de calculer la déplétion du peptide après réaction avec les molécules testées (**Figure I-13**).

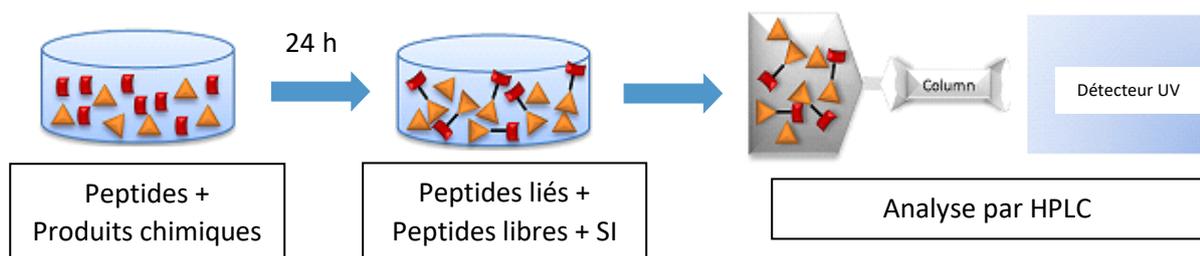


Figure I-13. Principe du Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)^[63]

En 2007, ce test a été complété par la même équipe en étendant le nombre de substances testées à 82, soit 44 nouvelles substances^[5]. Dans le but de classifier le potentiel sensibilisant des produits chimiques, un arbre décisionnel a été construit. Cet arbre décisionnel est établi sur la base des données de déplétion des peptides obtenus avec Pep-Lys et Pep-Cys permettant de classer les produits chimiques en quatre catégories : non sensibilisant, sensibilisant faible, sensibilisant modéré et sensibilisant fort (**Figure I-14**).

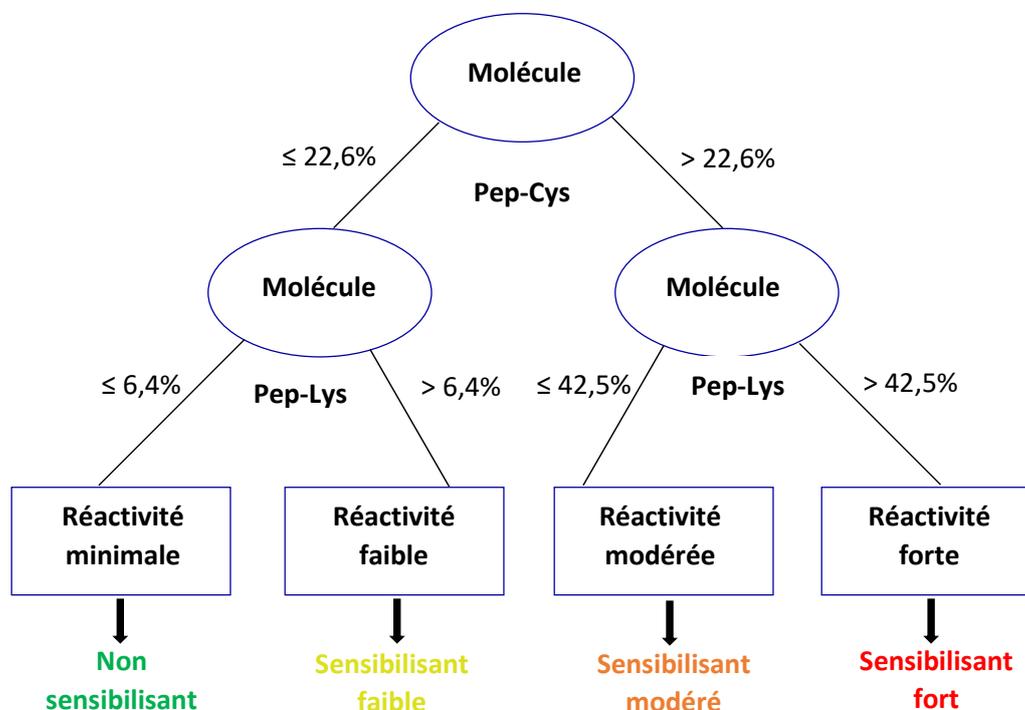


Figure I-14. Classification du potentiel sensibilisant des produits chimiques selon la méthode du DPRA^[5]

Le DPRA a été validé par l'ECVAM (Centre Européen de Validation des Méthodes Alternatives)^[64] et accepté par l'OCDE en juin 2019 sous la ligne directrice 442C^[65].

Peroxidase Peptide Reactivity Assay (PPRA)

Cependant, le DPRA présentait quelques limitations. Une des limitations du DPRA est qu'il ne peut pas mesurer la réactivité des pro-haptènes et de certains pré-haptènes qui ont besoin d'une transformation chimique préalable afin de devenir réactifs vis-à-vis d'acides aminés nucléophiles des protéines. Par conséquent, Gerberick *et al.* ont alors développé à partir du DPRA, un second test, le Peroxidase Peptide Reactivity Assay (PPRA)^[66]. Ce test est un dérivé du DPRA avec l'ajout d'une étape d'oxydation en utilisant un système de peroxydase de raifort et peroxyde d'hydrogène (HRP/P).

Les peptides sont incubés pendant 24 heures en présence de HRP/P et de la molécule à tester. Après incubation, la déplétion du peptide est mesurée par HPLC couplée à une détection par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) permettant de déterminer le potentiel sensibilisant des molécules testées.

Il faut noter que dans le cas des pré-haptènes, aucune différence significative de la déplétion peptidique n'a été observée avec ou sans HRP/P. Ceci est expliqué par un mécanisme d'auto-oxydation des pré-haptènes par l'air. Par contre, les pro-haptènes réagissent avec les peptides uniquement en présence du système HRP/P.

Ainsi, la combinaison de ces deux tests, DPRA et PPRA, permet d'évaluer le potentiel sensibilisant de nombreux composés, y compris les haptènes, les pro- et pré-haptènes.

2.2. Événement clé n°2 (KE2) : l'activation des kératinocytes

L'événement clé n°2 dans l'AOP de la sensibilisation cutanée est l'activation des kératinocytes. En effet, les sensibilisants peuvent réagir avec les protéines à la surface cellulaire et activer les kératinocytes conduisant à la libération de cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-18, et à l'induction de voies cellulaires cyto-protectrices^[67]. La production des IL-18 au niveau intracellulaire lors de l'exposition à des sensibilisants peut être utilisée pour prédire les substances allergisantes. Ainsi, l'Université de Milan a développé le test NCTC 2544 IL-18 pour identifier les sensibilisants. Ce test est basé sur la détection de

l'augmentation intracellulaire des IL-18 des cellules kératinocytes NCTC 2544 exposées aux allergènes^[68].

Les sensibilisants provoquent également l'induction d'une réponse antioxydante/électrophile dépendante de l'élément ARE/EpRE dans les kératinocytes^[69]. En effet, les allergènes se lient à la protéine régulatrice Keap1 (Kelch-like ECH-associates protein 1) qui est lié normalement au facteur de transcription Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2). Des modifications structurales par l'allergène conduisent à la dissociation de Keap1 et son facteur Nrf2. Le Nrf2 libéré interagit avec d'autres protéines et active des gènes cibles qui ont un élément de réponse antioxydant (ARE). Ainsi, basé sur l'augmentation de l'élément ARE dans les kératinocytes exposés aux allergènes, il est possible d'évaluer le potentiel sensibilisant des substances chimiques. En effet, la voie de signalisation Keap1/Nrf2/ARE est la base mécanistique dans le développement des nombreux tests *in vitro* afin d'identifier les substances allergisantes tels que le test d'AREc32, le KeratinoSens™, le LuSens, le SENS-IS et le SenCeeTox. Dans ce manuscrit de thèse, nous ne présenterons que le test KeratinoSens™.

Le test KeratinoSens™ utilise une lignée cellulaire de kératinocytes humains (HaCaT) modifiée sur un gène qui est capable de produire la luciférase en présence de la substance sensibilisante. Ce gène codant pour la luciférase fonctionne sous le contrôle de l'élément ARE du gène humain AKR1C2^[70, 71]. L'induction de la luciférase est donc utilisée pour détecter les allergènes.

Ainsi, la molécule à tester est incubée avec les cellules HaCaT transfectées génétiquement pendant 48 heures. Après lyse cellulaire, la luciférine, substrat de la luciférase qui permet à la luciférase de devenir fluorescente, est ajoutée. La détection de luminescence est mesurée au luminomètre après 20 minutes. La viabilité cellulaire est parallèlement mesurée par un test de MTT. Ce test colorimétrique est basé sur la réduction d'un sel jaune de tétrazolium (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium ou MTT) en cristaux de formazan violets par NAD(P)H dans la mitochondrie cellulaire. Pour valider le test KeratinoSens®, la viabilité cellulaire doit être supérieure à 70%. L'induction de la luciférase est mesurée par luminescence et est corrélée au potentiel allergisant de la molécule testée. Un taux d'induction supérieur à 1,5 fois par rapport à un témoin (correspondant à une augmentation de l'activité du gène de 50%) est considéré comme induisant une réponse

allergique (**Figure I-15**).

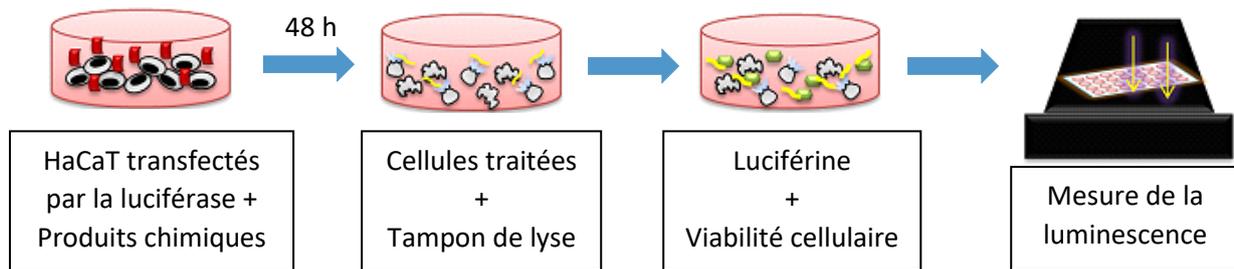


Figure I-15. Principe du test KeratinoSens™^[63]

Ce test a été validé par l'ECVAM^[72] et accepté par l'OCDE en juin 2018 sous la ligne directrice 442D^[73].

2.3. Événement clé n°3 (KE3) : l'activation des cellules dendritiques

Comme indiqué dans l'AOP, l'activation des cellules dendritiques est l'événement clé n°3 dans la sensibilisation cutanée. Dans cette étape, le complexe antigénique haptène-protéine précédemment formé dans le KE1 est internalisé dans les cellules dendritiques pour former des peptides chimiquement modifiés. Ces peptides sont externalisés à la surface des cellules dendritiques via une protéine CMH II. Les cellules dendritiques arrivent ensuite vers les ganglions lymphatiques proximaux, où elles peuvent présenter le complexe haptène-protéine aux lymphocytes T. Cette présentation induit l'activation mutuelle entre la cellule dendritique et la cellule T. L'activation des cellules dendritiques, lors d'une exposition à des sensibilisants, entraîne la sécrétion des cytokines et des chimiokines ainsi que l'augmentation des molécules de costimulation (CD40, CD86 et CD54). Jouant un rôle important dans le processus d'allergie, les cellules dendritiques ont rapidement été proposées comme des candidates prometteuses pour le développement de tests *in vitro* dans l'identification des sensibilisants cutanés. Ainsi, les différents essais *in vitro* tels que le h-CLAT, le MUSST, le U-SENS, l'IL-8 Luc Assay, le PBMDC, le VITOLENS et le SensiDerm ont été développés. Dans la partie suivante, nous parlerons du test représentatif, le h-CLAT (Human Cell Line Activation Test), qui mesure le changement des molécules de costimulation à la surface des cellules dendritiques lors de l'application des allergènes.

La surexpression des marqueurs CD86 et CD54 à la surface des cellules dendritiques en présence d'allergènes est la base du développement des méthodes *in vitro* pour détecter des

sensibilisants. Parmi elles, la méthode h-CLAT est un essai qui mesure les changements de l'expression de ces marqueurs sur une lignée cellulaire de leucémie monocyttaire humaine, les cellules THP-1, après 24 heures d'exposition au produit chimique d'essai. Les cellules THP-1 ont la capacité de se différencier en cellules avec des caractéristiques des cellules dendritiques^[74]. L'augmentation de l'expression de marqueurs de surface est mesurée par cytométrie en flux après coloration cellulaire avec des anticorps (anti-CD86 et anti-CD54) marqués au fluorochrome. L'intensité de fluorescence relative (RFI) des marqueurs de surface par rapport au contrôle est calculée (**Figure I-16**). La substance testée sera répertoriée sensibilisante si elle provoque l'augmentation du CD86 1,5 fois (RFI > 150%) et/ou l'augmentation du CD54 2 fois (RFI > 200%) par rapport à un témoin.

Ce test a été validé par l'ECVAM^[75], et accepté par l'OCDE sous la ligne directrice 442E en Juin 2018^[76].

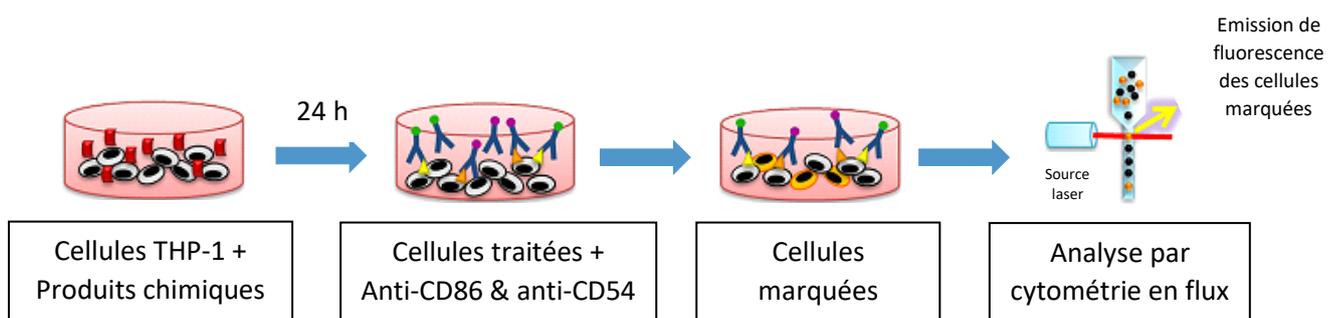


Figure I-16. Principe du test h-CLAT^[63]

2.4. Événement clé n°4 (KE4) : l'activation, la division et la différenciation des lymphocytes T

Comme décrit précédemment, la présentation du complexe antigénique haptène-protéine par les cellules dendritiques induit l'activation et la différenciation des lymphocytes T. Cette étape est l'événement clé n°4 de l'AOP de la sensibilisation cutanée. Cet événement implique également la prolifération des lymphocytes T ainsi que la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires tels que l'IL-2, l'INF- γ et le TNF- β . Ainsi, une possibilité pour prédire la sensibilisation cutanée est le développement des méthodes *in vitro* afin de mesurer la prolifération lymphocytaire ou de caractériser les cytokines formées lors de l'exposition aux allergènes. Cependant, jusqu'à maintenant, aucune méthode mesurant le KE4 n'est disponible.

3. Méthodes d'identification des allergènes respiratoire

Il est important de noter que les tests précédemment décrits ont été principalement développés afin d'évaluer les sensibilisants cutanés. À l'heure actuelle, bien qu'un certain nombre de test aient été publiés pour détecter les allergènes respiratoires, aucune méthode n'est largement appliquée ou entièrement acceptée. Parmi elles, le test IgE sérique et le profilage des cytokines sont deux méthodes relativement simples.

3.1. Profilage des cytokines

Ce test est basé sur le fait que les sensibilisants respiratoires favorisent la différenciation des lymphocytes naïfs Th0 en lymphocytes Th2 associée à la sécrétion des cytokines IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et IL-13, alors que les sensibilisants cutanés induisent une réponse Th1 impliquant à la production d'IL-2, d'INF- γ et de TNF- β . En pratique, les souris sont exposées à la substance à tester par voie topique sur les deux flancs. Cinq jours plus tard, ce traitement est répété. Après cinq jours supplémentaires, la substance testée est appliquée sur le dos des deux oreilles pendant trois jours consécutifs. Les souris sont ensuite sacrifiées et les ganglions lymphatiques sont excisés. Les cytokines sont enfin mesurés afin de déterminer si la substance testée est un sensibilisant respiratoire ou cutané^[77].

3.2. Test IgE sérique

Le test IgE de souris est une nouvelle approche pour l'identification prédictive de sensibilisants respiratoires. Cette méthode est basée sur la mesure des changements de la concentration sérique d'IgE chez les souris suite à une exposition topique à la substance testée. Concernant la procédure, la substance à tester est appliquée sur les deux flancs des souris. Sept jours plus tard, une nouvelle application est répétée sur le dos des deux oreilles des souris. Quatorze jours après le début de l'exposition, les souris sont sacrifiées et le taux d'IgE dans le sérum est mesuré^[78].

Cependant, le changement des IgE sériques n'est pas suffisamment sensible dans certain cas d'allergènes respiratoires tels que le toluènediisocyanate (TDI), l'hexaméthylènediisocyanate (HDI) et l'anhydride hexahydrophthalique (HHPA). En revanche, le profilage des cytokines est une méthode plus efficace permettant d'évaluer de nombreux allergènes respiratoires^[24].

Il est intéressant de préciser que les sensibilisants respiratoires se sont également révélés positifs dans le LLNA et le DPRA, qui sont eux-mêmes des modèles validés pour détecter les allergènes cutanés.

V. Présentation du sujet de thèse

Comme décrit précédemment, la peau est une barrière protectrice majeure contre les facteurs exogènes de l'environnement. La peau est donc une barrière physique mais aussi un organe métaboliquement compétent impliqué dans l'activation/détoxication des produits chimiques et un acteur majeur du système immunitaire. Cependant, l'exposition cutanée aux produits chimiques peut induire des réactions allergiques, principalement cutanées mais également respiratoires.

Le rôle de la chimie est prédominant dans les allergies cutanées/respiratoires. En effet, les allergènes cutanés et respiratoires sont des molécules de faibles poids moléculaire, incapables d'activer directement le système immunitaire. Ils doivent se lier de manière covalente aux protéines endogènes pour former des structures immunogènes qui activent, après traitement par des cellules présentatrices d'antigènes, les lymphocytes T. À cet égard, les sensibilisants cutanés induiront principalement la réponse des lymphocytes Th1, associée à la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires d'IFN- γ , IL-2 et TNF- β . Les sensibilisants respiratoires, quant à eux, induiront principalement la réponse Th2, impliqué à la production des cytokines IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et IL-13 qui favoriseront la production d'anticorps humoraux^[3]. Il faut noter que l'activation des cellules Th1 induit les réponses immunitaires à médiation cellulaire, y compris la réaction d'hypersensibilité retardée de type IV. Alors que la différenciation des cellules Th2 est associée à la réponse immunitaire humorale conduisant à la production d'immunoglobulines E. Pendant longtemps, on a cru que la voie d'exposition, la peau ou les voies respiratoires, définissait le type d'allergie qu'elle provoque. Cependant, les recherches plus récentes ont démontré que l'orientation Th1/Th2 de la réponse était intrinsèque au produit chimique et non au site d'exposition car les sensibilisants respiratoires peuvent déclencher une réponse Th2 lorsqu'ils sont appliqués sur la peau^[23]. De plus, il faut noter que dans les méthodes d'identification des allergènes respiratoires précédemment décrites, les molécules testées sont appliquées par voie topique pouvant induire la sensibilisation respiratoire.

D'autre part, dans le cadre du développement de méthodes alternatives pour l'identification des sensibilisants chimiques, une nouvelle méthode basée sur le KE1, le Direct Peptide Reactivity Assay, a été développée^[4, 5]. Un grand nombre de produits chimiques y compris les sensibilisants cutanés et respiratoires ont ainsi été évalués pour leur capacité à réagir avec des peptides contenant un résidu soit lysine soit cystéine. De façon très intéressante, il a été observé que les sensibilisants respiratoires réagissaient principalement avec les résidus lysines tandis que les sensibilisants cutanés réagissaient principalement avec les résidus cystéines^[3]. On peut donc émettre l'hypothèse que la modification différente des protéines épidermiques par les deux types d'allergènes pourrait induire l'orientation de la réponse allergique. Néanmoins, le lien entre la sélectivité chimique des allergènes et l'orientation du système immunitaire (réponse Th1/Th2) n'est pas encore compris.

Dans ce travail de thèse, nous envisageons donc d'étudier la façon dont les allergènes cutanés et respiratoires interagissent avec les protéines épidermiques dans un environnement vivant complexe, et comment cela oriente différemment la réponse immunitaire. Pour cela, notre stratégie combine la technique d'analyse par résonance magnétique nucléaire à haute résolution en rotation à l'angle magique (RMN HRMAS) et l'analyse protéomique par la spectrométrie de masse pour identifier les protéines modifiées dans les épidermes humains reconstitués exposés aux allergènes cutanés et respiratoires. Dans ce chapitre d'introduction générale, nous présenterons brièvement les épidermes humains reconstitués, la technique de la RMN HRMAS et l'analyse protéomique avant de les étudier plus en détail dans des chapitres suivants.

1. Les épidermes humains reconstitués

Les épidermes humains reconstitués (RHE) présentent une forte similitude avec un véritable épiderme humain en termes de morphologie et d'activité métabolique. Le développement de nouveaux modèles de peau et de nouvelles méthodologies suit une tendance mondiale visant à réduire ou remplacer les tests sur les animaux. Depuis le premier épiderme humain reconstitué obtenu par Rheinwald et Green en 1975^[79], de nombreux modèles des RHE ont été développés et utilisés pour les tests d'irritation cutanée tels que EpiDerm™^[80], CellSystems EST-1000^[81], SkinEthic™^[82], EpiSkin™^[83] et LabCyte EPI-MODEL™^[84].

Dans ce travail de thèse, nous avons choisi de travailler avec le modèle EpiSkin™ (modèle 1,07 cm², EpiSkin, Lyon, France). Ce modèle est un épiderme reconstitué par culture de kératinocytes humains normaux sur une matrice de collagène pendant 13 jours. Sa structure présente une forte similitude avec celle d'un épiderme humain^[85] (**Figure I-17**).

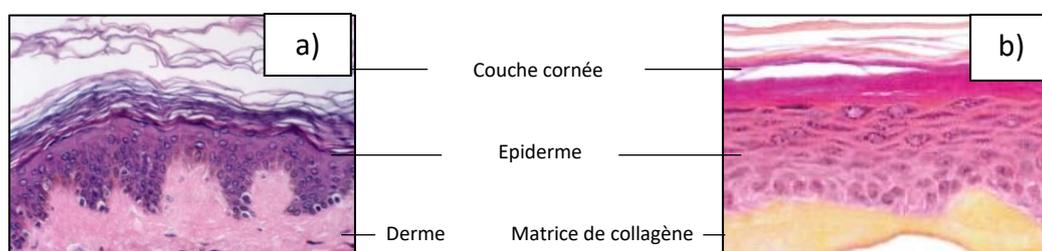


Figure I-17. Coupes histologiques d'un épiderme humain (a) et d'un modèle EpiSkin™ (b)

2. La RMN HRMAS

La RMN HRMAS (High-Resolution Magic Angle Spinning) est la RMN à haute résolution en rotation à l'angle magique. C'est une technique dérivée de la RMN du solide qui permet d'étudier des composés mobiles dans un milieu hétérogène^[86]. Afin de supprimer les différences de susceptibilités magnétiques dans un milieu hétérogène, l'échantillon doit tourner à une fréquence de rotation rapide en formant un angle de 54,7° avec le champ magnétique principal. Cet angle est appelé angle magique (**Figure I-18**).

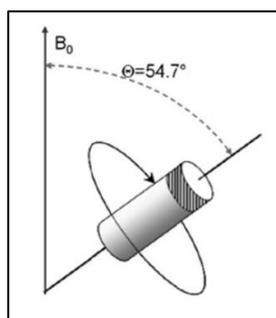


Figure I-18. Rotation à l'angle magique

Cette technique est largement utilisée notamment dans la synthèse en phase solide^[87] mais également dans l'analyse d'échantillons biologiques^[88]. Au laboratoire de Dermatochimie, la RMN HRMAS est une technique du choix dans le suivi de la réactivité des produits chimiques avec les épidermes humains reconstitués^[89-92].

Nous présenterons en détail cette technique lors du quatrième chapitre de ce manuscrit.

3. L'analyse protéomique

Décrite pour la première fois en 1995^[93, 94], l'analyse protéomique est une technique qui étudie les protéomes. Le protéome est l'ensemble des protéines d'une cellule, d'un tissu ou d'un organisme qui se caractérise par sa localisation, ses interactions, ses modifications post-traductionnelles à un moment donné et sous des conditions données. L'analyse protéomique est une technique de plus en plus courante pour caractériser les protéines. En effet, de nombreuses études utilisent cette technique dans l'analyse de changement du protéome ou d'identification des protéines modifiées dans l'interaction des allergènes chimiques avec les lignes cellulaires épidermiques^[95], la peau humaine^[96] ou les épidermes humains reconstitués^[97].

L'analyse protéomique permet l'identification d'un grand nombre de protéines, généralement par séparation des protéines en utilisant l'électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide (2D-PAGE) ou la chromatographie liquide à nano débit (nanoLC), suivie d'une identification par la spectrométrie de masse^[95, 97]. Ainsi, l'analyse protéomique du protéome des RHE traités par un sensibilisant cutané ou respiratoire pourrait permettre d'identifier les protéines modifiées qui pourraient être responsables de l'orientation immunitaire. Nous souhaitons créer un « proteome map » des protéines exprimées dans les RHE après leur incubation avec un allergène cutané ou respiratoire, ce qui permettrait d'identifier les protéines modifiées par ces deux types d'allergènes.

Nous présenterons en détail cette technique lors du cinquième chapitre de ce manuscrit.

4. Choix des allergènes et objectif du travail de thèse

D'après les observations cliniques et les résultats du DPRA^[4, 5], nous avons sélectionné quatre sensibilisants différents (**Figure I-19**).

- Un sensibilisant respiratoire, l'anhydride phtalique (PA) **1** qui présente une forte affinité pour la lysine.
- Une molécule possédant une affinité extrême pour la cystéine. Il s'agit de la 2,3-

diphénylcyclopropénone (DCP) **2** qui est responsable de nombreux cas de l'allergie cutanée sévère.

- Enfin, deux molécules ayant une affinité mixte à la fois pour la lysine et pour la cystéine. Il s'agit du 4,4'-méthylènediphényldiisocyanate (4,4'-MDI) **3** et du *p*-tolylisocyanate **4**.

Ces allergènes sont synthétisés en substitution au carbone 13 dans une ou plusieurs positions réactives afin de pouvoir étudier leurs interactions avec des épidermes humains reconstitués par RMN HRMAS.

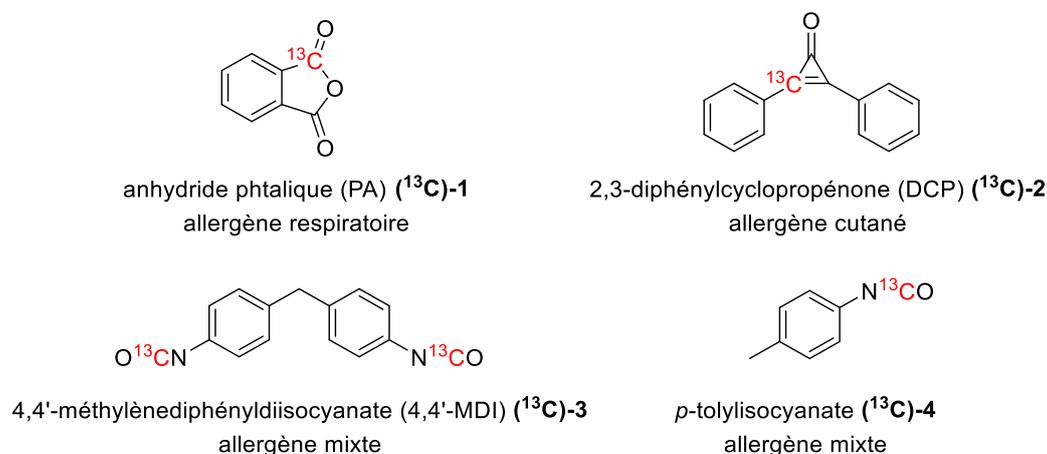


Figure I-19. Structure chimique des allergènes étudiés

Notre objectif est donc de caractériser la réactivité des allergènes vis-à-vis d'épidermes humains reconstitués par la RMN HRMAS et par l'analyse protéomique pour comprendre les événements différents intervenant dans le processus de l'allergie induit par les sensibilisants cutanés et respiratoires.

Ce manuscrit de thèse se compose de cinq parties. Après une introduction générale, nous présenterons la synthèse des allergènes substitués au carbone 13. Puis, le troisième chapitre sera consacré aux tests de réactivité des allergènes vis-à-vis d'acides aminés ainsi que d'une protéine modèle BSA (Bovine Serum Albumin) en solution. Ces tests nous permettront d'obtenir des références pour les études par RMN HRMAS. Nous analyserons dans le quatrième chapitre les résultats de l'interaction entre les allergènes et les épidermes humains reconstitués observés par RMN HRMAS. Enfin, le dernier chapitre concernera l'analyse protéomique des épidermes exposés aux différents allergènes.

Chapitre II

Synthèse des allergènes étudiés

Chapitre II : Synthèse des allergènes étudiés

Dans le but d'étudier la réactivité des allergènes vis-à-vis d'épidermes humains reconstitués, il faut, dans un premier temps, synthétiser les composés. Les allergènes sont synthétisés en substitution au carbone 13 sur un ou plusieurs sites réactifs afin de favoriser les études de leurs interactions avec des épidermes par RMN HRMAS. En effet, la substitution au carbone 13 permet d'augmenter l'abondance de l'isotope 13 qui est le seul visible en RMN. Par conséquent, la visibilité et la résolution des signaux des adduits formés dans les épidermes sont accrues. L'interprétation des résultats est donc facilitée puisque les autres carbones non substitués sont « muets » en spectre RMN du carbone 13. En raison du coût des précurseurs substitués au carbone 13, il a fallu tout d'abord développer des voies de synthèse efficaces et reproductibles en version non substituée avant de les appliquer dans la préparation des molécules substituées au carbone 13.

Dans ce chapitre, nous présenterons les voies de synthèses en version non substituée dans un premier temps, et en série substituée au carbone 13 dans un deuxième temps, des quatre allergènes de notre étude : l'anhydride phtalique **1**, la 2,3-diphénylcyclopropénone **2**, le 4,4'-méthylènediphényldiisocyanate **3** et le *p*-tolylisocyanate **4**.

I. Allergène respiratoire - Anhydride phtalique (PA)

1. Généralités

Décrit pour la première fois par Auguste Laurent en 1836^[98], l'anhydride phtalique (PA) est un produit organique important utilisé dans la fabrication de phtaléines, de plastifiants pour le PVC, de colorants, de résines, de plastiques, de peintures ou de vernis. De part sa large utilisation dans l'industrie, le PA est un allergène respiratoire responsable d'un grand nombre de cas de sensibilisation, se déclarant principalement sous forme de rhinite allergique ou d'asthme en milieu professionnel^[99, 100]. En effet, d'après la classification du LLNA^[101, 102] et du DPRA^[4, 5], l'anhydride phtalique est considéré comme un sensibilisant fort.

Etant un intermédiaire polyvalent pour l'industrie chimique, le PA est produit à plus de 3 millions de tonnes par an dans le monde^[103]. Actuellement, la production industrielle du PA est principalement l'oxydation catalytique du naphthalène ou de l'*o*-xylène, qui sont raffinés à

partir du pétrole ou du charbon. En effet, la première procédure industrielle de fabrication du PA était l'oxydation en phase gazeuse du naphthalène en présence de pentoxyde de vanadium (**Schéma II-1**)^[104].

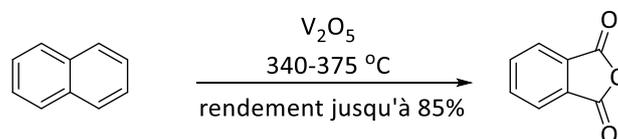


Schéma II-1. Méthode industrielle de synthèse du PA à partir du naphthalène

Au cours des dernières années, l'*o*-xylène est devenu la matière première préférée dans la synthèse commerciale du PA en raison de son faible coût, de sa disponibilité, de sa facilité de transport et de la pureté supérieure du produit obtenu. Ainsi, de nombreuses études ont été menées sur l'oxydation en phase gazeuse de l'*o*-xylène menant au PA en présence de pentoxyde de vanadium (**Schéma II-2**)^[105, 106].

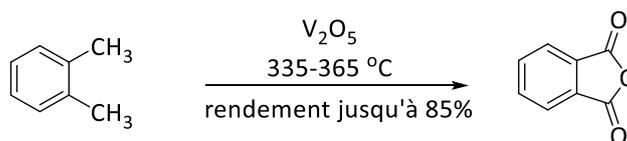


Schéma II-2. Méthode industrielle de synthèse du PA à partir de l'*o*-xylène

2. Choix de la position de substitution au carbone 13

Le PA est une petite molécule possédant deux groupements carbonyles qui sont les sites électrophiles capables de réagir avec des centres nucléophiles des chaînes latérales des protéines. Afin de suivre de manière aisée et efficace sa réactivité avec les protéines épidermiques, nous avons décidé de le synthétiser avec un enrichissement au carbone 13 sur une ou des positions réactives stratégiques. Dans le cas du PA, nous avons choisi les deux groupements carbonyles comme les positions à substituer au carbone 13. Cependant, le PA présente une structure symétrique, il est donc suffisant de substituer l'un des deux carbonyles (**Figure II-1**).

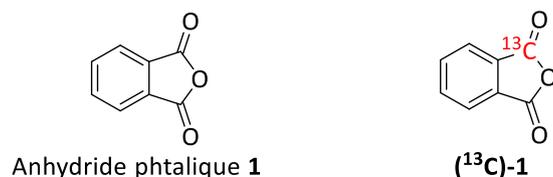


Figure II-1. Anhydride phtalique **1** et son analogue substitué au carbone 13 (**¹³C-1**)

3. Analyse rétrosynthétique du PA substitué au carbone 13 (**¹³C-1**)

Comme nous l'avons dit précédemment, le PA est obtenu dans l'industrie par l'oxydation de l'*o*-xylène ou du naphthalène en présence de pentoxyde de vanadium dans des conditions drastiques (température élevée et haute pression). Par ailleurs, il nous faut introduire une substitution au carbone 13 dans la molécule. Par conséquent, afin d'éviter les conditions difficiles des méthodes industrielles et dans l'objectif de synthétiser le PA substitué au carbone 13, nous nous sommes intéressés à une voie de synthèse plus douce passant par un intermédiaire d'acide phtalique qui subit ensuite une déshydratation pour former le PA.

Lors de précédentes études au laboratoire de Dermatochimie, Joan Guldemann^[107] a mis au point une synthèse de PA substitué au carbone 13 (**¹³C-1**), passant par l'acide phtalique comme intermédiaire (**Schéma II-3**).

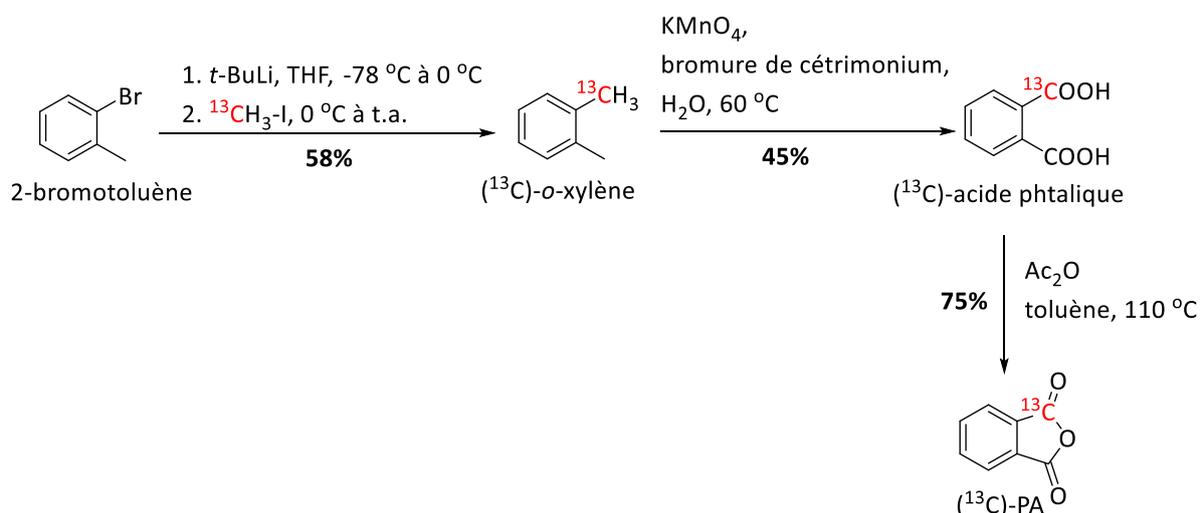


Schéma II-3. Voie de synthèse du PA substitué au carbone 13 à partir du (**¹³C**)-iodométhane^[107]

Dans cette synthèse, la substitution au carbone 13 est introduite à l'aide du précurseur (**¹³C**)-

iodométhane. En effet, dans un premier temps, l'*o*-xylène est préparé par un échange halogène-métal entre le 2-bromotoluène et le *tert*-butyllithium, qui est suivi d'une alkylation par le (^{13}C)-iodométhane. L'*o*-xylène est ensuite oxydé en présence de KMnO_4 et de bromure de cétrimonium en acide phtalique. Ce dernier est finalement cyclisé pour donner le PA. Cette voie de synthèse passe par trois étapes avec un rendement global relativement faible de 19%.

L'étape d'oxydation de l'*o*-xylène avec l'utilisation de métaux de transition est difficile à réaliser avec de bons rendements. Nous avons donc décidé de développer une méthode plus efficace pour la synthèse du PA substitué au carbone 13.

Notre stratégie est d'introduire la substitution au carbone 13 à l'aide du cyanure de potassium substitué, K^{13}CN (270,5€/1g, Eurisotop). Le PA pourra être synthétisé à partir de l'acide phtalique lui-même obtenu par l'hydrolyse d'un dérivé dicyano. L'étape d'hydrolyse plus facile à réaliser que l'oxydation de groupements méthylés devrait permettre d'obtenir le PA avec de bons rendements (**Schéma II-4**).

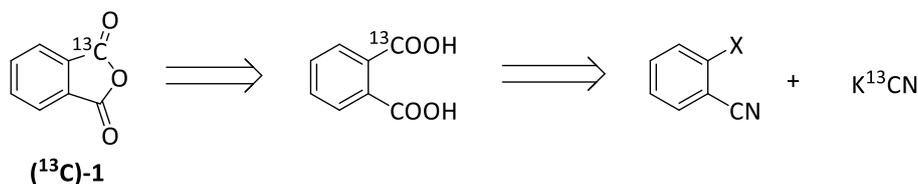


Schéma II-4. Analyse rétrosynthétique du PA substitué au carbone 13 (^{13}C)-1 à partir de K^{13}CN

4. Synthèse du PA substitué au carbone 13 (^{13}C)-1

La première étape de cette synthèse consiste en la formation du 1,2-dicyanobenzène **5** à partir du 2-halogénobenzonitrile et de cyanure de potassium (KCN). Classiquement, les voies de synthèse des nitriles d'aryle incluent la réaction de Sandmeyer et la réaction de Rosenmund – von Braun.

Dans la réaction de Sandmeyer, l'amine aromatique est diazotée par l'acide nitreux formé *in situ* par l'action du nitrite de sodium en présence d'un excès d'acide. Le sel de diazonium obtenu sera décomposé pour donner, en fonction des réactifs présents, l'halogénure d'aryle ou le nitrile d'aryle voulu (**Schéma II-5**)^[108].

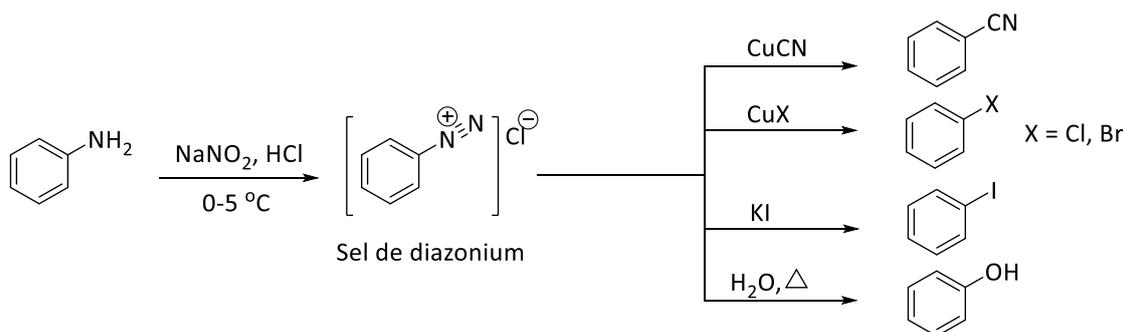


Schéma II-5. Réaction de Sandmeyer

La synthèse de Rosenmund – von Braun est une réaction organique dans laquelle un halogénure d'aryle réagit avec du cyanure de cuivre (I) pour donner un nitrile d'aryle (**Schéma II-6**).



Schéma II-6. Réaction de Rosenmund – von Braun dans la synthèse des nitriles d'aryle

Mais le CuCN substitué au carbone 13 n'est malheureusement pas disponible dans le commerce. Nous avons donc cherché d'autres méthodes de synthèse.

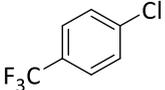
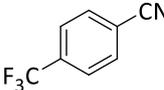
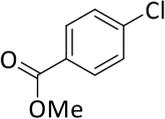
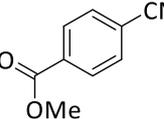
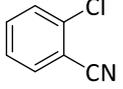
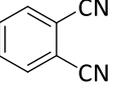
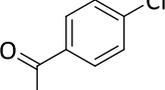
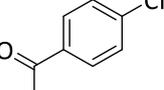
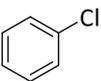
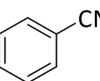
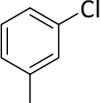
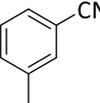
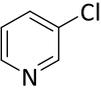
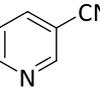
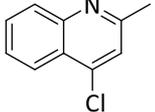
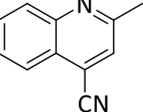
Les nitriles d'aryle peuvent également être synthétisés par la cyanuration d'halogénures d'aryle catalysés par des métaux de transition tels que le palladium^[109-111], le cuivre^[112, 113] et le nickel^[114] en utilisant KCN ou NaCN en tant que source de cyanure. Sachant que la réactivité des composés d'aryle-X est inversement proportionnelle à l'énergie de dissociation de la liaison C-X, l'ordre de réactivité est donc : Ar-I > Ar-Br > Ar-Cl. Généralement, les groupements électroattracteurs sur le cycle aromatique augmentent la réactivité, tandis que les substituants électrodonneurs diminuent la réactivité. En conséquence, les substrats utilisés dans la cyanuration sont plutôt des iodures et des bromures d'aryle et quelques chlorures d'aryles activés. En 2001, Sundermeier *et al.* ont publié la première cyanuration des chlorures d'aryle et d'hétéroaryle activés catalysée par l'acétate de palladium (II), en utilisant KCN comme source de cyanure en présence de 1,5-bis(diphénylphosphino)pentane (dpppe) et de *N,N,N',N'*-tétraméthyléthylènediamine (TMEDA) dans le toluène à 160 °C (**Schéma II-7**)^[111].



Schéma II-7. Synthèse des nitriles d'aryle et d'hétéroaryle selon la méthode de Sundermeier

Différents nitriles d'aryle ont été obtenus et le **Tableau II-1** résume les résultats de cette étude de Sundermeier et ses collègues.

Tableau II-1 : Résumé de la cyanuration des chlorures d'aryle et d'hétéroaryle catalysée par l'acétate de palladium (II)^[111]

Entrée	Chlorure d'aryle	Produit	Conversion (%)	Rendement (%) ^a
1			97	91
2			85	75
3			96	91
4			99	96
5			33	33
6			23	17
7			48	46
8			76	74 ^b

^a : rendement déterminé par GC

^b : rendement isolé

Selon ces résultats, les chlorures d'aryle activés donnent les nitriles correspondants avec de bons à d'excellents rendements (75% à 96%) (**Tableau II-1, entrées 1-4**). Les chlorures d'aryle non activés donnent les produits désirés avec des rendements faibles, de 17% à 33% (**Tableau II-1, entrées 5-6**), tandis que les chlorures de *N*-hétéroaryle fournissent les nitriles

correspondants avec des rendements modérés à bons, de 46% à 74% (**Tableau II-1, entrées 7-8**). Le mécanisme de cette réaction est proposé à la **Schéma II-8**.

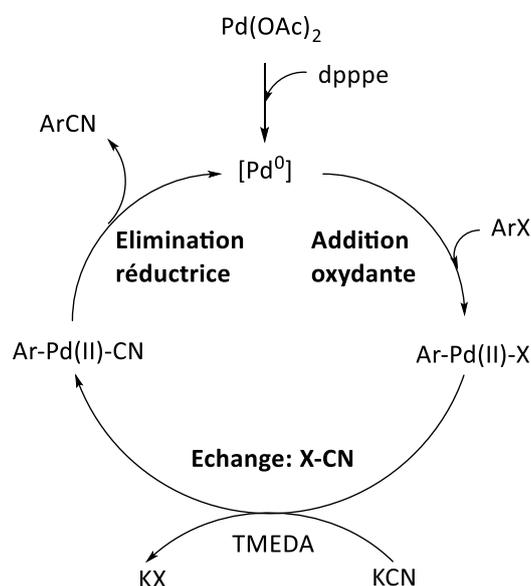


Schéma II-8. Mécanisme de réaction de la cyanuration des halogénures d'aryle et d'hétéroaryle catalysée par l'acétate de palladium (II)

Dans un premier temps, un complexe de palladium (0) est formé spontanément à partir du $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ et du ligand phosphine bidenté, dpppe, par une réduction intramoléculaire^[115]. Ce complexe subit ensuite une addition oxydante de l'halogénure d'aryle pour former un nouveau complexe dans lequel le palladium existe sous forme de palladium (II). Puis, une étape d'échange halogénure-cyanure permet de former un nouveau complexe $\text{ArPd}(\text{II})\text{CN}$. Enfin, une élimination réductrice donne le nitrile d'aryle voulu et reforme le catalyseur sous forme de complexe $[\text{Pd}^0]$.

Dans cette réaction, Sundermeier *et al.* ont constaté que l'ajout d'une base organique, la TMEDA, conduit à une augmentation de la conversion des chlorures d'aryle et donc du rendement des produits formés. Cela est expliqué par l'influence de la TMEDA sur la solubilité du cyanure^[111]. Par ailleurs, les ions cyanures peuvent désactiver le catalyseur au palladium en formant des composés $\text{Pd}(\text{II})(\text{CN})_x^{(x-2)-}$ ($x = 3, 4$) qui ne peuvent plus être réduits en palladium (0) catalytiquement actif^[116]. Sundermeier et ses collègues suggèrent que l'amine chélatante, la TMEDA, est capable de substituer des ions cyanure au centre du palladium, régénérant ainsi un catalyseur au palladium actif^[117].

Cette synthèse permet d'obtenir des cyanures d'aryle avec de bons rendements à partir de sels de cyanure simples tels que KCN ou NaCN. De plus, ces sels de cyanure substitués au carbone 13 sont actuellement disponibles dans le commerce et leur prix est abordable ($K^{13}CN$: 270,5€/1g, $Na^{13}CN$: 389,7€/1g, Eurisotop).

Nous avons donc reproduit cette méthode pour synthétiser le 1,2-dicyanobenzène **5** à partir du 2-chlorobenzonitrile commercial et de KCN (**Schéma II-9**).

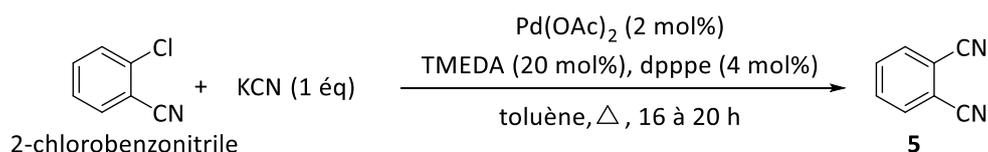


Schéma II-9. Synthèse du 1,2-dicyanobenzène **5** à partir du 2-chlorobenzonitrile

Tableau II-2 : Conditions opératoires testées pour l'obtention du 1,2-dicyanobenzène **5**

Entrée	Température de réaction (°C)	Temps de réaction (h)	Conversion de 2-chlorobenzonitrile (%)	Rdt (%) ^a
1	160	16	72	64
2	170	16	90	84
3	170	20	100	96

^a : rendement isolé

En suivant les conditions réactionnelles de la publication, nous avons synthétisé le 1,2-dicyanobenzène **5** avec une conversion modérée de 72% et un rendement de 64% (**Tableau II-2, entrée 1**). Afin d'améliorer la conversion des produits de départ ainsi que le rendement du 1,2-dicyanobenzène **5**, nous avons modifié légèrement les conditions opératoires en jouant sur la température et le temps de réaction. En augmentant la température de réaction jusqu'à 170 °C avec le même temps de réaction, nous avons effectivement constaté une augmentation de la conversion du 2-chlorobenzonitrile (90%) et un bon rendement (**Tableau II-2, entrée 2**). Les conditions optimales ont été obtenues avec une température de 170 °C et un temps de réaction de 20 heures. Avec ces conditions, nous obtenons un taux de conversion de 100% et un rendement de 96% en produit isolé (**Tableau II-2, entrée 3**).

Nous avons reproduit à l'identique ces conditions pour la préparation du 1,2-dicyanobenzène substitué au carbone 13 (^{13}C)-**5** avec un rendement de 95% (**Schéma II-10**).

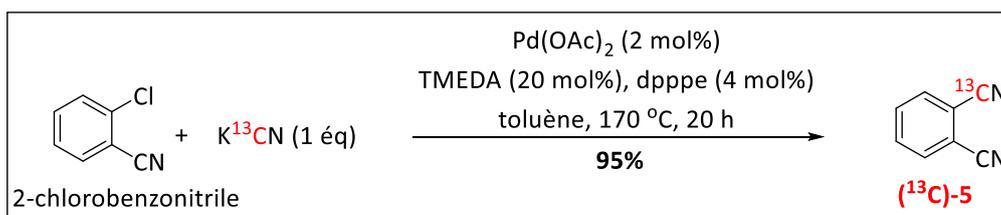


Schéma II-10. Méthode sélectionnée pour la synthèse du 1,2-dicyanobenzène substitué au carbone 13 (¹³C)-5

L'étape suivante consiste à hydrolyser les deux groupements cyanures en acide carboxylique. Dans la littérature, plusieurs méthodes ont été développées pour la synthèse de dérivés d'acides carboxyliques à partir de divers nitriles. La plupart d'entre elles sont réalisées en milieu acide fort ou basique fort à température élevée et avec des temps de réaction longs^[118]. De plus, la conversion de nitriles en acides à l'aide de sels métalliques, tels que le perborate de sodium et les sels de cuivre à des températures élevées, est également bien documentée^[119]. Récemment, le liquide ionique [bmim]HSO₄ a été utilisé pour la conversion de nitriles en acides carboxyliques dans des conditions douces et avec une excellente pureté (Schéma II-11)^[120].

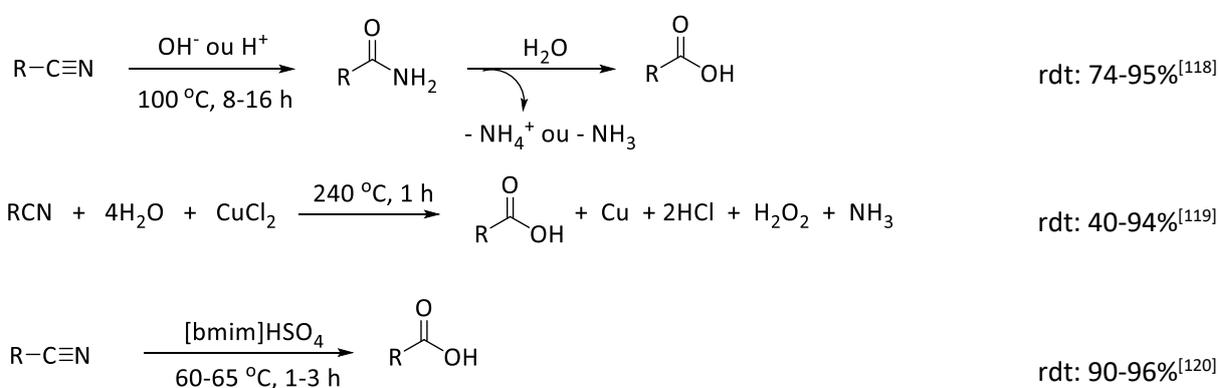


Schéma II-11. Quelques méthodes de synthèse des acides carboxyliques à partir des nitriles

Nous avons choisi d'utiliser la méthode de Yu Zhou et *al.*^[121], qui consiste en une hydrolyse basique à l'aide d'hydroxyde de potassium. Nous avons ainsi obtenu l'acide phtalique **6** à partir du 1,2-dicyanobenzène **5** avec un excellent rendement de 96%. L'acide phtalique substitué au carbone 13 correspondant a été préparé par cette méthode avec un rendement de 95% (Schéma II-12).

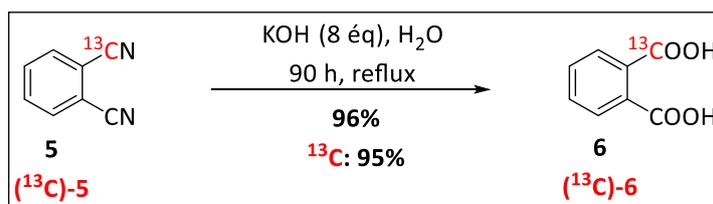


Schéma II-12. Synthèse de l'acide phtalique **6** et son analogue substitué au carbone 13 (¹³C)-**6** par hydrolyse des nitriles correspondants

Enfin, le PA **1** peut être obtenu par une réaction de déshydratation cyclisante de l'acide phtalique **6** en présence d'anhydride acétique^[122]. Ainsi, nous avons pu obtenir le PA **1** avec un excellent rendement de 90%. Le mode opératoire a été reproduit à l'identique pour préparer le PA substitué (¹³C)-**1** avec un rendement également de 90% (**Schéma II-13**).

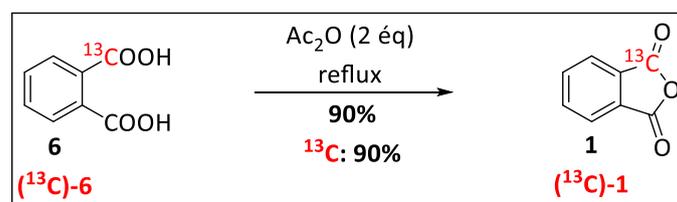


Schéma II-13. Formation du PA **1** et son analogue substitué au carbone 13 (¹³C)-**1** par déshydratation cyclisante

5. Synthèse du PA substitué au carbone 13 : bilan

Une nouvelle méthode de synthèse du PA à partir de KCN a été développée avec succès et nous a donné le PA **1** avec un rendement global de 83%. (¹³C)-**1** a été obtenu en reproduisant cette procédure à partir de K¹³CN, avec un rendement global similaire de 81% (**Schéma II-14**).

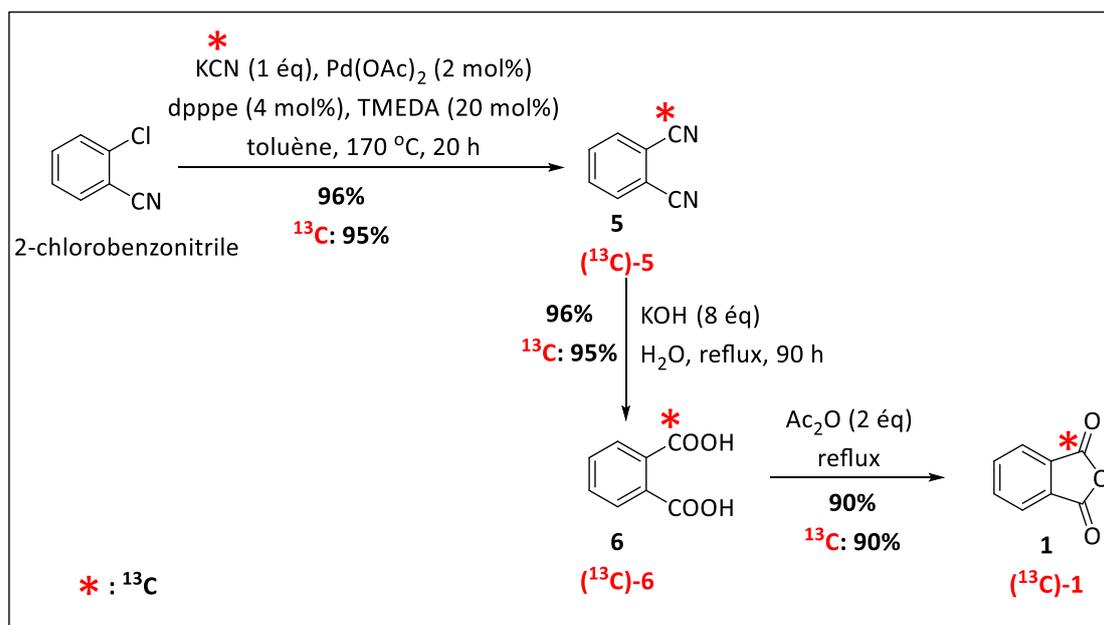


Schéma II-14. Bilan de la synthèse du PA substitué au carbone 13 (^{13}C)-1 à partir de K^{13}CN

II. Allergène cutané - 2,3-Diphénylcyclopropénone (DCP)

1. Généralités

Synthétisée pour la première fois en 1959 par Breslow *et al.*^[123], la 2,3-diphénylcyclopropénone (DCP) est essentiellement utilisée dans la lutte contre l'*alopecie areata*. Cette maladie entraîne la perte des cheveux, et peut toucher des hommes ou des femmes à n'importe quel âge. Son étiologie est incertaine, bien que des facteurs immunologiques, génétiques et environnementaux puissent jouer un rôle important dans le développement de la perte de cheveux permanente ou temporaire^[124]. L'*alopecie areata* est considérée comme une maladie auto-immune générée par les lymphocytes T cytotoxiques dans laquelle l'organisme s'attaque à ses propres follicules pileux et supprime ou arrête la croissance des cheveux^[55, 125]. Il est possible que 5% des cas d'*alopecie areata* puissent se transformer en *alopecie totalis* et 1% des cas aboutissent à l'*alopecie universalis*. Dans les cas d'*alopecie totalis*, les patients présentent une perte totale de cheveux alors que les patients perdent également les poils, y compris les sourcils et les cils dans les cas d'*alopecie universalis*^[55].

Dans le traitement de l'*alopecie areata*, il n'existe pas de norme d'or. Les corticostéroïdes

sont utilisés par voie topique (bétaméthasone, clobétasol dipropionate)^[126, 127] et par voie intra-lésionnelle (triamcinolone acétonide)^[128] afin de supprimer la réaction inflammatoire auto-immune observée dans l'alopecie. Le minoxidile^[129] et le tacrolimus^[130] sont les autres traitements topiques. Ils inhibent la prolifération des cellules T et la transcription du gène des cytokines IL-2, IFN- γ , TNF- α qui interviennent dans l'initiation de la réponse immunitaire dans l'alopecie. Cependant, l'utilisation de tacrolimus est limitée par l'Administration des Aliments et des Médicaments des Etats Unis (Food and Drug Administration, FDA) en raison du risque de développement de tumeurs malignes^[131].

En 1983, Happle *et al.* ont rapporté pour la première fois une utilisation de la diphénylcyclopropénone (DCP) dans le traitement de l'alopecie areata. Depuis, le traitement topique avec la DCP est considéré comme l'un des traitements le plus efficace pour l'alopecie areata avec des taux de réussite allant de 4% à 85%^[132, 133]. Son mécanisme d'action n'est pas complètement compris. Bien que la DCP est actuellement acceptée le plus largement dans le traitement de l'alopecie areata, elle provoque souvent des effets indésirables comme le développement d'allergies de contact^[134, 135]. En effet, la DCP a été classée comme un sensibilisant extrême selon le LLNA^[101, 102] et le DPRA^[4, 5].

2. Choix de la position de substitution au carbone 13

La DCP est une petite molécule tricyclique dont la structure est particulière. En effet, elle contient un cycle cyclopropénique, formé par trois atomes de carbone ayant une tension de cycle élevée et sur lequel une fonction carbonyle est présente. La réactivité chimique de la DCP est donc générée par le groupement carbonyle et le cycle cyclopropénique. En effet, la double liaison C=O est fortement polarisée, avec une charge négative partielle sur l'oxygène et une charge positive partielle sur le carbone. Ce dernier très électrophile, peut réagir avec des résidus nucléophiles. De plus, la double liaison de l'alcène fait partie d'un système conjugué avec la fonction carbonyle voisine. Cette localisation particulière permet de rendre la double liaison C=C électrophile donc réactive vis-à-vis de résidus nucléophiles. De manière générale, un carbone hybridé sp^2 possède des angles de 120° , or dans le cas de la DCP, chaque sommet du cycle de la cyclopropénone a un angle théorique de 60° . Cela implique une tension de cycle élevée qui peut être diminuée par l'ouverture du cycle suite à une addition nucléophile sur les sites électrophiles.

Nous avons envisagé de substituer l'une de ces trois positions électrophiles du cycle cyclopropénone de la DCP par un carbone 13 pour étudier sa réactivité envers les résidus nucléophiles. Cependant, la DCP présentant une symétrie, nous avons choisi d'enrichir au carbone 13 l'un des carbones de l'alcène (**Figure II-2**).

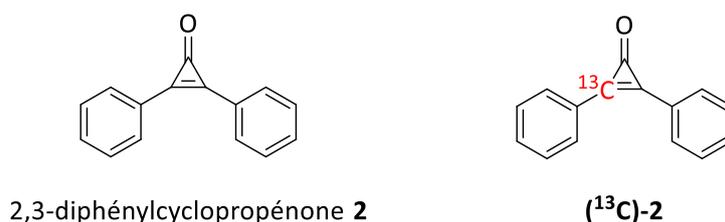


Figure II-2. 2,3-Diphénylcyclopropénone **2** et son analogue substitué au carbone 13 (^{13}C)-**2**

3. Analyse rétrosynthétique de la DCP substituée au carbone 13 (^{13}C)-**2**

La première synthèse de la DCP a été développée par Breslow *et al.*^[123] (**Schéma II-15**).

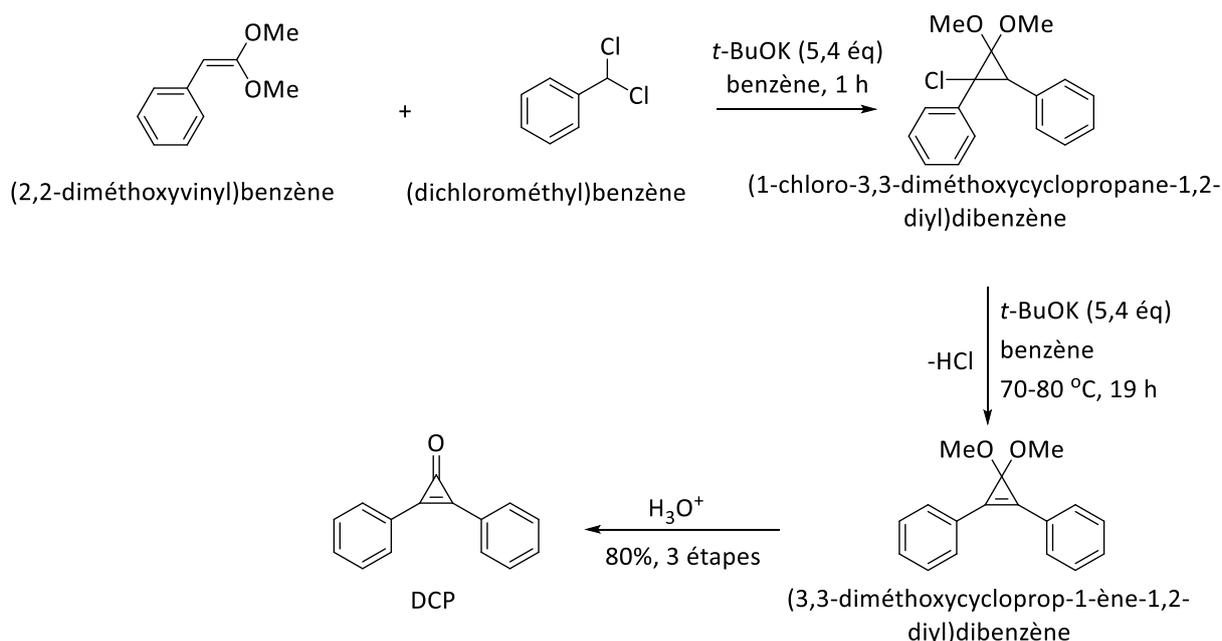


Schéma II-15. Première synthèse de la DCP selon Breslow *et al.*

Elle est basée sur l'addition d'un carbène sur du (2,2-diméthoxyvinyl)benzène pour former le (1-chloro-3,3-diméthoxycyclopropane-1,2-diyl)dibenzène. Le carbène est lui-même obtenu *in situ* à partir du dichlorométhylbenzène. Le composé cyclique obtenu est ensuite traité par une base afin d'éliminer HCl pour donner le (3,3-diméthoxycycloprop-1-ène-1,2-

diyl)dibenzène qui est enfin hydrolysé en milieu acide pour obtenir la DCP avec un bon rendement de 80%. Cependant, le (2,2-diméthoxyvinyl)benzène et le dichlorométhylbenzène ne sont pas disponibles en version substituée au carbone 13. Ainsi, cette méthode ne nous permet pas de synthétiser la DCP substituée.

Une autre méthode de synthèse de la DCP a été publiée en 2014 par Cai *et al.*^[136] En se basant sur le travail de Poloukhine et Popik^[137], ils ont synthétisé la DCP à partir du tétrachlorocyclopropène et du benzène à l'aide du trichlorure d'aluminium (**Schéma II-16**). En effet, en présence du trichlorure d'aluminium, le tétrachlorocyclopropène est transformé en cation trichlorocyclopropénium. Ce dernier est ensuite arylé par le benzène, suivi d'une hydrolyse pour former la DCP avec un bon rendement de 85%.

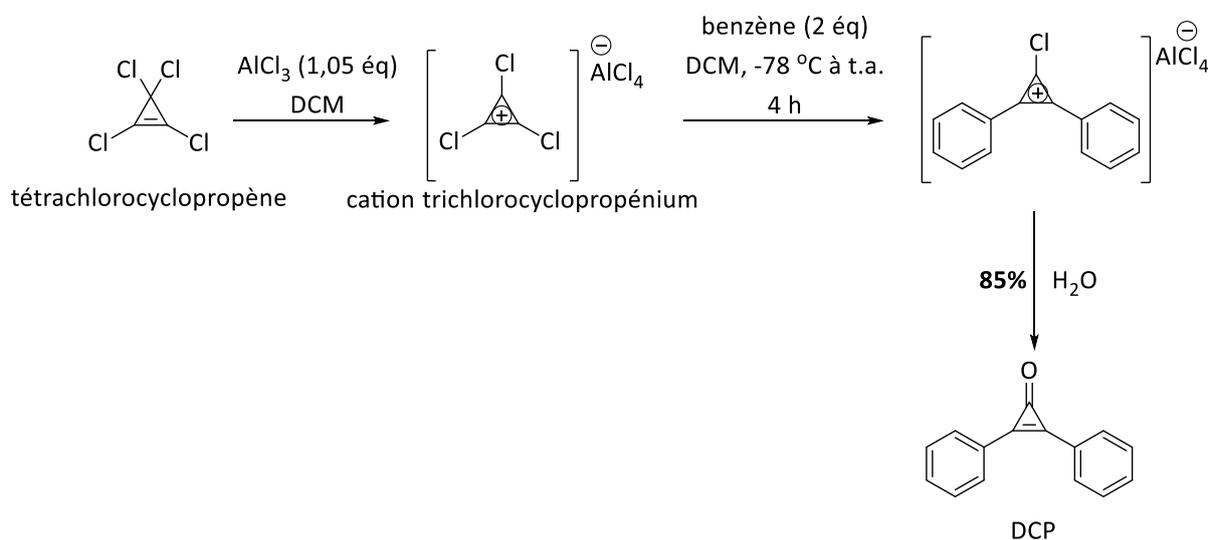


Schéma II-16. Synthèse de la DCP selon la méthode de Cai *et al.*

Malheureusement, la matière première, le tétrachlorocyclopropène, n'est pas disponible en version substituée au carbone 13. Nous avons donc cherché d'autres méthodes de synthèse de la DCP.

Plus récemment, en 2020, Zhou *et al.*^[138] ont publié une voie de synthèse de la DCP basée sur les travaux de Breslow *et al.*^[139] La nouvelle étape de cette synthèse est la préparation de la 1,3-diphénylacétone à partir de l'acide phénylacétique en présence du *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et de la 4-diméthylaminopyridine (DMAP). La 1,3-diphénylacétone obtenue avec de bon rendement est ensuite transformée en DCP selon la

méthode de Breslow. En effet, la bromation de la 1,3-diphénylacétone permet d'obtenir la 1,3-dibromo-1,3-diphénylacétone avec un excellent rendement de 92%. Cette dernière est finalement traitée avec la triéthylamine entraînant l'élimination de HBr pour conduire à la DCP avec un rendement de 60% (**Schéma II-17**).

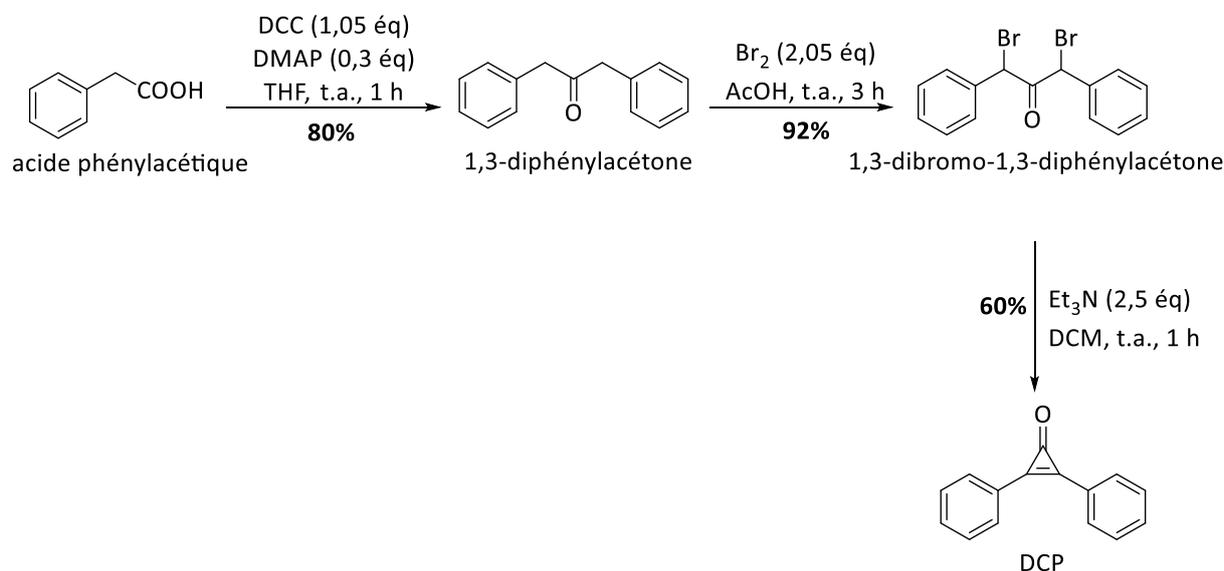


Schéma II-17. Synthèse de la DCP selon la méthode de Zhou *et al.*

Pour notre synthèse, il nous faut tout d'abord préparer la 1,3-diphénylacétone substituée au carbone 13 en position α dans le but de synthétiser la DCP substituée. Cependant, en utilisant l'acide phénylacétique- α - ^{13}C ($\text{C}_6\text{H}_5^{13}\text{CH}_2\text{COOH}$), cette réaction ne permet que de former la 1,3-diphénylacétone substituée aux deux positions α , nous obligeant à utiliser deux équivalents d'acide phénylacétique. De plus, le prix onéreux de l'acide phénylacétique- α - ^{13}C (605,45€/1g, Sigma-Aldrich) est également un inconvénient de cette synthèse.

En analysant toutes les méthodes possibles de la littérature, nous pouvons remarquer que la 1,3-diphénylacétone est un intermédiaire important dans la synthèse de la DCP substituée au carbone 13. Ainsi, notre stratégie est tout d'abord de préparer la 1,3-diphénylacétone substituée à l'aide de l'acide benzoïque substitué commercial (106€/1g, Eurisotop). Par comparaison le coût de l'acide benzoïque et l'acide phénylacétique substitué au carbone 13, nous espérons que cette synthèse de la 1,3-diphénylacétone en plusieurs étapes sera plus efficace que celle en une étape de Zhou *et al.*, dans laquelle deux équivalents du précurseur substitué beaucoup plus cher sont utilisés. La 1,3-diphénylacétone sera ensuite transformée

en DCP selon la méthode de Breslow *et al.* (**Schéma II-18**).

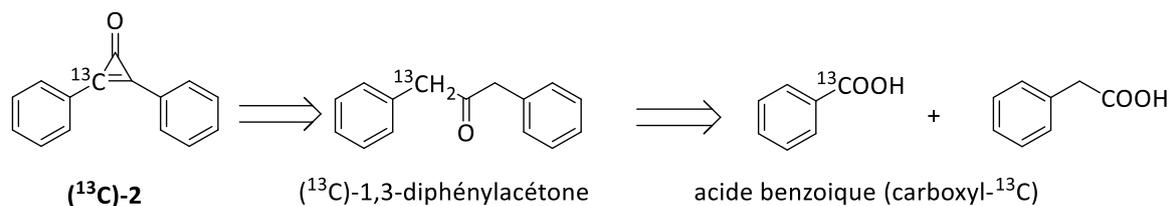


Schéma II-18. Analyse rétrosynthétique de la 1,3-diphénylcyclopropénone (^{13}C)-2 à partir de l'acide benzoïque substitué au carbone 13

4. Synthèse de la DCP substituée au carbone 13 (^{13}C)-2

Dans le cadre de la synthèse de la 2,3-diphénylcyclopropénone substituée au carbone 13 (^{13}C)-2, la 1,3-diphénylacétone substituée au carbone 13 est tout d'abord préparée à partir de l'acide benzoïque (carboxyl- ^{13}C , 99%) et de l'acide phénylacétique. L'acide benzoïque sera transformé en chlorure de benzyle, à partir de l'alcool benzylique. Ce dérivé chloré sera ensuite transformé en chlorure de benzylmagnésium correspondant. Ce réactif de Grignard formé *in situ* sera finalement couplé avec un dérivé de l'acide phénylacétique pour former la 1,3-diphénylacétone.

Ainsi, la première étape de cette synthèse est une réduction de l'acide benzoïque commercial en alcool benzylique **7**. Dans la littérature, de nombreuses méthodes sont proposées en utilisant différents agents de réduction tels que le tétrahydroaluminate de lithium (LiAlH_4)^[140], le borane-tétrahydrofurane ($\text{BH}_3\text{-THF}$)^[141], le borane-diméthylsulfure ($\text{BH}_3\text{-SMe}_2$)^[142] ou encore le tétrahydroborate de sodium (NaBH_4)^[143]. Nous nous sommes intéressés à la méthode développée par Blake *et al.*^[140] qui permet la conversion efficace des acides carboxyliques en alcools dans des conditions réactionnelles douces, en présence de LiAlH_4 dans le THF. Cette méthode nous a permis d'obtenir l'alcool benzylique **7** avec un excellent rendement de 98%. L'alcool benzylique substitué au carbone 13 correspondant (^{13}C)-**7** a été préparé à l'identique avec un rendement de 99% (**Schéma II-19**).

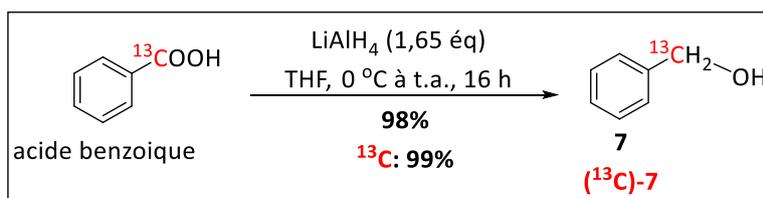


Schéma II-19. Méthode sélectionnée pour la préparation de l'alcool benzylique substitué au carbone 13 (^{13}C -7)

L'étape suivante correspond à la préparation du chlorure de benzyle **8**. De manière générale, la chloration des alcools est réalisée à l'aide de réactifs classiques tels que l'acide chlorhydrique concentré (HCl)^[144], le chlorure de thionyle (SOCl₂)^[145], le pentachlorure de phosphore (PCl₅)^[146], le trichlorure de phosphore (PCl₃)^[147], le trichlorure de phosphoryle (POCl₃)^[148] ou encore le complexe DMF/chlorure de pivaloyle^[149]. Parmi ces méthodes et dans le but de maximiser le rendement du produit formé, nous avons choisi le chlorure de thionyle pour la chloration de l'alcool benzylique. Nous avons obtenu le chlorure de benzyle **8** avec un rendement de 90%. En reproduisant cette méthode, le chlorure de benzyle substitué au carbone 13 correspondant (^{13}C -8) a été préparé avec un rendement de 84% (**Schéma II-20**).

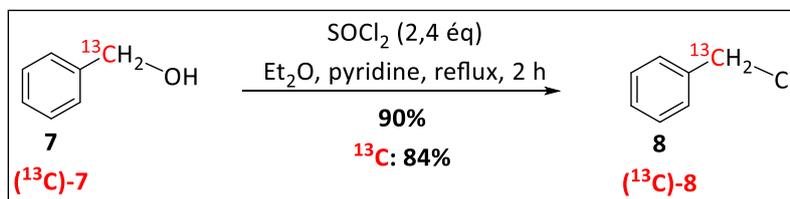


Schéma II-20. Méthode sélectionnée pour la chloration de l'alcool benzylique (^{13}C -7) en chlorure de benzyle (^{13}C -8)

La suite de la synthèse consiste en la préparation de la 1,3-diphénylacétone **11** qui peut être obtenue par une réaction de couplage entre un réactif de Grignard provenant du chlorure de benzyle précédemment obtenu, et un dérivé d'acide phénylacétique (**Schéma II-21**).

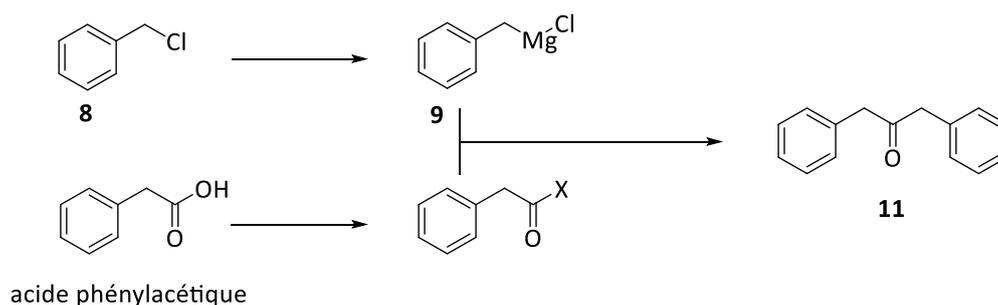


Schéma II-21. La voie pour la préparation de la 1,3-diphénylacétone **11** à partir du chlorure de benzyle **8** et de l'acide phénylacétique

En principe, la réaction de couplage entre les acides carboxyliques ou leur dérivés et les réactifs de Grignard représente une des méthodes les plus simples pour la synthèse des cétones. Cependant, malgré la simplicité inhérente, cette réaction est sévèrement limitée, principalement à cause de la formation des alcools tertiaires non souhaités^[150, 151].

En effet, au sein de notre laboratoire, une première synthèse de la 1,3-diphénylacétone a été réalisée en faisant le couplage entre le chlorure de benzylmagnésium et le chlorure de phénylacétyle^[107]. Malheureusement, un mélange de produits a été obtenu, dont la formation de l'alcool tertiaire (**Figure II-22**). Cela peut être expliqué par la forte polarisation de la liaison C-Mg, qui rend le carbone très nucléophile et donc très réactif vis-à-vis de la fonction carbonyle de la cétone formée.

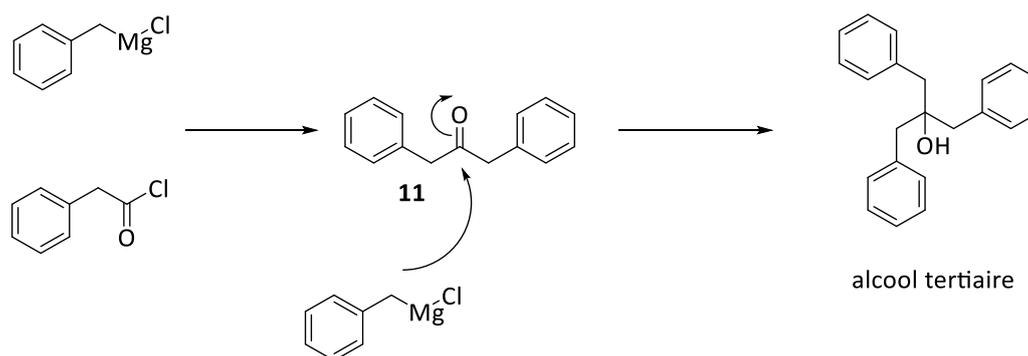


Schéma II-22. Formation d'alcool tertiaire dans la réaction de couplage entre le réactif de Grignard et le chlorure d'acide^[107]

Afin de surmonter ce problème, Joan Guldemann a transformé le réactif de Grignard en un dérivé organocuvreux dans le but d'abaisser le caractère nucléophile de l'atome carbone car

la liaison C-Cu est moins polarisée que celle C-Mg. Malheureusement, il n'a obtenu la 1,3-diphénylacétone qu'avec un rendement faible de 30% (**Schéma II-23**)^[107].

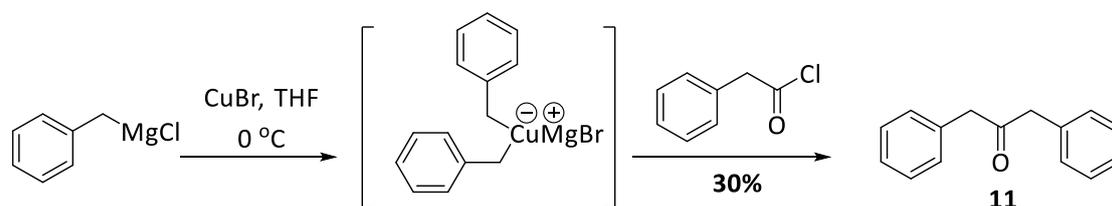


Schéma II-23. Synthèse de la 1,3-diphénylacétone en utilisant le réactif organocuvivieux^[107]

Enfin, une autre méthode a été proposée en utilisant un catalyseur, le tris(acétylacétonate) de fer(III) ($\text{Fe}(\text{acac})_3$) pour cette réaction de couplage^[152]. En suivant cette méthode, Joan Guldemann a obtenu la 1,3-diphénylacétone avec un rendement moyen de 55% (**Schéma II-24**)^[107].

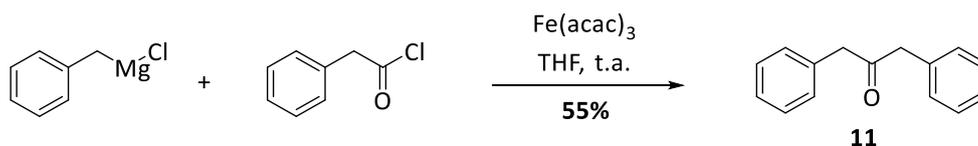


Schéma II-24. Synthèse de la 1,3-diphénylacétone catalysée par le tris(acétylacétonate) de fer(III) ($\text{Fe}(\text{acac})_3$)^[107]

Dans l'objectif de chercher une autre méthode plus efficace, nous nous sommes intéressés aux travaux de Schiaffo *et al.* qui ont utilisé les amides de Weinreb dans la synthèse des cétones^[153]. En effet, les amides de Weinreb sont largement utilisés en tant qu'agents d'acylation efficaces depuis leur première utilisation en 1981 par Nahm et Weinreb^[154]. Le principal avantage de ces amides par rapport aux autres dérivés d'acides carboxyliques est qu'ils peuvent réagir proprement avec les dérivés organométalliques^[155, 156] pour donner des cétones avec des rendements élevés sans formation de produits secondaires. De manière significative, ces réactions ne produisent pas d'alcools tertiaires, même avec un grand excès de réactif organométallique utilisé, du fait de la stabilité exceptionnelle de l'intermédiaire tétraédrique généré *in situ* par la chélation (**Schéma II-25**).

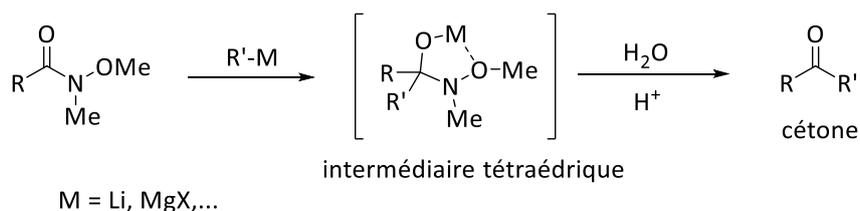


Schéma II-25. Préparation des cétones à partir de l'amide de Weinreb

Aucune suraddition se produit en raison de la chélation de l'ion métallique entre l'oxygène du carbonyle et l'oxygène du *N*-méthoxy, ce qui empêche la libération prématurée de la fonction cétone jusqu'à ce qu'un traitement acide soit effectué. Cela permet d'éviter la formation d'alcool tertiaire et d'augmenter ainsi le rendement de cétone formée.

Traditionnellement, les amides de Weinreb sont préparés à partir des acides carboxyliques^[157] ou de leurs dérivés tels que les esters^[158], les lactones^[159], les amides^[160] ou encore les anhydrides^[161]. Parmi ces différentes méthodes, la conversion « one pot » des acides carboxyliques est la plus intéressante. Ces méthodes reposent principalement sur l'activation *in situ* de l'acide carboxylique, suivie d'un couplage avec la *N,O*-diméthylhydroxylamine. Dans la littérature, plusieurs agents activant l'acide carboxylique ont été utilisés, à savoir le *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC)^[157], l'anhydride propylphosphonique/*N*-méthylmorpholine (PPA/NMM)^[162], les dérivés du *N*-benzotriazole^[163], les dérivés du [1,3,5]triazine y compris le 2-chloro-4,6-diméthoxy-[1,3,5]triazine (CDMT) et le chlorure de 4-(4,6-diméthoxy[1,3,5] triazin-2-yl)-4-méthylmorpholinium (DMTMM)^[164], le trichloroacétonitrile (TCA)/triphénylphosphine (TPP)^[165], etc... Cependant, la plupart de ces méthodes présentent des inconvénients, notamment des réactifs toxiques ou coûteux, des temps de réaction longs, des températures de réaction élevées, des rendements faibles, des réactions en plusieurs étapes ou des procédures de traitement compliquées.

Nous nous sommes donc intéressés à l'utilisation du *N,N'*-carbonyldiimidazole (CDI) qui permet d'activer *in situ* l'acide carboxylique dans la synthèse des amides de Weinreb^[166]. En effet, le CDI est l'un des nombreux réactifs principalement utilisés pour l'activation des groupements carboxyles. De plus, il est relativement bon marché et les sous-produits des réactions d'activation sont le dioxyde de carbone et l'imidazole. Cette méthode nous a permis

d'obtenir le *N*-méthoxy-*N*-méthyle-2-phénylacétamide **10** avec un excellent rendement de 98% à partir de l'acide phénylacétique (**Schéma II-26**).

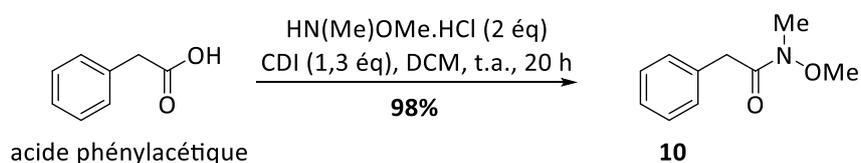


Schéma II-26. Méthode sélectionnée pour la préparation du *N*-méthoxy-*N*-méthyle-2-phénylacétamide **10**

En ce qui concerne le réactif de Grignard, le chlorure de benzylmagnésium a été préparé à partir du chlorure de benzyle en présence de tournure de magnésium dans de l'éther éthylique (Et₂O)^[167] (**Schéma II-27**). Le chlorure de benzylmagnésium formé a été utilisé directement sans purification pour l'étape suivante.

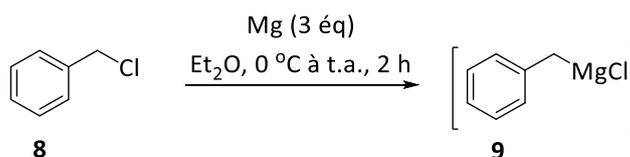


Schéma II-27. Préparation du réactif de Grignard **9** à partir du chlorure de benzyle **8**

La réaction de couplage entre le *N*-méthoxy-*N*-méthyle-2-phénylacétamide **10** et le chlorure de benzylmagnésium **9**, généré *in situ*, conduit à la 1,3-diphénylacétone **11** avec un rendement de 79%. La 1,3-diphénylacétone substituée au carbone 13 (¹³C)-**11** a également été obtenue en reproduisant cette synthèse avec un bon rendement de 83% (**Schéma II-28**).

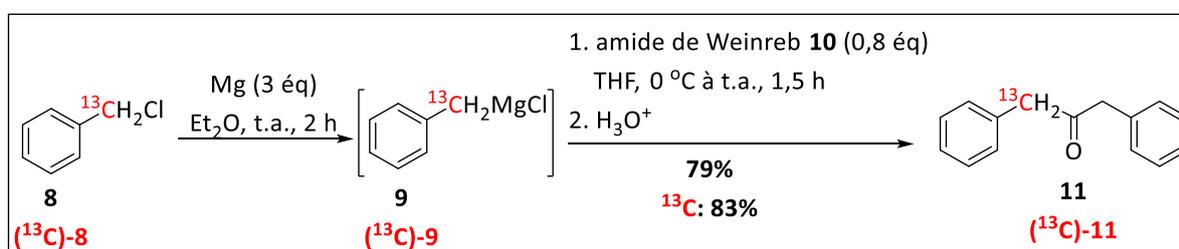


Schéma II-28. Synthèse de la 1,3-diphénylacétone substituée au carbone 13 (¹³C)-**11**

La suite de notre synthèse correspond à l'halogénéation en position α et α' de la fonction carbonyle de la 1,3-diphénylacétone **11** précédemment synthétisée, en suivant la méthode

de Breslow *et al.* En chimie organique, l'halogénéation des cétones est un type spécial d'halogénéation. Dans cette réaction, les atomes d'halogène (Cl, Br, I) peuvent être substitués sélectivement en position α d'une cétone. En effet, la position α d'un groupe carbonyle dans une cétone est facilement halogénée en raison de sa capacité à former un énolate dans des conditions basiques ou un énol dans des conditions acides. Dans notre cas, nous avons réalisé cette réaction dans un milieu acide en présence de deux équivalents de dibrome (Br_2), ce qui nous a permis d'obtenir la 1,3-dibromo-1,3-diphénylacétone **12** avec un bon rendement de 75%. La 1,3-dibromo-1,3-diphénylacétone substituée au carbone 13 (^{13}C)-**12** a été synthétisée en reproduisant à l'identique cette méthode avec un rendement de 73% (**Schéma II-29**).

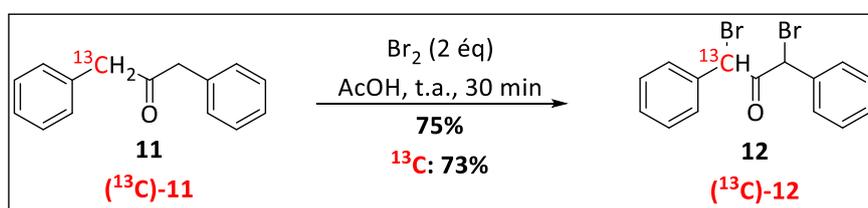


Schéma II-29. Méthode de synthèse de la 1,3-dibromo-1,3-diphénylacétone substituée au carbone 13 (^{13}C)-**12**

La dernière étape de cette procédure consiste en la synthèse de la DCP **2** en suivant la méthode proposée par Breslow *et al.* En effet, en traitant la 1,3-dibromo-1,3-diphénylacétone **12** avec la triéthylamine dans le dichlorométhane pendant 30 minutes, nous avons finalement obtenu la DCP **2** avec un rendement de 62%. La diphénylcyclopropénone substituée au carbone 13 (^{13}C)-**2** a également été obtenue en reprenant cette synthèse avec un même rendement de 62% (**Schéma II-30**).

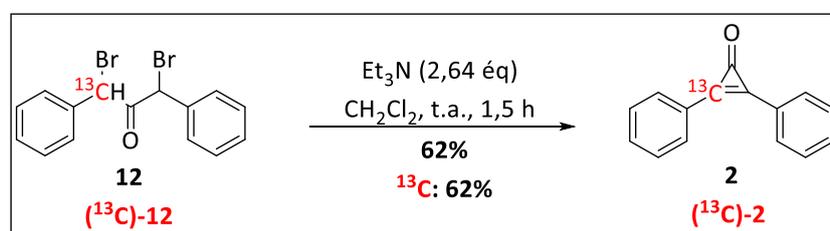


Schéma II-30. Méthode de synthèse de la diphénylcyclopropénone substituée au carbone 13 (^{13}C)-**2**

5. Synthèse de la DCP substituée au carbone 13 : bilan

Une nouvelle procédure de synthèse de la DCP en 6 étapes à partir de l'acide benzoïque a été développée et nous a donné la DCP avec un rendement global de 32%. La DCP substituée au carbone 13 a été obtenue en reproduisant cette procédure à partir de l'acide benzoïque substitué correspondant, avec un rendement global similaire de 31% (**Schéma II-31**).

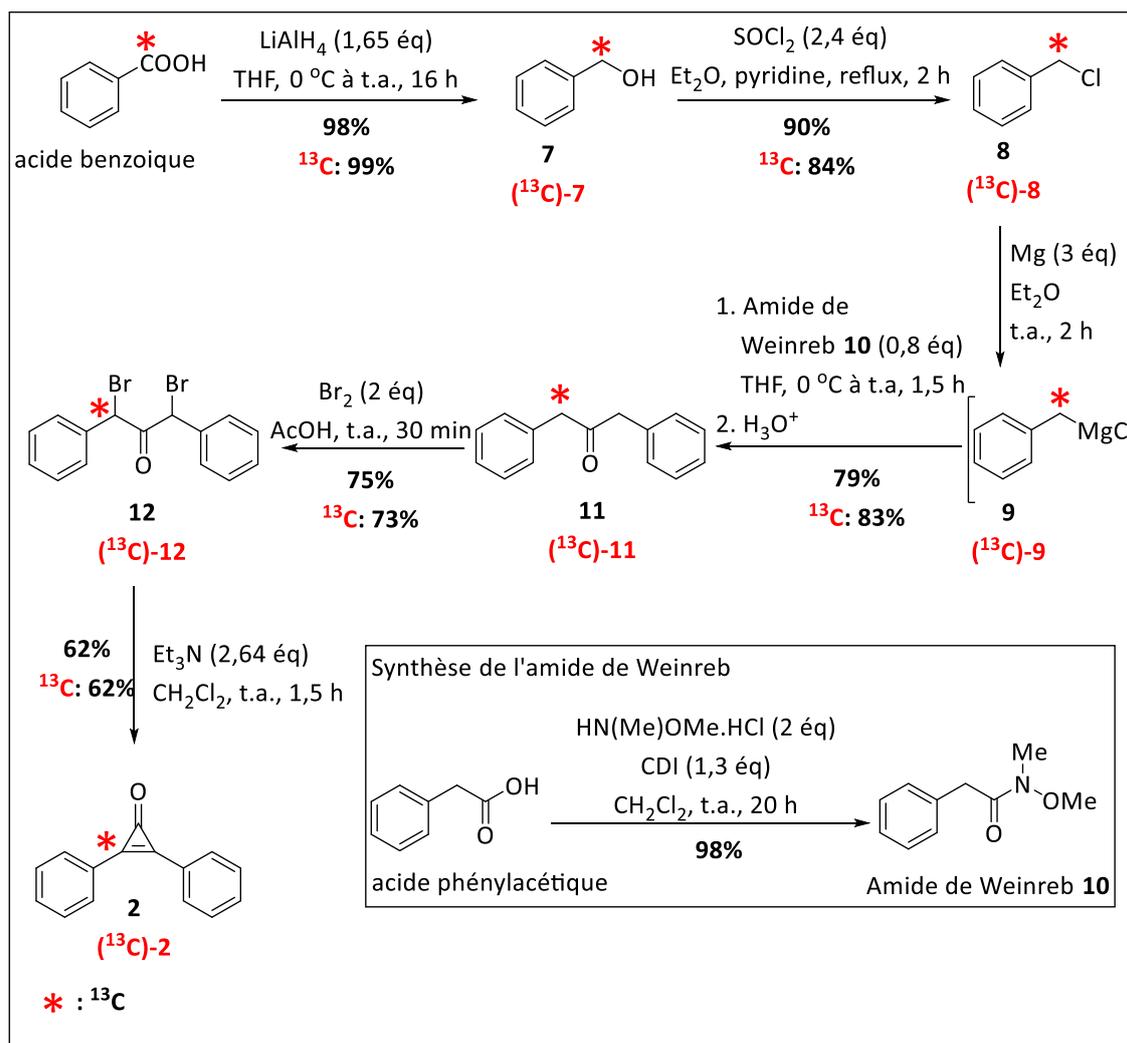


Schéma II-31. Bilan de la synthèse de la DCP substituée au carbone 13 (^{13}C)-2 à partir de l'acide benzoïque substitué

III. Allergène mixte - les isocyanates

Décrits pour la première fois par Adorf Wurtz en 1849, les isocyanates sont des composés chimiques aromatiques, aliphatiques ou cycloaliphatiques de faible poids moléculaire qui

contiennent une fonction très réactive de type $-N=C=O$. Ils sont très largement utilisés dans la production de polyuréthane, de revêtements, d'élastomères et de pesticides. En 2000, plus de 4 millions de tonnes d'isocyanates ont été produits dans le monde, ce qui implique un nombre important de personnes pouvant être exposées à ce type de composés^[168]. Les isocyanates les plus couramment utilisés sont les toluènediisocyanates (TDI), les méthylènediphényldiisocyanates (MDI) et l'hexaméthylènediisocyanate (HDI)^[169]. Le 2,4-TDI est utilisé dans la fabrication des mousses de polyuréthane et des élastomères. Le HDI, un isocyanate aliphatique, sert d'agent de réticulation dans la fabrication de matériaux utilisés en art dentaire et dans les lentilles de contact. Il entre également dans la composition des peintures pour automobiles. L'isocyanate cycloaliphatique, 4,4'-méthylènedicyclohexyldiisocyanate (HMDI), quant à lui, est utilisé pour la production des colles pour la fabrication des matériaux médicaux^[170].

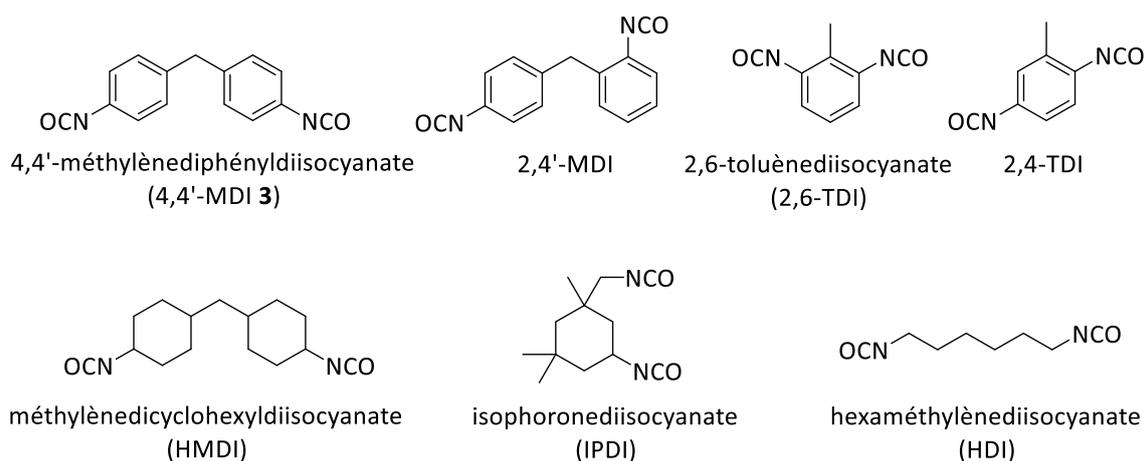


Figure II-3. Les isocyanates les plus utilisés dans l'industrie

De part leur large utilisation dans l'industrie, les isocyanates présentent cependant un risque bien connu principalement en raison de leurs effets indésirables sur les voies respiratoires^[171, 172]. En effet, les isocyanates sont une cause majeure d'asthme professionnel dans le monde. L'industrie du polyuréthane s'est considérablement développée. Le nombre de travailleurs et de consommateurs ayant un risque d'exposition ne cesse de croître. En 1951, Fuchs et Valade ont signalé les premiers cas d'asthme lié à l'utilisation de 2,4-TDI et 2,6-TDI dans la fabrication de plastique. Depuis, d'autres études ont recensé de nombreux cas d'asthme causés par les isocyanates, principalement chez les travailleurs manipulant ces composés. Aux États-Unis, chaque année, environ 100 000 travailleurs sont exposés aux isocyanates et 5% à 10% de ces

travailleurs développeront un asthme professionnel^[173]. Parmi les isocyanates les plus utilisés dans l'industrie, les MDI^[174, 175] et les TDI^[176] sont souvent rapportés comme cause du développement d'asthme.

Par ailleurs, ce sont également des sensibilisants cutanés. En 1983, des allergies de contact causées par une exposition au HMDI ont été mises en évidence chez les ouvriers qui produisent le polyuréthane^[177]. En 2003, une autre étude a montré que les isocyanates aliphatiques (HDI, HMDI et IPDI) provoquent des eczémas sévères chez des travailleurs dans une usine de fabrication de matériaux médicaux^[170]. Depuis, les autres isocyanates tels que les MDI et les TDI ont également été classés comme sensibilisants cutanés^[178, 179]. Ces travaux montrent que l'isocyanate est un allergène mixte qui provoque non seulement des allergies respiratoires mais également des allergies de contact.

Dans ce travail de thèse, nous étudions la réactivité d'un diisocyanate plus couramment utilisé dans l'industrie, le 4,4'-MDI, qui est un sensibilisant respiratoire et cutané fort^[178, 180]. De plus, nous choisissons également un autre isocyanate plus petit, le *p*-tolylisocyanate, qui devrait pénétrer plus facilement dans les épidermes humains reconstitués utilisés dans le test de réactivité des allergènes (**Figure II-4**).

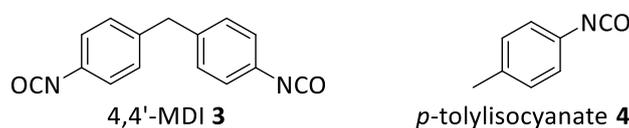


Figure II-4. Les isocyanates à étudier dans notre travail de thèse

1. Le 4,4'-méthylènediphényldiisocyanate (4,4'-MDI)

1.1. Généralité

Le 4,4'-méthylènediphényldiisocyanate (4,4'-MDI) est un diisocyanate aromatique largement utilisé dans la fabrication de polyuréthane. En raison de leur durabilité et de leur ténacité, le 4,4'-MDI est utilisé comme produit de revêtement pour les avions, camions-citernes et semi-remorques. Le 4,4'-MDI est également employé pour lier le caoutchouc à la rayonne et au nylon. Etant l'isocyanate le moins volatil, le 4,4'-MDI est recommandé pour remplacer les TDI lorsque cela est possible^[169]. Le 4,4'-MDI est connu comme un allergène respiratoire et cutané

dont le potentiel sensibilisant a été observé sur l'animal^[181] et sur l'Homme^[182].

1.2. Choix de la position de substitution au carbone 13

Le groupement chimique isocyanate est très réactif et électrophile. Donc, il est le site idéal pour être attaqué par les fonctions nucléophiles des chaînes latérales des protéines. Afin d'élaborer le profil de réactivité de 4,4'-MDI, nous avons décidé de le synthétiser avec la substitution au carbone 13 sur les positions réactives stratégiques, c'est-à-dire les deux fonctions isocyanates (**Figure II-5**). Ceci permettra de suivre de manière efficace sa réactivité avec les épidermes humains reconstitués, à l'aide de la RMN HRMAS.



Figure II-5. 4,4'-MDI **3** et son analogue substitué au carbone 13 (¹³C)-**3**

1.3. Analyse rétrosynthétique du 4,4'-MDI substitué au carbone 13 (¹³C)-**3**

Une synthèse des isocyanates a été publiée pour la première fois en 1849 par Adolf Wurtz. Puis, de nombreuses méthodes de synthèse ont été développées par les chimistes^[183]. Parmi ces méthodes, la transformation de l'amine primaire en isocyanate à l'aide du phosgène est la réaction la plus utilisée, notamment dans l'industrie (**Schéma II-32**)^[184].

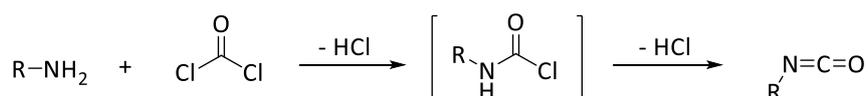


Schéma II-32. Synthèse des isocyanates à partir de l'amine primaire à l'aide de phosgène

Cependant, cette méthode présente certains inconvénients. Le premier point, le phosgène est extrêmement toxique. Le deuxième point, le phosgène, étant un gaz, est difficile à transporter, stocker et manipuler. Et enfin, une grande quantité d'HCl, produit secondaire corrosif, est produite lors de cette réaction.

Dans le but de remplacer le phosgène gazeux, le carbonate de bis(trichlorométhyle) (BTC) ou triphosgène a été utilisé dans la préparation des isocyanates^[185] (**Schéma II-33**).

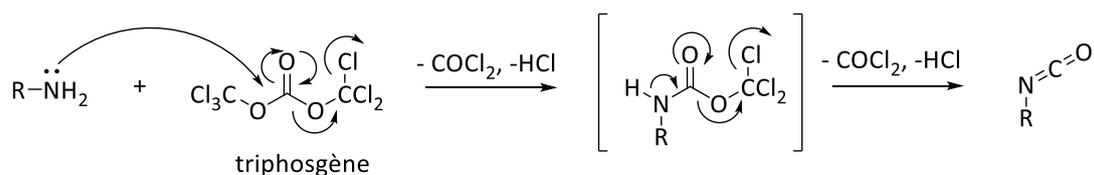


Schéma II-33. Synthèse des isocyanates à partir de l'amine primaire à l'aide de triphosgène

Au sein de notre laboratoire, Olivier Fleischel a appliqué cette méthode de synthèse pour la préparation du 4,4'-MDI avec un bon rendement (**Schéma II-34**)^[186].

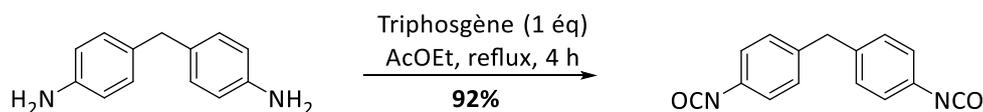


Schéma II-34. Synthèse du 4,4'-MDI à l'aide de triphosgène réalisée dans notre laboratoire

Le principal avantage du triphosgène par rapport au phosgène ou au diphosgène est qu'il se présente sous forme solide (point de fusion : 80 °C; point d'ébullition : 206 °C)^[187]. Ceci facilite son utilisation, sa manipulation, son transport et son stockage grâce à sa faible tension de vapeur et à sa stabilité par rapport à l'équivalent gazeux de phosgène et à l'équivalent liquide de diphosgène^[185]. Cependant, le phosgène et l'acide chlorhydrique sont également formés en tant que produits secondaires dans cette synthèse. De plus, le triphosgène est également un composé très toxique comme le phosgène. Bien que le triphosgène soit solide, la tension de vapeur est suffisamment élevée (0,4 mbar à température ambiante) pour entraîner facilement des concentrations toxiques^[188]. Enfin, en raison du prix excessif de triphosgène enrichi au carbone 13 (1432€/1g, Sigma-Aldrich), nous avons décidé de chercher d'autres voies de synthèse.

Dans un premier temps, le fluorure de carbonyle (COF₂) est un réactif alternatif bien documenté dans la littérature pour la préparation des isocyanates^[189]. Le fluorure de carbonyle est similaire au phosgène en termes de structure et de propriété chimique, mais, la toxicité du COF₂ est 20 fois moindre que celle du phosgène^[189]. En utilisant cette méthode, Quan *et al.* ont synthétisé le 4,4'-MDI à partir de la 4,4'-diphénylméthanediamine (MDA) (**Schéma II-35**).

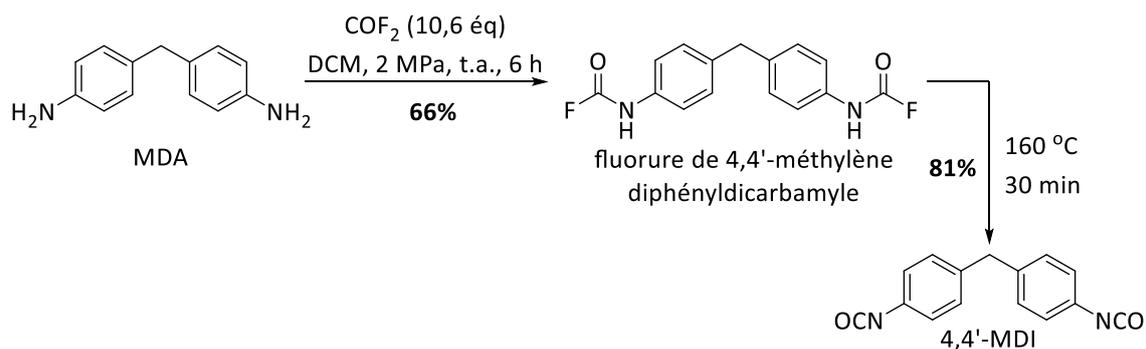


Schéma II-35. Synthèse du 4,4'-MDI à l'aide du fluorure de carbonyle selon Quan *et al.*

Cette synthèse se fait en deux étapes. La première étape consiste en la formation d'un intermédiaire, le fluorure de 4,4'-méthylènediphényldicarbamyle. En chauffant à environ 160 °C pendant 30 min, cet intermédiaire est transformé en 4,4'-MDI. Cette méthode est réalisée dans les conditions réactionnelles douces, mais le rendement du 4,4'-MDI est relativement faible. De plus, le COF_2 en version substituée au carbone 13 n'est pas disponible dans le commerce. Par conséquent, cette méthode ne peut pas être utilisée dans notre étude afin de synthétiser le 4,4'-MDI substitué au carbone 13.

Une autre alternative attrayante pour la synthèse des isocyanates est l'utilisation du N,N' -carbonyldiimidazole (CDI) (**Schéma II-36**)^[190]. Dans cette méthode, l'amine primaire réagit avec le CDI (1 équivalent) pour former tout d'abord l'imidazole- N -carboxamide. Ce dernier se dissocie en isocyanate et imidazole, même à température ambiante. L'isocyanate est ensuite isolé par distillation avec de bons rendements.

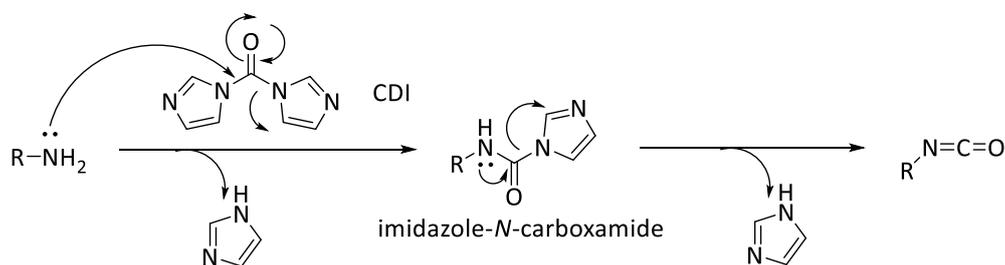


Schéma II-36. Synthèse des isocyanates à partir des amines primaires en utilisant le N,N' -carbonyldiimidazole

Le CDI présente la même réactivité que le phosgène dans la réaction avec des amines primaires pour former des isocyanates. Néanmoins, il possède des avantages importants par

rapport au phosgène. Premièrement, dans cette réaction, le produit secondaire est uniquement l'imidazole qui peut être facilement éliminé par la distillation. Deuxièmement, le CDI est une substance chimique solide non toxique et plus facile à manipuler que le phosgène gazeux et toxique. Cependant, en raison du coût élevé du CDI substitué au carbone 13 (5247€/1g, Sigma-Aldrich), cette méthode n'a pas été sélectionnée dans notre étude.

En 2002, Zhao *et al.* ont développé une méthode de synthèse de 4,4'-MDI à partir du diméthylcarbonate (DMC) (**Schéma II-37**)^[191].

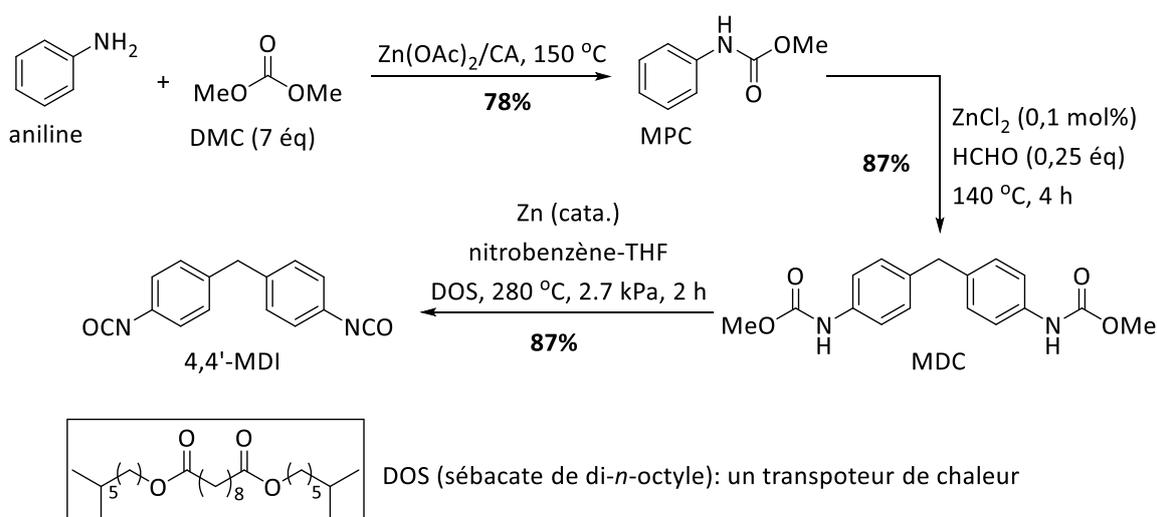


Schéma II-37. Synthèse du 4,4'-MDI à partir du diméthylcarbonate selon Zhao *et al.*

Cette synthèse se fait en trois étapes. Dans une première étape, le méthyle-*N*-phénylcarbamate (MPC) est préparé à partir de l'aniline et du diméthylcarbonate (DMC) à l'aide d'un catalyseur, l'acétate de zinc (II) supporté sur le charbon actif ($\text{Zn(OAc)}_2/\text{CA}$). Le MPC se condense ensuite avec le formaldéhyde pour produire du diméthyle-4,4'-méthylènediphényldicarbamate (MDC). Enfin, le MDC est décomposé en 4,4'-MDI en présence de zinc en poudre en quantité catalytique et à haute température.

Cette synthèse permet d'obtenir le 4,4'-MDI à partir du diméthylcarbonate en trois étapes avec de bons rendements. Cependant, les conditions opératoires sont drastiques (température élevée, haute pression). De plus, dans le but de synthétiser le 4,4'-MDI substitué au carbone 13, l'utilisation 7 équivalents du diméthylcarbonate substitué, dont le prix est élevé (4893€/1g, Sigma-Aldrich), pose un problème de coût. Cette méthode de synthèse est donc inapplicable pour la préparation du 4,4'-MDI dans notre étude.

Lors d'études précédentes au laboratoire, Olivier Fleischel a développé une voie de synthèse du 4,4'-MDI passant par l'intermédiaire de diéthyle-4,4'-méthylènediphényldicarbamate (Schéma II-38)^[186].

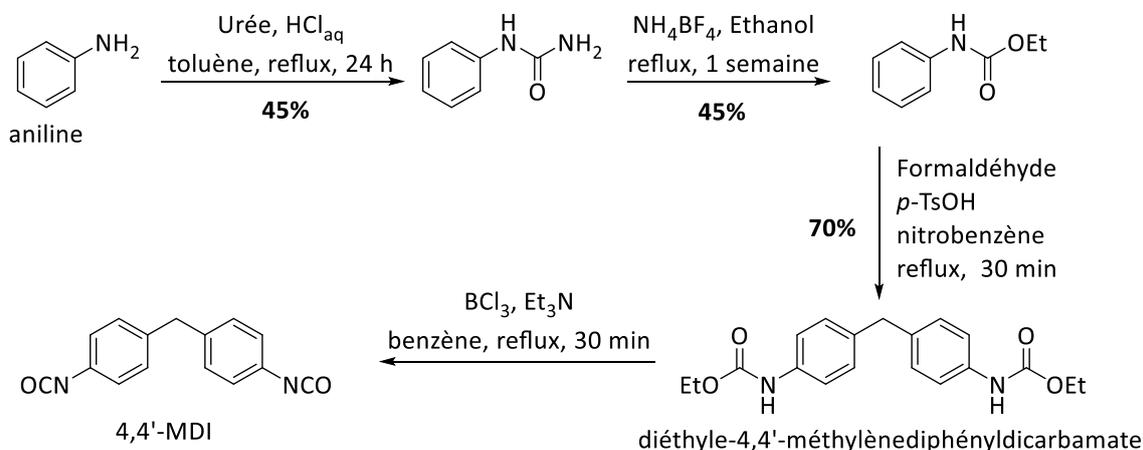


Schéma II-38. Voie de synthèse du 4,4'-MDI à partir de l'urée

Dans cette synthèse, il a envisagé de préparer le 4,4'-MDI en utilisant l'urée en tant que précurseur substitué au carbone 13. En effet, dans une première étape, la phénylurée est synthétisée à partir de l'aniline et de l'urée avec un rendement modéré. La phénylurée est ensuite transformée en éthyle-*N*-phénylcarbamate. La troisième étape consiste à condenser ce monocarbamate sur du formaldéhyde, en présence d'acide *p*-toluène sulfonique, à reflux, afin de générer le dicarbamate correspondant. Ce dernier est finalement transformé en 4,4'-MDI à l'aide du trichlorure de bore. Cependant, dans la dernière étape, le diisocyanate n'a pas pu être isolé. Par conséquent, cette voie de synthèse n'a pas été appliquée dans la préparation du 4,4'-MDI substitué au carbone 13 lors de son étude.

Toutefois, les carbamates sont bien documentés dans la littérature pour la synthèse des isocyanates^[192-194]. Nous souhaitons donc trouver une méthode efficace de purification du 4,4'-MDI permettant d'appliquer l'utilisation de carbamates dans la préparation du 4,4'-MDI substitué au carbone 13. Notre stratégie est de préparer tout d'abord un dicarbamate substitué, intermédiaire clé dans la synthèse des isocyanates, à l'aide d'un précurseur substitué commercial et dont le prix est abordable, $K^{13}CN$ (270,5€/1g, Eurisotop). Le dicarbamate pourra ensuite être transformé en 4,4'-MDI à l'aide du trichlorure de bore (Schéma II-39).

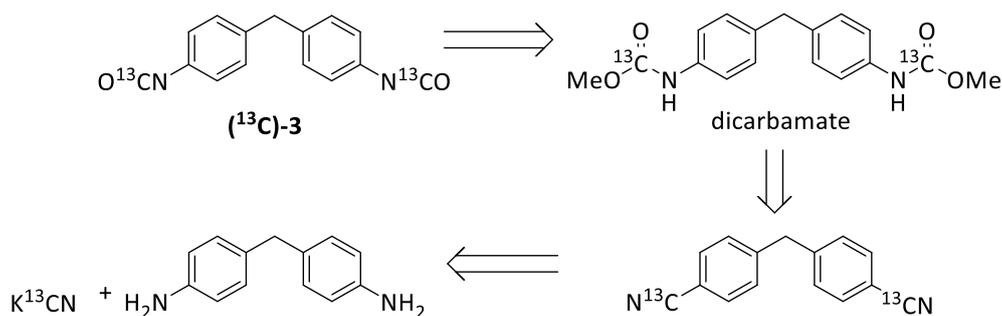


Schéma II-39. Analyse rétrosynthétique du 4,4'-MDI substitué au carbone 13 (^{13}C)-3 à partir de K^{13}CN

1.4. Synthèse du 4,4'-MDI substitué au carbone 13 (^{13}C)-3

La première étape de cette synthèse consiste en la préparation du 4,4'-dicyanodiphénylméthane à partir du 4,4'-diiododiphénylméthane et de KCN. Comme nous l'avons dit précédemment pour la synthèse de PA, les réactions de cyanuration des halogénures d'aryle (aryle-X, X = Cl, Br, I) catalysées par des métaux de transition sont des méthodes efficaces pour obtenir des nitriles d'aryle. Concernant les halogénures d'aryle de départ, seul le dérivé dichloré, moins réactif, est commercial. Du fait de l'indisponibilité du 4,4'-diiododiphénylméthane **13** dans le commerce, nous l'avons préparé grâce à la méthode de Sandmeyer^[195], à partir de la 4,4'-diphénylméthanediamine commerciale (MDA). Nous avons réussi à synthétiser le 4,4'-diiododiphénylméthane **13** avec un rendement de 61% en passant par le sel de diazonium qui est traité ensuite par l'iodure de potassium pour donner le 4,4'-diiododiphénylméthane correspondant (**Schéma II-40**).

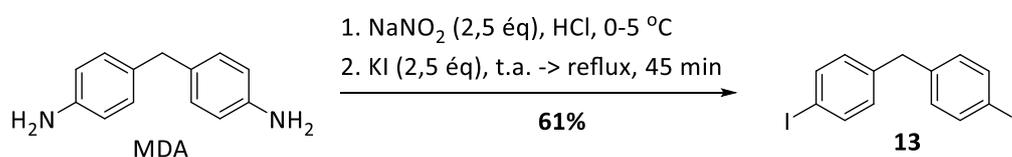


Schéma II-40. Préparation du 4,4'-diiododiphénylméthane **13**

Dans un premier temps, nous avons donc reproduit la méthode de Sundermeier *et al.*^[111] en utilisant le 4,4'-dichlorodiphénylméthane et le 4,4'-diiododiphénylméthane en tant qu'halogénure d'aryle. Malheureusement, le 4,4'-dicyanodiphénylméthane est obtenu avec de mauvais rendements de 17% à 18%, quel que soit l'halogénure de départ (**Schéma II-41**).

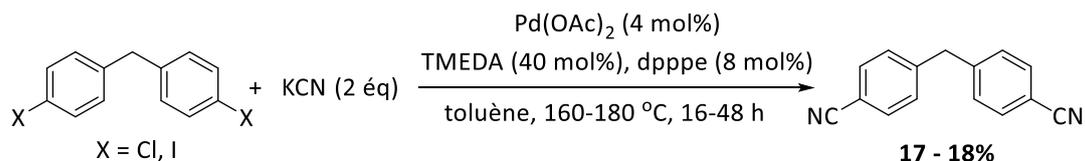


Schéma II-41. Synthèse du 4,4'-dicyanodiphénylméthane selon la méthode de Sundermeier *et al.*

En 1973, Takagi *et al.* ont publié une autre méthode de cyanuration des dérivés d'aryle-X catalysée par le palladium en utilisant les bromures ou les iodures d'aryle avec KCN en tant qu'agent de cyanuration (**Schéma II-42**)^[109].

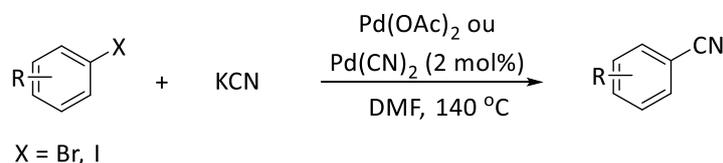


Schéma II-42. Cyanuration des halogénures d'aryle selon Takagi *et al.*

Dans cette réaction, le cyanure de palladium (II) ou l'acétate de palladium (II) sont utilisés comme catalyseur en l'absence de ligand supplémentaire. Cette réaction est réalisée dans le DMF à 140-150 °C pendant 2 à 12 heures.

En suivant cette méthode, nous avons essayé de synthétiser le 4,4'-dicyanodiphénylméthane à partir du 4,4'-diiododiphénylméthane. Malheureusement, à nouveau, nous n'avons pas pu obtenir le produit attendu (**Schéma II-43**).

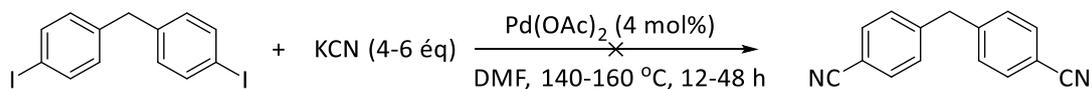


Schéma II-43. Synthèse du 4,4'-dicyanodiphénylméthane à partir du 4,4'-diiododiphénylméthane selon la méthode de Takagi *et al.*

En 1998, Anderson et ses collègues ont développé une méthode de cyanuration co-catalysée par le palladium (0) et l'iodure de cuivre (I)^[110]. Cette méthode fournit un accès efficace dans la synthèse des nitriles d'aryle en utilisant KCN ou NaCN en tant que source de cyanure (**Schéma II-44**).

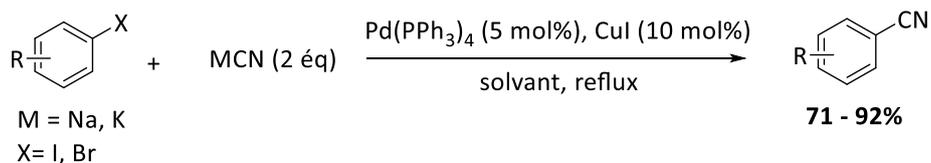


Schéma II-44. Cyanuration des (pseudo)halogénures d'aryle selon Anderson *et al.*

En suivant les conditions réactionnelles de cette publication, nous avons synthétisé le 4,4'-dicyanodiphénylméthane à partir du 4,4'-diiododiphénylméthane et de KCN avec des rendements reproductibles allant de 70% à 75% (**Schéma II-45**). Toutefois, ce rendement de réaction n'est pas vraiment satisfaisant. De plus, il faut utiliser quatre équivalents de KCN, ce qui pose un problème de coût lors de l'application en version substituée au carbone 13. Nous avons donc cherché d'autres méthodes plus efficaces.

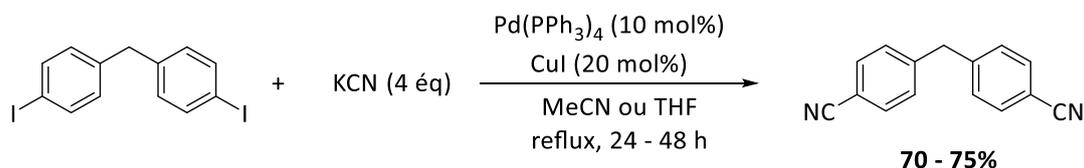


Schéma II-45. Synthèse du 4,4'-dicyanodiphénylméthane selon la méthode d'Anderson *et al.*

En 2005, Cristau *et al.* ont décrit une procédure efficace de cyanuration catalysée par le cuivre en utilisant les bromures ou les iodures d'aryle et KCN^[112]. Dans cette étude, le benzonitrile a été obtenu avec un excellent rendement de 94% à partir de l'iodobenzène et de KCN en présence d'iodure de cuivre (I) en tant que catalyseur et de 1,10-phénanthroline en tant que ligand. Cette réaction a été réalisée dans le DMF à 110 °C pendant 24 heures (**Schéma II-46**).

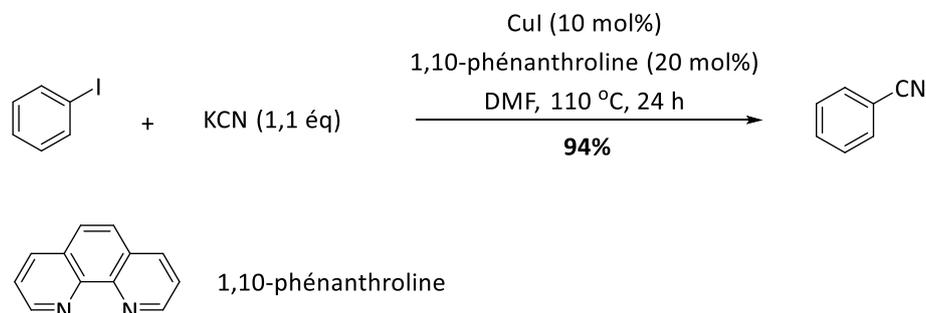


Schéma II-46. Cyanuration de l'iodobenzène selon Cristau *et al.*

Le mécanisme de formation du benzonitrile est proposé dans la **Schéma II-47** ci-dessous :

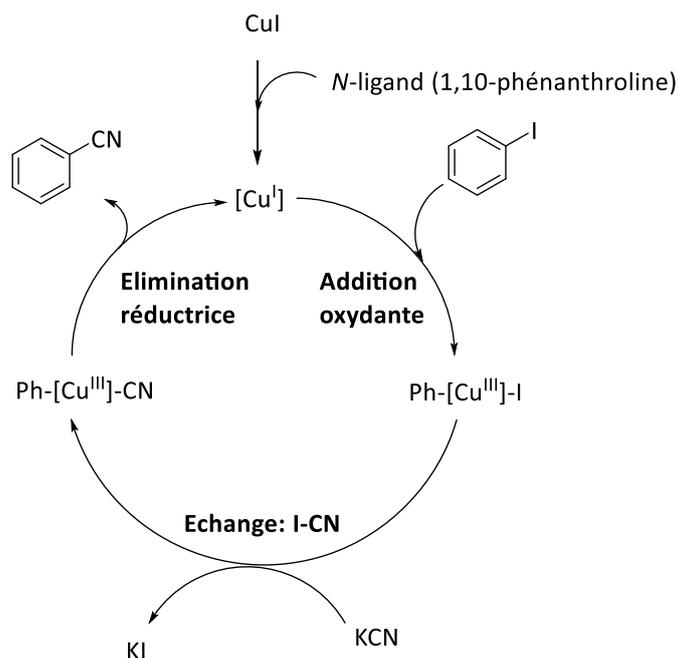


Schéma II-47. Mécanisme proposé de la formation du benzonitrile selon Cristau *et al.*

La première étape consiste en une addition oxydante de l'iodobenzène au complexe du catalyseur de cuivre (I) – ligand qui est présenté sous forme de $[Cu^I]$. L'intermédiaire de cuivre (III) résultant ($Ph[Cu^{III}]I$) subit une substitution nucléophile de l'iodure par le cyanure pour donner le $Ph[Cu^{III}]CN$. La troisième étape implique l'élimination réductrice du benzonitrile et la régénération du catalyseur $[Cu^I]$.

Le bromobenzène a également été utilisé dans cette méthode de synthèse du benzonitrile. Mais celui-ci n'est pas assez réactif et des quantités catalytiques d'iodure de potassium (KI) doivent être ajoutées au milieu avant l'introduction de KCN. Enfin, afin de palier au problème de solubilité de KCN dans le DMF, un agent de cyanuration liquide, l'acétone cyanohydrine, a également été testé (**Schéma II-48**)^[112].

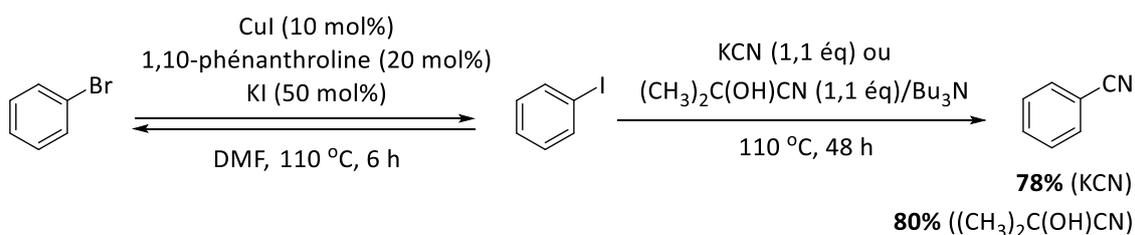


Schéma II-48. Cyanuration du bromobenzène selon Cristau *et al.*

Le benzonitrile a été obtenu avec succès à partir du bromobenzène avec de bons rendements. Cependant, l'acétone cyanohydrine substitué au carbone 13 ((CH₃)₂C(OH)¹³CN) n'est pas disponible dans le commerce. Nous avons donc choisi la synthèse du 4,4'-dicyanodiphénylméthane **14** à partir de l'iodure d'aryle, le 4,4'-diiododiphénylméthane **13**, et de KCN (**Schéma II-49**).

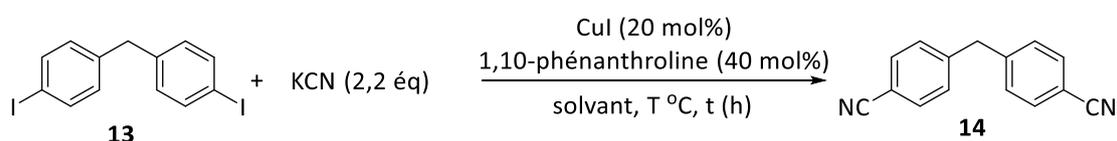


Schéma II-49. Synthèse du 4,4'-dicyanodiphénylméthane **14** en utilisant la méthode de Cristau *et al.*

En reproduisant les conditions réactionnelles de la publication, nous avons obtenu le 4,4'-dicyanodiphénylméthane **14** avec un bon rendement de 82% (**Tableau II-3, entrée 1**). Afin d'améliorer encore ce rendement, nous avons modifié légèrement les conditions réactionnelles en jouant sur la température et le temps de réaction. En augmentant le temps ou la température de réaction, le rendement de 4,4'-dicyanodiphénylméthane **14** n'a pas changé significativement (**Tableau II-3, entrée 2 et 3**). Par contre, en changeant à la fois la température et le temps de réaction, nous avons obtenu un rendement excellent de 94% de 4,4'-dicyanodiphénylméthane **14** (**Tableau II-3, entrée 4**). Cependant, KCN est un solide peu soluble dans le DMF, ce qui peut influencer le rendement de réaction. Afin d'améliorer la solubilité de KCN, nous avons tenté d'utiliser l'acétonitrile à la place du DMF. Malheureusement, ce changement a fait beaucoup chuter le rendement (**Tableau II-3, entrée 5**).

Tableau II-3 : Conditions opératoires testées pour l'obtention du 4,4'-dicyanodiphénylméthane **14**

Entrée	KCN (ég)	CuI (mol%)	1,10-phénanthroline (mol%)	Solvant	T (°C)	Temp s (h)	Rdt (%) ^a
1	2.2	20	40	DMF	110	24	82
2	2.2	20	40	DMF	110	48	84
3	2.2	20	40	DMF	120	24	83
4	2.2	20	40	DMF	120	48	94
5	2.2	20	40	ACN	120	48	62

^a : rendement isolé

Grâce aux résultats encourageants, nous avons réalisé à plusieurs reprises cette réaction dans la meilleure condition sélectionnée (**Tableau II-3, entrée 4**). Le 4,4'-dicyanodiphénylméthane **14** a ainsi été obtenu avec un excellent rendement de 95%. Son analogue substitué au carbone 13, (¹³C)-**14**, a été préparé par cette méthode avec un rendement de 97% (**Schéma II-50**).

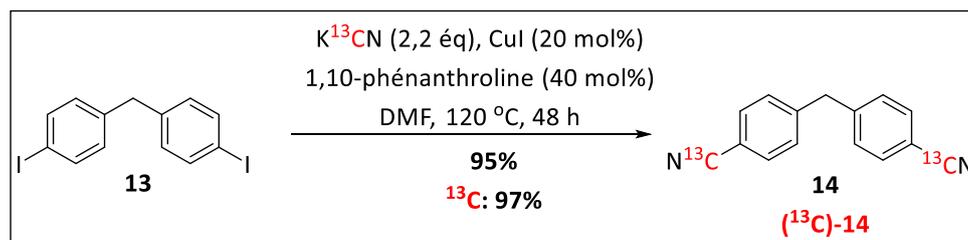


Schéma II-50. Synthèse du 4,4'-dicyanodiphénylméthane **14** et son analogue substitué (¹³C)-

14

L'étape suivante consiste en la synthèse du 4,4'-méthylènedibenzamide **15** à partir du 4,4'-dicyanodiphénylméthane **14**. Il y a beaucoup de méthode de synthèse des amides primaires décrites dans la littérature telles que l'hydrolyse des nitriles correspondants^[196-200], l'amidation des acides ou des chlorures d'acide avec l'ammoniac^[201, 202], l'amidation oxydative des aldéhydes ou des aldoximes correspondants^[203, 204] et l'oxydation des amines ou des alcools primaires^[205, 206]. Parmi elles, l'hydrolyse des nitriles est devenue l'une des méthodes les plus largement utilisées. Les méthodes conventionnelles d'hydrolyse des nitriles nécessitent généralement un acide ou une base forte. Cependant, les acides ou bases fortes peuvent provoquer une surhydrolyse des amides primaires pour donner les acides correspondants. Afin de surmonter cet inconvénient, différents types de catalyseurs métalliques, à savoir Ru, Rh, Cu, Cs, ont été utilisés^[197-200]. Ces méthodes permettent d'obtenir les amides avec de bons rendements à partir de divers nitriles.

Pour l'hydrolyse du composé **14**, nous avons choisi les méthodes utilisant des conditions basiques douces pour éviter à la fois la surhydrolyse et l'utilisation des catalyseurs métalliques. Nous nous sommes tout d'abord focalisés sur le travail de Midya *et al.* basé sur l'utilisation de *tert*-butoxyde de potassium dans l'hydrolyse des nitriles^[207]. Le *tert*-butoxyde de potassium agit comme source d'oxygène nucléophile lors de l'hydrolyse des nitriles pour

donner les amides correspondants avec d'excellents rendements dans des conditions douces (Schéma II-51).

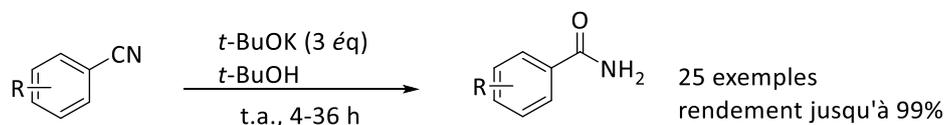


Schéma II-51. Hydrolyse des nitriles d'aryle selon la méthode de Midya *et al.*

En appliquant cette méthode, nous avons obtenu le 4,4'-méthylènedibenzamide **15** avec un rendement moyen de 65% à partir du 4,4'-dicyanodiphénylméthane **14** (Schéma II-52).

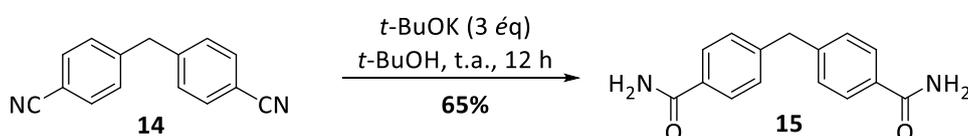


Schéma II-52. Synthèse du 4,4'-méthylènedibenzamide **15** en utilisant la méthode de Midya

Une augmentation du temps de réaction jusqu'à 48 heures ne permet pas d'améliorer le rendement.

En 2018, Zhan *et al.* ont développé une méthode efficace de synthèse des amides primaires par l'hydrolyse des nitriles en utilisant le peroxyde d'hydrogène^[208]. En appliquant cette méthode, nous avons facilement transformé le 4,4'-dicyanodiphénylméthane **14** en 4,4'-méthylènedibenzamide **15** avec un excellent rendement de 95%. Le mode opératoire a été reproduit à l'identique pour synthétiser le 4,4'-méthylènedibenzamide substitué au carbone 13 (¹³C)-**15** avec un rendement également de 95% (Schéma II-53).

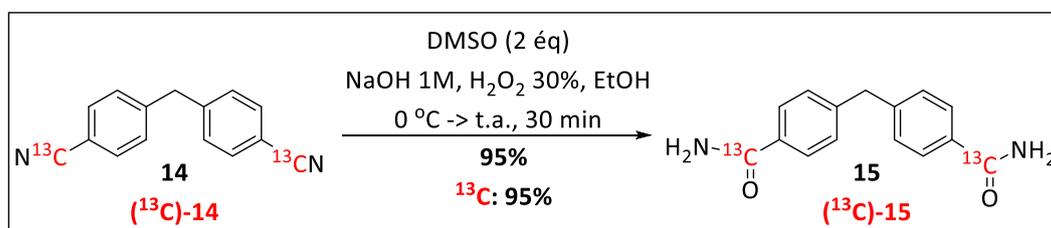
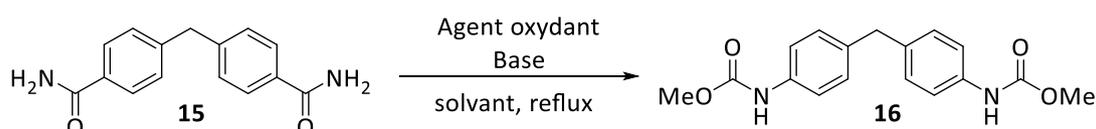


Schéma II-53. Méthode sélectionnée pour l'obtention du 4,4'-méthylènedibenzamide **15** et son analogue substitué au carbone 13 (¹³C)-**15**

L'étape suivante est la préparation du diméthyle-4,4'-méthylènediphényldicarbamate **16**. Le réarrangement d'Hofmann est une méthode efficace bien connue pour la synthèse des amines ou des carbamates à partir des amides primaires. Classiquement, le réarrangement d'Hofmann transforme un amide primaire en amine primaire sous l'action du dibrome en milieu basique aqueux. Par conséquent, dans l'objectif de préparer les carbamates, plusieurs modifications ont été réalisées pour améliorer les conditions de réaction tels que l'utilisation de $\text{PhI}(\text{OAc})_2\text{-KOH}$ ^[209], de $\text{NBA-LiOH.H}_2\text{O}$ ^[210], de TCCA-DBU ^[211], de NBS-DBU ^[212], de $\text{TsNBr}_2\text{-DBU}$ ^[213], de $\text{NBS-}t\text{-BuOK}$ ^[214], etc... Ces méthodes ont en commun l'utilisation d'une base accompagnée un agent oxydant.

Nous avons essayé de suivre ces méthodes en modifiant quelques conditions réactionnelles afin de préparer le diméthyle-4,4'-méthylènediphényldicarbamate **16** à partir du 4,4'-méthylènedibenzamide **15**.



Les conditions opératoires testées sont résumées dans le **Tableau II-4**.

Tableau II-4 : Conditions opératoires testées pour l'obtention du diméthyle-4,4'-méthylènediphényldicarbamate **16**

Entrée	Agent oxydant	Base	Solvant	Temps (h)	Température (°C)	Rdt (%) ^a
1	NBS (2 éq.)	<i>t</i> -BuOK (3 éq.)	MeOH	16	65	79
2	NBS (2 éq.)	<i>t</i> -BuOK (3 éq.)	MeOH	24	65	79
3	NBS (2 éq.)	<i>t</i> -BuOK (3 éq.)	MeOH	16	80	55
4	TCCA (0,76 éq.)	DBU (4,5 éq.)	MeOH	16	65	72
5	TCCA (1 éq.)	DBU (4,5 éq.)	MeOH	16	65	73
6	TCCA (1 éq.)	DBU (4,5 éq.)	MeOH	24	65	73
7	NBS (2 éq.)	DBU (4,5 éq.)	MeOH	16	65	98
8	NBS (2 éq.)	DBU (4,5 éq.)	EtOH	16	65	76

^a : rendement isolé

Pour commencer, la réaction a été effectuée en utilisant le *N*-bromosuccinimide (NBS) (2 éq.) et le *tert*-butoxyde de potassium (3 éq.) dans du méthanol. Le chauffage à reflux (65 °C) du mélange réactionnel a donné un rendement de 79% du diméthyle-4,4'-

méthylènediphényldicarbamate **16** après 16 heures de réaction (**Tableau II-4, entrée 1**). L'augmentation du temps ou de la température de réaction ne permet pas d'améliorer le rendement (**Tableau II-4, entrées 2-3**). Voire l'augmentation de température de réaction a fait baisser le rendement de réaction (**Tableau II-4, entrée 3**) à cause de la décomposition du NBS dans le milieu basique à haute température^[215]. Un autre système d'agent oxydant-base, TCCA-DBU (l'acide trichlorocyanurique et le 1,8-diazabicyclo-[5.4.0]undec-7-ène), a été testé. Malheureusement, ceci nous a permis d'obtenir le dicarbamate **16** avec des rendements modérés (**Tableau II-4, entrées 4-6**). En associant le NBS et le DBU, nous avons pu obtenir le dicarbamate **16** avec un excellent rendement de 98% (**Tableau II-4, entrée 7**). L'éthanol a été également utilisé à la place de méthanol dans le but de synthétiser le carbamate d'éthyle. Néanmoins, le diéthyle-4,4'-méthylènediphényldicarbamate a été obtenu avec un rendement modéré de 76% (**Tableau II-4, entrée 8**).

Les conditions opératoires de la ligne 7 dans le **Tableau II-4** ont donc été utilisées afin de synthétiser le diméthyle-4,4'-méthylènediphényldicarbamate substitué au carbone 13 (¹³C)-**16** (**Schéma II-54**).

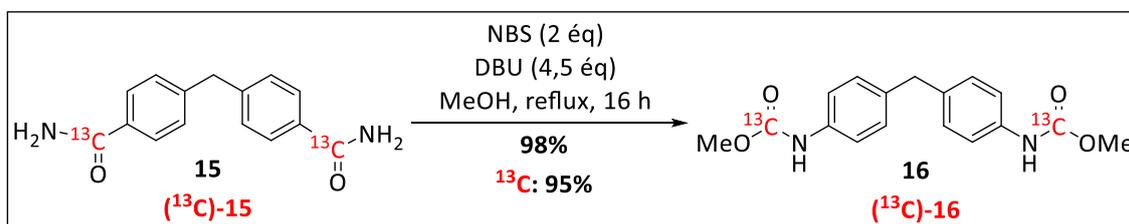


Schéma II-54. Synthèse du diméthyle-4,4'-méthylènediphényldicarbamate substitué au carbone 13 (¹³C)-**16**

Enfin, le 4,4'-MDI **3** peut être obtenu par l'élimination de l'alcool à partir du dicarbamate **16**. Il y a actuellement plusieurs réactions de synthèse des isocyanates décrites dans la littérature utilisant des carbamates comme intermédiaire clé^[192-194]. Parmi elles, nous nous sommes focalisés sur la réaction d'élimination de l'alcool du dicarbamate selon Pedro Uriz et *al.*^[194] Dans cette étude, de nombreux monoisocyanates et diisocyanates ont été obtenus en éliminant facilement l'alcool de mono- et dicarbamates correspondants en présence de montmorillonite K10 (**Schéma II-55**).

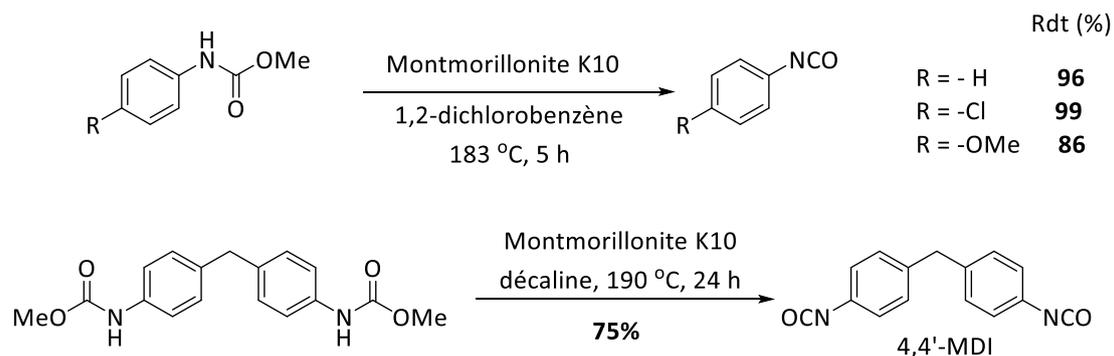


Schéma II-55. Synthèse des isocyanates à partir des carbamates en utilisant la montmorillonite K10^[194]

La montmorillonite K10 a été admise comme un agent efficace pour la synthèse de mono- et de diisocyanate à partir du mono- et du dicarbamate. De plus, son faible coût, son accessibilité facile et sa réutilisabilité sont des avantages supplémentaires à prendre en compte pour une production à grande échelle. Le mécanisme de cette réaction est décrit dans la **Schéma II-56**^[194].

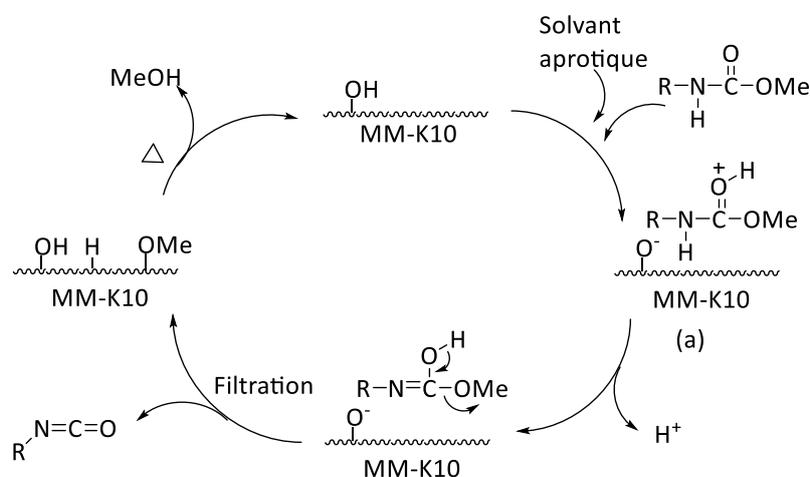


Schéma II-56. Mécanisme de génération des isocyanates à partir des carbamates à l'aide de la montmorillonite K10

La montmorillonite K10 peut agir comme un catalyseur acide. En effet, ses centres acides de Brønsted interagissent avec le carbamate par protonation du groupement carbonyle pour donner l'intermédiaire ionique (a). Cet intermédiaire subit une élimination de la molécule d'alcool pour former l'isocyanate. La température de réaction permet d'éliminer l'alcool de l'argile afin de régénérer la surface active.

En suivant cette méthode, nous avons essayé de synthétiser le 4,4'-MDI à partir du diméthyle-4,4'-méthylènediphényldicarbamate. Malheureusement, malgré de nombreux essais et en faisant varier plusieurs paramètres de la réaction tels que le ratio des réactifs et/ou le temps de réaction, nous n'avons pas pu obtenir l'isocyanate voulu.

En 1995, Valli et Alper ont proposé une méthode de synthèse des isocyanates avec d'excellents rendements en éliminant l'alcool à partir du carbamate d'alkyle en présence de chlorocatécholborane^[192] (**Schéma II-57**).

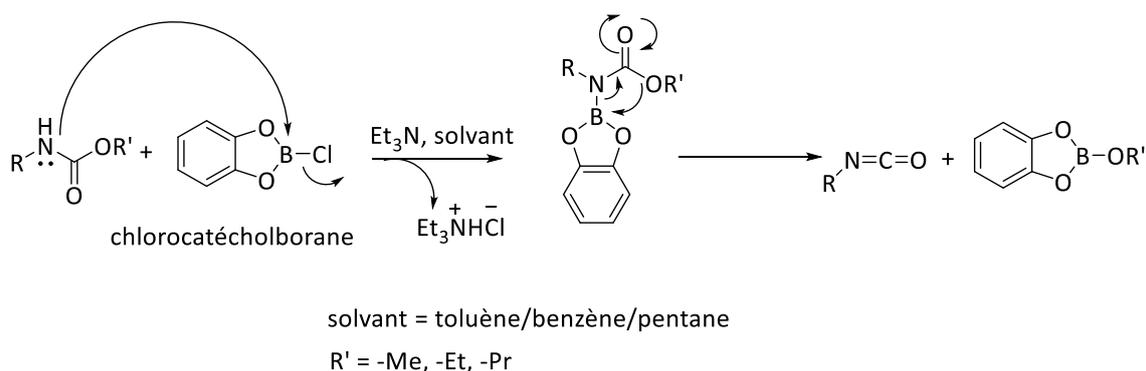


Schéma II-57. Synthèse des isocyanates à partir du carbamate en présence de chlorocatécholborane

Puis, en 1998, Alper et Butler ont modifié cette méthode en utilisant le trihalogénure de bore (BCl_3 , BBr_3) à la place de chlorocatécholborane^[193] (**Schéma II-58**). Les isocyanates peuvent ainsi être facilement isolés par l'évaporation du solvant et du borate de trialkyle sous pression réduite, suivie d'une distillation sous vide à haute température.

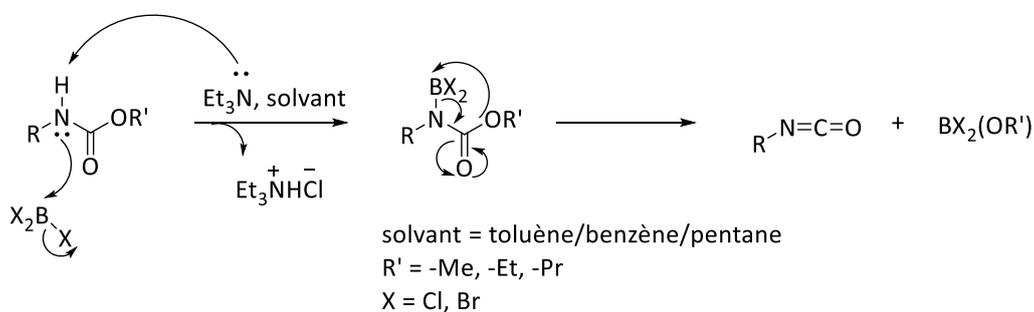


Schéma II-58. Synthèse des isocyanates à partir du carbamate en présence de trihalogénure de bore

Alper et Butler ont synthétisé de nombreux isocyanates avec d'excellents rendements dans des conditions réactionnelles douces (**Tableau II-5**). Cependant, ils n'isolaient pas les isocyanates formés à l'exception du cas de l'entrée 4, **Tableau II-5**.

Tableau II-5 : Conversions des carbamates en isocyanates correspondants à l'aide de BCl_3^a

Entrée	Produit de départ	Produit d'arrivée	R	Rdt (%) ^b
1			Me Et Pr	87 93 88
2			Me Et Pr	90 100 100
3			Me Et	91 100
4			Me Et	73 ^c 68 ^c
5			Me Et	93 94
6			Me Et	87 97

^a **Condition réactionnelle** : isocyanates : BCl_3 (0,37 éq.), Et_3N (1,1 éq.), benzène, reflux, 1 h, diisocyanates : BCl_3 (0,74 éq.), Et_3N (2,2 éq.), benzène, reflux, 1 h

^b **Rendement LC-MS**

^c **Rendement isolé**

En reproduisant ces travaux, nous avons synthétisé le 4,4'-MDI **3** à partir du diméthyle-4,4'-méthylènediphényldicarbamate **16** (**Schéma II-59**).

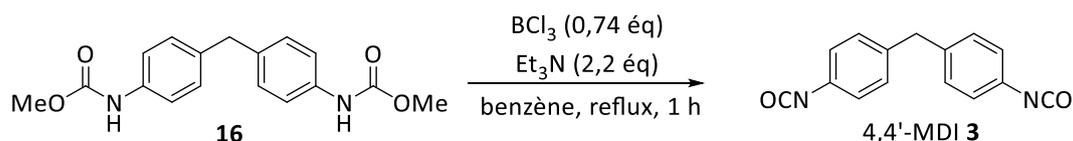


Schéma II-59. Synthèse du 4,4'-MDI à partir du diméthyle-4,4'-méthylènediphényldicarbamate

En analysant le spectre RMN du produit brut de la réaction, nous avons trouvé que la conversion de diméthyle-4,4'-méthylènediphényldicarbamate **16** est de 100% (**Figure II-6**).

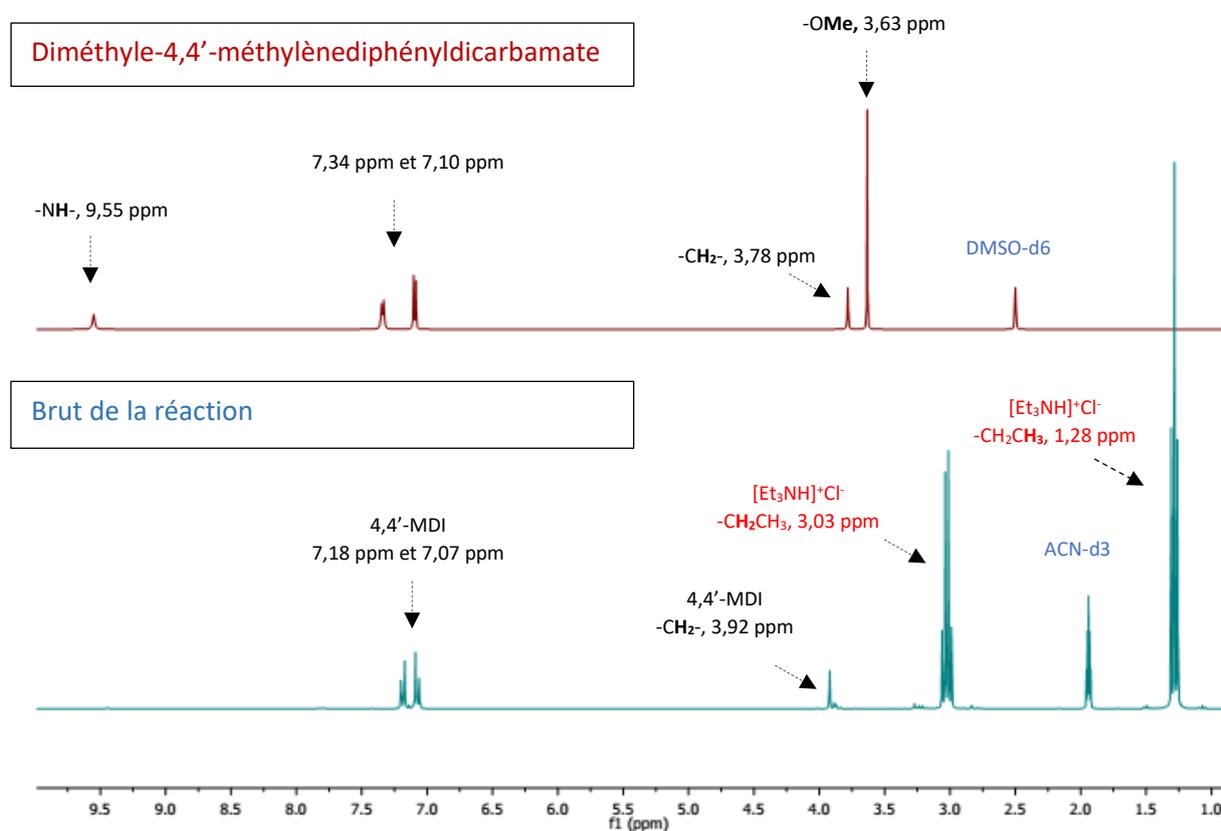


Figure II-6. Vérification de la conversion du diméthyle-4,4'-méthylènediphényldicarbamate par RMN

Toutefois, le produit brut contient le 4,4'-MDI **3**, le chlorhydrate de triéthylammonium ([Et₃NH]⁺Cl⁻) et des impuretés inconnues. Nous avons donc essayé d'isoler le 4,4'-MDI **3** en distillant au « four à boules » (1 mbar, 160 °C). Ceci a permis d'éliminer les impuretés, sauf le chlorhydrate de triéthylammonium qui distille avec le 4,4'-MDI.

Bien que nous n'ayons pas isolé le 4,4'-MDI **3** pur par la distillation, le résultat obtenu était encourageant. En effet, après la distillation au « four à boules » nous obtenons le 4,4'-MDI **3** avec un rendement acceptable de 67% en calculant sur le spectre RMN.

Nous avons donc cherché des méthodes afin de séparer le 4,4'-MDI **3** et le chlorhydrate de triéthylammonium à partir de leur mélange. Le sel de chlorhydrate de triéthylammonium est soluble parfaitement dans l'eau avec une solubilité de 10⁶ mg/L à 25 °C^[216]. L'isocyanate, lui,

est un groupement sensible à l'eau. Cette réaction donne initialement l'acide carbamique qui se décompose pour donner l'amine et le dioxyde de carbone. L'amine libérée réagit ensuite soit avec l'acide carbamique, soit avec l'isocyanate initial pour former un produit de type urée (Schéma II-60).

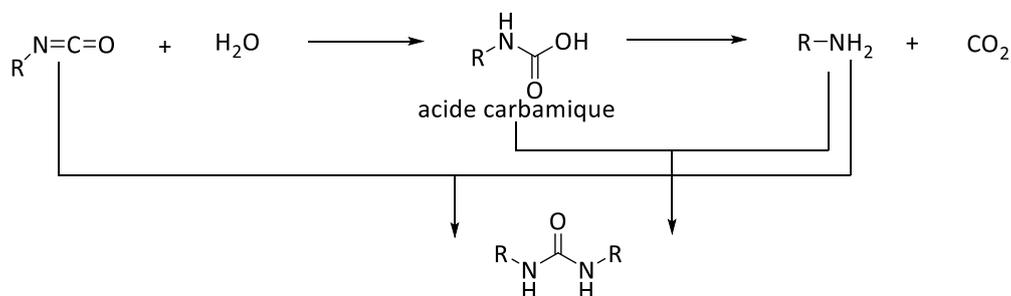


Schéma II-60. Réaction entre l'isocyanate et l'eau dans des conditions déterminées

Cependant, par rapport aux autres réactifs nucléophiles tels que l'alcool (R-OH), le thiol (R-SH) ou l'amine (R-NH₂, R₁R₂NH), l'isocyanate réagit lentement avec l'eau (H-OH)^[217-219]. Ainsi, un lavage rapide du mélange à l'eau froide permet d'obtenir le MDI **3** pur avec un rendement acceptable de 55% (Figure II-7).

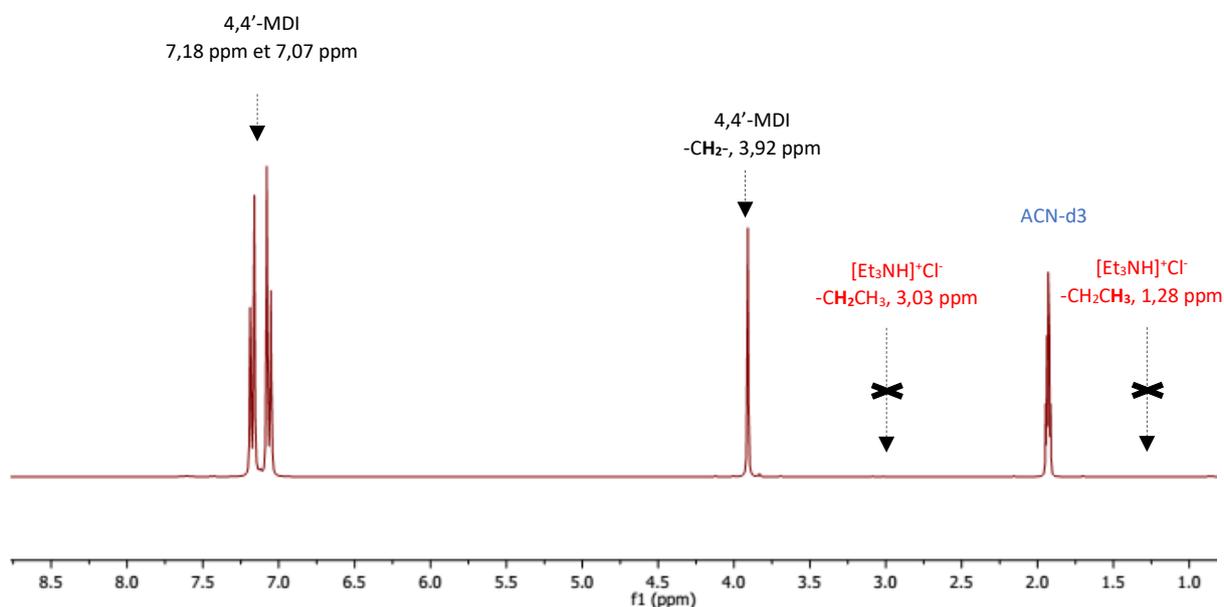


Figure II-7. Obtention du 4,4'-MDI à partir de son mélange avec le [Et₃NH]⁺Cl⁻ grâce au lavage par l'eau froide

Cette réaction a été réalisée à plusieurs reprises donnant des rendements reproductibles

allant de 50% à 55% en 4,4'-MDI **3**. Le mode opératoire a été reproduit pour préparer le 4,4'-MDI substitué au carbone 13 (^{13}C)-**3** avec un rendement similaire de 50% (**Schéma II-61**).

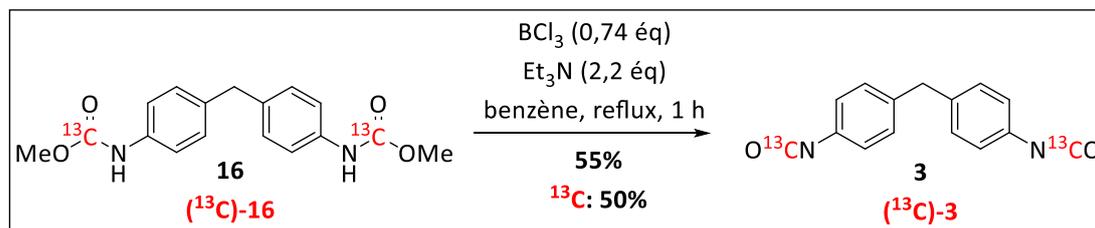


Schéma II-61. Synthèse du 4,4'-MDI substitué au carbone 13 (^{13}C)-**3**

1.5. Synthèse du 4,4'-MDI substitué au carbone 13 : bilan

Une nouvelle méthode de synthèse du 4,4'-MDI à partir de KCN a été développée et nous a donné le 4,4'-MDI **3** avec un rendement global de 44%. Le 4,4'-MDI substitué au carbone 13 (^{13}C)-**3** a été obtenu en reproduisant cette procédure à partir de K^{13}CN , avec un rendement global similaire de 40% (**Schéma II-62**).

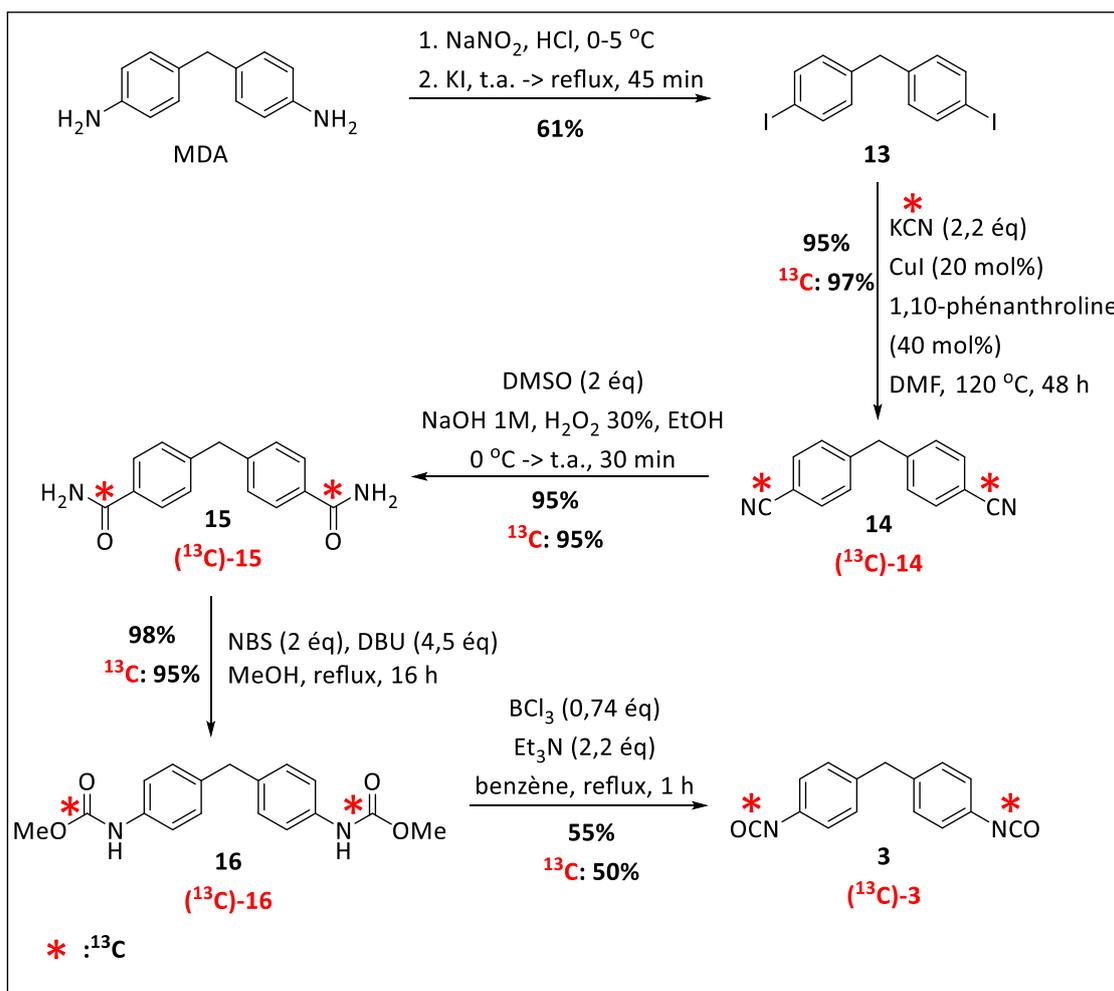


Schéma II-62. Bilan de la synthèse du 4,4'-MDI substituée au carbone 13 (^{13}C)-3 à partir de K^{13}CN

2. Le *p*-tolylisocyanate

2.1. Généralités

Le *p*-tolylisocyanate, un monoisocyanate aromatique hautement réactif, est un intermédiaire dans les synthèses organiques. Il est également trouvé comme contaminant à l'état de traces dans les diisocyanates et les polymères isocyanates commerciaux^[220]. Il n'a pas été associé à des cas cliniques de sensibilisation en raison d'une faible exposition. Cependant, il est un allergène chimique respiratoire et cutané connu dans les modèles animaux, qui provoque des réponses cellulaires et immunitaires fortes^[220-222].

2.2. Choix de la position de substitution au carbone 13

Afin de favoriser les études avec les acides aminés, les modèles protéiques ainsi que les épidermes humains reconstitués, le *p*-tolylisocyanate a été synthétisé en substitution au carbone 13 au niveau de la position active C=O du groupement -NCO comme dans le cas du 4,4'-MDI (**Figure II-8**).



Figure II-8. *p*-Tolylisocyanate **4** et son analogue substitué au carbone 13 (¹³C)-**4**

2.3. Analyse rétrosynthétique du *p*-tolylisocyanate substitué au carbone 13 (¹³C)-**4**

L'analyse rétrosynthétique de (¹³C)-**4** est décrite dans la **Schéma II-63** en appliquant la voie de synthèse du diisocyanate 4,4'-MDI **3**. K¹³CN est utilisé comme précurseur substitué au carbone 13. Ainsi, l'intermédiaire clé, le méthyle-*N*-tolylcarbamate, pourrait subir une élimination d'alcool pour former le *p*-tolylisocyanate.

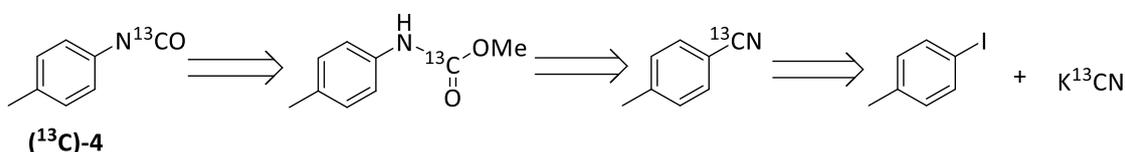


Schéma II-63. Analyse rétrosynthétique du *p*-tolylisocyanate substitué au carbone 13 (¹³C)-**4** à partir de K¹³CN

2.4. Synthèse du *p*-tolylisocyanate substitué au carbone 13 (¹³C)-**4**

La première étape de synthèse du *p*-tolylisocyanate consiste en la préparation du 4-méthylbenzonnitrile **17** en utilisant le 4-iodotoluène commercial et KCN en tant que synthons de départ. Cette étape, à l'aide du catalyseur CuI, permet d'obtenir le 4-méthylbenzonnitrile **17** avec un excellent rendement de 96%. Le 4-méthylbenzonnitrile substitué au carbone 13 (¹³C)-**17** a été synthétisé avec un rendement similaire de 95% en reproduisant à l'identique cette méthode (**Schéma II-64**).

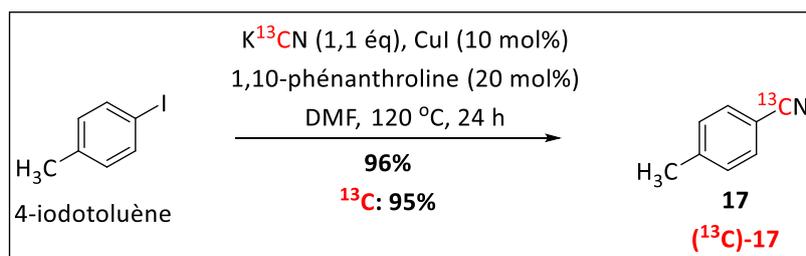


Schéma II-64. Synthèse du 4-méthylbenzonitrile **17** et son analogue substitué (^{13}C) -**17**

Ce nitrile obtenu est ensuite hydrolysé partiellement en utilisant du peroxyde d'hydrogène en tant qu'oxydant pour former l'amide primaire correspondant **18** avec un rendement de 95%. Cette synthèse nous a permis d'obtenir le 4-méthylbenzamide substitué au carbone 13 (^{13}C) -**18** avec un rendement quantitatif (**Schéma II-65**).

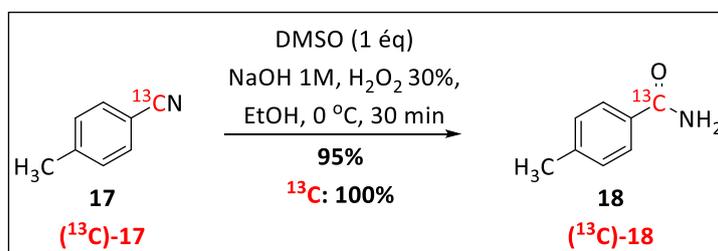


Schéma II-65. Synthèse du 4-méthylbenzamide **18** et son analogue substitué (^{13}C) -**18**

La troisième étape consiste à synthétiser le méthyle-*N*-tolylcarbamate **19** à partir de 4-méthylbenzamide **18** par la réaction de réarrangement d'Hofmann dans l'alcool méthylique. Cette étape a été réalisée avec un rendement modéré de 73%. En appliquant de manière identique cette méthode, le méthyle-*N*-tolylcarbamate substitué au carbone 13 a été obtenu avec un bon rendement de 86% (**Schéma II-66**).

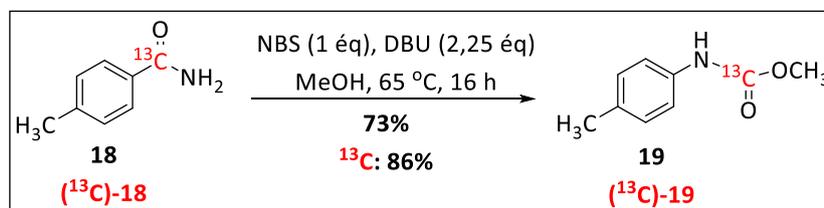


Schéma II-66. Synthèse du méthyle-*N*-tolylcarbamate **19** et son analogue substitué (^{13}C) -**19**

Enfin, la conversion du méthyle-*N*-tolylcarbamate **19** en *p*-tolylisocyanate **4** a été réalisée selon les travaux d'Alper *et al.*^[193] déjà décrits lors de la synthèse de diisocyanate 4,4'-MDI **3**. Pour

cette dernière étape, nous avons réussi à purifier le *p*-tolylisocyanate par la distillation au « four à boules » évitant ainsi l'étape de lavage par l'eau. Celui-ci a été isolé pur avec un rendement de 65%. Le mode opératoire a été reproduit à l'identique pour préparer le *p*-tolylisocyanate substitué au carbone 13 avec un rendement de 79% (Schéma II-67).

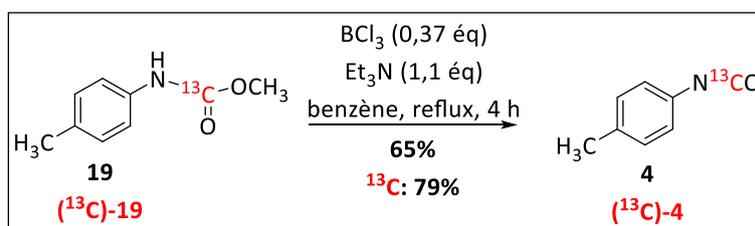


Schéma II-67. Synthèse du *p*-tolylisocyanate **4** et son analogue substitué $(^{13}\text{C})\text{-4}$

2.5. Synthèse du *p*-tolylisocyanate substitué au carbone 13 : bilan

En utilisant la méthode de synthèse développée pour MDI, nous avons préparé le *p*-tolylisocyanate **4** à partir de KCN avec un rendement global de 43%. Le *p*-tolylisocyanate substitué au carbone 13 $(^{13}\text{C})\text{-4}$ a été obtenu en reproduisant cette procédure avec un rendement global de à 65% (Schéma II-68).

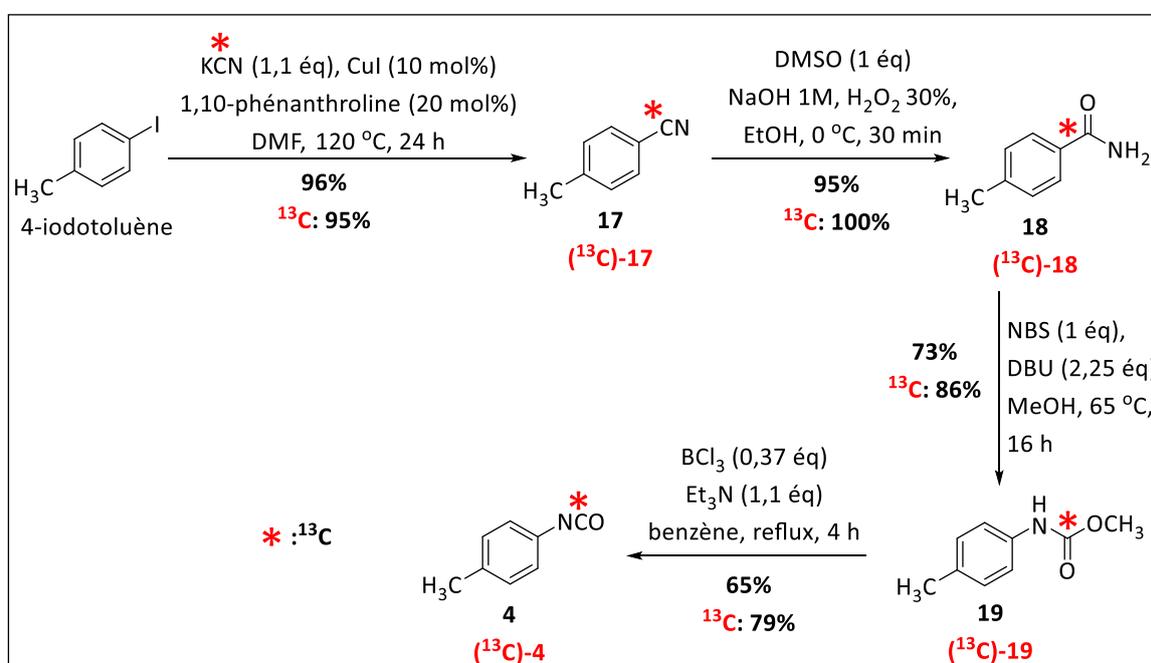


Schéma II-68. Bilan de la synthèse du *p*-tolylisocyanate substitué au carbone 13 $(^{13}\text{C})\text{-4}$ à partir de K^{13}CN

IV. Conclusion

Ce chapitre présente les diverses voies de synthèse qui ont été développées dans le but d'obtenir les quatre allergènes étudiés à partir des précurseurs substitués au carbone 13.

Ainsi, le PA substitué au carbone 13 (**¹³C**)-1 a été obtenu à partir du précurseur simple et bon marché, K¹³CN, en trois étapes avec un rendement global de 81%.

La DCP a été préparée en 6 étapes. Parmi celles-ci, la synthèse de la 1,3-diphénylacétone a été améliorée grâce à l'utilisation d'un amide de Weinreb dans le couplage avec le chlorure de benzylmagnésium. Cette voie de synthèse, appliquée en série substituée au carbone 13, a abouti à la DCP substituée (**¹³C**)-2 avec un rendement global de 31%.

En ce qui concerne le 4,4'-MDI, une nouvelle synthèse « non-phosgène » a été mise au point afin d'éviter d'utiliser des réactifs toxiques. Cette voie de synthèse s'est avérée être efficace. En effet, en utilisant K¹³CN en tant que précurseur substitué, nous avons réussi à préparer le MDI substitué au carbone 13 (**¹³C**)-3 en quatre étapes avec un rendement global de 44%.

La dernière molécule de notre étude est un monoisocyanate, le *p*-tolylisocyanate (**¹³C**)-4, plus petit que le 4,4'-MDI (**¹³C**)-3. Il a été préparé en appliquant la méthode de synthèse du MDI avec un rendement global de 65% à partir de K¹³CN.

Chapitre III

**Etude de la réactivité des allergènes
substitués au carbone 13 envers les
acides aminés et une protéine modèle
en milieu liquide**

Chapitre III : Etude de la réactivité des allergènes substitués au carbone 13 envers les acides aminés et une protéine modèle en milieu liquide

La réactivité des allergènes cutanés et respiratoires vis-à-vis des résidus nucléophiles présents dans les épidermes humains reconstitués sera étudiée. Avant de réaliser cette étude, il est nécessaire d'effectuer des expériences sur des acides aminés, des peptides ou des protéines modèles afin d'obtenir des données de référence. Par conséquent, des études sur la réactivité des allergènes substitués au carbone 13 vis-à-vis d'acides aminés nucléophiles et d'une protéine modèle, l'albumine sérique bovine (BSA), ont été entreprises.

Dans ce chapitre, nous présenterons dans un premier temps les études envers les acides aminés et le glutathion. Puis, dans un deuxième temps, nous aborderons la réactivité des allergènes étudiés vis-à-vis de la BSA.

I. Réactivité des allergènes substitués au carbone 13 envers les acides aminés et le glutathion

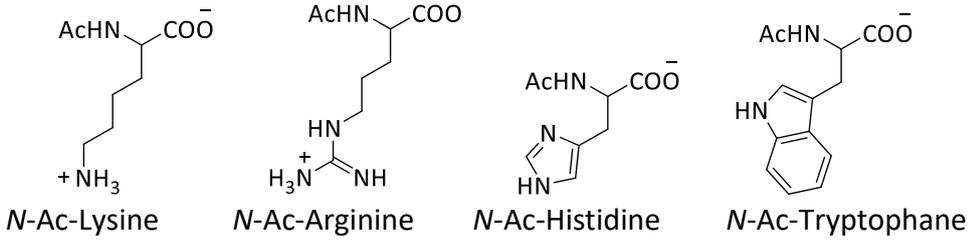
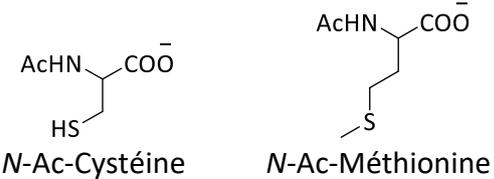
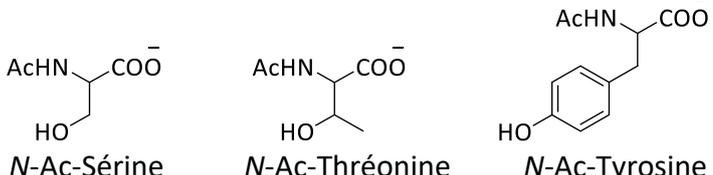
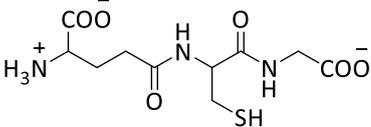
1. Sélection des acides aminés

Nous avons sélectionné les acides aminés nucléophiles ayant la capacité de réagir avec les centres réactifs électrophiles des allergènes. Les acides aminés potentiellement nucléophiles sont classés en trois types : « azotés », « soufrés » et « hydroxylés ». Ces acides aminés sont utilisés en version *N*-acétylée afin d'éviter la réaction secondaire du groupement amine terminal avec les allergènes (**Tableau III-1**).

Nous avons également étudié la réactivité des allergènes vis-à-vis du glutathion (GSH). Le GSH est un pseudo-tripeptide constitué de trois acides aminés (l'acide glutamique, la cystéine, la glycine) possédant des propriétés réductrices et nucléophiles importantes. Ce pseudo-tripeptide existe majoritairement sous forme réduite (GSH) (99%) et minoritairement sous forme oxydée (GSSG) (1%) et participe aux réactions redox par l'oxydation réversible de la fonction thiol (-SH) libre de la cystéine^[223, 224]. Le GSH joue également un rôle important dans la détoxification des composés électrophiles ayant un potentiel cytotoxique ou génotoxique^[225]. En dehors de la fonction thiol, le GSH possède un groupement amine (-NH₂)

libre sur la glycine terminale qui est capable de réagir avec les centres électrophiles des allergènes. Cette structure particulière du GSH permet de tester la réactivité des allergènes ayant une affinité à la cystéine ou à la lysine et notamment les allergènes mixtes ayant une affinité à la fois pour ces deux nucléophiles.

Tableau III-1 : Structure des acides aminés et du GSH utilisés dans l'étude de réactivité des allergènes (à pH 7,4)

Acides aminés azotés	 <p><i>N</i>-Ac-Lysine <i>N</i>-Ac-Arginine <i>N</i>-Ac-Histidine <i>N</i>-Ac-Tryptophane</p>
Acides aminés sulfurés	 <p><i>N</i>-Ac-Cystéine <i>N</i>-Ac-Méthionine</p>
Acides aminés hydroxylés	 <p><i>N</i>-Ac-Sérine <i>N</i>-Ac-Thréonine <i>N</i>-Ac-Tyrosine</p>
GSH	

2. Mode opératoire

L'allergène (1 équivalent) solubilisé dans de l'acétonitrile deutéré (300 μ L) est mélangé avec l'acide aminé ou le GSH (10 équivalents) solubilisé dans un tampon phosphate 0,1 M à pH 7,4 (300 μ L). La réaction est suivie par RMN du carbone 13 à partir d'un temps initial considéré comme $t = 0$. Les analyses par RMN bidimensionnelle [^1H - ^{13}C] HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) et HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) sont réalisées dès que le signal du carbone 13 de l'allergène disparaît ou que la réaction n'évolue plus afin

d'élucider les structures des adduits formés. Le mélange réactionnel est également analysé par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) afin de compléter les informations obtenues par RMN.

3. Résultats

3.1. Réactivité de l'anhydride phtalique (^{13}C)-1

Le **Schéma III-1** présente l'ensemble des adduits observés lors de la réaction entre (^{13}C)-1 et les acides aminés nucléophiles/le GSH. Seuls la *N*-Ac-Lys et le GSH ont montré une réactivité avec (^{13}C)-1 pour former des adduits de type amide et imide (**Schéma III-1**).

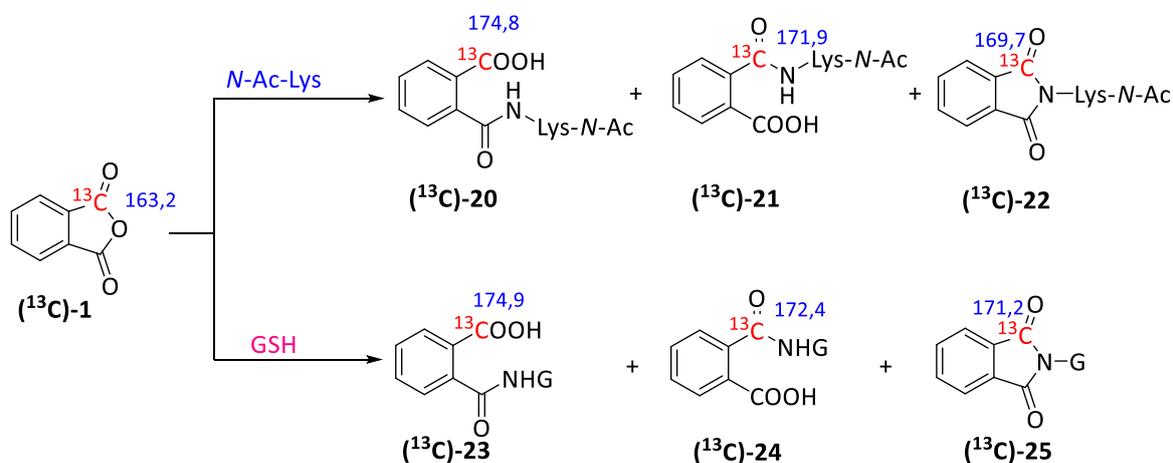
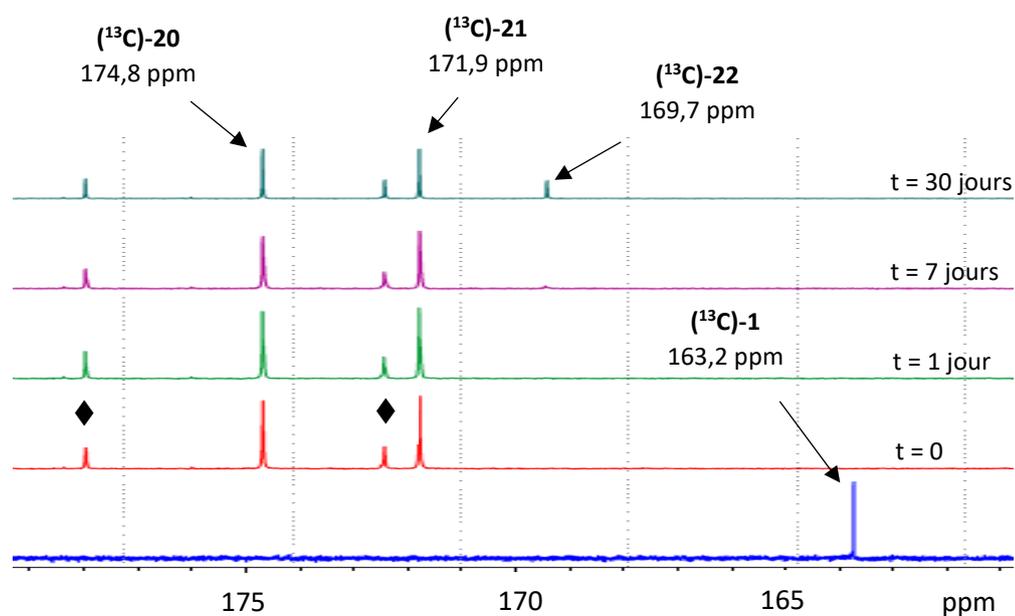


Schéma III-1. Adduits formés par la réaction entre (^{13}C)-1 et les acides aminés/le GSH

a) Réactivité de (^{13}C)-1 vis-à-vis de la *N*-Ac-Lys

En suivant la cinétique de la réaction entre (^{13}C)-1 et la *N*-Ac-Lys par RMN du carbone 13, nous avons observé que (^{13}C)-1 a déjà réagi totalement avec la *N*-Ac-Lys lors de la première mesure. En effet, à $t = 0$, le signal à 163,2 ppm du carbone 13 du groupement carbonyle de (^{13}C)-1 disparaît totalement et conduit à la formation des 2 adduits à 174,8 ppm et 171,9 ppm (**Figure III-1**).



$(^{13}\text{C})\text{-1} + N\text{-Ac-Lys}$, $\text{ACN-d}_3/\text{tampon phosphate } 0,1 \text{ M à pH } 7,4$

◆ $N\text{-Ac-Lys}$

Figure III-1. Cinétique de la réaction entre $(^{13}\text{C})\text{-1}$ et la $N\text{-Ac-Lys}$

Les expériences de RMN bidimensionnelle [$^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$] montrent que le signal du carbone à 174,8 ppm correspondrait au carbone de la fonction acide de l'adduit $(^{13}\text{C})\text{-20}$. Tandis que le signal du carbone à 171,9 ppm correspondrait au carbone de la fonction amide de l'adduit $(^{13}\text{C})\text{-21}$.

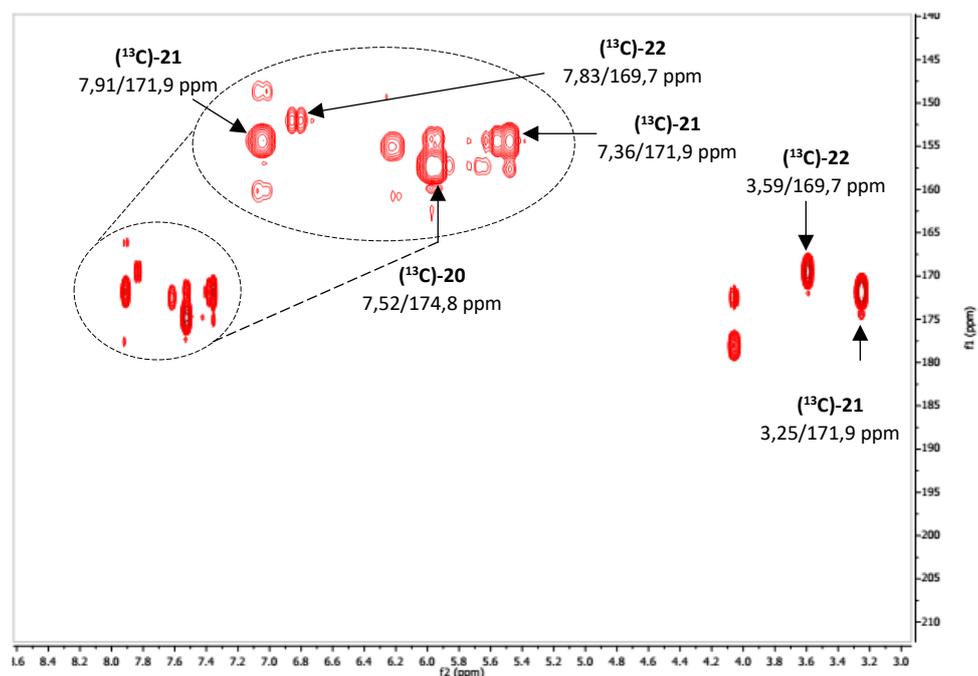


Figure III-2. Spectre HMBC permettant de caractériser les adduits $(^{13}\text{C})\text{-20}$, $(^{13}\text{C})\text{-21}$, $(^{13}\text{C})\text{-22}$

En effet, le spectre HMBC montre que le signal du carbone à 171,9 ppm corrèle avec un proton à 7,91 ppm correspondant au proton porté par l'atome d'azote de la fonction amide. De plus, nous avons détecté une autre corrélation avec un proton aromatique à 7,36 ppm. Enfin, une corrélation a également été observée avec les protons à 3,25 ppm correspondant aux protons de la chaîne latérale de la *N*-Ac-Lys. Le signal du carbone à 174,8 ppm, quant à lui, présente une seule corrélation avec un proton aromatique à 7,52 ppm (**Figure III-2**).

Après 7 jours de réaction, un nouveau signal du carbone à 169,7 ppm apparaît (**Figure III-1**). En observant le spectre HMBC (**Figure III-2**), nous avons trouvé que ce signal du carbone corrèle avec un proton aromatique à 7,83 ppm et des protons à 3,59 ppm portés par un carbone de la chaîne latérale de la *N*-Ac-Lys. Ces analyses sont en accord avec un adduit (^{13}C)-**22** résultant de la cyclisation des adduits (^{13}C)-**20** et (^{13}C)-**21** (**Schéma III-2**).

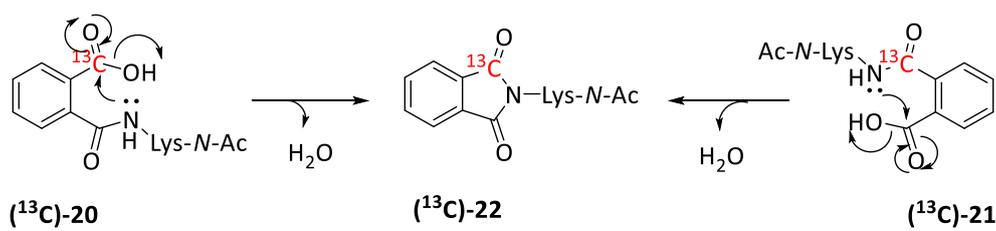


Schéma III-2. Formation de l'adduit (^{13}C)-**22** à partir des adduits (^{13}C)-**20** et (^{13}C)-**21**

La formation de ces trois adduits a été confirmée par spectrométrie de masse. Ainsi, nous avons trouvé deux composés ayant des rapports m/z 338,1430 et 320,1325 en mode positif (**Figure III-3**) qui correspondent aux adduits (^{13}C)-**20**/ ^{13}C)-**21** et (^{13}C)-**22**.

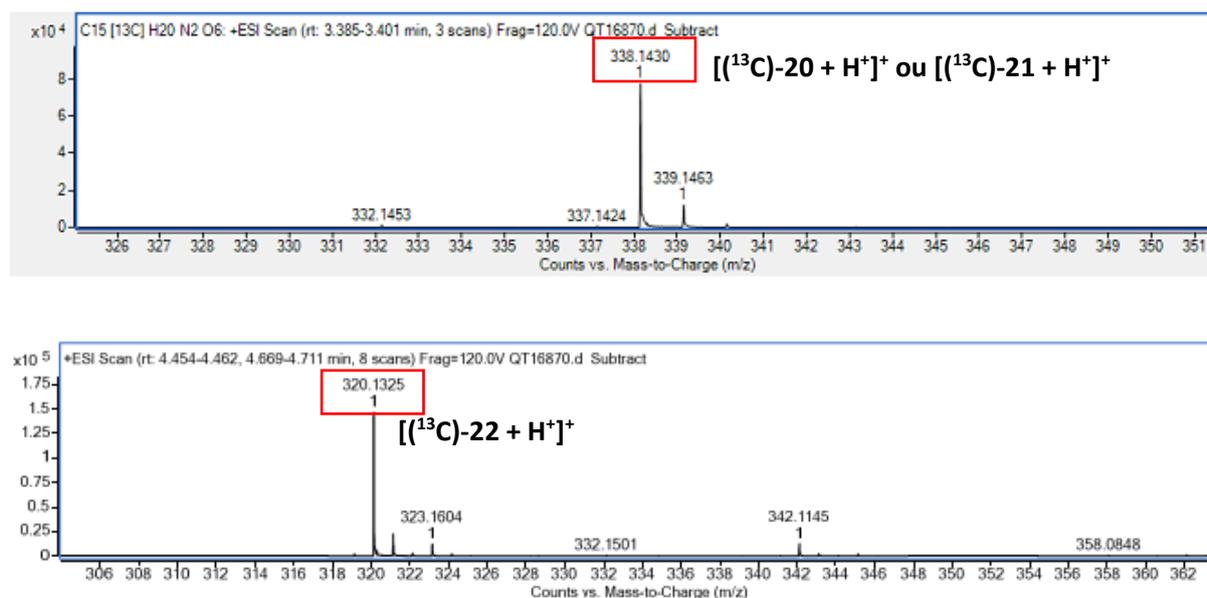


Figure III-3. Spectres MS permettant de confirmer la formation des adduits (^{13}C)-20, (^{13}C)-21 et (^{13}C)-22

Les informations spectrales, permettant de caractériser la structure des adduits formés lors de la réaction de (^{13}C)-1 et de la *N*-Ac-Lys, sont résumées dans le **Tableau III-2**.

Tableau III-2 : Informations spectrales permettant de caractériser les adduits (^{13}C)-20, (^{13}C)-21, (^{13}C)-22

Adduit formé	δ (ppm) ^{13}C RMN	δ (ppm) ^1H HMBC	Spectres MS (m/z)	Structure proposée
(^{13}C)-20	174,8	7,52	338,1430	
(^{13}C)-21	171,9	7,91 ; 7,36 ; 3,25	338,1430	
(^{13}C)-22	169,7	7,83 ; 3,59	320,1325	

b) Réactivité de (^{13}C)-1 vis-à-vis du GSH

En suivant la cinétique de la réaction entre (^{13}C)-1 et le GSH par RMN du carbone 13, nous

avons trouvé que $(^{13}\text{C})\text{-1}$ a déjà réagi avec le GSH lors de la première mesure pour donner deux adduits à 174,9 ppm et 172,4 ppm qui correspondraient à deux produits de type amide $(^{13}\text{C})\text{-23}$, $(^{13}\text{C})\text{-24}$, respectivement (**Figure III-4**). À $t = 14$ jours, la réaction n'évolue plus et un nouveau signal à 171,2 ppm apparaît qui pourrait correspondre à l'adduit cyclisé de type imide $(^{13}\text{C})\text{-25}$ comme dans le cas de la *N*-Ac-Lys.

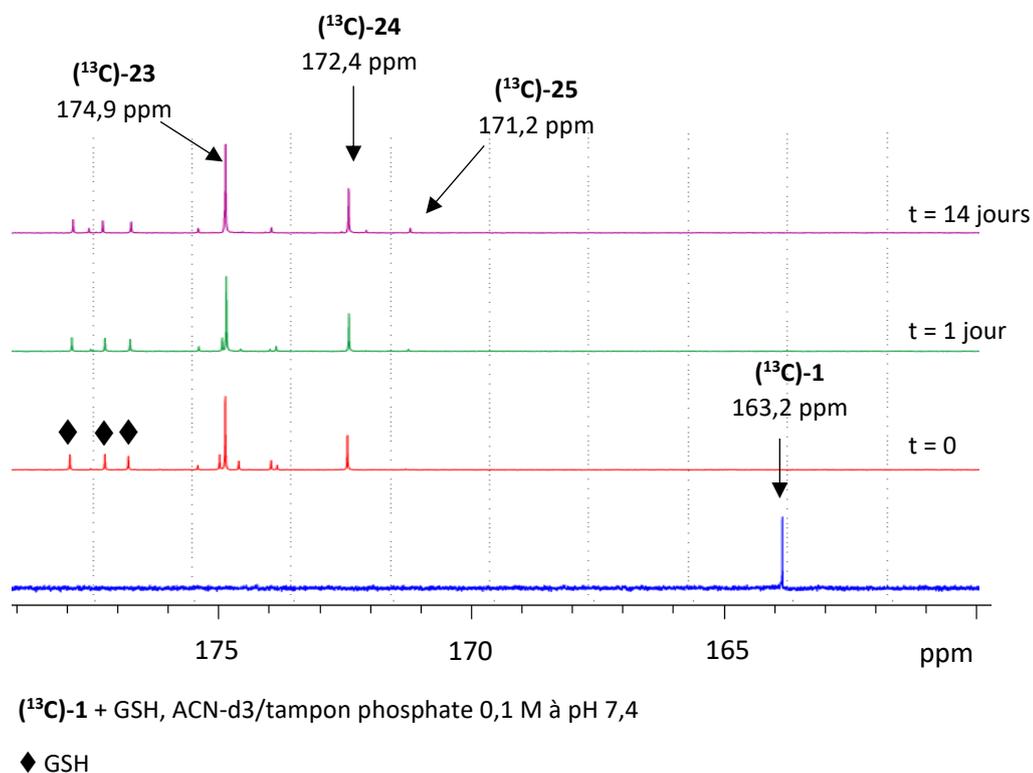


Figure III-4. Cinétique de la réaction entre $(^{13}\text{C})\text{-1}$ et le GSH

La structure des adduits $(^{13}\text{C})\text{-23}$, $(^{13}\text{C})\text{-24}$ et $(^{13}\text{C})\text{-25}$ est élucidée par le spectre HMBC (**Figure III-5**).

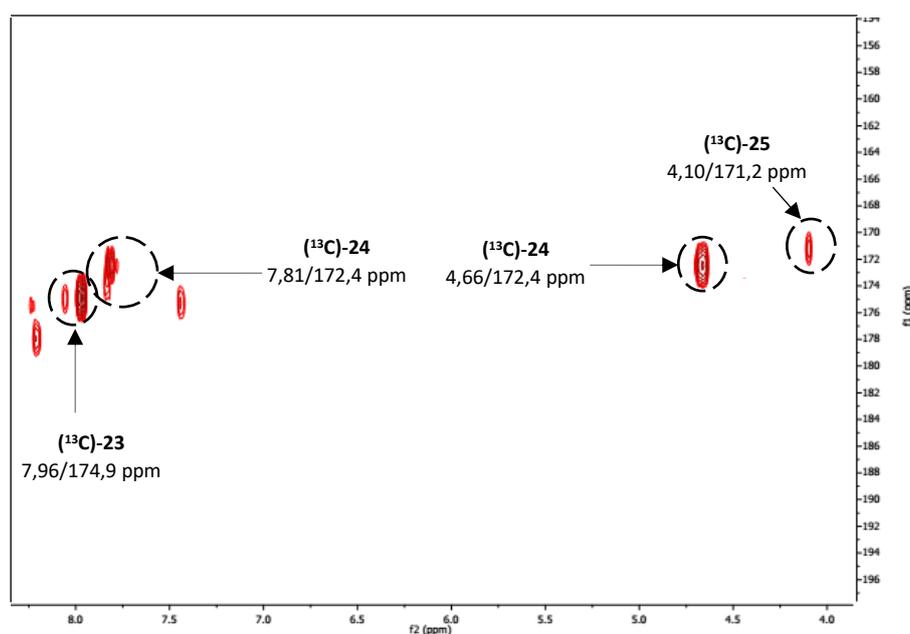


Figure III-5. Spectre HMBC permettant d'identifier les adduits $(^{13}\text{C})\text{-23}$, $(^{13}\text{C})\text{-24}$ et $(^{13}\text{C})\text{-25}$

En effet, le signal du carbone à 172,4 ppm est corrélé avec un proton à 7,81 ppm qui est porté par le noyau aromatique. Il corrèle également avec le proton α à 4,66 ppm de l'acide glutamique du GSH. Le signal du carbone à 174,9 ppm, quant à lui, présente seulement une corrélation avec un proton aromatique à 7,96 ppm. Enfin, le petit signal du carbone à 171,2 ppm est corrélé avec le proton α à 4,10 ppm de l'acide glutamique du GSH.

La formation des adduits majoritaires de type amide a également été confirmée par LC-MS. Ainsi, nous avons trouvé un ion moléculaire de m/z 439,1008 (en mode positif) (**Figure III-6**) qui correspond à l'adduit $(^{13}\text{C})\text{-23}$ ou $(^{13}\text{C})\text{-24}$. Par contre, l'adduit cyclisé $(^{13}\text{C})\text{-25}$ n'a pas été détecté.

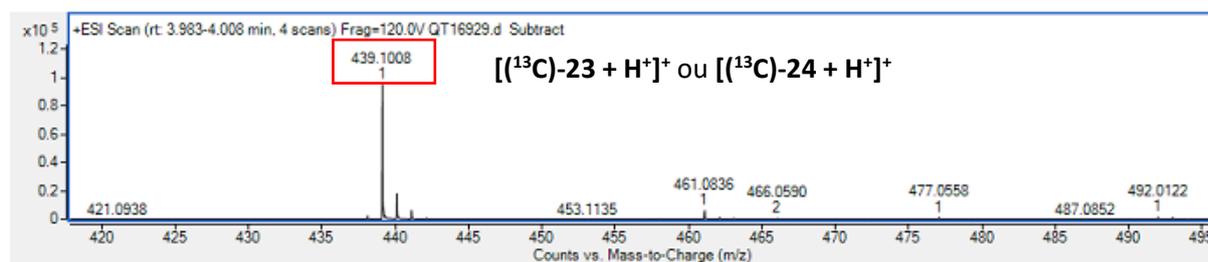
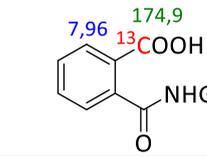
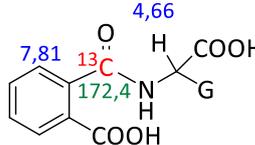
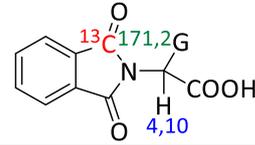


Figure III-6. Spectres MS permettant de confirmer la formation des adduits $(^{13}\text{C})\text{-23}$, $(^{13}\text{C})\text{-24}$

Les informations spectrales sont présentées dans le **Tableau III-3**, permettant de caractériser

la structure des adduits formés lors de la réaction de (^{13}C)-1 et du GSH.

Tableau III-3 : Informations spectrales permettant de caractériser les adduits (^{13}C)-23, (^{13}C)-24, (^{13}C)-25

Adduit formé	δ (ppm) ^{13}C RMN	δ (ppm) ^1H HMBC	Spectres MS (m/z)	Structure proposée
(^{13}C)-23	174,9	7,96	439,1008	
(^{13}C)-24	172,4	7,81 ; 4,66	439,1008	
(^{13}C)-25	171,2	4,10	-	

3.2. Réactivité de la 2,3-diphénylcyclopropénone (^{13}C)-2

Le schéma suivant présente l'ensemble des adduits formés entre (^{13}C)-2 et les acides aminés nucléophiles ou le GSH. Parmi les acides aminés testés, la *N*-Ac-Cys, la *N*-Ac-His et le GSH ont montré une réactivité avec (^{13}C)-2 (Schéma III-3).

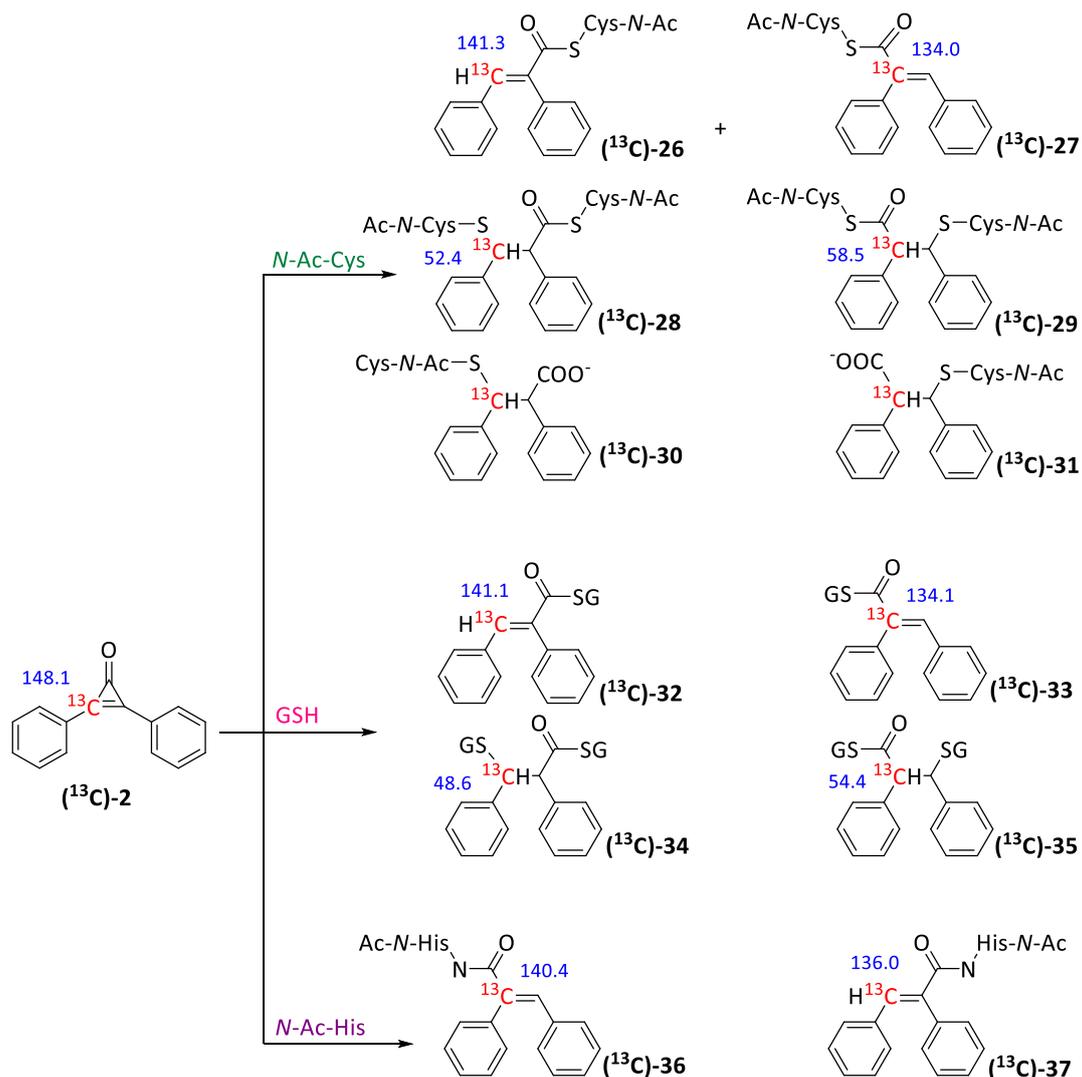


Schéma III-3. Adduits formés par la réaction entre (13C)-2 et les acides aminés/le GSH

a) Réactivité de (13C)-2 vis-à-vis de la N-Ac-Cys

D'après les résultats du DPRA, la DCP (13C)-2 devrait avoir une forte affinité envers les résidus thiolés. En faisant la réaction entre (13C)-2 et la N-Ac-Cys, nous avons déterminé les adduits formés à l'aide des expériences de RMN du carbone 13 mono- et bidimensionnelles ainsi que des analyses de LC-MS.

À partir du premier jour, l'intensité du signal à 148,1 ppm correspondant au carbone 13 de (13C)-2 diminue tandis que deux nouveaux signaux à 141,3 ppm et 134,0 ppm apparaissent et augmentent au cours du temps. De plus, dans la zone de 50,0 ppm à 60,0 ppm, deux autres signaux plus faibles apparaissent à 52,4 ppm et 58,5 ppm. À t = 14 jours, le signal à 148,1 ppm disparaît totalement (**Figure III-7**).

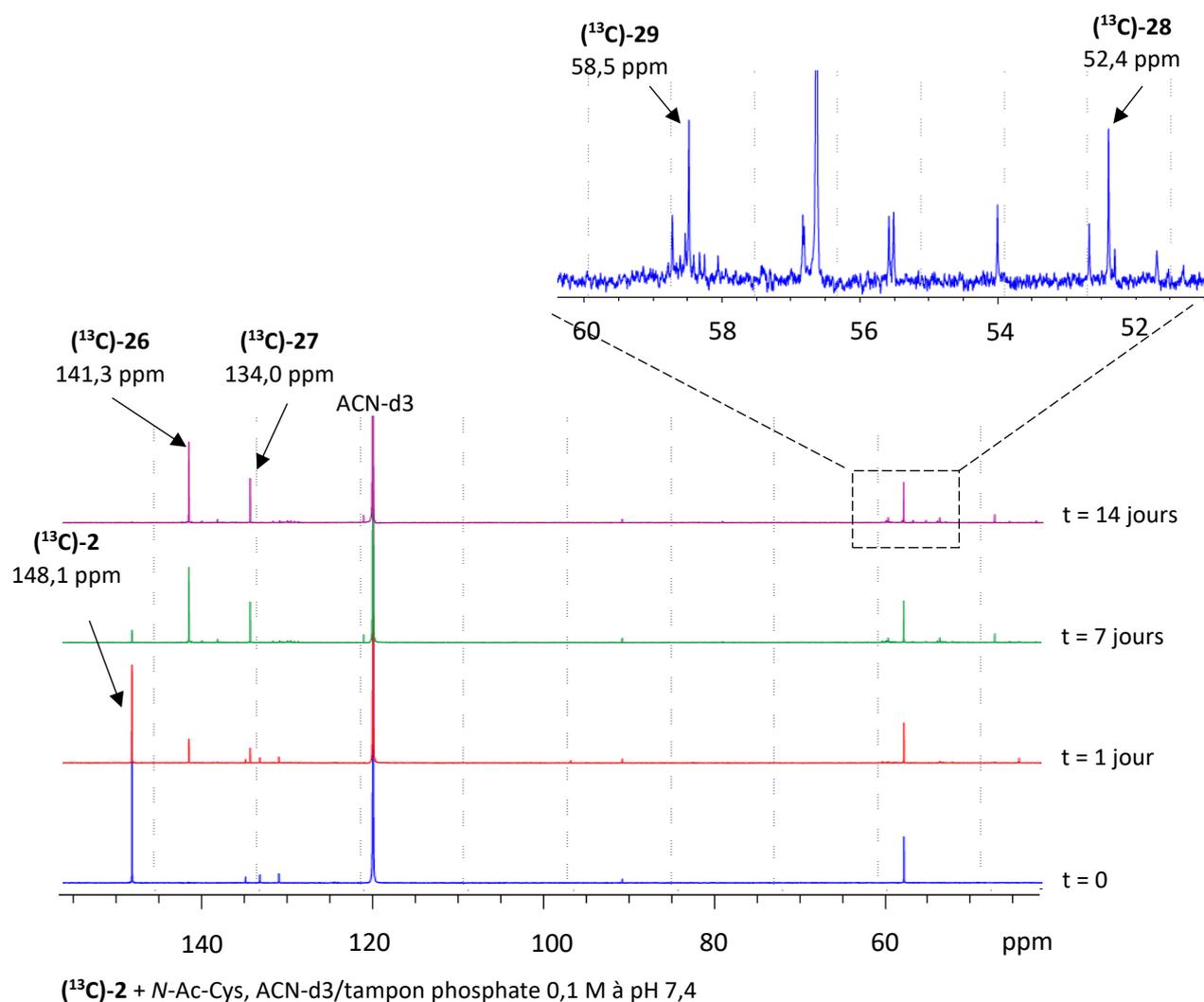


Figure III-7. Cinétique de la réaction entre $(^{13}\text{C})\text{-2}$ et la *N*-Ac-Cys

Le spectre HSQC montre que le signal du carbone à 141,3 ppm corrèle avec un proton à 7,79 ppm. En analysant le spectre HMBC (**Figure III-8**), nous avons observé que ce signal du carbone est en corrélation avec un proton aromatique à 7,01 ppm. Le signal à 141,3 ppm pourrait donc correspondre au carbone 13 de l'adduit $(^{13}\text{C})\text{-26}$ formé par une réaction d'addition nucléophile du groupement thiol de la *N*-Ac-Cys sur le carbonyle de $(^{13}\text{C})\text{-2}$ amenant ainsi à l'ouverture du cycle à trois atomes de carbone. En HMBC, le deuxième signal du carbone à 134,0 ppm corrèle avec un proton aromatique à 7,16 ppm et aussi avec un proton à 7,79 ppm porté par l'atome de carbone voisin. De plus, nous avons observé aucune corrélation $[^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}]$ pour ce signal lors du traitement du spectre HSQC. Ainsi, le signal à 134,0 ppm pourrait correspondre au carbone 13 d'un autre adduit $(^{13}\text{C})\text{-27}$ formé entre $(^{13}\text{C})\text{-2}$ et la *N*-Ac-Cys.

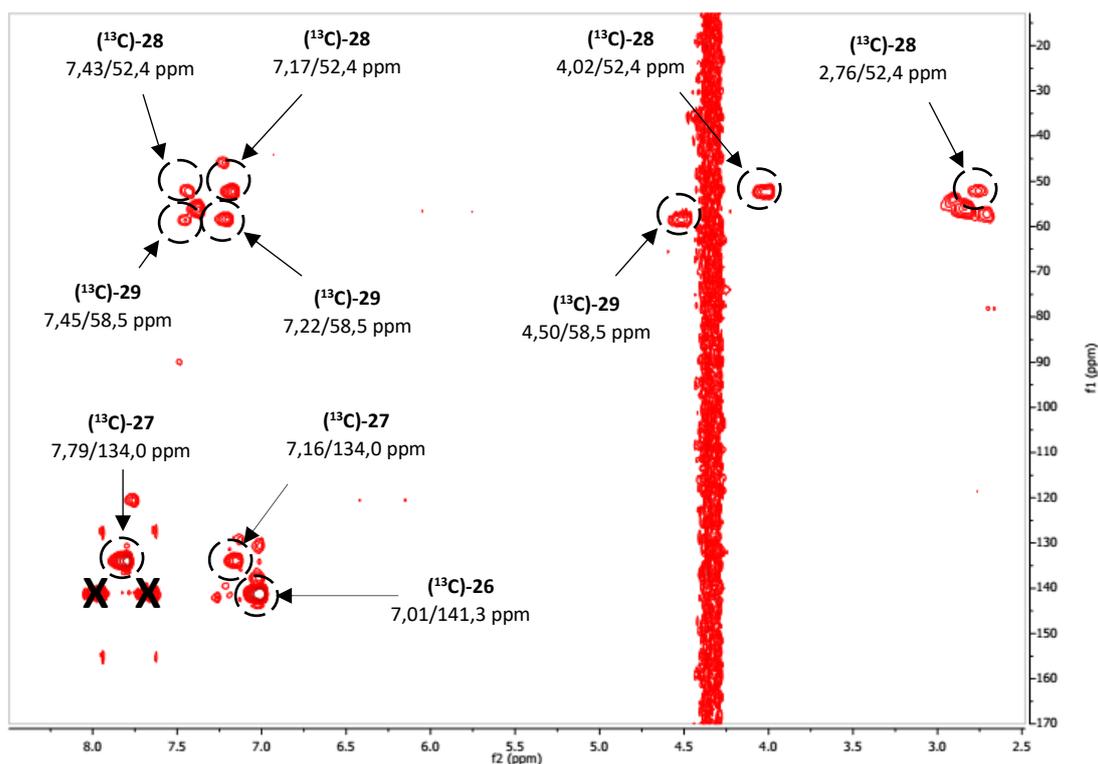


Figure III-8. Spectre HMBC permettant d'identifier les adduits (^{13}C -26, (^{13}C -27, (^{13}C -28 et (^{13}C -29 (X = résidus de corrélation à courte distance entre C (141,3 ppm) et H (7,79 ppm))

Selon Eicher et Weber^[226], la formation des deux adduits (^{13}C -26 et (^{13}C -27 peut être expliquée par la réaction d'addition nucléophile du groupement thiol de la *N*-Ac-Cys sur le carbone de la fonction carbonyle de (^{13}C -2. Cette addition est accompagnée de l'ouverture du cycle à trois atomes de carbone, ouverture favorisée par sa haute tension de cycle (**Schéma III-4**).

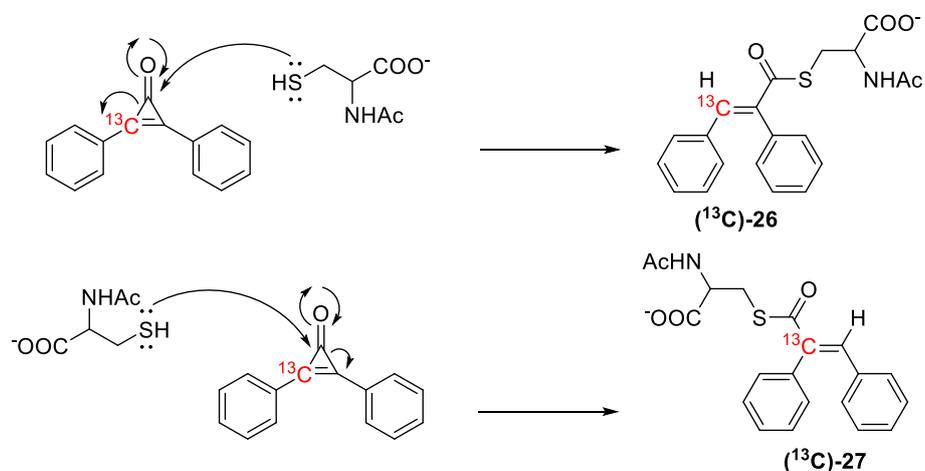


Schéma III-4. Mécanisme de formation des adduits (^{13}C -26 et (^{13}C -27

Les deux signaux à 58,5 ppm et 52,4 ppm ne peuvent pas correspondre aux carbones sp^2 de la double liaison C=C comme dans le cas des adduits (^{13}C)-26 et (^{13}C)-27. Par conséquent, il semble que la double liaison C=C n'existe plus. Le spectre HMBC montre que le signal du carbone à 52,4 ppm corrèle avec des protons aromatiques à 7,43 ppm et 7,17 ppm mais également avec un proton à 4,02 ppm porté par un atome de carbone sp^3 voisin et avec des protons à 2,76 ppm dans la chaîne latérale de la *N*-Ac-Cys. Ce signal pourrait donc correspondre à l'adduit (^{13}C)-28 résultant d'une addition nucléophile d'une deuxième molécule de *N*-Ac-Cys sur la double liaison C=C de l'adduit (^{13}C)-26 (Schéma III-5). Le signal du carbone à 58,5 ppm, quant à lui, corrèle avec des protons aromatiques à 7,45 ppm et 7,22 ppm et également avec un proton à 4,50 ppm porté par un atome de carbone voisin. Ainsi, ce signal pourrait correspondre à un autre double adduit (^{13}C)-29 de la réaction entre (^{13}C)-27 et une deuxième molécule de *N*-Ac-Cys (Schéma III-5).

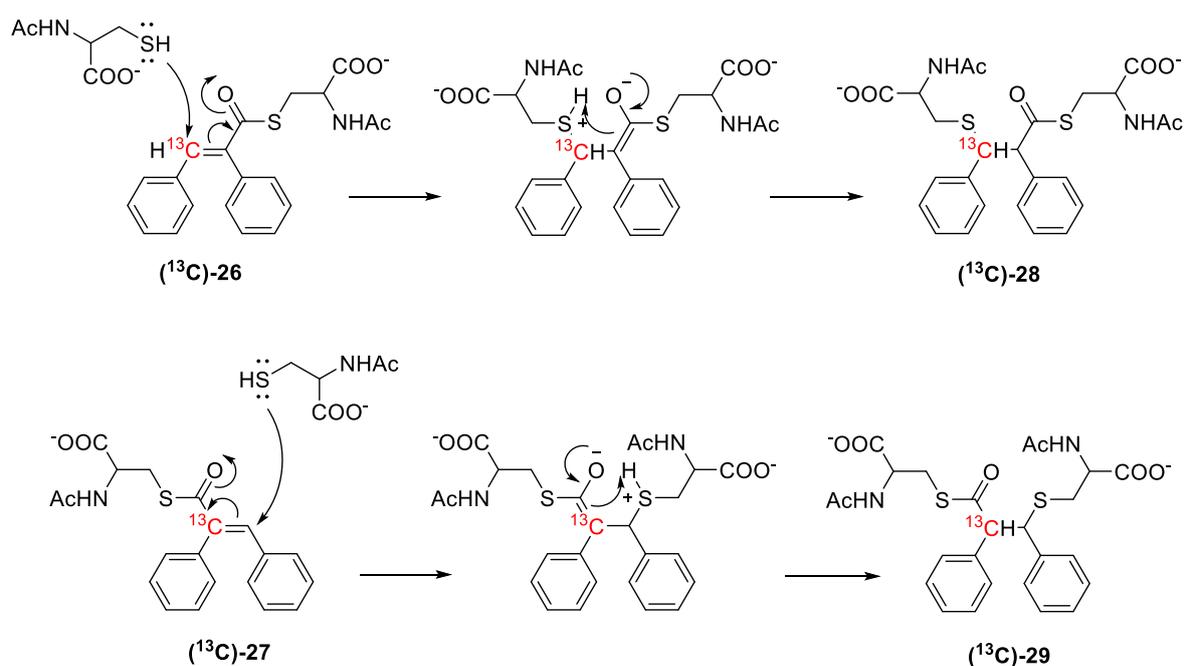


Schéma III-5. Mécanisme de formation des adduits (^{13}C)-28 et (^{13}C)-29

La formation de ces quatre adduits a également été confirmée par LC-MS. Ainsi, nous avons trouvé deux composés ayant des rapports m/z 371,1130 et 534,1425 (en mode positif) (Figure III-9) qui correspondent respectivement aux adduits (^{13}C)-26/(^{13}C)-27 et (^{13}C)-28/(^{13}C)-29.

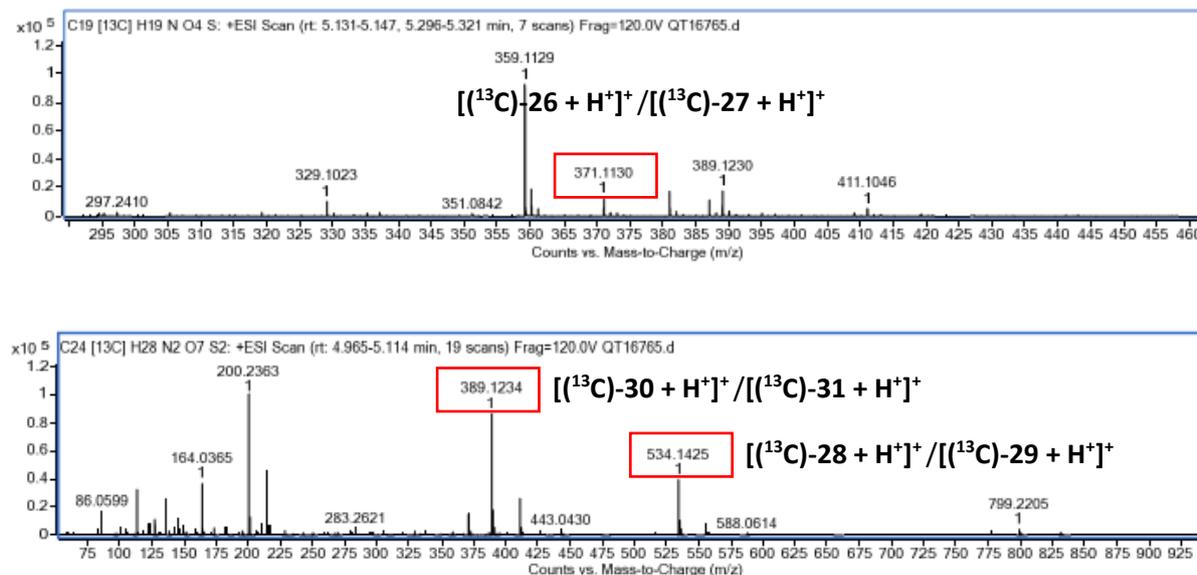


Figure III-9. Spectres MS permettant de confirmer la formation des adduits (^{13}C) -26, (^{13}C) -27, (^{13}C) -28, (^{13}C) -29, (^{13}C) -30 et (^{13}C) -31

Nous avons également détecté un autre signal dans le spectre MS dont le rapport m/z est 389,1234. Ce signal, ayant une différence de m/z de 18 unités par rapport aux adduits (^{13}C) -26/ (^{13}C) -27, pourrait correspondre aux adduits résultant de la réaction entre la *N*-Ac-Cys et (^{13}C) -2 suivi par une addition d'une molécule d'eau. En effet, d'après Parkinson *et al.*^[227], le thiol peut réagir avec la DCP en s'additionnant sur la double liaison dans le cycle cyclopropénique pour former un dérivé de cyclopropanone instable. Celui-ci subit soit une oxydation du soufre soit une addition d'eau sur le carbonyle impliquant l'ouverture du cycle cyclopropanone. Dans les conditions réactionnelles de notre étude, il est impossible de former l'adduit d'oxydation du soufre. Ainsi, l'ion moléculaire de m/z 389,1234 observé dans le spectre LC-MS pourrait correspondre aux adduits (^{13}C) -30/ (^{13}C) -31 (Schéma III-6).

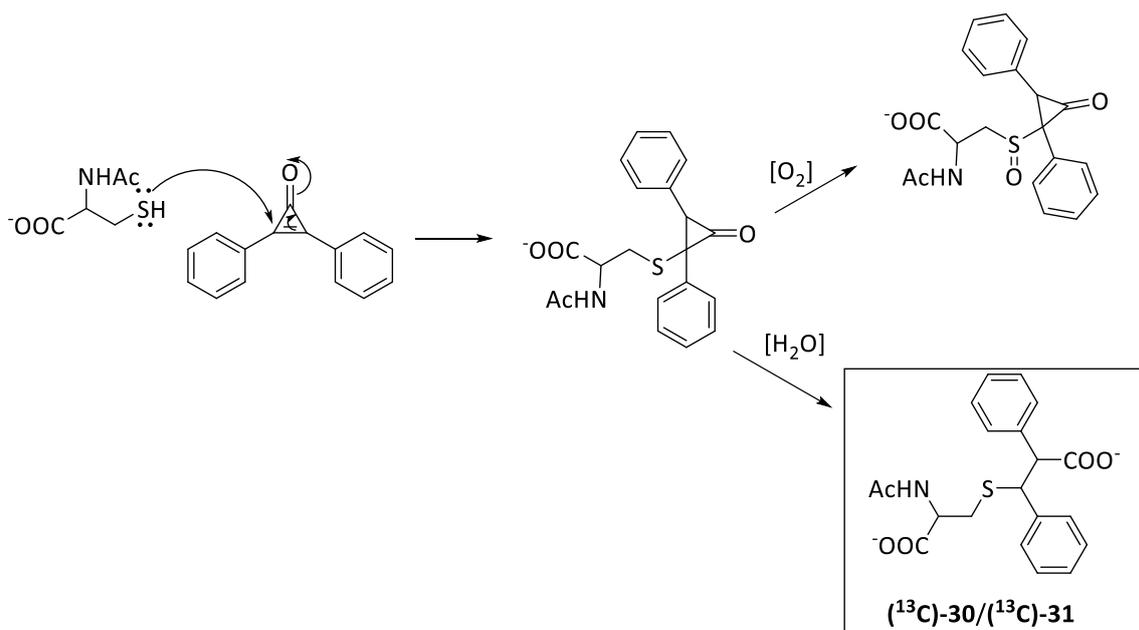


Schéma III-6. Mécanisme de formation des adduits (^{13}C)-30 et (^{13}C)-31

Cependant, nous n'avons pas pu détecter et élucider la structure des adduits (^{13}C)-30/(^{13}C)-31 par les spectres RMN. Cela pourrait être la conséquence de leur faible quantité formée.

Le **Tableau III-4** résume les informations spectrales permettant de caractériser la structure des adduits formés lors de la réaction de (^{13}C)-2 et de la *N*-Ac-Cys.

Tableau III-4 : Informations spectrales permettant de caractériser des adduits (^{13}C)-26, (^{13}C)-27, (^{13}C)-28, (^{13}C)-29, (^{13}C)-30 et (^{13}C)-31

Adduit formé	δ (ppm) ^{13}C RMN	δ (ppm) ^1H HSQC	δ (ppm) ^1H HMBC	Spectre MS (m/z)	Structure proposée
(^{13}C)-26	141,3	7,79	7,01	371,1130	
(^{13}C)-27	134,0	-	7,79 ; 7,16	371,1130	
(^{13}C)-28	52,4	-	7,43 ; 7,17 ; 4,02 ; 2,76	534,1425	

(¹³C)-29	58,5	-	7,45 ; 7,22 ; 4,50	534,1425	
(¹³C)-30	-	-	-	389,1234	
(¹³C)-31	-	-	-	389,1234	

b) Réactivité de (¹³C)-2 vis-à-vis du GSH

Comme pour le cas de la *N*-Ac-Cys, (¹³C)-2 réagit de la même manière mais plus rapidement avec le GSH. En effet, à partir du premier jour, le signal à 148,1 ppm correspondant au carbone 13 de (¹³C)-2 diminue au cours du temps, tandis que deux nouveaux signaux à 141,1 ppm, 134,1 ppm apparaissent. À *t* = 7 jours, le signal à 148,1 ppm disparaît totalement (**Figure III-10**).

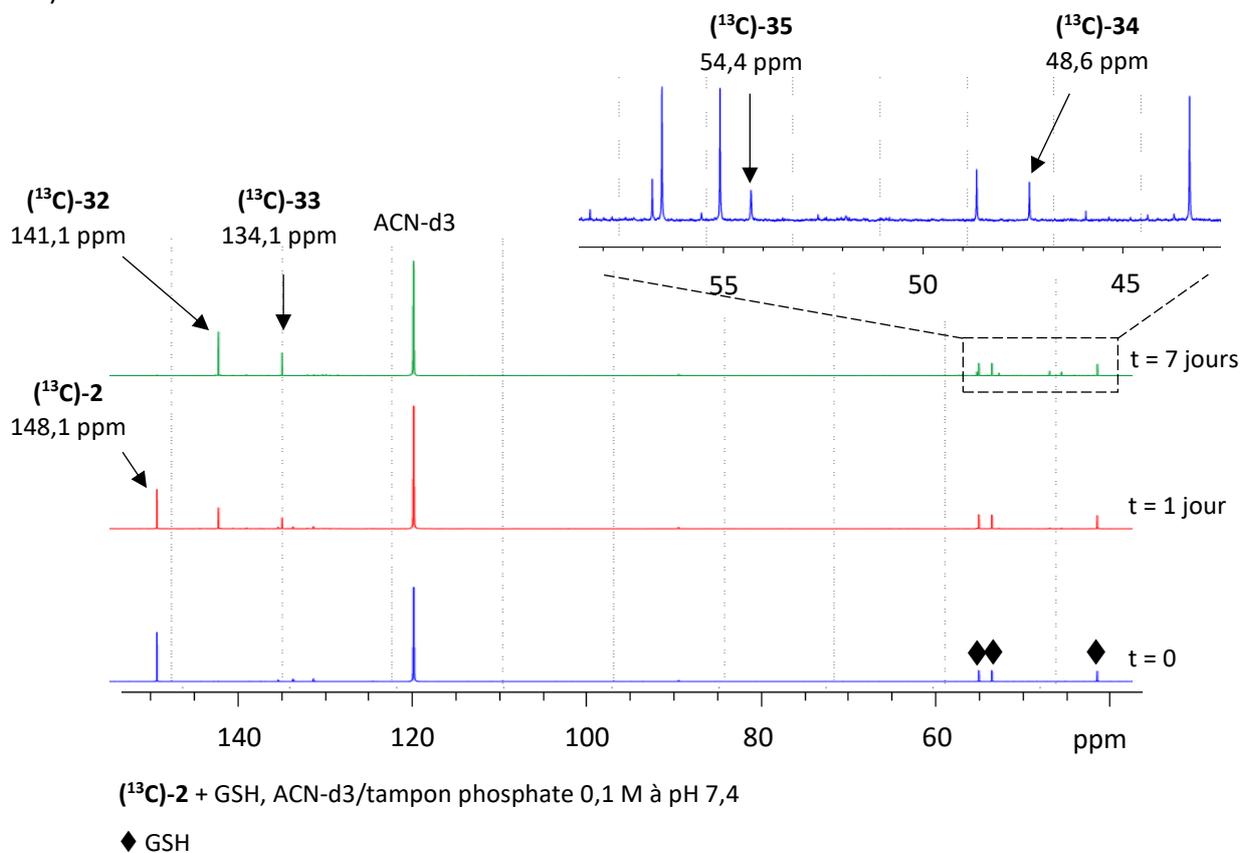


Figure III-10. Cinétique de la réaction entre (¹³C)-2 et le GSH

Le spectre HSQC montre que le signal du carbone à 141,1 ppm corrèle avec un proton à 7,79 ppm. En observant le spectre HMBC (**Figure III-11**), ce signal du carbone ne corrèle qu'avec des protons aromatiques à 7,27 ppm, 7,13 ppm et 7,01 ppm. Ce signal pourrait donc correspondre à un atome de carbone tertiaire d'une double liaison CH=C de l'adduit **(¹³C)-32**.

Le signal à 134,1 ppm, quant à lui, pourrait correspondre au carbone quaternaire d'une double liaison CH=C de l'adduit **(¹³C)-33**. En effet, le spectre HSQC n'a montré aucune corrélation avec des protons. De plus, en analysant le spectre HMBC, nous avons trouvé que le signal du carbone corrèle avec un proton aromatique à 7,14 ppm et avec un proton à 7,79 ppm porté par un carbone tertiaire de la double liaison CH=C. Les adduits **(¹³C)-32** et **(¹³C)-33** sont donc formés par la réaction d'addition nucléophile du groupement thiol de GSH sur la fonction carbonyle de **(¹³C)-2** provoquant ainsi l'ouverture du cycle de trois atomes de carbone comme dans le cas de la *N*-Ac-Cys.

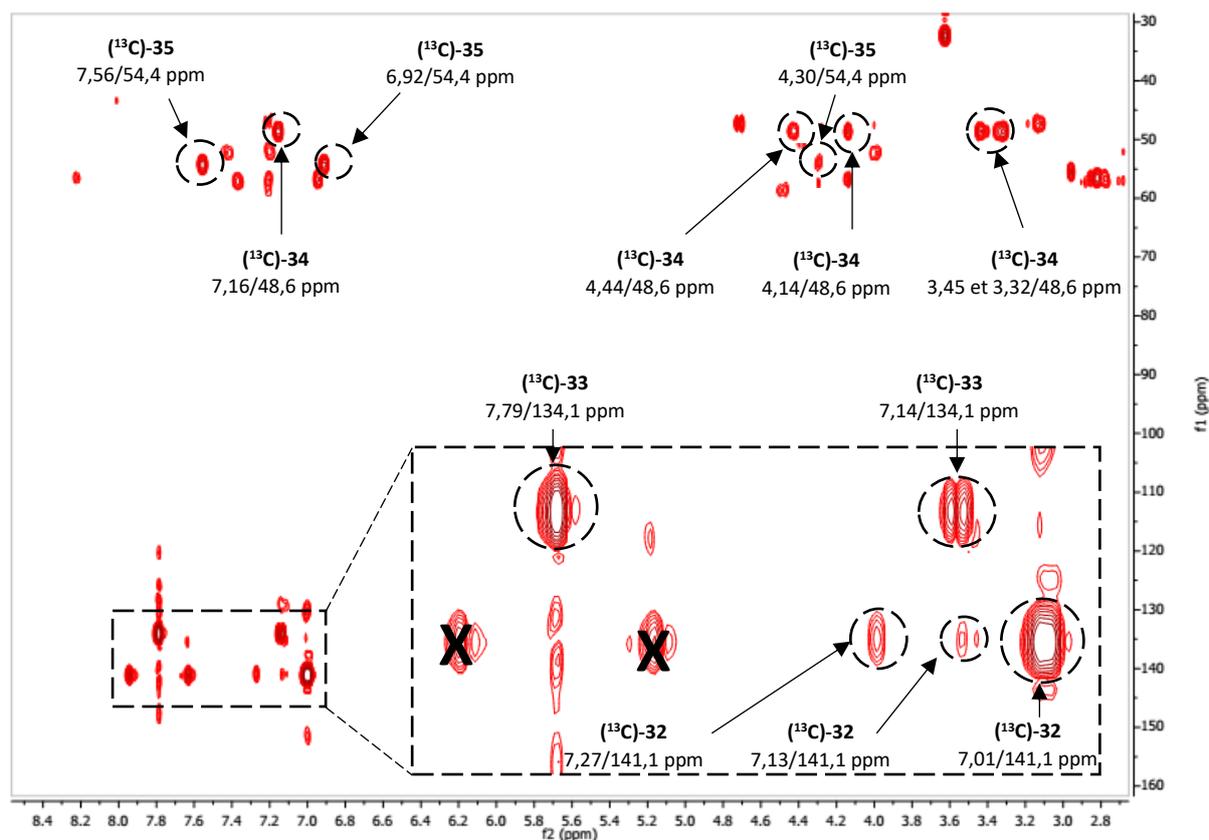


Figure III-11. Spectre HMBC permettant d'identifier les adduits **(¹³C)-32**, **(¹³C)-33**, **(¹³C)-34**, **(¹³C)-35** (X = résidus de corrélation à courte distance entre C (141,1 ppm) et H (7,79 ppm))

Après 7 jours de réaction, deux nouveaux signaux à 54,4 ppm et 48,6 ppm apparaissent

(Figure III-10). En spectre HSQC, le signal du carbone à 54,4 ppm corrèle avec un proton à 4,44 ppm. Le spectre HMBC montre des corrélations entre ce carbone et des protons aromatiques à 7,56 ppm et 6,92 ppm mais également avec un proton à 4,30 ppm porté par un atome de carbone adjacent. Comme dans le cas de la *N*-Ac-Cys, ce signal du carbone à 54,4 ppm pourrait donc être le double adduit (^{13}C)-35 résultant d'une addition nucléophile d'une deuxième molécule de GSH sur la double liaison C=C de l'adduit (^{13}C)-33.

Le spectre HSQC montre que le signal du carbone à 48,6 ppm corrèle avec un proton à 4,30 ppm. De plus, le spectre HMBC met en évidence des corrélations entre ce carbone avec un proton aromatique à 7,16 ppm et un proton à 4,44 ppm porté par l'atome de carbone voisin mais aussi avec des protons à 3,45 ppm, 3,32 ppm et 4,14 ppm correspondant aux protons de la chaîne latérale du GSH. Ainsi, ce signal du carbone à 48,6 ppm pourrait correspondre au carbone substitué d'un autre double adduit (^{13}C)-34.

De plus, la formation des adduits entre le GSH et (^{13}C)-2 a été confirmée par la LC-MS. En effet, nous avons trouvé deux composés ayant des rapports m/z 515,1683 et 533,1083 (en mode positif) (Figure III-12) qui correspond, respectivement, aux adduits (^{13}C)-32/(^{13}C)-33 et (^{13}C)-34/(^{13}C)-35.

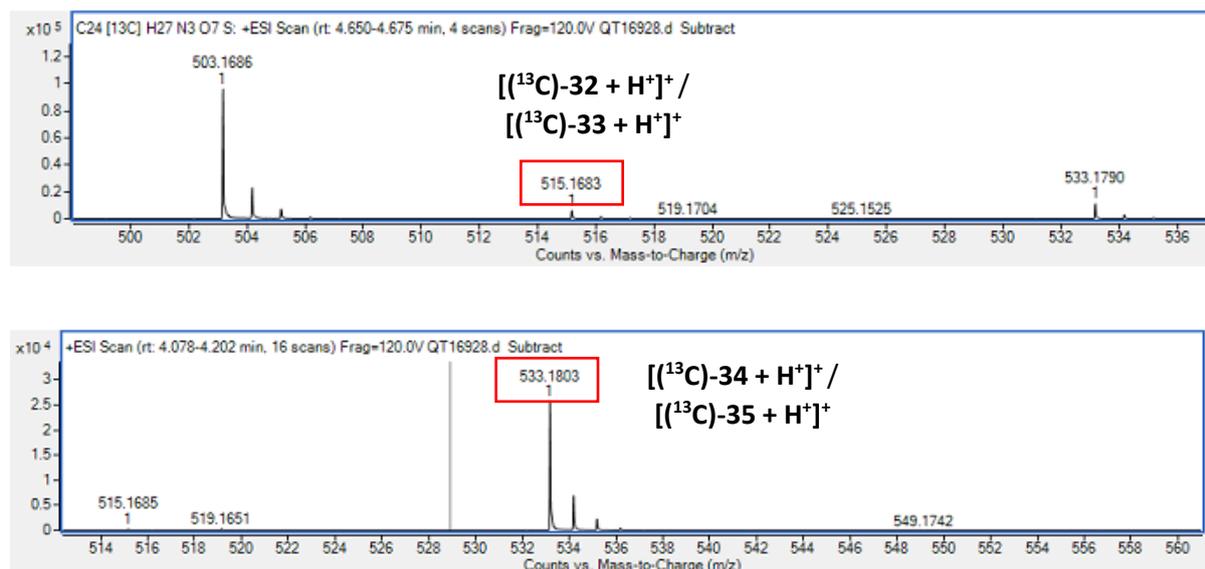


Figure III-12. Spectres MS permettant de confirmer la formation des adduits (^{13}C)-32, (^{13}C)-33, (^{13}C)-34 et (^{13}C)-35

Le Tableau III-5 résume les informations spectrales permettant de caractériser les adduits

formés entre le composé (^{13}C)-2 et le GSH.

Tableau III-5 : Informations spectrales permettant de caractériser les adduits (^{13}C)-32, (^{13}C)-33, (^{13}C)-34, (^{13}C)-35

Adduit formé	δ (ppm) ^{13}C RMN	δ (ppm) ^1H HSQC	δ (ppm) ^1H HMBC	Spectres MS (m/z)	Structure proposée
(^{13}C)-32	141,1	7,79	7,27 ; 7,13 ; 7,01	515,1683	
(^{13}C)-33	134,1	-	7,79 ; 7,14	515,1683	
(^{13}C)-34	48,6	4,30	7,16 ; 4,44 ; 4,14 ; 3,45 ; 3,32	533,1803	
(^{13}C)-35	54,4	4,44	7,56 ; 6,92 ; 4,30	533,1803	

c) Réactivité de (^{13}C)-2 vis-à-vis de la *N*-Ac-His

D'après les résultats du test du DPRA, la DCP a montré une forte affinité envers la cystéine. Cependant, nous avons également remarqué sa réactivité avec la *N*-Ac-His lors du test avec les acides aminés.

En suivant la cinétique de la réaction entre (^{13}C)-2 et la *N*-Ac-His, nous avons trouvé qu'à partir du premier jour de réaction, l'intensité du signal du carbone à 148,1 ppm de (^{13}C)-2 diminue tandis que deux nouveaux signaux à 140,4 ppm et 136,0 ppm apparaissent et augmentent au cours du temps. La réaction est plus lente qu'avec la *N*-Ac-Cys et le GSH, et le signal du carbone à 148,1 ppm de (^{13}C)-2 disparaît totalement après 30 jours de réaction (**Figure III-13**).

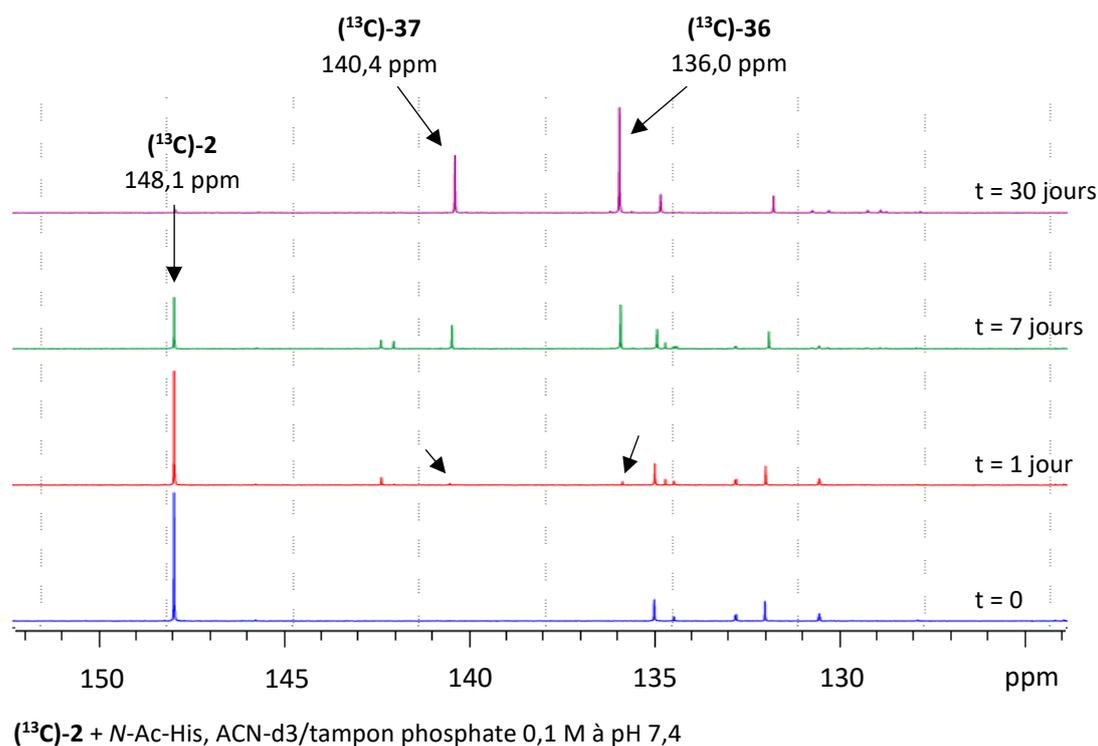


Figure III-13. Cinétique de la réaction entre (¹³C)-2 et la *N*-Ac-His

Le spectre HSQC montre que le signal du carbone à 136,0 ppm corrèle avec un proton à 7,55 ppm. En HMBC (**Figure III-14**), ce signal du carbone à 136,0 ppm corrèle avec des protons aromatiques à 7,17 ppm et 7,02 ppm. Donc, ce signal à 136,0 ppm pourrait être le carbone tertiaire de la double liaison $\text{CH}=\text{C}$ de l'adduit (¹³C)-36 formé par une réaction d'addition nucléophile entre l'imidazole de *N*-Ac-His et (¹³C)-2 provoquant ainsi l'ouverture du cycle cyclopropénique.

Un autre signal à 140,4 ppm ne présente aucune corrélation dans le spectre HSQC. En revanche, le spectre HMBC montre que ce carbone corrèle avec des protons aromatiques à 7,36 ppm et 7,16 ppm mais aussi avec un proton à 7,55 ppm porté par l'atome de carbone adjacent. C'est pourquoi, ce signal à 140,4 ppm pourrait correspondre au carbone quaternaire de la double liaison $\text{C}=\text{CH}$ de l'autre adduit (¹³C)-37 lors de la réaction entre (¹³C)-2 et la *N*-Ac-His.

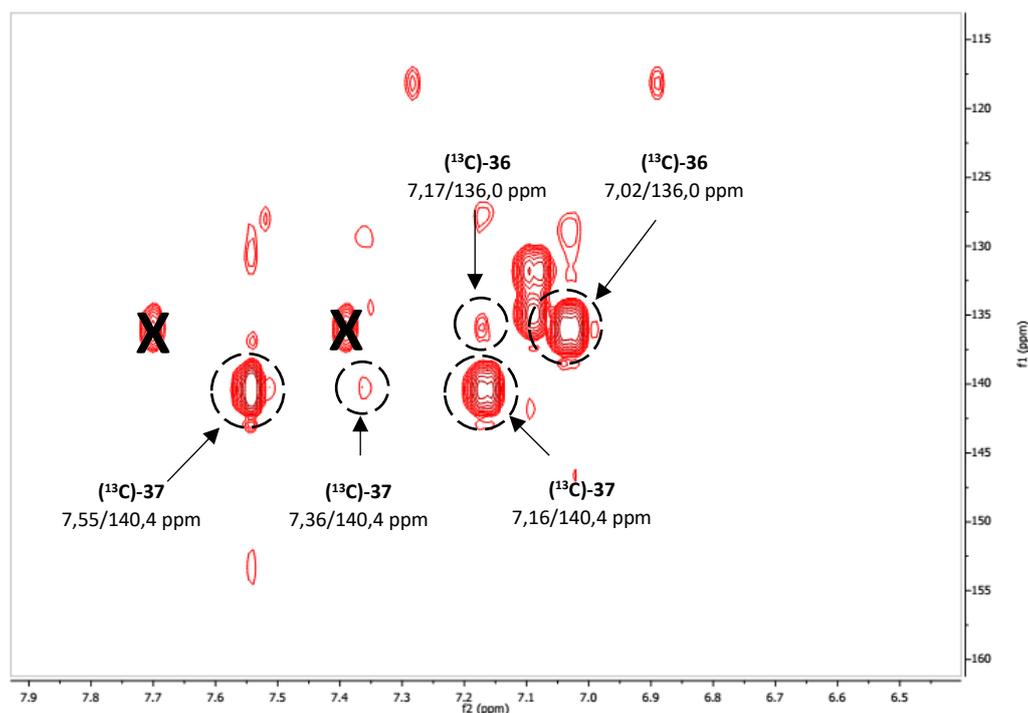


Figure III-14. Spectre HMBC permettant d'identifier les adduits (^{13}C)-36 et (^{13}C)-37

(X = résidus de corrélation à courte distance entre C (136,0 ppm) et H (7,55 ppm))

De plus, la formation des adduits (^{13}C)-36 et (^{13}C)-37 a été confirmée par la LC-MS. En effet, nous avons trouvé un composé ayant le rapport m/z 405,1645 (en mode positif) (**Figure III-15**) qui correspond à l'adduit (^{13}C)-36 ou (^{13}C)-37.

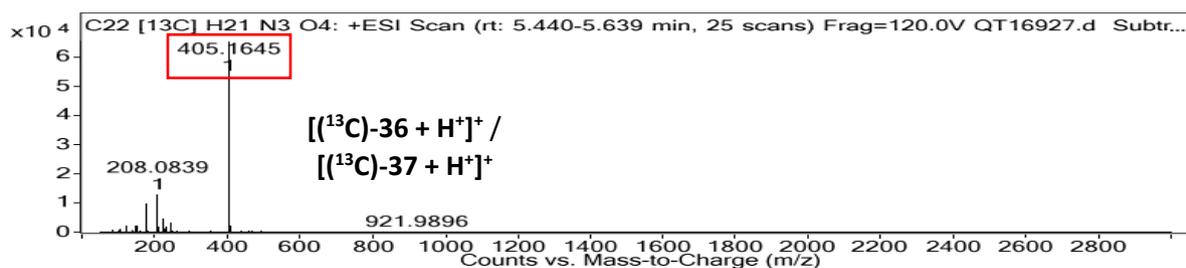


Figure III-15. Spectres MS permettant de confirmer la formation des adduits (^{13}C)-36 et (^{13}C)-37

Les informations spectrales des adduits formés entre le composé (^{13}C)-2 et la *N*-Ac-His sont résumées dans le **Tableau III-6**.

Tableau III-6 : Informations spectrales permettant de caractériser des adduits (^{13}C)-36 et (^{13}C)-37

Adduit formé	δ (ppm) ^{13}C RMN	δ (ppm) ^1H HSQC	δ (ppm) ^1H HMBC	Spectres MS (m/z)	Structure proposée
(^{13}C)-36	136,0	7,55	7,17 ; 7,02	405,1645	
(^{13}C)-37	140,4	-	7,55 ; 7,36 ; 7,16	405,1645	

La formation des adduits (^{13}C)-36 et (^{13}C)-37 correspond à l'attaque nucléophile de l'atome d'azote de l'imidazole de la *N*-Ac-His sur le groupement carbonyle de (^{13}C)-2 impliquant l'ouverture du cycle à trois atomes de carbone (**Schéma III-7**).

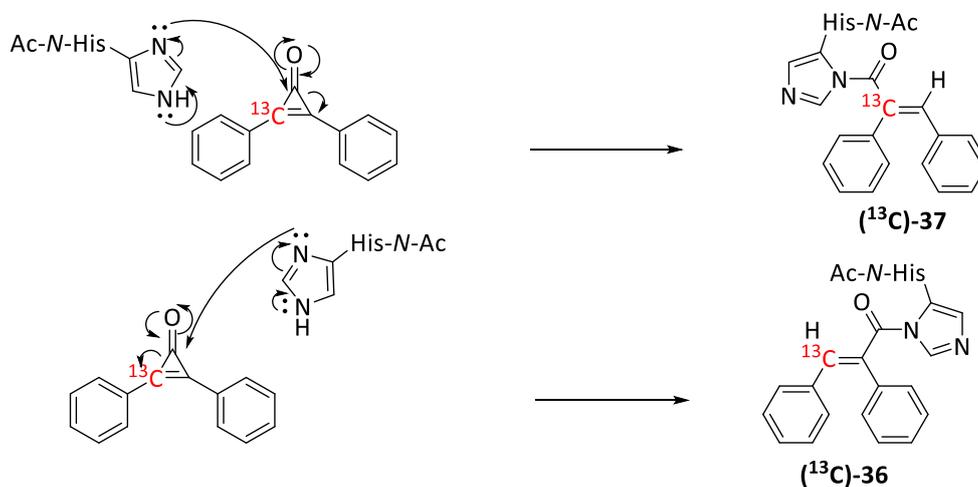


Schéma III-7. Mécanisme de formation des adduits (^{13}C)-36 et (^{13}C)-37

3.3. Réactivité du 4,4'-méthylènediphényldiisocyanate (^{13}C)-3

Parmi les acides aminés testés, la *N*-Ac-Cys, la *N*-Ac-Lys et le GSH ont montré une réactivité avec (^{13}C)-3. Le schéma suivant présente l'ensemble des adduits issus de la réaction entre (^{13}C)-3 et les acides aminés nucléophiles ou le GSH (**Schéma III-8**).

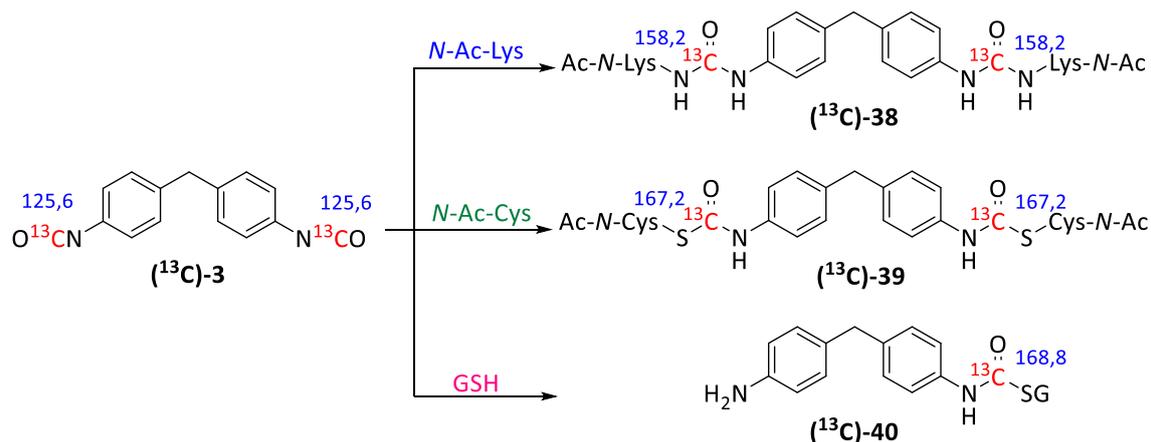


Schéma III-8. Adduits formés par la réaction entre $(^{13}\text{C})\text{-3}$ et les acides aminés ou le GSH

a) Réactivité de $(^{13}\text{C})\text{-3}$ vis-à-vis de la *N*-Ac-Lys

On rappelle que la fonction isocyanate est sensible à l'hydrolyse. La réaction entre l'isocyanate et l'eau donne des produits tels que l'acide carbamique, l'amine et les produits de type urée (**Schéma III-9**). Donc, avant d'évaluer la réactivité de $(^{13}\text{C})\text{-3}$ vis-à-vis d'acides aminés, il faut suivre son hydrolyse dans le milieu aqueux utilisé dans le test avec les acides aminés (CD_3CN /tampon phosphate (0,1 M ; pH 7,4)).

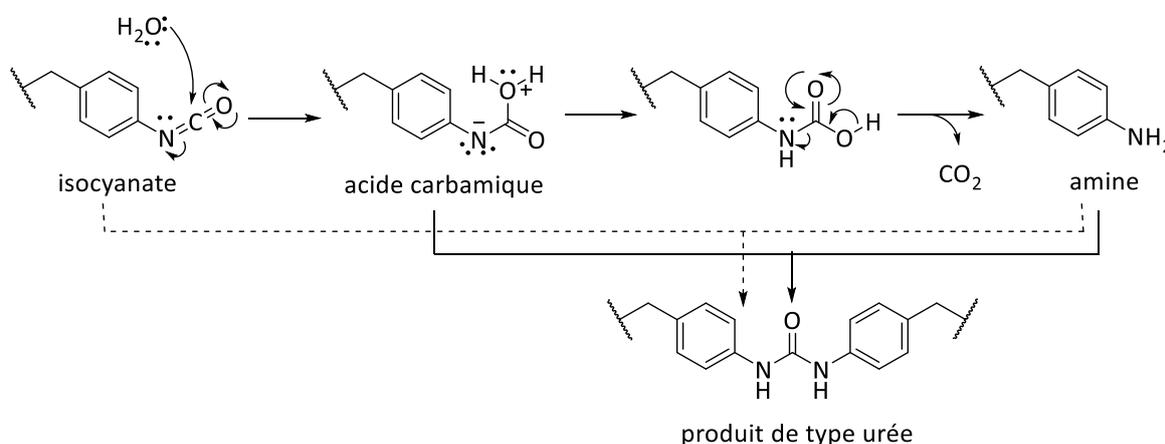


Schéma III-9. La réactivité des composés de type isocyanate dans l'eau

En suivant la cinétique de la réaction d'hydrolyse de $(^{13}\text{C})\text{-3}$ par RMN du carbone 13 (**Figure III-16**), nous avons observé que $(^{13}\text{C})\text{-3}$ semble s'hydrolyser presque totalement en acide dicarbamique $(^{13}\text{C})\text{-41}$ après quelques heures de réaction. En effet, il n'apparaît qu'un signal à 160,8 ppm correspondant à l'acide dicarbamique $(^{13}\text{C})\text{-41}$ ou à l'acide monocarbamique $(^{13}\text{C})\text{-42}$. Ce signal diminue au cours du temps en raison de la réaction de décarboxylation

partielle ou totale de l'acide dicarbamique (^{13}C)-**41** pour générer l'acide monocarbamique (^{13}C)-**42** et la diamine **43**, respectivement. Normalement, la diamine **43** réagit soit avec les acides carbamiques récemment générés soit avec le diisocyanate initial (^{13}C)-**3** pour former des produits de polymérisation (^{13}C)-**44**. Cependant, dans ce cas, la diamine **43** n'a pas semblé être réactive vis-à-vis des fonctions acides carbamiques ou isocyanates n'entraînant pas ainsi la formation de produits de polymérisation.

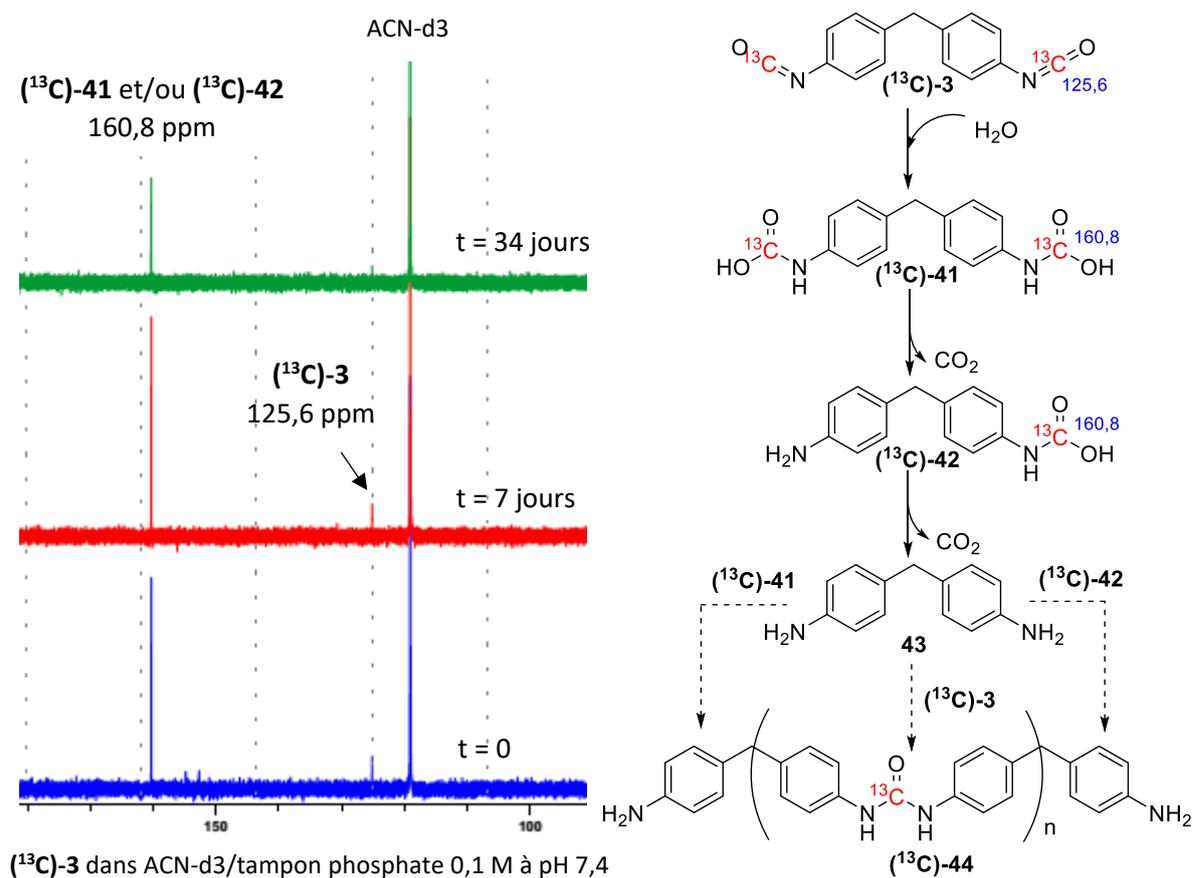


Figure III-16. Cinétique de la réaction de (^{13}C)-**3** et dans tampon phosphate

En tenant compte de l'hydrolyse de (^{13}C)-**3**, nous avons ensuite évalué sa réactivité envers des acides aminés nucléophiles.

(^{13}C)-**3** réagit rapidement avec la *N*-Ac-Lys pour former principalement un adduit à 158,2 ppm (**Figure III-17**). Le spectre HMBC (**Figure III-18**) montre que ce signal du carbone à 158,2 ppm corrèle avec deux protons à 7,89 ppm et 5,95 ppm dont chacun est porté par un atome d'azote différent. De plus, en HMBC, ce carbone corrèle également avec les autres protons à 3,08 ppm qui peuvent correspondre à ceux portés par un carbone de la chaîne latérale de la *N*-Ac-Lys. D'autres corrélations avec des protons aromatiques à 7,11 ppm et 7,20 ppm ont

également été détectées. Ces protons aromatiques sont portés, respectivement, par les carbones à 130,1 ppm et 121,1 ppm dans le spectre HSQC. Ainsi, le signal à 158,2 ppm pourrait être attribué à l'atome de carbone substitué de l'adduit (^{13}C)-38.

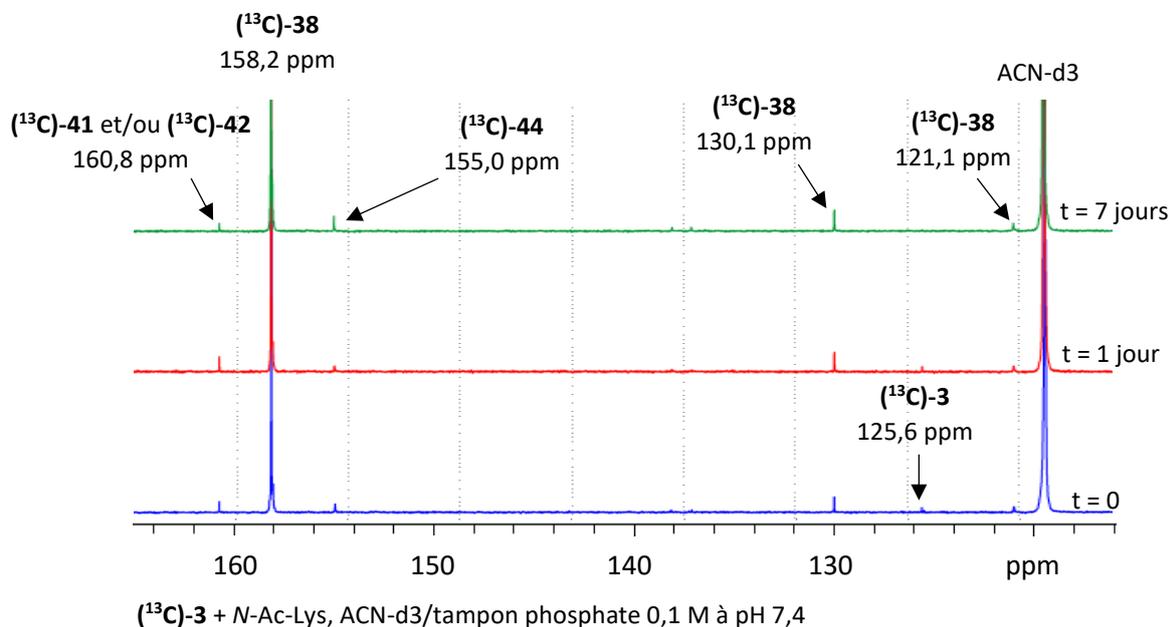


Figure III-17. Cinétique de la réaction entre (^{13}C)-3 et la N-Ac-Lys

Nous avons également observé un petit signal de carbone à 155,0 ppm qui apparaît lors de la première mesure et augmente au cours du temps. En spectre HMBC, ce signal montre une seule corrélation avec un proton à 8,04 ppm qui peut être porté par un atome d'azote dans le groupement -NH-. Ce signal pourrait correspondre au produit de polymérisation (^{13}C)-44. De plus, un autre signal de carbone à 160,8 ppm, de très faible intensité, pourrait correspondre à un composé de type acide carbamique (^{13}C)-41 ou (^{13}C)-42. Ce composé semble évoluer au fur et à mesure vers la formation d'un produit de polymérisation (^{13}C)-44 ou d'une diamine 43 suite à la décarboxylation des deux fonctions acides carbamiques.

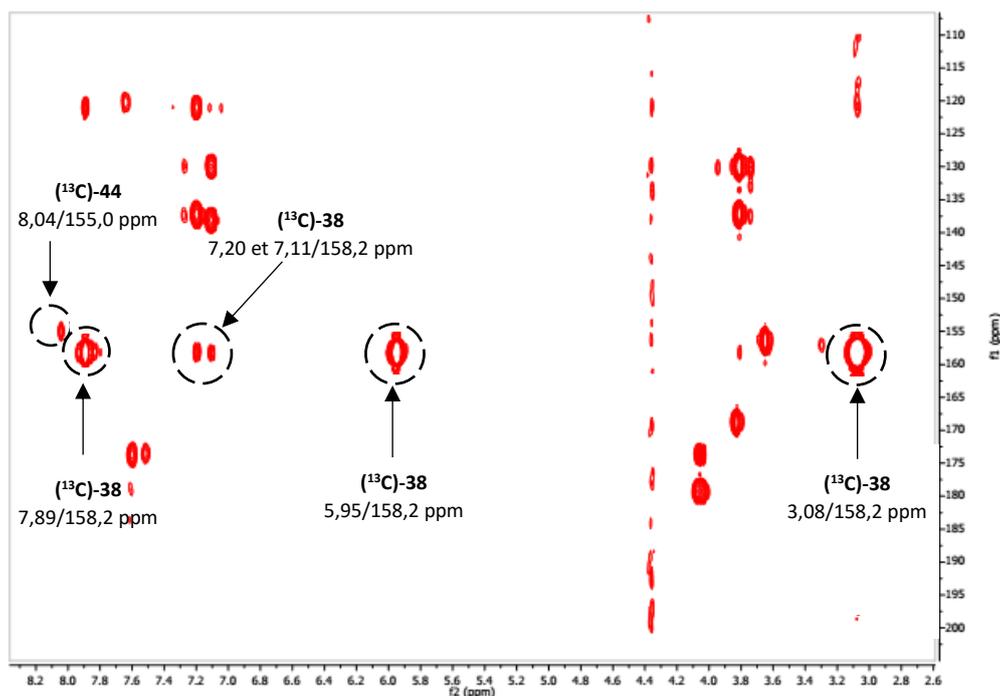


Figure III-18. Spectre HMBC permettant d'identifier les adduits (^{13}C -38 et (^{13}C -44

Des analyses LC-MS ont également été réalisées afin de confirmer la formation de ces adduits. En effet, nous avons trouvé un composé ayant le rapport m/z 629,3201 (en mode positif) (Figure III-19) qui correspond à l'adduit (^{13}C -38. Cependant, les autres composés de (^{13}C -41, (^{13}C -42, (^{13}C -44 n'ont pas été détectés.

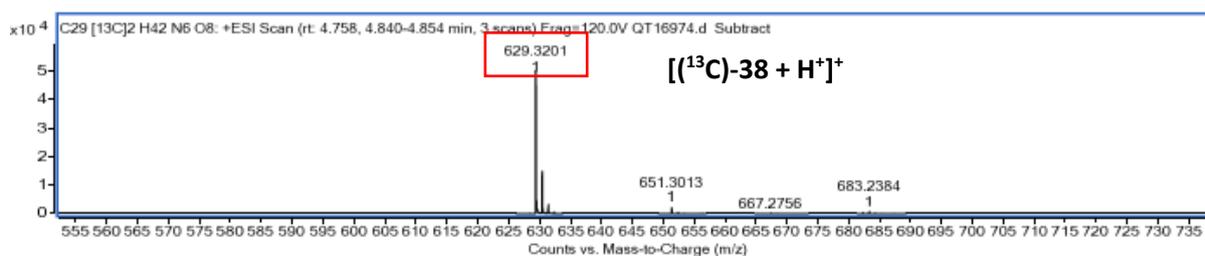


Figure III-19. Spectres MS permettant de confirmer la formation de l'adduit (^{13}C -38

Les informations spectrales des adduits formés entre (^{13}C -3 et la *N*-Ac-Lys sont résumées dans le **Tableau III-7**, permettant d'élucider leur structure.

Tableau III-7 : Informations spectrales permettant de caractériser des adduits formés entre (^{13}C)-**3** et la *N*-Ac-Lys

Adduit formé	δ (ppm) ^{13}C RMN	δ (ppm) ^1H HMBC	Spectres MS (m/z)	Structure proposée
(^{13}C)- 38	158,2	7,89 ; 7,20 ; 7,11 ; 5,95 ; 3,08	629,3201	
(^{13}C)- 41	160,8	-	-	
(^{13}C)- 42	160,8	-	-	
(^{13}C)- 44	155,0	8,04	-	
43	-	-	-	

b) Réactivité de (^{13}C)-**3** vis-à-vis de la *N*-Ac-Cys

En comparaison avec la *N*-Ac-Lys, (^{13}C)-**3** réagit plus lentement avec la *N*-Ac-Cys. Le signal du carbone à 125,6 ppm de (^{13}C)-**3** évolue au fur et à mesure vers la formation des deux signaux à 167,2 ppm et 155,0 ppm (**Figure III-20**). Dès que le signal à 125,6 ppm de (^{13}C)-**3** a totalement disparu et que la réaction n'évolue plus (34 jours de réaction), les expériences de corrélations [^1H - ^{13}C] hétéronucléaires ont été réalisées afin de caractériser la structure des produits formés.

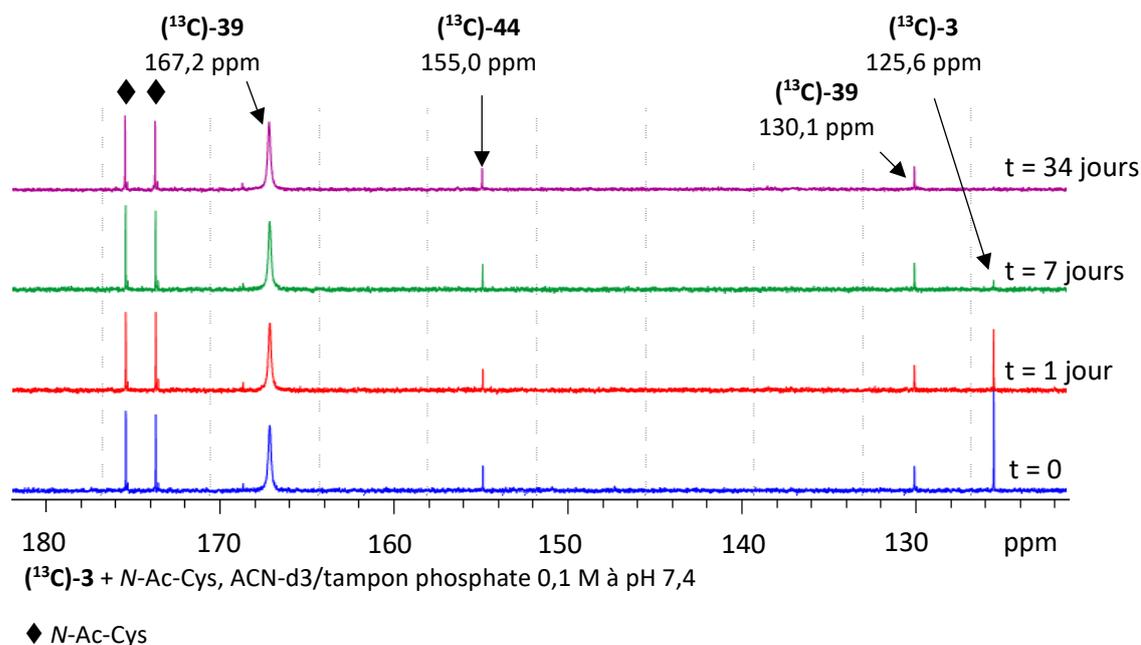


Figure III-20. Cinétique de la réaction entre $(^{13}\text{C})\text{-3}$ et la *N*-Ac-Cys

Le spectre HMBC (**Figure III-21**) montre que le signal de carbone à 167,2 ppm corrèle avec un proton à 9,52 ppm porté par l'atome d'azote. D'autres corrélations avec des protons à 3,38 ppm et 3,13 ppm portés par un atome de carbone de la chaîne latérale de la *N*-Ac-Cys ont été observées. Ce carbone a également des corrélations avec des protons aromatiques à 7,29 ppm et 7,12 ppm. Ces protons aromatiques sont portés, respectivement, par les carbones à 130,1 ppm et 121,0 ppm dans le spectre HSQC. Ainsi, ces informations permettent de confirmer la structure de l'adduit de type thiocarbamate $(^{13}\text{C})\text{-39}$.

Le deuxième signal de carbone à 155,0 ppm corrèle à longue distance avec un proton à 8,02 ppm porté par un atome d'azote. Il pourrait correspondre à l'adduit de polymérisation de $(^{13}\text{C})\text{-44}$ comme dans le cas de la *N*-Ac-Lys.

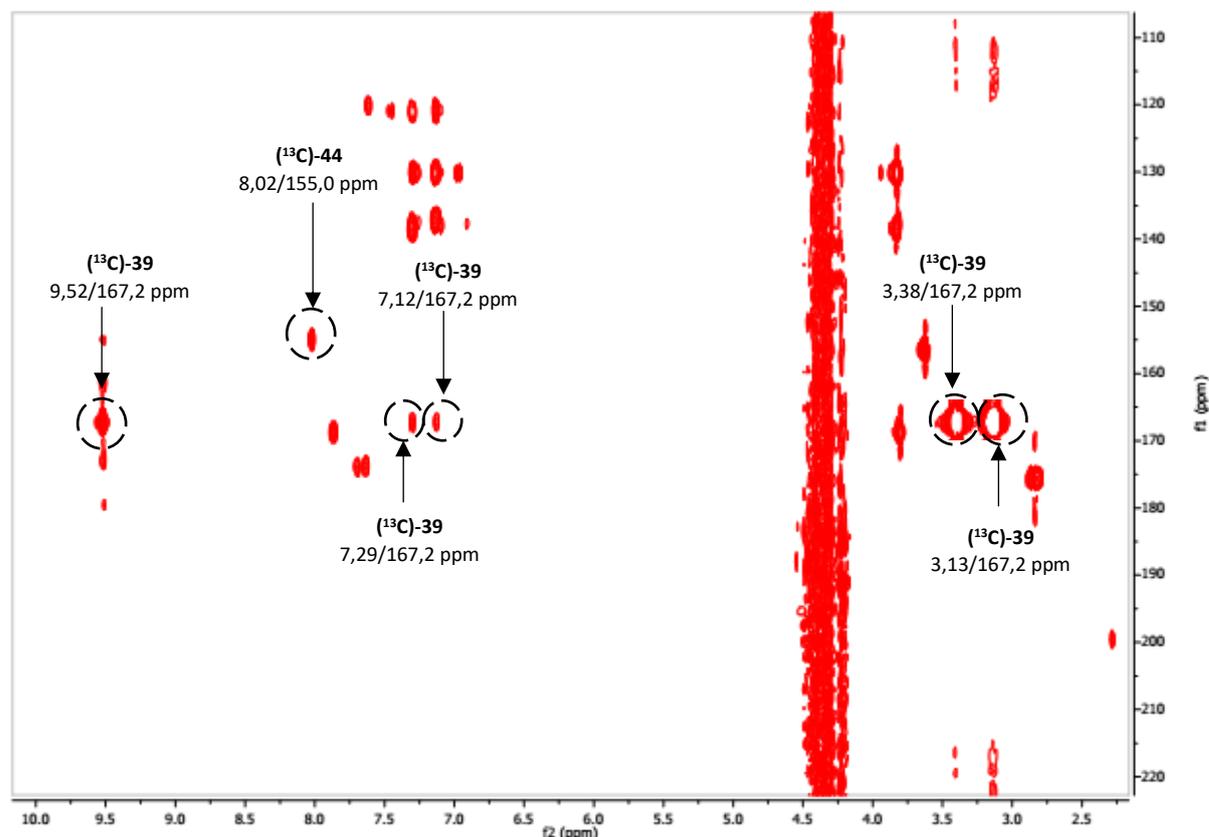


Figure III-21. Spectre HMBC permettant d'identifier les adduits $(^{13}\text{C})\text{-39}$ et $(^{13}\text{C})\text{-44}$

Des analyses de LC-MS ont également été réalisées afin de confirmer la formation de ces adduits. Nous avons ainsi trouvé un composé ayant le rapport m/z 579,1484 (en mode positif) (**Figure III-22**) qui correspond à l'adduit $(^{13}\text{C})\text{-39}$. Malheureusement, il n'a pas été possible de détecter l'adduit de polymérisation $(^{13}\text{C})\text{-44}$ malgré la recherche des ions moléculaires de l'adduit dimère ou trimère.

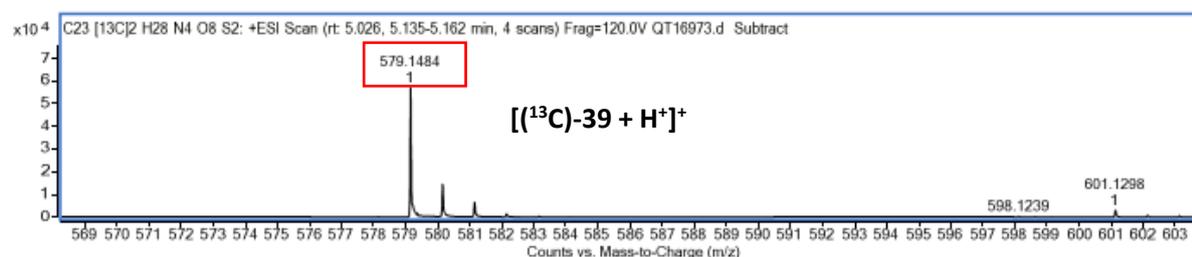
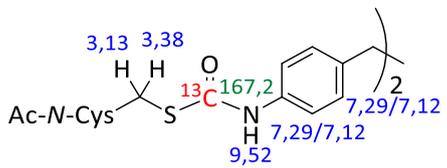
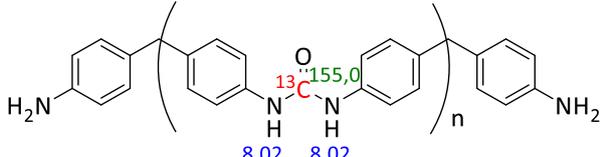


Figure III-22. Spectres MS permettant de confirmer la formation de l'adduit $(^{13}\text{C})\text{-39}$

Le **Tableau III-8** résume les informations spectrales permettant de caractériser les adduits formés entre le composé $(^{13}\text{C})\text{-3}$ et la *N*-Ac-Cys.

Tableau III-8 : Informations spectrales permettant de caractériser les adduits formés entre $(^{13}\text{C})\text{-3}$ et la *N*-Ac-Cys

Adduit formé	δ (ppm) ^{13}C RMN	δ (ppm) ^1H HMBC	Spectres MS (m/z)	Structure proposée
$(^{13}\text{C})\text{-39}$	167,2	9,52 ; 7,29 ; 7,12 ; 3,38 ; 3,13	579,1484	
$(^{13}\text{C})\text{-44}$	155,0	8,02	-	

c) Réactivité de $(^{13}\text{C})\text{-3}$ vis-à-vis du GSH

$(^{13}\text{C})\text{-3}$ réagit beaucoup plus lentement avec le GSH qu'avec la *N*-Ac-Lys et la *N*-Ac-Cys. Dans ce cas, l'hydrolyse semble plus rapide que la réactivité de $(^{13}\text{C})\text{-3}$ avec le GSH. Un seul petit nouveau signal à 167,1 ppm est détecté lors de la première mesure. Ce signal disparaît totalement après 7 jours de réaction et un autre signal à 168,8 ppm apparaît. Le signal à 125,6 ppm de $(^{13}\text{C})\text{-3}$ a totalement disparu après 34 jours de réaction et trois nouveaux signaux à 175,8 ppm, 179,6 ppm et 181,9 ppm ont été détectés (**Figure III-23**).

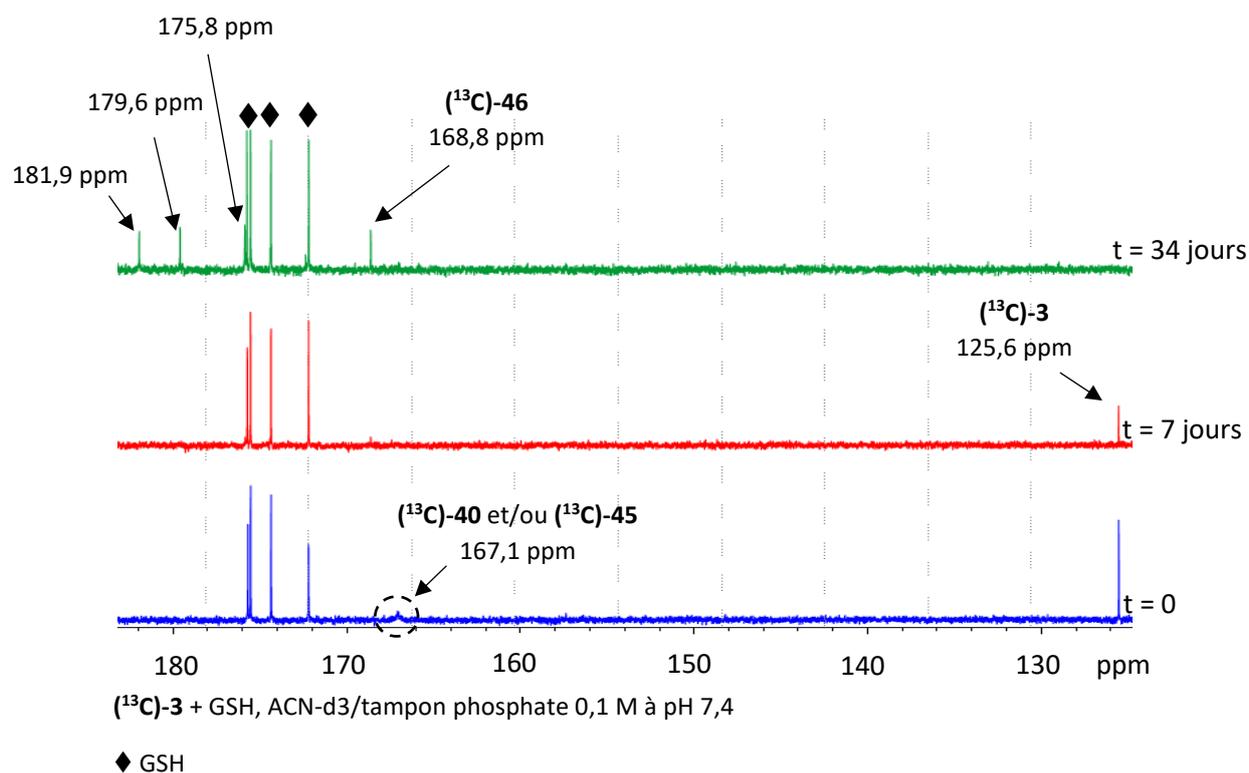


Figure III-23. Cinétique de la réaction entre $(^{13}\text{C})\text{-3}$ et le GSH

Basé sur les données obtenues lors de la réaction entre $(^{13}\text{C})\text{-3}$ et la *N*-Ac-Cys, il est possible que le signal du carbone à 167,1 ppm corresponde à l'atome de carbone substitué dans un adduit de type thiocarbamate $(^{13}\text{C})\text{-40}$ ou $(^{13}\text{C})\text{-45}$ (Figure III-24).



Figure III-24. Adduits possibles formés dans la réaction de $(^{13}\text{C})\text{-3}$ et le GSH

De plus, des analyses LC-MS effectuées permettent de détecter un ion moléculaire de m/z 533,1898 qui correspond à l'adduit $(^{13}\text{C})\text{-40}$ (Figure III-25). Par contre, l'adduit $(^{13}\text{C})\text{-45}$ n'est pas détecté en LC-MS.

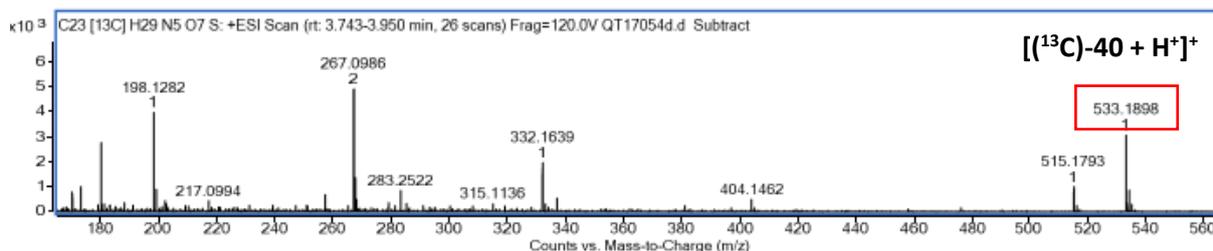


Figure III-25. Spectres MS permettant de confirmer la formation de l'adduit (^{13}C)-40

En analysant le spectre HMBC (**Figure III-26**), le signal du carbone à 168,8 ppm corrèle avec des protons à 4,07 ppm, 3,77 ppm, 3,65 ppm et 2,95 ppm. D'après les travaux d'Olivier Fleischel^[186], ce signal pourrait correspondre à un adduit (^{13}C)-46 provenant d'une addition intramoléculaire de la fonction amine du GSH sur la fonction carbonyle de l'adduit (^{13}C)-40 ou (^{13}C)-45, suivie de l'élimination du 4,4'-diaminodiphénylméthane (**Schéma III-10**). Les 3 signaux restant (175,8 ppm, 179,6 ppm, 181,9 ppm) présentent aucune corrélation à courte ou à longue distance dans les spectres RMN bidimensionnels. Nous ne pouvons pas ainsi élucider leur structure.

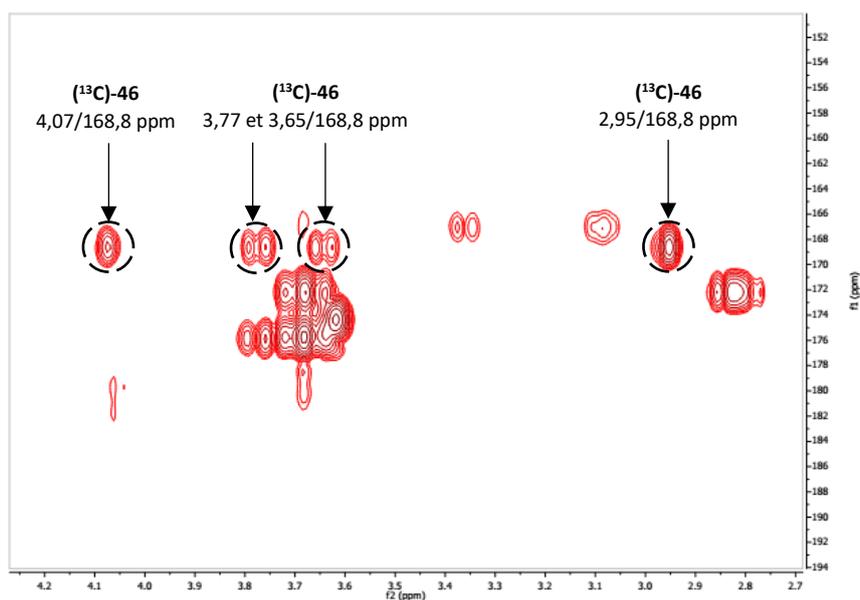


Figure III-26. Spectre HMBC permettant d'identifier l'adduit (^{13}C)-46

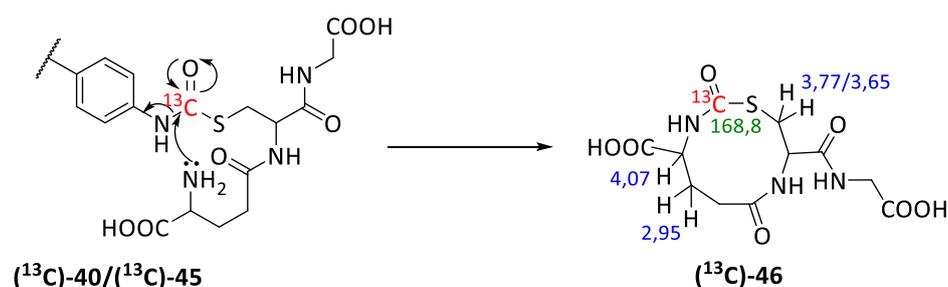


Schéma III-10. Formation de l'adduit $(^{13}\text{C})\text{-46}$ à partir de $(^{13}\text{C})\text{-40}$ ou $(^{13}\text{C})\text{-45}$

Les informations spectrales, qui permettent de caractériser les adduits formés entre le composé $(^{13}\text{C})\text{-3}$ et le GSH, sont résumées dans le **Tableau III-9**.

Tableau III-9 : Informations spectrales permettant de caractériser les adduits formés entre $(^{13}\text{C})\text{-3}$ et le GSH

Adduit formé	δ (ppm) ^{13}C RMN	δ (ppm) ^1H HMBC	Spectres MS (m/z)	Structure proposée
$(^{13}\text{C})\text{-40}$	167,1	-	533,1898	
$(^{13}\text{C})\text{-46}$	168,8	4,07 ; 3,77 ; 3,65 ; 2,95	-	

3.4. Réactivité du *p*-tolylisocyanate $(^{13}\text{C})\text{-4}$

Le schéma suivant présente l'ensemble des adduits formés entre $(^{13}\text{C})\text{-4}$ et les acides aminés nucléophiles/le GSH. Seuls la *N*-Ac-Cys, la *N*-Ac-Lys et le GSH ont montré une réactivité avec $(^{13}\text{C})\text{-4}$ (Schéma III-11).

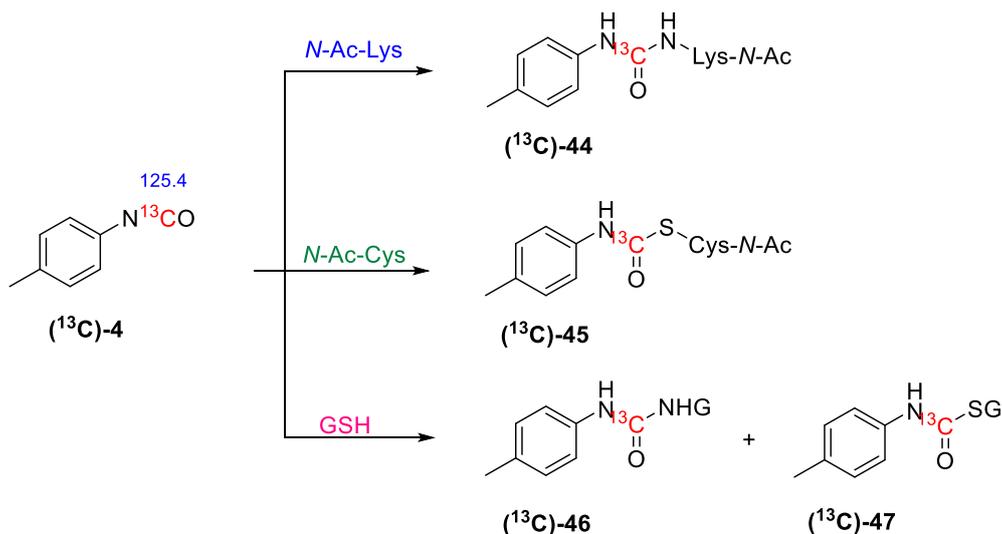
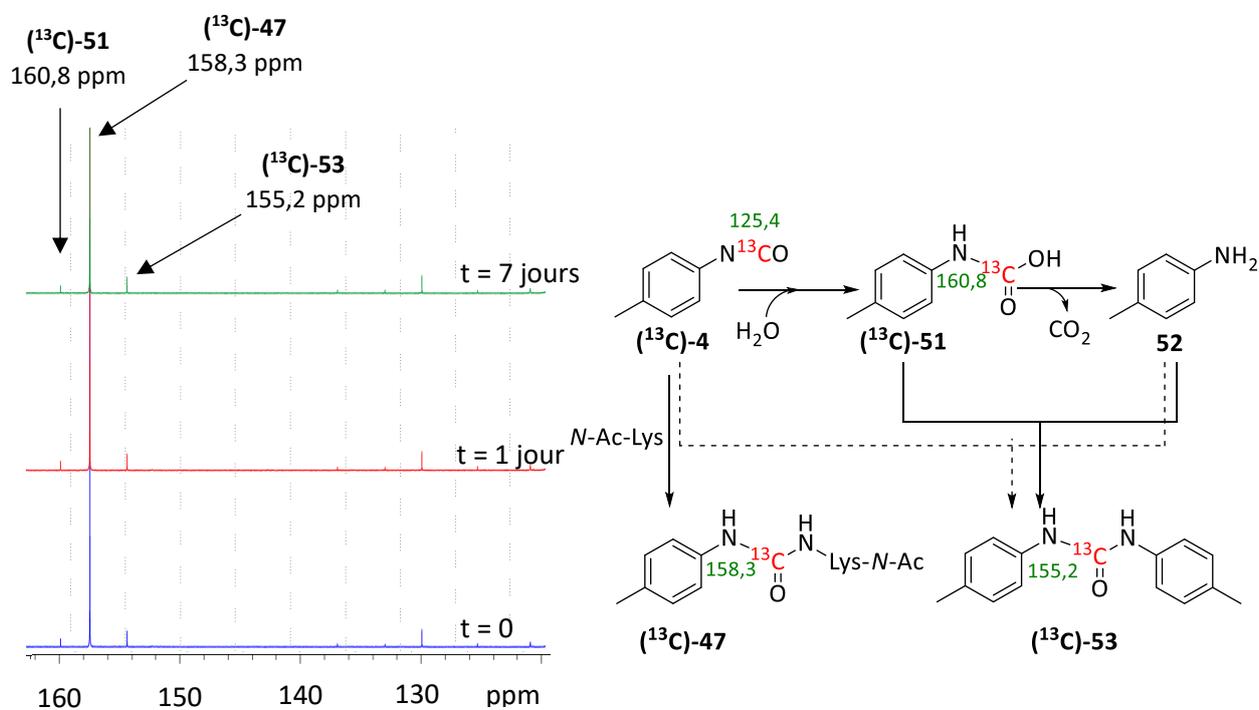


Schéma III-11. Adduits formés par la réaction entre (^{13}C)-4 et les acides aminés/le GSH

a) Réactivité de (^{13}C)-4 vis-à-vis de la $N\text{-Ac-Lys}$

Comme décrit précédemment, la fonction isocyanate est capable de réagir avec l'eau pour donner des produits tels que l'acide carbamique, l'amine ou des produits de type urée.



(^{13}C)-4 + $N\text{-Ac-Lys}$, ACN-d_3 /tampon phosphate 0,1 M à pH 7,4

Figure III-27. Cinétique de la réaction de (^{13}C)-4 avec la $N\text{-Ac-Lys}$

La réaction entre (^{13}C)-**4** et la *N*-Ac-Lys dans le tampon phosphate (0,1 M, pH 7,4) est suivie par la RMN du carbone 13 (**Figure III-27**). Nous avons trouvé que (^{13}C)-**4** réagit rapidement avec la *N*-Ac-Lys pour former principalement un adduit à 158,3 ppm et deux autres adduits en petite quantité à 160,8 ppm et 155,2 ppm. Comme dans le cas de (^{13}C)-**3**, ces trois signaux du carbone pourraient être attribués aux adduits (^{13}C)-**47**, (^{13}C)-**51** et (^{13}C)-**53**, respectivement.

En effet, le spectre HMBC (**Figure III-28**) montre que le signal du carbone à 158,3 ppm corrèle avec deux protons à 7,84 ppm et 5,94 ppm portés par deux atomes d'azote. De plus, ce carbone corrèle également avec des protons à 3,07 ppm et 2,22 ppm portés par des carbones de la chaîne latérale de la *N*-Ac-Lys. D'autres corrélations avec des protons aromatiques à 7,16 ppm et 7,05 ppm ont également été détectées. Ces protons aromatiques sont portés, respectivement, par les carbones à 121,1 ppm et 130,3 ppm. Ainsi, le signal à 158,3 ppm correspondrait à l'atome de carbone substitué dans l'adduit (^{13}C)-**47**.

Un autre signal du carbone à 160,8 ppm, de très faible intensité, pourrait correspondre à un acide carbamique (^{13}C)-**51** formé par la réaction d'hydrolyse de la fonction isocyanate. De plus, nous avons également observé un petit signal à 155,2 ppm qui a une seule corrélation à longue distance avec un proton à 7,97 ppm porté par un atome d'azote du groupement urée. Ce signal du carbone pourrait ainsi correspondre à *N,N'*-diphényl-(^{13}C)-urée (^{13}C)-**53**.

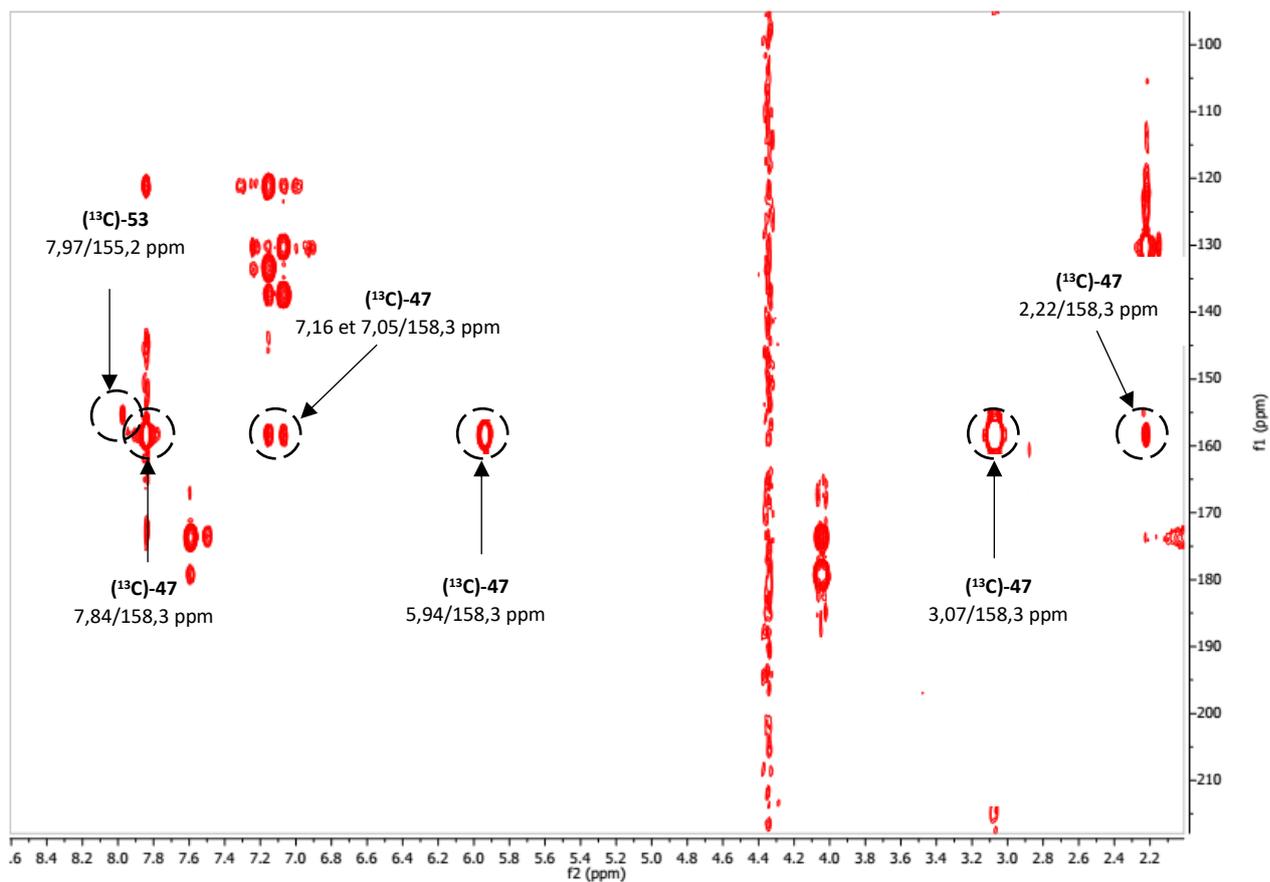


Figure III-28. Spectre HMBC permettant d'identifier les adduits (^{13}C -47 et (^{13}C -53

Ces adduits formés ont également été détectés par LC-MS. En effet, nous avons trouvé deux ions moléculaires de m/z 323,1799 et 242,1382 (en mode positif) (Figure III-29) qui correspondent aux adduits (^{13}C -47 et (^{13}C -53, respectivement.

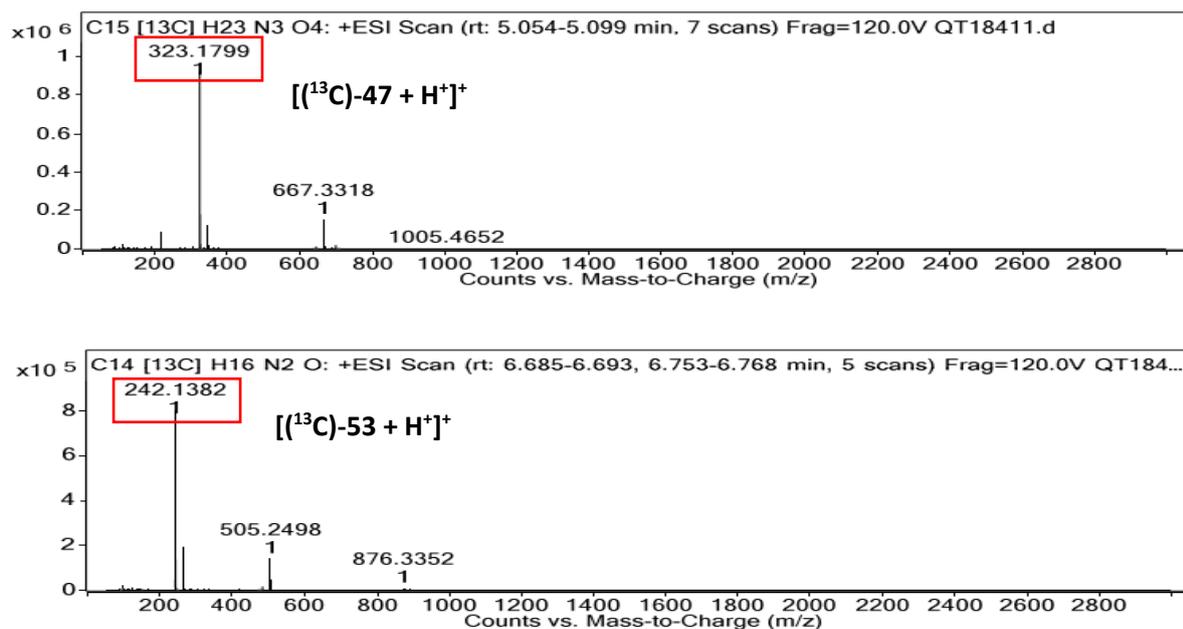


Figure III-29. Spectres MS permettant de confirmer la formation des adduits (^{13}C)-47 et (^{13}C)-53

Les informations spectrales des adduits formés entre le composé (^{13}C)-4 et la *N*-Ac-Lys sont résumées dans le **Tableau III-10**.

Tableau III-10 : Informations spectrales permettant de caractériser des adduits formés entre (^{13}C)-4 et la *N*-Ac-Lys

Adduit formé	δ (ppm) ^{13}C RMN	δ (ppm) ^1H HMBC	Spectres MS (m/z)	Structure proposée
(^{13}C)-47	158,3	7,84 ; 7,16 ; 7,05 ; 5,94 ; 3,07 ; 2,22	323,1799	
(^{13}C)-51	160,8	-	-	
(^{13}C)-53	155,2	7,97	242,1382	

b) Réactivité de (^{13}C)-4 vis-à-vis de la *N*-Ac-Cys

(^{13}C)-4 réagit avec la *N*-Ac-Cys plus lentement qu'avec la *N*-Ac-Lys. Le signal du carbone à 125,4 ppm de (^{13}C)-4 évolue au fur et à mesure vers la formation des deux signaux à 166,9

ppm et 155,2 ppm (**Figure III-30**). Après 21 jours de réaction, le signal à 125,6 ppm de (^{13}C) -**4** a totalement disparu et la réaction n'évolue plus. En comparant avec la réaction entre (^{13}C) -**3** et la *N*-Ac-Cys, ces deux signaux à 166,9 ppm et 155,2 ppm pourraient correspondre à un adduit de type thiocarbamate (^{13}C) -**48** et à l'adduit *N,N'*-diphényl- (^{13}C) -urée (^{13}C) -**53**. La structure de ces adduits est confirmée par les spectres HMBC et HSQC ainsi que par LC-MS.

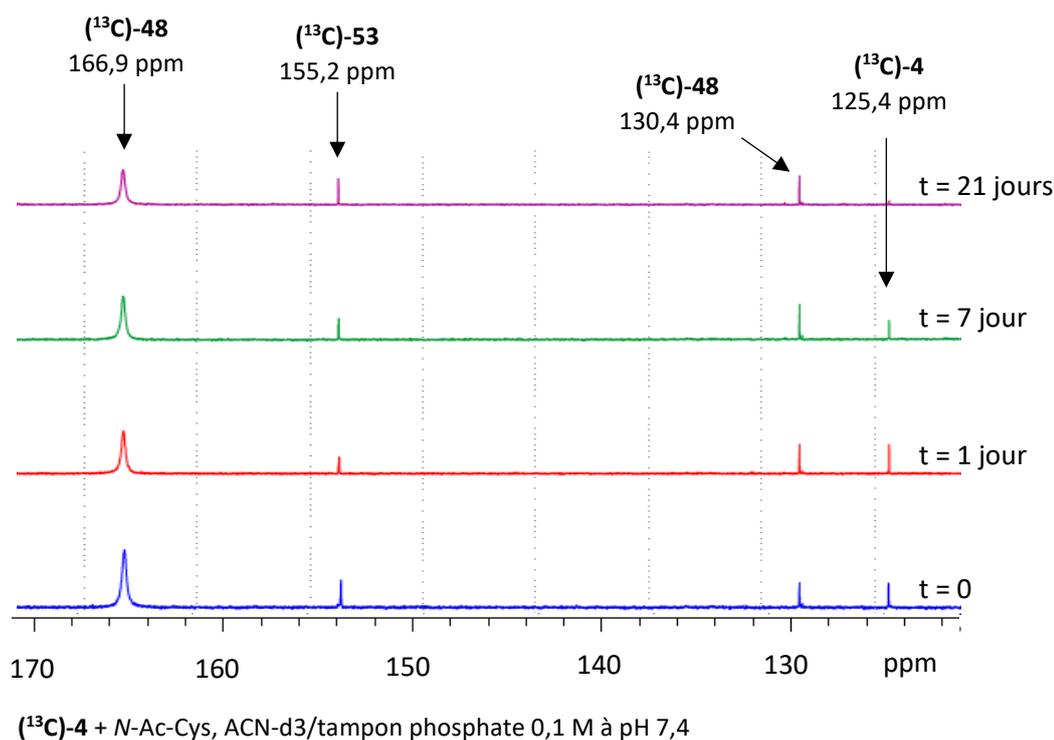


Figure III-30. Cinétique de la réaction entre (^{13}C) -**4** et la *N*-Ac-Cys

En effet, le spectre HMBC (**Figure III-31**) montre que le signal du carbone à 166,9 ppm corrèle avec un proton à 9,43 ppm porté par l'atome d'azote. D'autres corrélations avec des protons à 3,38 ppm et 3,12 ppm, portés par un atome de carbone de la chaîne latérale de la *N*-Ac-Cys, ont été observées. Ce carbone a également des corrélations avec des protons aromatiques à 7,24 ppm et 7,08 ppm. Ces protons aromatiques sont portés, respectivement, par les carbones à 120,0 ppm et 130,4 ppm (en HSQC). Ainsi, ces informations permettent de confirmer la structure de l'adduit (^{13}C) -**48**.

Le deuxième signal de carbone à 155,2 ppm, ayant une seule corrélation, en spectre HMBC, avec un proton à 7,95 ppm porté par un atome d'azote, pourrait correspondre à l'adduit *N,N'*-diphényl- (^{13}C) -urée (^{13}C) -**53** comme dans le cas de la *N*-Ac-Lys.

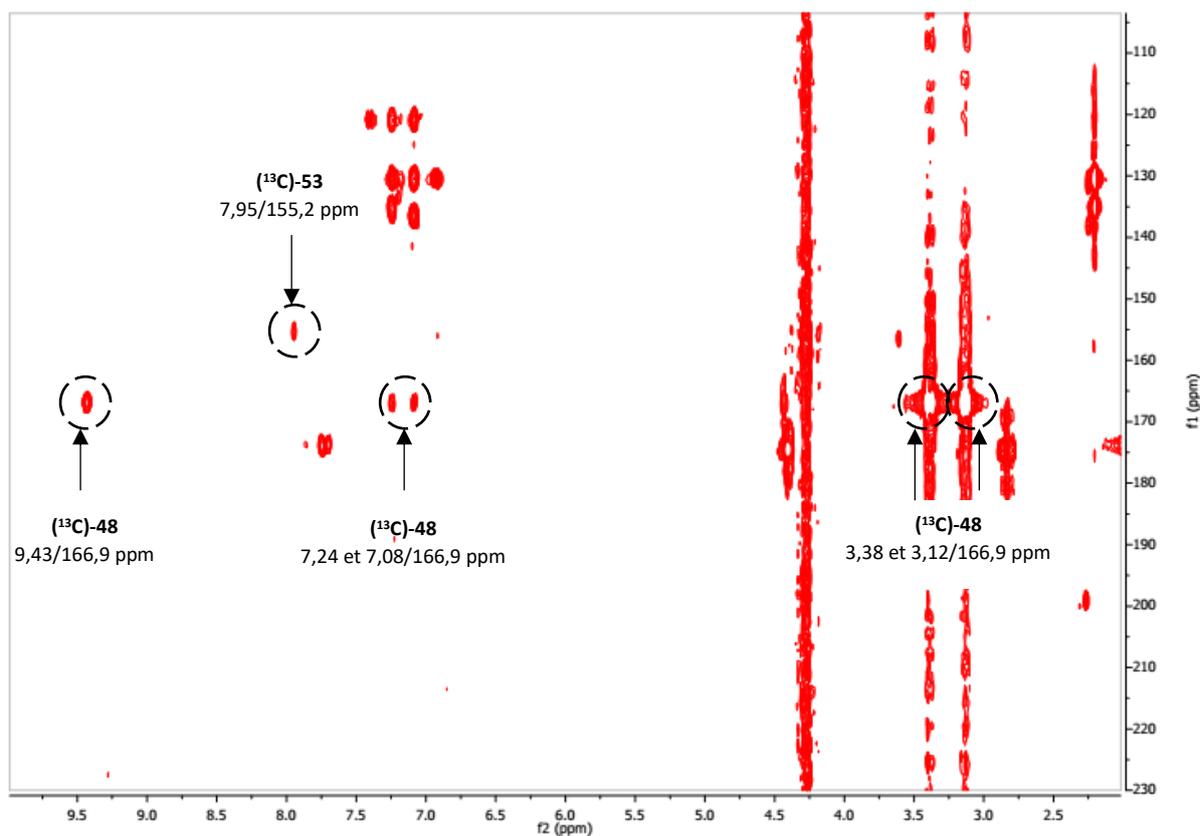


Figure III-31. Spectre HMBC permettant d'identifier les adduits $(^{13}\text{C})\text{-48}$ et $(^{13}\text{C})\text{-53}$

L'analyse LC-MS nous a permis de détecter deux composés ayant des rapports m/z 298,0940 et 242,1375 (en mode positif) (Figure III-32) qui correspondent aux adduits $(^{13}\text{C})\text{-48}$ et $(^{13}\text{C})\text{-53}$, respectivement.

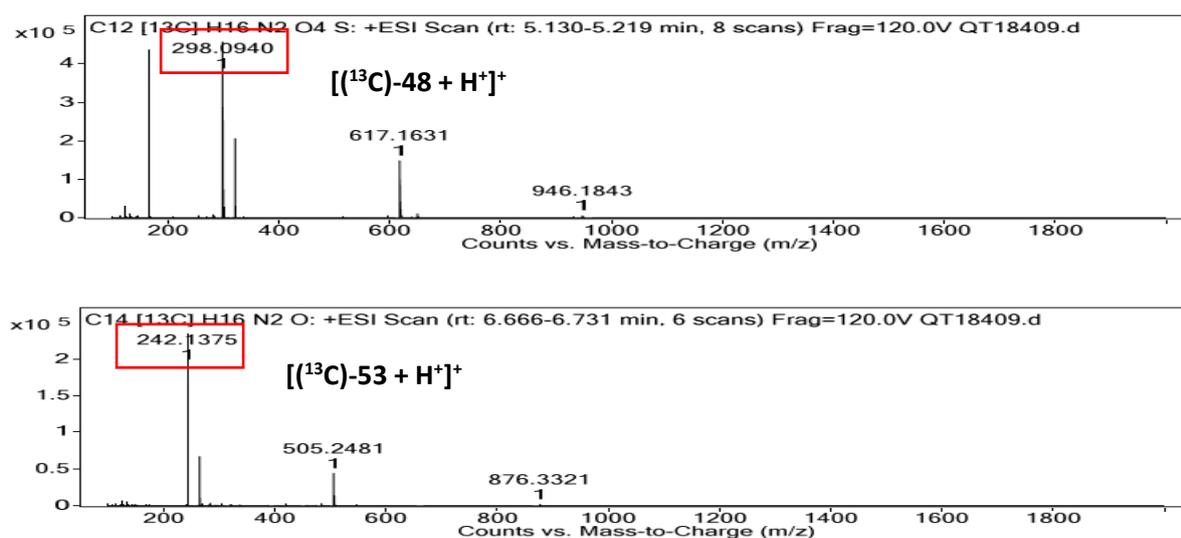


Figure III-32. Spectres MS permettant de confirmer des adduits $(^{13}\text{C})\text{-48}$ et $(^{13}\text{C})\text{-53}$

Le **Tableau III-11** résume les informations spectrales permettant de caractériser la structure des adduits formés lors de la réaction de (^{13}C)-4 et de la *N*-Ac-Cys.

Tableau III-11 : Informations spectrales permettant de caractériser des adduits formés entre (^{13}C)-4 et la *N*-Ac-Cys

Adduit formé	δ (ppm) ^{13}C RMN	δ (ppm) ^1H HMBC	Spectres MS (m/z)	Structure proposée
(^{13}C)-48	166,9	9,43 ; 7,24 ; 7,08 ; 3,38 ; 3,12	298,0940	
(^{13}C)-53	155,2	7,95	242,1375	

c) Réactivité de (^{13}C)-4 vis-à-vis du GSH

En suivant la cinétique de la réaction de (^{13}C)-4 vis-à-vis du GSH, nous avons détecté trois signaux à 166,8 ppm, 157,5 ppm et 155,2 ppm, et ce dès le premier temps de réaction. Le signal à 125,4 ppm de (^{13}C)-4 a totalement disparu après 34 jours (**Figure III-33**).

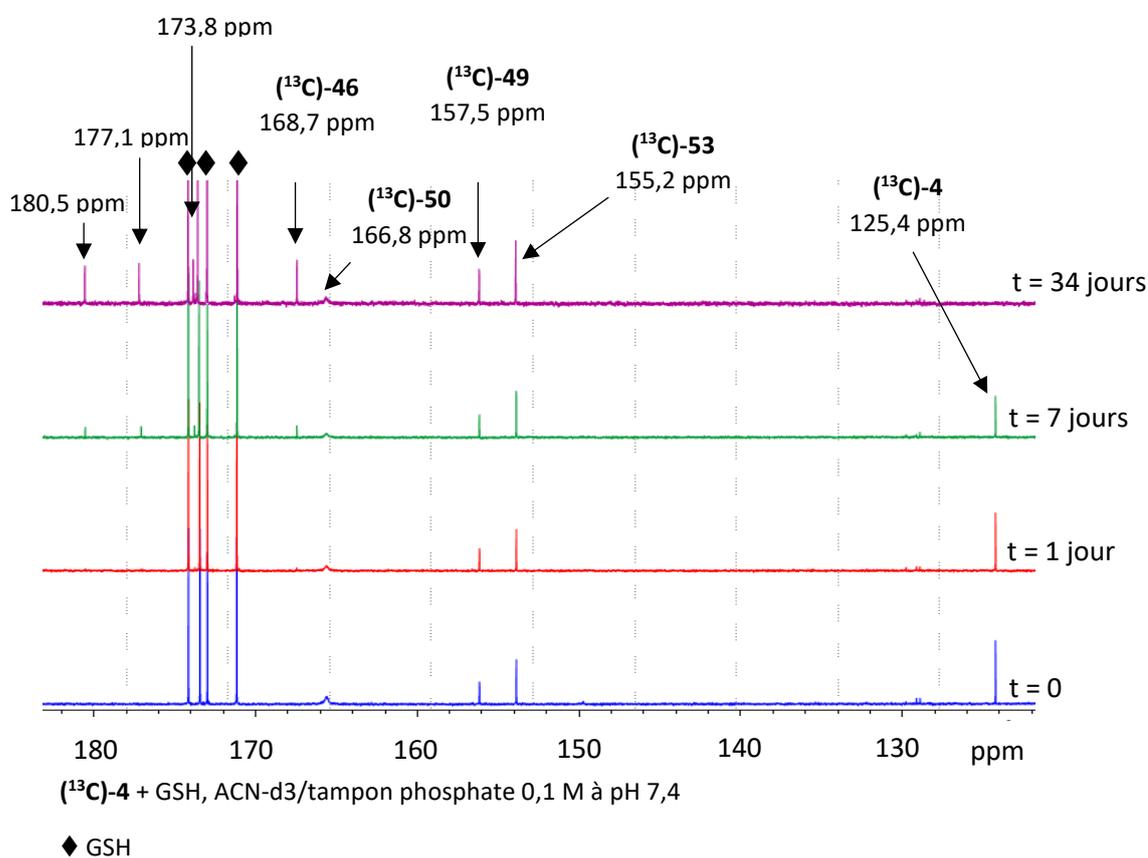


Figure III-33. Cinétique de la réaction entre (^{13}C)-4 et le GSH

En raison de faible quantité des adduits (^{13}C) -49 et (^{13}C) -50, il est impossible d'élucider leur structure par les expériences RMN bidimensionnelles. En se basant sur les données obtenues lors de la réaction entre (^{13}C) -4 et la *N*-Ac-Cys/la *N*-Ac-Lys, il est possible que le signal du carbone à 166,8 ppm corresponde à un atome de carbone substitué de l'adduit de type thiocarbamate (^{13}C) -50. Le signal à 157,5 ppm, quant à lui, pourrait être attribué à l'adduit de type urée (^{13}C) -49. Par contre, en spectre HMBC (Figure III-35), le signal à 155,2 montre une seule corrélation avec un proton à 7,90 ppm porté par un atome d'azote du groupement urée. Ce signal pourrait ainsi appartenir à l'adduit (^{13}C) -53 (Figure III-34).

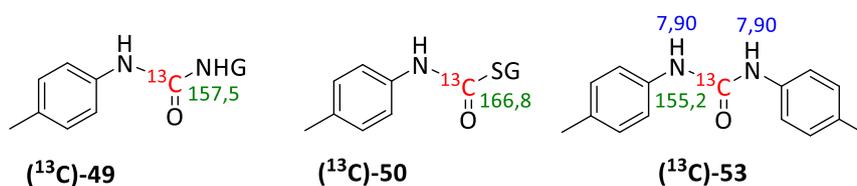


Figure III-34. Adduits formés dans la réaction de (^{13}C) -4 et le GSH

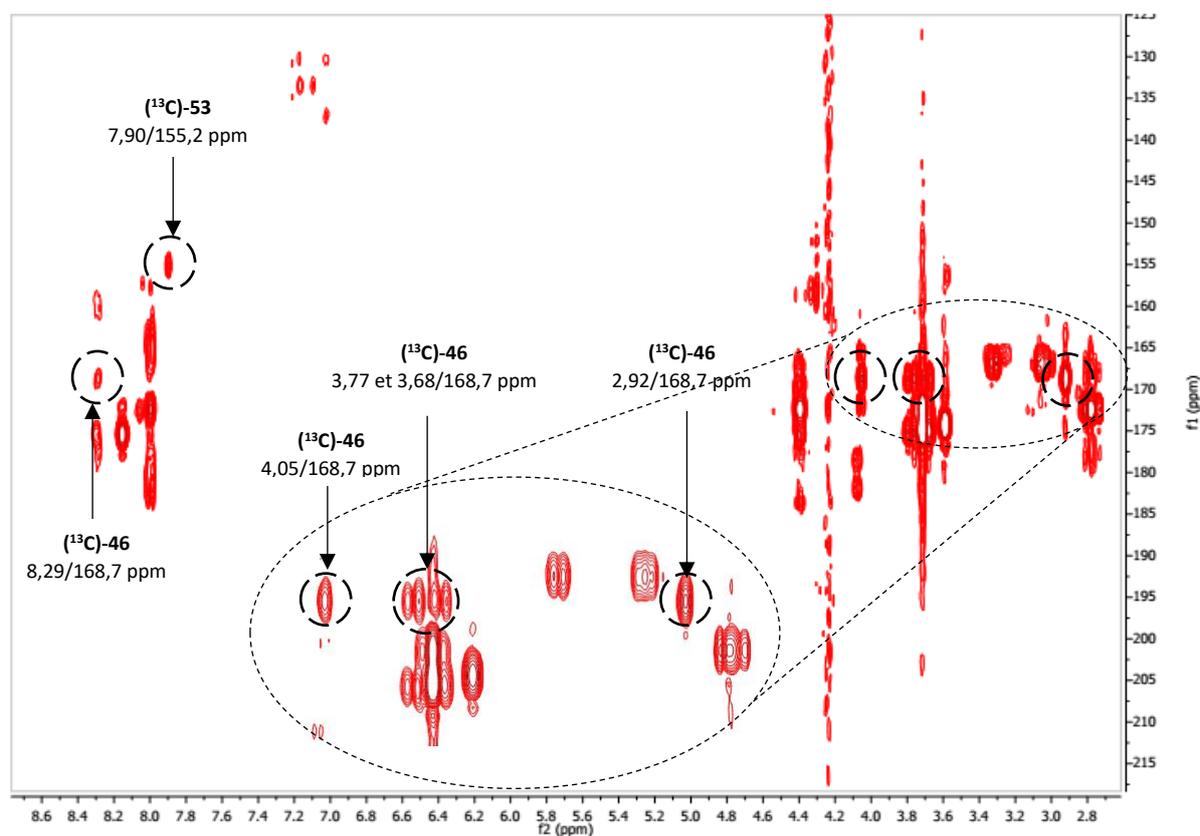


Figure III-35. Spectre HMBC permettant d'identifier les adduits (^{13}C) -46 et (^{13}C) -53

De plus, au bout du septième jour de réaction, 4 nouveaux signaux de carbone apparaissent à

168,7 ppm, 173,8 ppm, 177,1 ppm et 180,5 ppm. Dans les spectres RMN bidimensionnels, aucune corrélation de trois signaux à 173,8 ppm, 177,1 ppm et 180,5 ppm n'a été observée, ce qui ne permet pas d'élucider leur structure. Par contre, le spectre HMBC montre une corrélation du signal du carbone à 168,7 ppm avec un proton à 8,29 ppm porté par un atome d'azote. De plus, d'autres corrélations avec des protons à 4,05 ppm, 3,77 ppm, 3,68 ppm et 2,92 ppm sont également détectées. Ainsi, comme dans la réaction entre (^{13}C)-**3** et le GSH, ce signal pourrait correspondre à un adduit (^{13}C)-**46** provenant d'une addition intramoléculaire de la fonction amine du GSH sur la fonction carbonyle de l'adduit (^{13}C)-**50**, suivie de l'élimination de la *p*-toluidine (Schéma III-12).

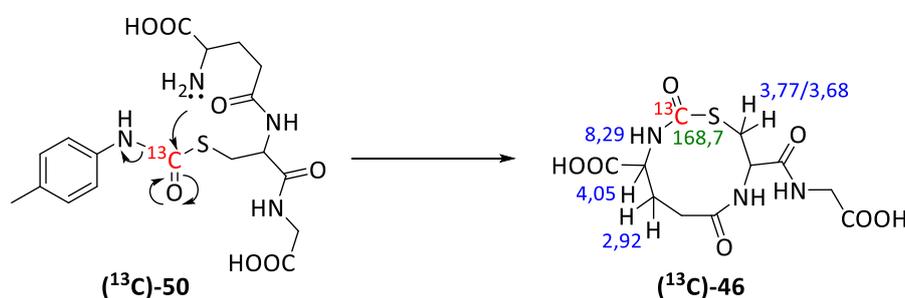


Schéma III-12. Formation de l'adduit (^{13}C)-**46** à partir de (^{13}C)-**50**

L'analyse LC-MS a été réalisée afin de confirmer la présence de ces adduits. En effet, nous avons détecté deux composés ayant des rapports m/z 442,1475 et 242,1385 (en mode positif) (Figure III-36) qui correspondent aux adduits (^{13}C)-**49**/ (^{13}C) -**50** et (^{13}C)-**53**, respectivement. Cependant, le composé (^{13}C)-**46** n'a pas été détecté.

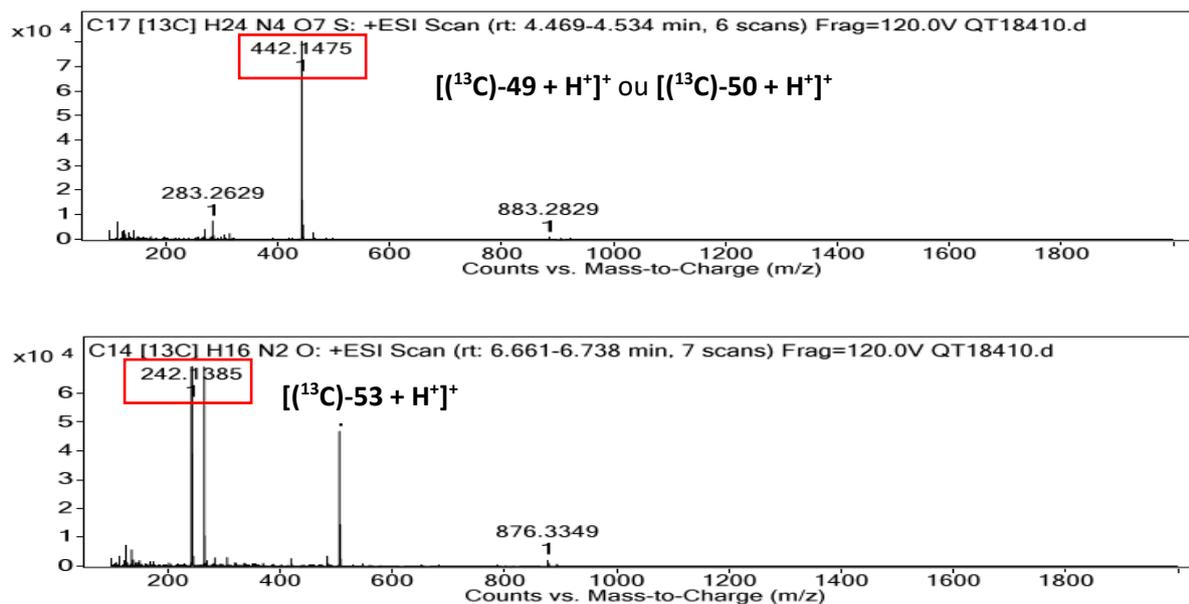


Figure III-36. Spectres MS permettant de confirmer la formation des adduits $(^{13}\text{C})\text{-49}/(^{13}\text{C})\text{-50}$ et $(^{13}\text{C})\text{-53}$

Les informations spectrales des adduits formés entre le composé $(^{13}\text{C})\text{-4}$ et le GSH sont résumées dans le **Tableau III-12**.

Tableau III-12 : Informations spectrales permettant de caractériser des adduits formés entre $(^{13}\text{C})\text{-4}$ et la *N*-Ac-Lys

Adduit formé	δ (ppm) ^{13}C RMN	δ (ppm) ^1H HMBC	Spectres MS (m/z)	Structure proposée
$(^{13}\text{C})\text{-49}$	157,5	-	442,1475	
$(^{13}\text{C})\text{-50}$	166,8	-	442,1475	
$(^{13}\text{C})\text{-53}$	155,2	7,90	242,1385	
$(^{13}\text{C})\text{-46}$	168,7	8,29 ; 4,05 ; 3,77 ; 3,68 ; 2,92	-	

II. Réactivité des allergènes substitués au carbone 13 envers une protéine modèle

1. L'albumine sérique bovine (BSA)

L'albumine sérique est l'une des protéines les plus abondantes dans le plasma des mammifères. C'est une protéine multifonctionnelle avec une capacité à fixer de nombreuses molécules, ce qui en fait une protéine transporteuse pour les métabolites, les médicaments, les métaux et les autres molécules. Grâce à ses propriétés de liaison, les albumines ont de larges applications cliniques, pharmaceutiques et biochimiques^[228].

En raison de la forte similitude structurelle avec l'albumine sérique humaine (HSA), l'albumine sérique bovine (BSA) est largement utilisée en tant que protéine modèle dans différents domaines^[228-230]. Le poids moléculaire de la BSA est d'environ 69 000 Da et elle est composée d'une seule chaîne polypeptidique qui comprend 607 résidus acides aminés dont :

- 60 lysines
- 26 arginines
- 17 histidines
- 3 tryptophanes
- 35 cystéines dont une seule libre (Cys58), les autres étant impliquées dans 17 ponts disulfures permettant de stabiliser la structure de la protéine.
- 5 méthionines
- 32 sérines
- 34 thréonines
- 21 tyrosines

De nombreux résidus nucléophiles (lysine, arginine, histidine, tryptophane, cystéine, méthionine, serine, thréonine, tyrosine) dans la composition de la BSA en font un modèle favorable dans l'étude de réactivité des allergènes. La BSA est donc un modèle de choix pour mimer la réactivité des protéines épidermiques dans notre étude et pour évaluer la procédure d'utilisation de la LC-MS/MS dans l'analyse protéomique avant d'appliquer à l'étude des épidermes humains reconstitués exposés aux différents allergènes.

2. Mode opératoire

La réactivité des allergènes vis-à-vis de HSA (protéine similaire à BSA) a été étudiée depuis longtemps au laboratoire de Dermatochimie^[90, 231, 232]. L'allergène substitué au carbone 13 est incubé avec la protéine modèle dans un tampon phosphate à un pH compris entre 7 et 8. Ce milieu reproduit les conditions physiologiques. Dans notre travail, nous avons utilisé un tampon phosphate 0,1 M à un pH de 7,4.

Une solution de l'allergène substitué au carbone 13 (200 équivalents) dans un minimum d'éthanol est ajoutée à une solution de BSA (1 équivalent) dans un tampon phosphate 0,1 M à pH de 7,4 qui a été dégazé pendant 15 minutes. Le mélange réactionnel est ensuite incubé à 37 °C pendant 9 jours. La solution est dialysée contre de l'eau (5 x 5 L), puis la protéine modifiée est lyophilisée avant d'être étudié par RMN du carbone 13.

L'échantillon pour l'analyse par RMN est préparé en solubilisant la protéine dans un mélange H₂O/D₂O avec une goutte d'acétonitrile comme référence interne. Le spectre RMN du carbone 13 de la BSA modifiée est comparé avec celui de la BSA native afin de déterminer les adduits formés. Grâce aux études de réactivité des allergènes avec les acides aminés et le GSH, nous pouvons comparer les déplacements chimiques des adduits observés avec la BSA et ceux observés avec les acides aminés ou le GSH.

3. Résultats

Nous avons étudié la réactivité de deux allergènes substitués au carbone 13 ((¹³C)-1 et (¹³C)-2) avec la BSA. Les allergènes de type isocyanate ((¹³C)-3 et (¹³C)-4), qui sont complètement hydrolysés dans les conditions de ce test, n'ont pas été étudiés.

3.1. Réactivité de l'anhydride phtalique (¹³C)-1 envers la BSA

Après l'incubation de (¹³C)-1 avec la BSA dans les conditions décrites, la dialyse et la lyophilisation de la protéine modifiée sont réalisées. La protéine obtenue est analysée par RMN du carbone 13 afin de déterminer les adduits formés. Le spectre RMN du carbone 13 de la BSA modifiée par (¹³C)-1 montre des différences par rapport au celui de la BSA native (**Figure III-37**). En effet, nous avons observé trois nouveaux signaux du carbone à 174,8 ppm,

171,8 ppm et 169,2 ppm.

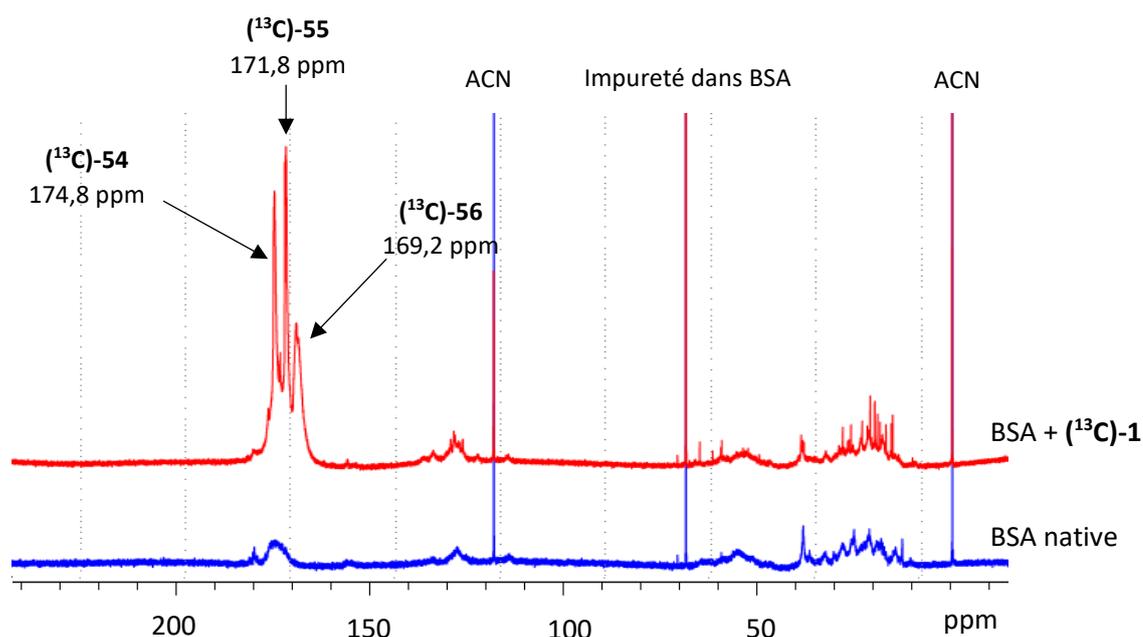


Figure III-37. Spectres ^{13}C RMN de la BSA native et de la BSA modifiée par $(^{13}\text{C})\text{-1}$

En comparant avec les études vis-à-vis des acides aminés et du GSH, nous observons que certains résidus lysines de la BSA sont modifiés par $(^{13}\text{C})\text{-1}$. En effet, deux signaux du carbone à 174,8 ppm et 171,8 ppm peuvent être attribués à deux adduits de type amide $(^{13}\text{C})\text{-54}$ et $(^{13}\text{C})\text{-55}$ formés entre les résidus lysines et $(^{13}\text{C})\text{-1}$. Le troisième signal à 169,2 ppm, quant à lui, correspond à l'adduit cyclisé de type imide $(^{13}\text{C})\text{-56}$ formé à partir des adduits $(^{13}\text{C})\text{-54}$ et $(^{13}\text{C})\text{-55}$. Les différents adduits formés entre la BSA et $(^{13}\text{C})\text{-1}$ sont résumés dans la **Schéma III-13**.

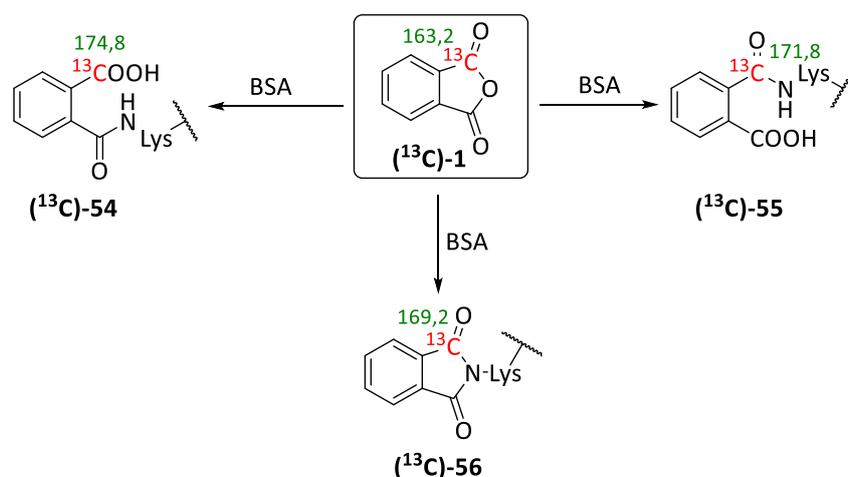


Schéma III-13. Adduits formés dans la réaction de BSA et de $(^{13}\text{C})\text{-1}$

3.2. Réactivité de la 2,3-diphénylcyclopropénone (^{13}C)-2 envers la BSA

La BSA est incubée avec (^{13}C)-2 dans les conditions décrites précédemment. La protéine modifiée obtenue après la dialyse et la lyophilisation n'a pas pu être solubilisée dans le mélange de solvant classique $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ afin de l'analyser par RMN. Après différents essais de solubilisation avec les mélanges de solvant décrits dans la littérature tels que $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$, $\text{H}_2\text{O}/t\text{-BuOH-d}_{10}^{[233]}$, seul le mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ avec un minimum d'acide trifluoroacétique (TFA) nous a permis de solubiliser une petite partie de la protéine modifiée. Cependant, une majeure partie insoluble dans le milieu a rendu la qualité du spectre RMN très mauvaise (**Figure III-38**).

En comparant le spectre de la BSA modifiée par (^{13}C)-2 et celui de la BSA native, nous avons observé plusieurs nouveaux signaux que nous n'avons pas pu les attribuer. Cependant, parmi eux, deux grands signaux à 136,3 ppm et 134,8 ppm semblent correspondre aux adduits provenant de la réaction entre (^{13}C)-2 et les résidus nucléophiles de la BSA.

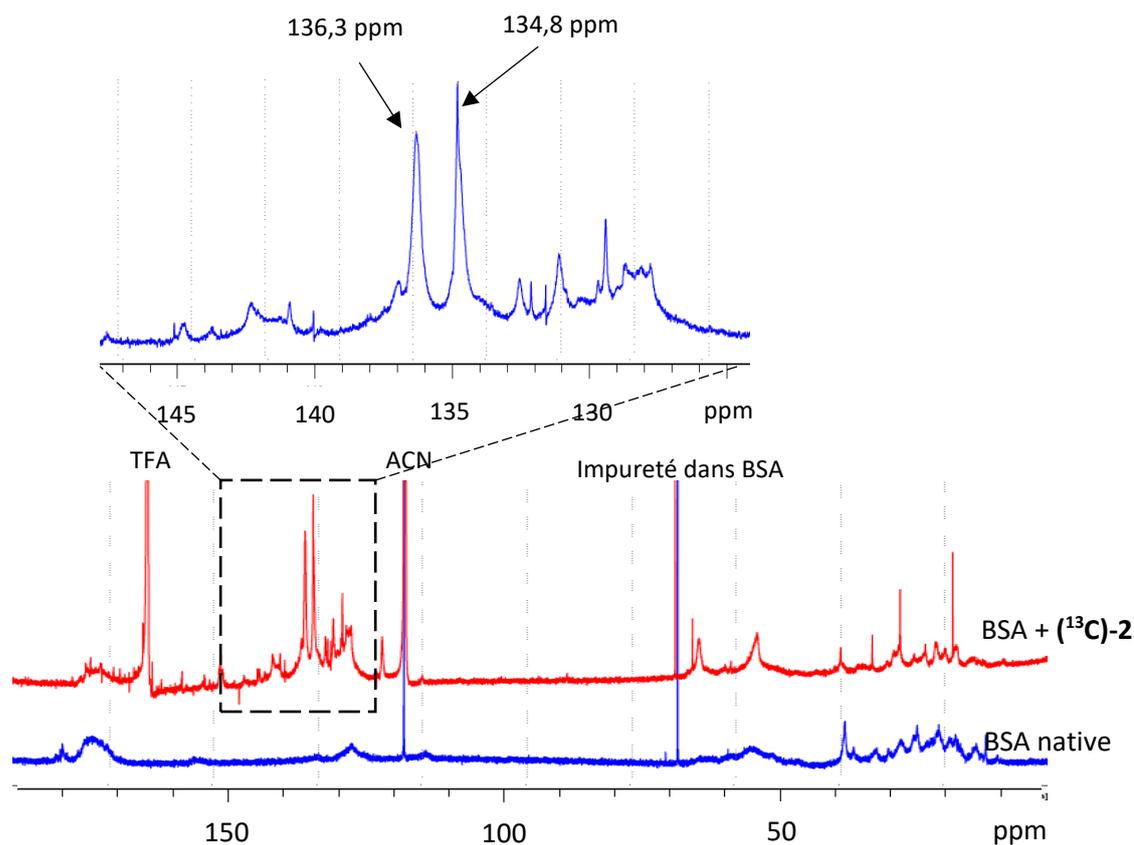


Figure III-38. Spectres ^{13}C RMN de la BSA native et de la BSA modifiée par $(^{13}\text{C})\text{-2}$

En se basant sur les études de réactivité de $(^{13}\text{C})\text{-2}$ avec les acides aminés, ces deux signaux à 136,3 ppm et 134,8 ppm pourraient correspondre aux adduits formés entre $(^{13}\text{C})\text{-2}$ et les résidus cystéines et histidines de la BSA. D'après le test du DPRA et notre étude de réactivité vis-à-vis des acides aminés, la DCP a montré une forte affinité avec les résidus cystéines mais également avec l'histidine. Alors qu'aucun adduit de la DCP avec les résidus lysines n'est observé. Cependant, Parkinson et ses collègues ont également observé la réactivité de la DCP avec les résidus lysines et arginines dans l'albumine sérique humain (HSA), une protéine modèle similaire à la BSA, en analysant les spectres MS/MS^[227]. Ceci pourrait provenir de la différence entre la réactivité des résidus nucléophiles inclus dans une protéine et celle des acides aminés ou des peptides isolés. Ainsi, dans une autre hypothèse, les deux signaux du carbone à 136,3 ppm et 134,8 ppm pourraient également être des adduits de $(^{13}\text{C})\text{-2}$ avec les résidus lysines ou arginines dans la BSA.

À ce stade, nous n'avons pas la capacité d'interpréter la structure de ces adduits par RMN à cause de la qualité du spectre et de nombreuses possibilités dont les déplacements chimiques sont proches. Ces adduits seront donc confirmés par une autre technique plus sensible, la

spectrométrie de masse, dans un chapitre suivant.

III. Conclusion

Ce chapitre présente de nombreux résultats qui fournissent des informations concernant la réactivité des différents allergènes face aux acides aminés nucléophiles, au GSH et à la protéine modèle BSA.

L'allergène respiratoire, l'anhydride phtalique **1**, a montré une réactivité spécifique pour les groupements aminés de la *N*-Ac-Lys, du GSH et de la BSA pour former les adduits de type amide et imide. Alors que la 2,3-diphénylcyclopropénone **2**, un allergène cutané, a montré une forte affinité pour les groupements thiols de la *N*-Ac-Cys et du GSH. Enfin, les tests de réactivité des allergènes mixtes (le 4,4'-méthylènediphényldiisocyanate **3** et le *p*-tolylisocyanate **4**) ont mis en évidence que ces molécules pouvaient réagir à la fois avec des résidus aminés et thiolés de la *N*-Ac-Lys, de la *N*-Ac-Cys et du GSH. Ces résultats sont en accord avec les données issues du DPRA^[4, 5]. En outre, une réactivité vis-à-vis de la *N*-Ac-His a également été observée dans le cas de la 2,3-diphénylcyclopropénone **2**. Cela pourrait fournir des informations intéressantes pour le rôle de l'histidine, qui a été négligé jusqu'à présent, dans l'induction de la sensibilisation cutanée.

Les études de réactivité de la 2,3-diphénylcyclopropénone **2**, du 4,4'-méthylènediphényldiisocyanate **3** et du *p*-tolylisocyanate **4** avec la BSA présentent des limitations du fait de problèmes de solubilisation de la protéine modifiée lors des études par RMN ou de l'hydrolyse facile de ces produits. D'autres protocoles sont donc à envisager dans les études par LC-MS/MS afin de compléter les données de réactivités envers la protéine modèle, BSA.

Chapitre IV

**Etude des interactions des allergènes
substitués au carbone 13 avec les
épidermes humains reconstitués par
RMN HRMAS**

Chapitre IV : Etude des interactions des allergènes substitués au carbone 13 avec les épidermes humains reconstitués par RMN HRMAS

Après l'obtention des résultats de réactivité *in vitro* des allergènes vis-à-vis d'acides aminés et de la protéine modèle, nous avons étudié leurs interactions avec les épidermes humains reconstitués, modèle EpiSkin™. Les épidermes reconstitués exposés aux allergènes substitués au carbone 13 ont été analysés par RMN HRMAS. Les résultats obtenus sont comparés avec ceux obtenus par les tests *in vitro* avec les acides aminés ou la protéine modèle afin d'identifier les modifications protéiques dans l'épiderme.

Dans ce chapitre, nous introduirons tout d'abord les épidermes humains reconstitués et la RMN HRMAS avant d'étudier la réactivité des allergènes substitués au carbone 13 envers les épidermes reconstitués, le modèle EpiSkin™. Nous finirons ce chapitre par les remarques et les conclusions de cette étude sur les épidermes.

I. Les épidermes humains reconstitués

Les épidermes humains reconstitués (RHE) sont des tissus tridimensionnels générés *in vitro* à partir de kératinocytes humains normaux dans un milieu défini. Dans la tendance mondiale visant à réduire ou remplacer les tests sur les animaux, de nombreux modèles d'épidermes humains reconstitués ont été développés. Ce sont des outils importants pour la recherche et le développement dans les industries pharmaceutique et cosmétique, permettant ainsi d'évaluer la réactivité et l'efficacité des produits chimiques. Dans cette partie, nous rappellerons tout d'abord l'historique du développement des RHE, puis nous présenterons les principaux modèles de RHE et enfin nous parlerons du modèle de choix dans notre étude, le modèle EpiSkin™.

1. Historique du développement des épidermes humains reconstitués

Un premier modèle d'épiderme humain reconstitué (RHE) a été développé en 1975 par Rheinwald et Green^[79]. Dans leurs travaux, ils ont montré que les kératinocytes pouvaient se développer et former des colonies en cultivant des cellules kératinocytaires diploïdes

humaines. Cependant, ils n'ont pas réussi à atteindre une différenciation totale des cellules. En 1983, Pruniéras *et al.* ont démontré que la culture de ces cellules kératinocytaires à une interface air-liquide permettait le développement d'un épiderme totalement différencié^[234]. Cette interface air-liquide semble être cruciale pour le développement de la couche cornée, qui constitue la barrière entre l'organisme et l'environnement. Au début des années 2000, de nombreux modèles d'épidermes *in vitro* ont été développés en raison des changements de législation européenne dans le domaine des produits chimiques et des cosmétiques^[53], ainsi que des considérations éthiques et économiques. De plus, en 2013, l'Europe a interdit totalement la commercialisation des produits cosmétiques, que ce soit pour les produits finis mais aussi pour les ingrédients, testés sur les animaux^[54]. Cette interdiction a considérablement accru l'attention sur les modèles épidermiques reconstitués dans l'industrie cosmétique. Les progrès techniques permettent de développer des modèles RHE ayant de fortes similitudes avec l'épiderme humain en termes de structure, de composition et de fonctionnalités^[235].

2. Les principaux modèles d'épidermes humains reconstitués

Actuellement, différents modèles d'épidermes humains reconstitués sont commercialisés par plusieurs sociétés. Des exemples de modèles les plus connus et disponibles dans le commerce sont l'EpiDerm™ (MatTek Corporation, USA), le SkinEthic™ (Episkin, France) et l'Episkin™ (Episkin, France). Nous présenterons brièvement les deux modèles EpiDerm™ et SkinEthic™. Le modèle de choix dans notre étude, l'EpiSkin™, sera présenté plus en détail.

Le modèle EpiDerm™ est reconstitué à partir de kératinocytes humains normaux. Les kératinocytes sont cultivés à l'interface air-liquide sur un support en polycarbonate recouvert de collagène^[80]. Etant un modèle multicouche hautement différencié, il est organisé en couche basale, épineuse, granulaire et cornifiée. Comme de nombreux modèles épidermiques, l'EpiDerm™ est maintenu à l'interface air-milieu de culture, permettant l'application directe des molécules testées à sa surface.

Le modèle SkinEthic™ est reconstruit par culture des kératinocytes humains normaux à l'interface air-liquide pendant 17 jours. Ce modèle est produit sur un support en polycarbonate intégrés dans un gel d'agarose^[82]. Le modèle SkinEthic™ (modèle 4 cm²) a été

utilisé au laboratoire de Dermatochimie pour étudier les interactions avec les allergènes chimiques^[89, 90, 92].

3. Le modèle EpiSkin™ et ses applications

Pour nos études, nous avons sélectionné le modèle d'épiderme humain reconstitué EpiSkin™ (modèle 1,07 cm², EpiSkin, Lyon, France). Le modèle EpiSkin™ a été développé pour la première fois par Tinois *et al.*^[236] et acheté par l'Oréal en 1997. Cet épiderme est reconstitué *in vitro* par culture de kératinocytes humains normaux sur un support à l'interface air-liquide pendant 13 jours. Le support est une matrice de collagène bovin de type I, mimant le derme, recouverte d'un film de collagène humain de type IV. Le modèle EpiSkin™ est histologiquement similaire à l'épiderme humain natif. Ce modèle montre toutes les couches des épidermes humains (**Figure IV-1**). Cependant, la couche cornée du modèle EpiSkin™ possède un nombre plus élevé de couches cellulaires par rapport à celle de l'épiderme humain et, par conséquent, est plus épaisse.

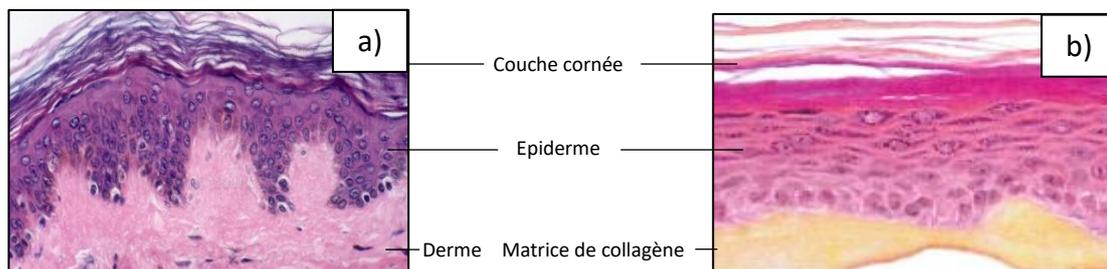


Figure IV-1. Morphologie d'un épiderme humain **(a)** et d'un modèle EpiSkin™ **(b)**

Le kit EpiSkin™ est actuellement commercialisé sous forme de plaques de 12 puits avec deux modèles : le modèle large (1,07 cm²) que nous utilisons dans ce travail, et le modèle petit (0,38 cm²).

Avec les modèles EpiDerm™ et SkinEthic™, le modèle EpiSkin™ est utilisé largement dans différents domaines. En effet, il est exposé à des xénobiotiques afin de réaliser des tests d'irritation^[83]. Il est également utilisé avec l'objectif de distinguer les substances corrosives et non corrosives^[237]. De plus, il est utilisé dans l'évaluation de la phototoxicité suite à l'exposition à des composés phytotoxiques^[238] ou encore dans l'évaluation de la perméabilité aux produits cosmétiques^[239]. Parmi eux, les tests d'irritation cutanée en utilisant les modèles

EpiSkin™, EpiDerm™ et SkinEthic™ ont été validés par l'ECVAM^[240, 241] et récemment acceptés par l'OECD^[242].

II. La RMN HRMAS

La RMN HRMAS (High-Resolution Magic Angle Spinning) est une technique de la RMN du solide qui permet de suivre des réactions chimiques ou des interactions dans un milieu hétérogène. Pour l'acquisition d'un spectre RMN en phase solide, l'échantillon doit être mis en rotation à une fréquence rapide et en formant un angle de $54,7^\circ$ (angle magique) avec le champ magnétique principal B_0 (**Figure IV-2**).

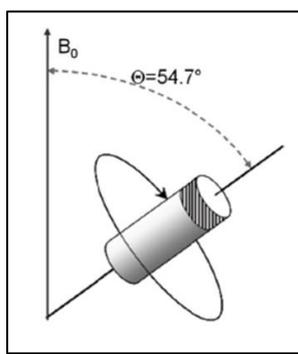


Figure IV-2. Rotation de l'échantillon à l'angle magique par rapport au champ magnétique principal B_0

Dans cette partie, nous rappellerons un peu d'histoire de cette technique. Puis nous présenterons son principe de base avant de finir par ses applications dans les différents domaines.

1. Historique

La RMN HRMAS est née en 1959, lorsque Andrew *et al.* ont publié pour la première fois l'effet d'un angle de $54,7^\circ$ sur le spectre RMN solide du sodium 23 ^[243]. En effet, en tournant l'échantillon du chlorure de sodium à un angle de 50° à 100° par rapport au champ magnétique principal, ils ont trouvé que l'affinement maximal du signal était obtenu à un angle de $54,7^\circ$, appelé angle magique. Cet effet est expliqué par la suppression des couplages dipolaires qui sont responsables de la largeur du signal. Ils ont également observé des bandes latérales autour du signal de spectre RMN. Ces bandes ayant pour origine l'inhomogénéité du

champ, peuvent être diminuées et déplacées loin du signal principal avec une vitesse de rotation de 810 rps. Cependant, cette vitesse n'a pas permis de supprimer totalement ces bandes latérales. La même année, Lowe a également observé les bandes latérales lors d'acquisition de spectres RMN du fluor 19 à partir de l'échantillon solide de CaF_2 ou de téflon^[244]. Dans cette étude, ces bandes peuvent être supprimées par l'augmentation significative de la vitesse de rotation de l'échantillon.

En 1995, pour faciliter l'analyse de résines fonctionnalisées dans la chimie combinatoire, Anderson *et al.* ont montré que la technique de la RMN à haute résolution associée à une rotation rapide à l'angle magique (HRMAS, High-Resolution Magic Angle Spinning) permettait de supprimer les différences de susceptibilités magnétiques et les couplages dipolaires résiduels dus à la nature du système hétérogène^[245]. La résolution des spectres obtenus en RMN HRMAS est proche de celle acquise en RMN du liquide sur des phases homogènes. La technique RMN HRMAS est actuellement appliquée dans de nombreux domaines de recherche qui seront présentés dans la partie qui suit le principe de cette technique.

2. Principe de la RMN HRMAS

Dans la RMN, liquide ou solide, une mobilité suffisante des molécules dans l'échantillon analysé est nécessaire à l'obtention de spectres de qualité suffisante. Contrairement aux molécules libres en solution, dans un échantillon solide, le milieu est anisotrope et les mouvements moléculaires sont faibles ou parfois inexistantes. Ainsi, plusieurs phénomènes non désirés, qui sont à l'origine de l'élargissement des signaux, apparaissent. En effet, lorsqu'une molécule est fixe dans une structure solide, elle perd sa capacité à tourner librement et de manière isotrope, ce qui entraîne des temps de relaxation transversaux plus courts conduisant à des signaux plus larges. La perte de mobilité n'est cependant pas le seul facteur contribuant à l'élargissement des signaux. Les différences de susceptibilité magnétique et les interactions anisotropes résiduelles comme le couplage dipolaire et l'anisotropie de déplacement chimique sont également des causes importantes^[246, 247]. En effet, les molécules possédant une susceptibilité magnétique et une orientation différente dans l'espace vont être influencées de manière différente par le champ magnétique extérieur. Le signal obtenu est ainsi élargi car il est la somme d'un ensemble de signaux. La rotation rapide de l'échantillon à l'angle magique a la capacité de moyenniser ces effets indésirables

pour diminuer la largeur des signaux obtenus^[86, 248]. La RMN HRMAS permet donc d'obtenir des spectres de bonnes qualités à partir d'échantillons solides.

3. Applications

La RMN HRMAS est actuellement appliquée dans divers domaines tels que la chimie, la biologie ou encore la médecine. Les applications importantes incluent l'analyse des produits issus de la synthèse sur support solide, des lipides, des polymères, des échantillons biologiques et des aliments^[86, 249].

Depuis que Merrifield a découvert la synthèse organique sur support solide en 1963, elle devient une technique très importante pour la chimie combinatoire. Cette technique de synthèse est une méthode dans laquelle les molécules sont greffées de manière covalente sur un support solide (résine ou polymère) et synthétisées en multi-étapes complexes. Cette méthode est appliquée non seulement à la synthèse des peptides mais aussi à la synthèse des polysaccharides, des oligonucléotides ainsi que de petites protéines. Elle devient également une méthode de synthèse intéressante dans le développement de médicaments^[250, 251]. Cependant, un inconvénient majeur de cette approche est la surveillance des réactions qui se produisent sur le support solide. Le clivage de l'intermédiaire de la résine pour une analyse ultérieure en utilisant des méthodes en solution peut altérer les produits désirés. Même si le clivage est possible, la procédure expérimentale est laborieuse et chronophage. Ces limitations ont conduit au développement de méthodologies analytiques efficaces pour la caractérisation *in situ* des composés lorsqu'ils sont encore liés à un support solide. Ainsi, en 1989, Stöver *et al.* ont été les pionniers qui utilisent la RMN HRMAS dans l'analyse des produits de synthèse en phase solide^[252]. Depuis, de nombreuses études ont utilisé la RMN HRMAS comme la méthode analytique cruciale dans la synthèse sur support solide^[245, 253-255].

La RMN HRMAS est également appliquée en analyse des produits alimentaires^[256]. Les échantillons alimentaires peuvent être considérés comme des matrices complexes hétérogènes semi-solides, contenant différentes espèces chimiques telles que des protéines, des lipides, des sucres ou des acides organiques. Des informations sur la composition chimique des aliments peuvent donc être obtenues à l'aide de l'analyse par RMN HRMAS. La détermination de la composition permet de déterminer l'origine géographique, de vérifier les

ingrédients nutritionnels ou encore de contrôler la qualité du produit. La première étude des aliments par RMN HRMAS a été présentée en 1989 par Rutar qui a caractérisé des compositions lipidiques dans les graines de tournesols et de haricots^[257]. En 2002, Brescia *et al.* ont mentionné la potentialité de la RMN HRMAS dans le contrôle de la viande en termes d'origine et de détection de falsification^[258]. Plus récemment, en 2010, deux études sur le profil métabolique des légumes par RMN HRMAS ont été publiées. Dans les deux études, les spectres RMN 1D et 2D ont permis de caractériser plusieurs composés tels que les acides organiques, les sucres et les acides aminés dans le poivron^[259] et la tomate^[260].

La caractérisation des échantillons biologiques est un autre exemple d'application de la RMN HRMAS. En 1996, Cheng *et al.* ont utilisé la RMN HRMAS afin d'analyser des ganglions lymphatiques de rat dans le but de comprendre et d'évaluer le développement de tumeurs^[88]. Depuis cette étude, la RMN HRMAS a été appliquée pour l'analyse de différents échantillons biologiques tels que le cerveau, la prostate, le cœur, les reins ou le foie^[261]. De plus, la recherche du profil des métabolites humains par RMN HRMAS est une technique très utile dans le diagnostic des cancers^[262, 263]. En effet, l'analyse des tissus biologiques à l'aide de la RMN HRMAS permet de mesurer qualitativement et quantitativement les métabolites. Le profil des métabolites est la base dans le diagnostic et la recherche des traitements du cancer.

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

Depuis quelques années, le laboratoire de Dermatochimie a développé une procédure pour l'étude des interactions entre les allergènes et les protéines dans les épidermes humains reconstitués (RHE) à l'aide de la RMN HRMAS.

En 2013, Elbayed *et al.* ont montré que la RMN HRMAS est bien adaptée pour étudier des RHE permettant des études tant qualitatives que quantitatives^[89]. En utilisant cette technique, ils ont étudié les interactions chimiques *in situ* du dodécanesulfonate de méthyle substitué au carbone 13, un sensibilisant cutané, avec les protéines épidermiques dans le modèle SkinEthic™. Dans cette étude, la stabilité des échantillons épidermiques a été évaluée pour assurer des études fiables et reproductibles. Les auteurs ont également décrit le protocole de préparation, de stockage et d'analyse des échantillons. Ce protocole peut être utilisé sur

différents épidermes reconstitués pour étudier divers produits chimiques responsables de l'allergie. Ce travail d'Elbayed *et al.* a été suivi par d'autres recherches qui ont étudié la réactivité de différents allergènes vis-à-vis du modèle RHE SkinEthic™^[90-92]. Ces études sont vraiment importantes car elles permettent d'ouvrir des perspectives pour l'évaluation des produits chimiques sensibilisants mais aussi pour la compréhension moléculaire de la régulation du système immunitaire par les allergènes en combinant la RMN HRMAS et les épidermes humains reconstitués.

IV. Etude des interactions des allergènes cutanés et respiratoires substitués au carbone 13 vis-à-vis d'épidermes humains reconstitués, modèle EpiSkin™, par RMN HRMAS

Pour nos études, nous avons choisi le modèle d'épiderme humain reconstitué EpiSkin™ qui est plus simple d'utilisation. Au laboratoire de Dermatochimie, des expériences de RMN HRMAS mono- et bidimensionnelles ont déjà été réalisées sur plusieurs échantillons épidermiques des modèles SkinEthic™ et EpiSkin™. La caractérisation du modèle EpiSkin™ par RMN HRMAS (résultats non publiés) montre des résultats hautement similaires à ceux du modèle SkinEthic™.

Dans la partie suivante, nous évoquerons tout d'abord le mode opératoire développé dans notre laboratoire permettant de suivre la réactivité des haptènes dans les épidermes humains reconstitués par RMN HRMAS. Puis, nous présenterons les résultats obtenus par RMN HRMAS de la réactivité des allergènes cutanés et respiratoires étudiés envers les épidermes reconstitués EpiSkin™. Enfin, nous finirons par les conclusions de cette étude.

1. Mode opératoire

Un protocole en plusieurs étapes a été développé dans notre laboratoire permettant de suivre la réactivité des haptènes envers les épidermes humains reconstitués par RMN HRMAS (**Figure IV-3**). Les molécules substituées au carbone 13 sont d'abord appliquées sur les épidermes humains reconstitués. Les épidermes sont ensuite incubés à 37 °C pendant les temps appropriés. Enfin, les échantillons sont préparés à froid et analysés par RMN HRMAS à 4 °C^[89].

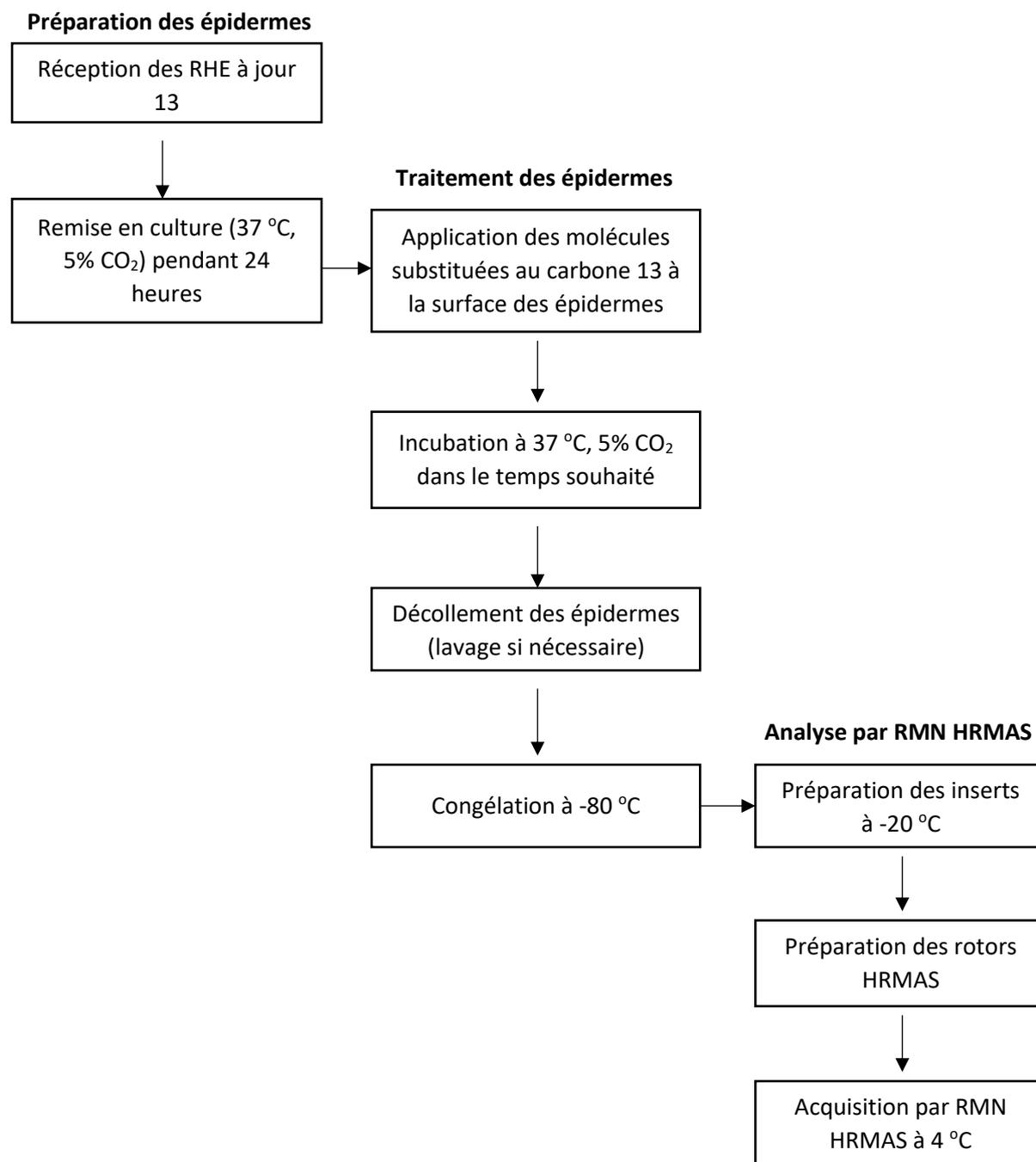


Figure IV-3. Protocole général pour la manipulation et l'analyse des épidermes humains reconstitués^[264]

1.1. Application des allergènes substitués au carbone 13 sur les épidermes humains reconstitués

Le modèle d'épiderme humain reconstitué EpiSkin™ (modèle 1,07 cm², EpiSkin, Lyon, France) a été choisi dans notre étude. Les épidermes sont envoyés après une période de culture de

13 jours. Les épidermes EpiSkin™, qui reposent sur un gel d'agarose permettant la nutrition des épidermes durant le transport, sont emballés dans une plaque de 12 puits (**Figure IV-4**).

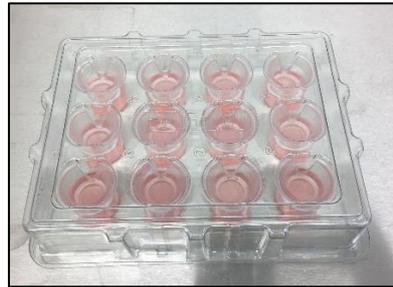


Figure IV-4. Plaque de 12 puits d'épiderme reposant sur le gel d'agarose du modèle EpiSkin™

Dès la réception, les épidermes sont manipulés dans une hotte à flux laminaire afin d'assurer des conditions stériles. Tout d'abord, les épidermes sont retirés du support d'agarose et l'excès d'agarose est enlevé à l'aide d'une compresse tissée stérile. Chaque épiderme est ensuite remis dans un puit contenant environ 2 mL du milieu de culture d'une nouvelle plaque. Puis, les épidermes sont incubés à 37 °C, 5% de CO₂ dans une atmosphère humidifiée pendant 24 heures avant d'appliquer les allergènes (**Figure IV-5**).

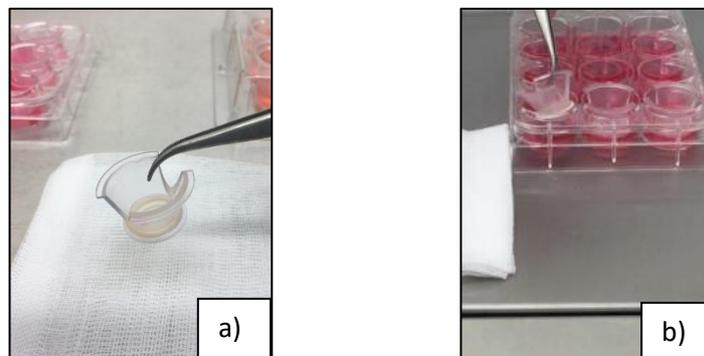


Figure IV-5. Enlever l'excès d'agarose sur une compresse tissée stérile (a) avant de remettre l'épiderme dans le milieu de culture (b)

Après 24 heures d'incubation, les allergènes substitués au carbone 13 sont appliqués à la surface des épidermes. Les allergènes sont généralement appliqués en solution en utilisant l'acétone comme véhicule. L'acétone permet une bonne pénétration à travers l'épiderme et est facilement éliminée par évaporation lors de l'incubation. Cependant, la solution de (¹³C)-DCP dans l'acétone pénètre difficilement dans l'épiderme et cristallise rapidement à la

surface. Pour cette raison, un mélange acétone – l'huile d'olive (AOO) a été utilisé comme véhicule dans le cas de la (^{13}C)-DCP. L'utilisation de l'AOO sera présentée en détail dans la partie de la (^{13}C)-DCP.

De manière générale, 30 μL de la solution de l'allergène substitué au carbone 13 (0,4 M) est appliquée localement sur l'épiderme. Les échantillons témoins sont préparés en traitant les épidermes avec le véhicule (30 μL) uniquement. Les épidermes sont ensuite incubés dans l'étuve à CO_2 (37 $^\circ\text{C}$, 5% CO_2) pendant le temps nécessaire pour la réaction. Nous avons prévu les temps d'incubation nécessaires en nous basant sur les études de réactivité des allergènes avec les acides aminés en phase liquide. Pour les allergènes étudiés dans ce travail, nous avons laissé incubé de 30 minutes à 24 heures. Les temps d'incubation pour chaque allergène seront détaillés lors de leur étude.

Après une durée d'incubation nécessaire, les épidermes sont retirés de l'étuve à CO_2 , décollés, rincés si nécessaire, congelés à -80 $^\circ\text{C}$ et stockés jusqu'à la préparation des échantillons pour l'analyse par RMN HRMAS (**Figure IV-6**).

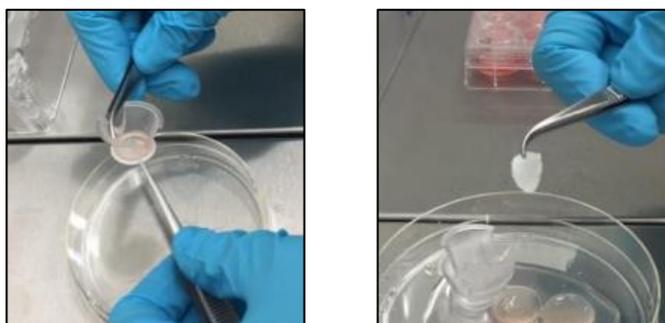


Figure IV-6. Décollement des épidermes de leur support

1.2. Préparation des échantillons pour l'analyse par RMN HRMAS

a) Préparation d'un insert

Après avoir été congelé à -80 $^\circ\text{C}$, l'épiderme est carotté à l'aide d'un poinçon de biopsie de 2 mm (**Figure IV-7**) dans un cryostat maintenu à la température de -20 $^\circ\text{C}$ afin de limiter le risque de dégradation et de décongélation des échantillons.



Figure IV-7. Poinçon de biopsie de 2 mm

L'épiderme prélevé (15 à 20 mg) est ensuite introduit dans un insert jetable Kel-F en PCTFE (polychlorotrifluoroéthylène) (**Figure IV-8a**). L'échantillon est bien poussé au fond de l'insert à l'aide d'un piston supplémentaire (**Figure IV-8b**). Un petit volume de D₂O (8 µL) est rapidement ajouté pour assurer le « lock » lors de l'acquisition RMN (**Figure IV-8c**). L'insert est ensuite scellé hermétiquement par un bouchon conique (**Figure IV-8d**) et conservé à -80 °C jusqu'à l'analyse RMN HRMAS.

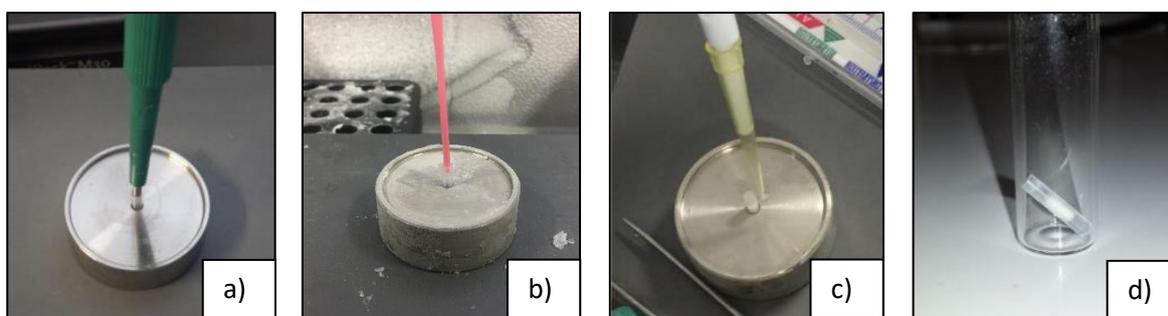


Figure IV-8. Préparation d'un insert pour l'analyse RMN HRMAS



Figure IV-9. Insert Kel-F et son bouchon conique

b) Préparation d'un rotor

Avant l'analyse RMN HRMAS, l'insert est placé dans un rotor ZrO₂ standard de 4 mm qui est ensuite fermé par un capuchon (**Figure IV-10**). Le rotor est ensuite inséré dans la sonde RMN HRMAS pré-refroidie à 4 °C. Toutes les expériences RMN HRMAS sont effectuées à 4 °C et commencent dès que la température à l'intérieur de la sonde est stable. Une fois l'analyse RMN HRMAS terminée, l'insert est retiré du rotor et stocké à -80 °C. Par conséquent, une analyse RMN complémentaire peut être effectuée à un stade ultérieur.



Figure IV-10. Rotor ZrO₂ 4 mm et son capuchon

1.3. Acquisitions RMN HRMAS

Les spectres RMN HRMAS sont enregistrés sur un spectromètre Avance Bruker II WB 500 MHz (Institut de Chimie, Strasbourg) équipé d'une sonde de résonance HRMAS à triple gradient (¹H, ¹³C et ³¹P). Afin d'assurer la stabilité métabolique des échantillons lors de l'acquisition, une unité de refroidissement est utilisée pour réguler la température de la sonde à 4 °C en refroidissant l'air entrant dans la sonde. Les échantillons sont mis en rotation à une vitesse invariante de 3501 Hz pour maintenir les bandes latérales de rotation hors de la région spectrale d'intérêt.

Les échantillons sont analysés par RMN HRMAS au moyen d'expériences monodimensionnelles (¹H CPMG, ¹³C) ou bidimensionnelles (¹H-¹³C HSQC) si nécessaire. Les spectres de proton monodimensionnel utilisent une séquence d'impulsions Carr-Purcell-Meiboom-Gill (¹H CPMG) couplée à une suppression de l'eau. La séquence CPMG permet une meilleure observation en réduisant l'intensité des signaux des macromolécules et lipides présents dans le spectre.

Les enregistrements RMN HRMAS sont toujours réalisés selon la même série de séquences :

1. Séquence 1D ¹H CPMG
2. Séquence 1D ¹³C
3. Séquence 2D ¹H-¹³C hétéronucléaire HSQC. Ce spectre 2D HSQC n'est réalisé que dans le cas où les adduits formés contiennent des carbones substitués primaires, secondaires ou tertiaires (le cas de la DCP). Dans le cas où les adduits formés ne contiennent que des carbones substitués quaternaires, seul le spectre 1D ¹³C est réalisé.
4. Séquence 1D ¹H CPMG. Ce spectre permet de contrôler la stabilité métabolique des

échantillons après les expériences.

Sur chaque lot d'épidermes RHE utilisé pour chaque série d'étude, un échantillon témoin est analysé. L'analyse RMN HRMAS de cet échantillon témoin permet de faciliter l'interprétation des spectres obtenus en discriminant les signaux d'origine de l'épiderme et ceux provenant des nouveaux adduits formés entre les haptènes et les protéines épidermiques. Ainsi, en superposant le spectre 1D ou 2D de l'échantillon témoin à celui de l'échantillon traité par une molécule substituée au carbone 13, l'apparition de nouveaux signaux est rapidement décelable.

Dans la suite de ce chapitre, nous présenterons les résultats obtenus en analysant, par RMN HRMAS, les épidermes RHE traités par les allergènes étudiés.

2. Résultats

2.1. Réactivité de l'anhydride phtalique substitué au carbone 13, (^{13}C)-1, sur les RHE EpiSkin™

Nous avons dans un premier temps étudié les interactions entre l'anhydride phtalique substitué au carbone 13 (^{13}C)-1 et les protéines épidermiques des RHE EpiSkin™.

Une solution de (^{13}C)-1 dans l'acétone (30 μL , 0,4 M) est appliquée sur chaque épiderme EpiSkin™. Les temps d'incubations choisis sont 1 heure, 8 heures et 24 heures. L'échantillon témoin est traité par de l'acétone (30 μL) à la place de la solution de (^{13}C)-1 et incubé pendant 24 heures.

Les résultats obtenus dans le test de réactivité avec les acides aminés en phase liquide ont montré que les adduits formés entre (^{13}C)-1 et les résidus nucléophiles ne contiennent que les carbones substitués quaternaires. Ainsi, les échantillons d'épiderme reconstitué sont analysés par RMN HRMAS au moyen d'expériences 1D ^1H CPMG et 1D ^{13}C .

Le spectre 1D ^1H CPMG de l'échantillon témoin et ceux des échantillons traités par (^{13}C)-1 montrent clairement la présence de (^{13}C)-1 et/ou ses adduits dans la zone des protons aromatiques. De plus, une diminution des signaux issus du lactate (1,33 ppm), de l'alanine (1,48 ppm) et de la glycine (3,56 ppm) est également observée (**Figure IV-11**).

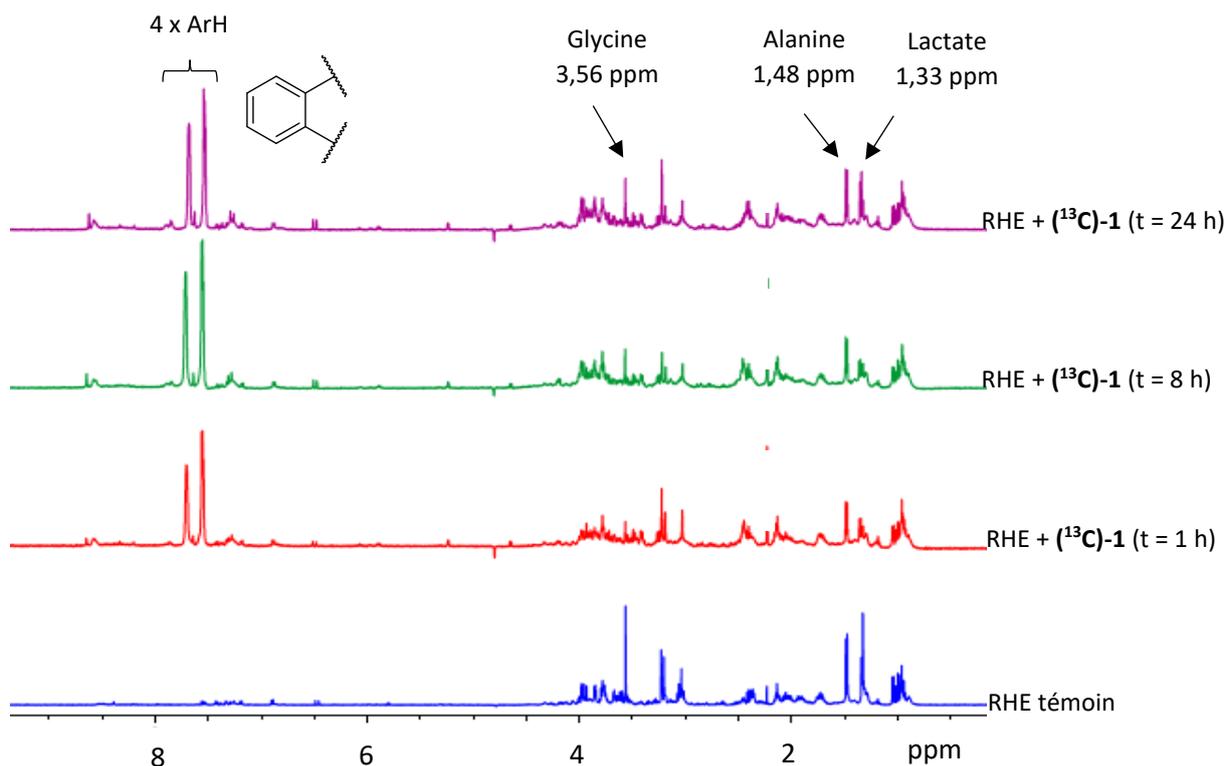


Figure IV-11. Superposition des spectres 1D ^1H CPMG RMN HRMAS de l'échantillon RHE témoin et des échantillons RHE traités par $(^{13}\text{C})\text{-1}$

La superposition des spectres 1D ^{13}C de l'épiderme témoin et des épidermes traités par $(^{13}\text{C})\text{-1}$ montre la formation majoritaire de l'acide phtalique par la réaction d'hydrolyse du PA dans l'épiderme (**Figure IV-12**). En raison de la différence de pH biologique local dans l'épiderme, le déplacement chimique du groupement acide de l'acide phtalique formé est légèrement déblindé au cours du temps (175,6 ppm, 175,7 ppm et 176,2 ppm). Nous avons également observé la formation d'adduits dès 1 h de réaction. En effet, dans l'épiderme traité par le PA à temps d'incubation 1 h, nous observons l'apparition de nombreux petits signaux de 172,6 ppm à 173,9 ppm dès 1 h d'incubation. Par comparaison avec les études avec les acides aminés, le GSH et la protéine modèle BSA, ces signaux pourraient correspondre aux adduits de type amide formés entre $(^{13}\text{C})\text{-1}$ et des résidus lysines des protéines épidermiques. Après 8 h d'incubation, nous observons des nouveaux signaux de 170,3 ppm à 171,1 ppm qui pourraient correspondre aux adduits cyclisés de type imide formés à partir des adduits de type amide.

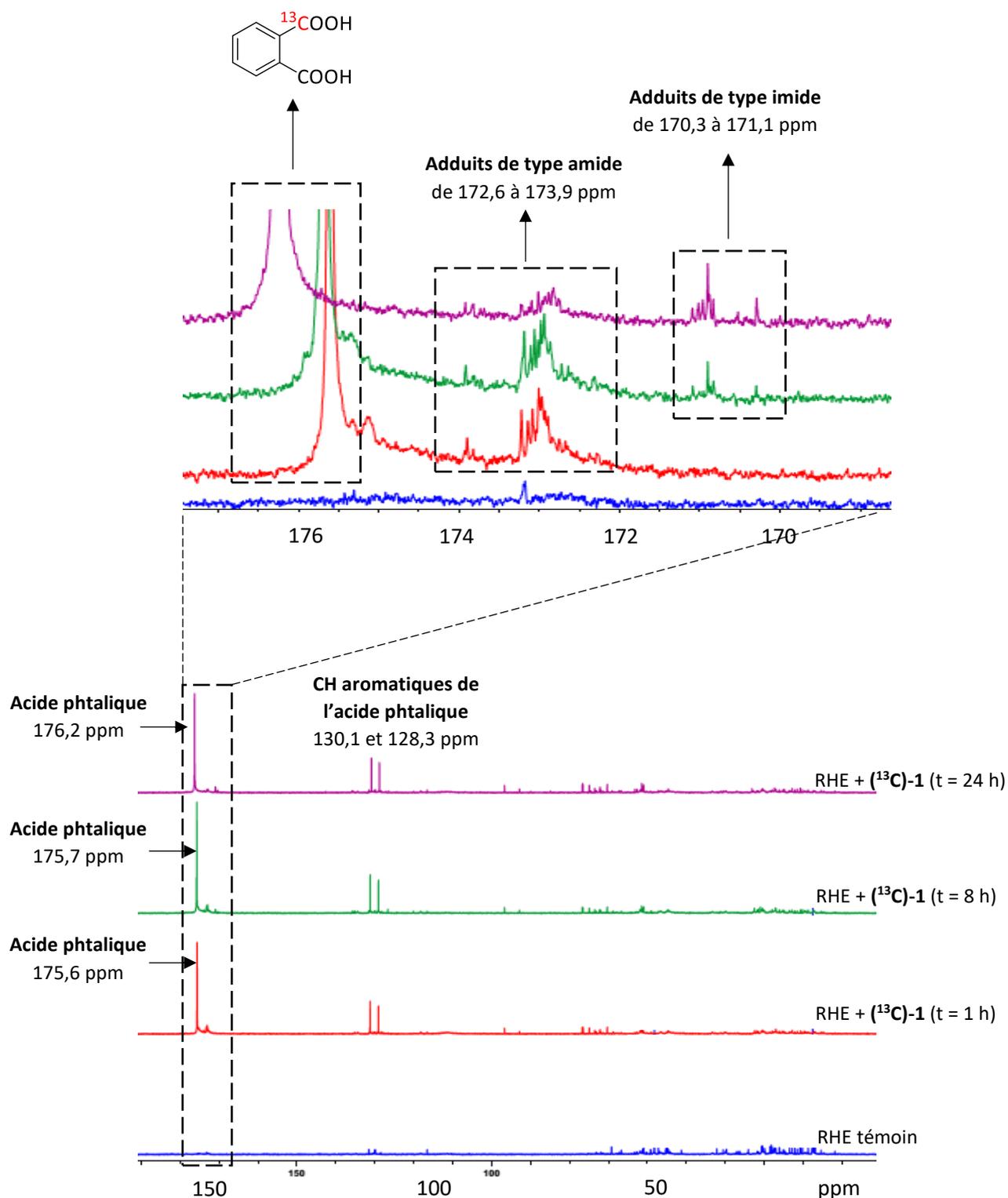


Figure IV-12. Superposition des spectres 1D ^{13}C RMN HRMAS de l'échantillon RHE témoin et des échantillons RHE traités par (^{13}C) -1

Ce résultat est en cohérence avec celui obtenu dans les tests de la réactivité de (^{13}C) -1 vis-à-vis d'acides aminés et de la protéine modèle en solution. Le profil de réactivité de l'anhydride

phtalique a également été observé dans les études de Gerberick *et al.* qui ont observé une forte affinité de l'anhydride phtalique avec le peptide lysine^[5].

Nous observons deux signaux de carbones sp^2 à 130,1 ppm et à 128,3 ppm qui corrént avec les protons aromatiques dans le spectre 2D HSQC. Ainsi, ces signaux pourraient correspondre aux carbones aromatiques de l'acide phtalique ou des adduits formés. De plus, dans la zone de 70 à 78 ppm, il apparaît des petits signaux du carbone. Ces signaux, ayant un déplacement chimique de carbone sp^3 , pourraient être dû au métabolome de l'épiderme humain reconstitué.

L'anhydride phtalique est un allergène respiratoire bien connu, associé à des réactions d'hypersensibilité de type immédiate telles que l'asthme ou la rhinite allergique. Il a également été démontré qu'il provoquait l'augmentation des immunoglobulines E spécifiques dans les tests sur la peau^[265]. Dans notre étude, l'anhydride phtalique a également montré une réactivité immédiate (1 h d'incubation) avec les résidus lysines présents dans l'épiderme reconstitué. Cette réaction modifie les protéines épidermiques conduisant à l'initiation de l'allergie respiratoire.

2.2. Réactivité de la 2,3-diphénylcyclopropénone substituée au carbone 13, (¹³C)-2, sur les RHE EpiSkin™

Comme nous l'avons précédemment décrit, le traitement topique avec la 2,3-diphénylcyclopropénone (DCP) est considéré comme une thérapie de l'alopécie. Initialement, une solution de DCP à haute concentration dans l'acétone (2% ou 3%) est appliquée topiquement pour obtenir une sensibilisation pendant 48 heures. Puis, une concentration de DCP plus faible, de 0,001% à 0,1%, est appliquée une fois par semaine pendant une période de 6 à 12 mois. Le traitement sera interrompu après une repousse complète des cheveux ou en l'absence de signes d'amélioration après 6 mois^[266-269].

Ces études cliniques ont montré que l'acétone est un bon véhicule pour la DCP dans le traitement topique de l'alopécie. Nous avons ainsi utilisé l'acétone dans la préparation de la solution de (¹³C)-2 afin d'appliquer sur les épidermes RHE.

Dans un premier temps, une solution de (¹³C)-2 dans l'acétone à 0,4 M \approx 8,3% (w/v) a été

testée. Cependant, nous nous sommes aperçus que (^{13}C)-2 ne pénétrait pas correctement dans l'épiderme. En effet, la superposition des spectres (1D ^1H CPMG, 1D ^{13}C) de l'échantillon témoin avec ceux de l'échantillon traité par (^{13}C)-2 montrent peu de différences et aucun nouveau signal du carbone 13 n'est détecté.

En cas de mauvaise pénétration, (^{13}C)-2 pourrait être présent à la surface de l'épiderme et sur le support en polycarbonate sur lequel repose l'épiderme. (^{13}C)-2 pourrait également être trouvé dans le milieu de culture dans lequel baigne l'épiderme (**Figure IV-13**).

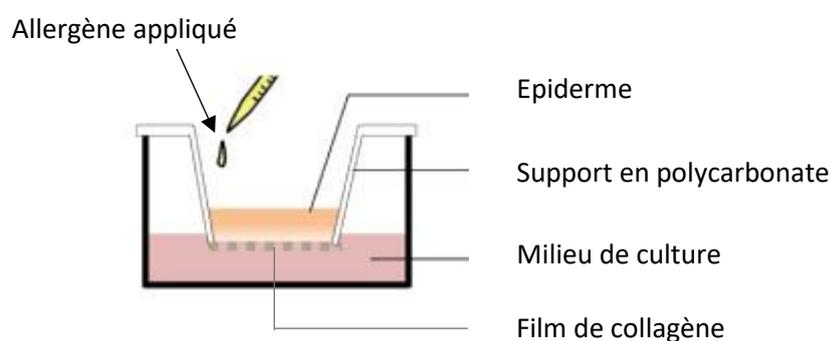


Figure IV-13. Eléments du modèle EpiSkin™

Afin de vérifier ces hypothèses, le milieu de culture et le support en polycarbonate ont été étudiés. Le milieu de culture est analysé par RMN du liquide. Pour ce faire, le milieu de culture obtenu après l'incubation est évaporé, resublimé dans D_2O et analysé par RMN. Aucune trace du (^{13}C)-2 n'a été trouvée. Le support en polycarbonate, quant à lui, est rincé par le CDCl_3 . La solution de lavage est ensuite analysée par RMN. Plus de 96% de (^{13}C)-2 appliqué sur l'épiderme a été retrouvée sur le support en polycarbonate.

Dans le but d'améliorer la pénétration de (^{13}C)-2 dans l'épiderme, nous avons testé divers véhicules, qui sont bien documentés dans la littérature pour faire pénétrer des substances dans les épidermes humains reconstitués, tels que le DMSO, l'éthanol et l'isopropanol^[270-273]. De plus, nous avons également dilué la solution de (^{13}C)-2 jusqu'à la concentration de 2% (w/v) utilisée dans le traitement de l'alopecie. Malheureusement, à nouveau, (^{13}C)-2 n'a pas pénétré dans l'épiderme. Les cristaux blancs ont majoritairement été retrouvés à la surface de l'épiderme et sur le support en polycarbonate (**Tableau IV-1**).

Tableau IV-1 : Vérification de la présence de (¹³C)-2 sur le support en polycarbonate lors de l'utilisation de différents véhicules pour faire pénétrer (¹³C)-2 dans l'épiderme

Véhicule	Concentration de (¹³ C)-2 (%) (w/v)	(¹³ C)-2 appliquée sur l'épiderme	(¹³ C)-2 retrouvée sur le support en polycarbonate
Acétone	2%	2,50 mg	96% (2,40 mg)
DMSO	2%	2,50 mg	97% (2,42 mg)
Ethanol	2%	2,50 mg	91% (2,28 mg)
Isopropanol	2%	2,50 mg	92% (2,30 mg)

Un autre mélange, l'acétone – l'huile d'olive (AOO 4 : 1, v/v), a été suggéré comme véhicule de choix pour les tests de sensibilisation par voie topique^[274, 275]. Nous avons donc tenté d'utiliser ce véhicule afin d'améliorer la pénétration de (¹³C)-2 dans l'épiderme.

Une solution de (¹³C)-2 dans le AOO (120 µL, 2%) est appliquée en 4 fois 30 µL toutes les 15 minutes sur chaque épiderme EpiSkin™. Les temps d'incubations choisis sont 1 heure, 8 heures et 24 heures. L'échantillon témoin est traité par le AOO (4 x 30 µL) à la place de la solution de (¹³C)-2 et laissé sous incubation pendant 24 heures.

Le milieu de culture et le support en polycarbonate ont également été analysés afin de vérifier la présence de (¹³C)-2. L'analyse du milieu de culture n'a détecté aucune trace de (¹³C)-2. En revanche, nous avons trouvé (¹³C)-2 sur le support en polycarbonate (**Tableau IV-2**).

Tableau IV-2 : Vérification de la présence de (¹³C)-2 sur le support en polycarbonate lors de l'utilisation de l'AOO pour faire pénétrer (¹³C)-2 dans l'épiderme

Entrée	Temps d'incubation	(¹³ C)-2 appliquée sur l'épiderme	(¹³ C)-2 retrouvée sur le support en polycarbonate	(¹³ C)-2 pénétrée dans RHE
1	1 h	2,50 mg	1,77 mg (70%)	0,73 mg
2	8 h	2,50 mg	1,74 mg (69%)	0,76 mg
3	24 h	2,50 mg	1,76 mg (70%)	0,74 mg

Condition d'application de (¹³C)-2 : véhicule : acétone – l'huile d'olive (4 : 1), concentration de (¹³C)-2 : 2%, volume d'application : 4 x 30 µL

Cette fois, la quantité de (¹³C)-2 trouvée sur le support en polycarbonate diminue par rapport aux cas d'utilisation d'autres véhicules. La (¹³C)-2 semble mieux pénétrer dans l'épiderme.

Par comparaison avec le spectre 1D ¹³C de l'échantillon témoin, les épidermes traités par la (¹³C)-2/AOO montrent un nouveau signal à 148,1 ppm qui correspond au carbone substitué

de (^{13}C)-2 (Figure IV-14).

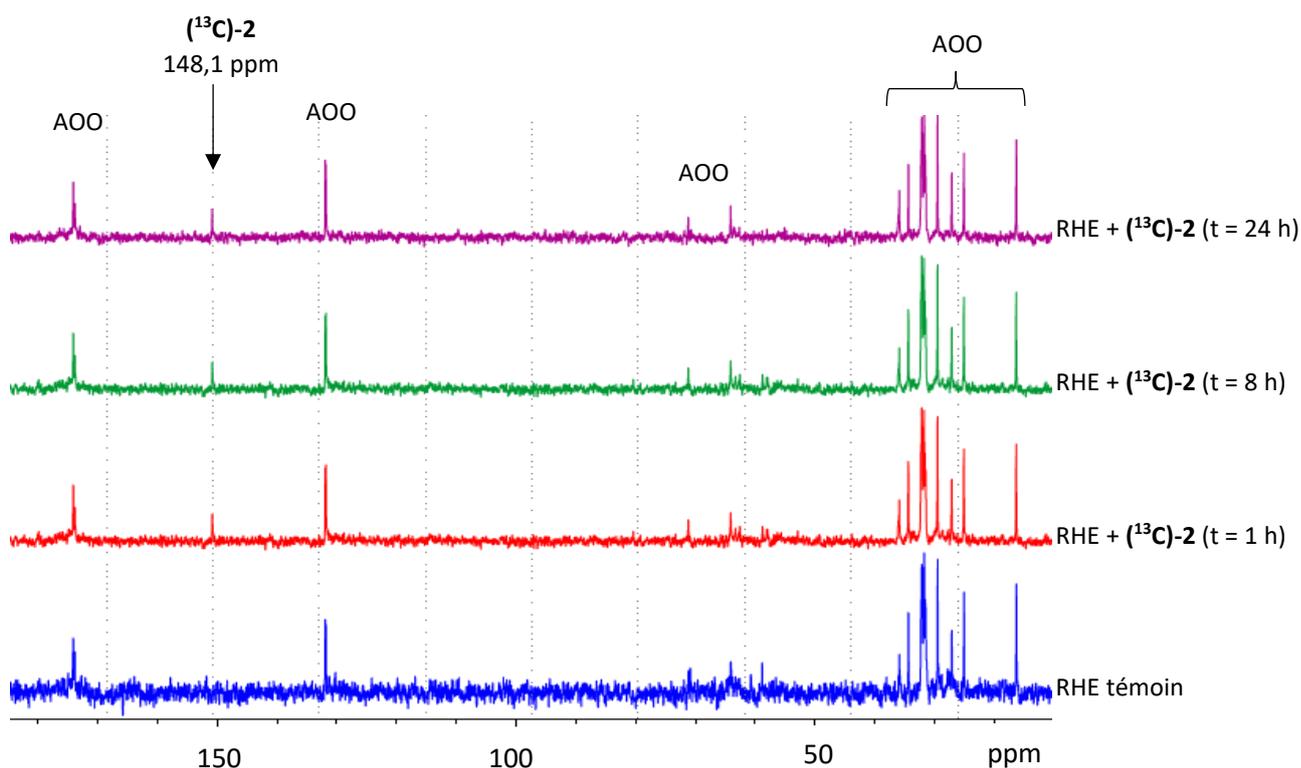


Figure IV-14. Superposition des spectres 1D ^{13}C RMN HRMAS de l'échantillon RHE témoin et des échantillons RHE traités par (^{13}C)-2/AOO

Ainsi, ce résultat montre l'efficacité du mélange acétone – huile d'olive (4 : 1) pour améliorer la pénétration de la DCP dans l'épiderme humain reconstitué. Malheureusement, la RMN HRMAS ne permet pas de détecter d'adduits formés du fait de la faible quantité de (^{13}C)-2 ayant pénétrée dans l'épiderme. En outre, l'absence d'adduits formés pourrait être également expliquée par la faible réactivité de (^{13}C)-2 avec les résidus thiolés dans les protéines épidermiques en raison du taux bas des cystéines libres dans l'épiderme humain (0,9%)^[276]. Ainsi, la petite quantité des adduits formés ne serait pas suffisante pour être détectée par la RMN HRMAS.

La réactivité de (^{13}C)-2 envers les protéines épidermiques sera alors étudiée par un autre outil beaucoup plus sensible, la LC-MS/MS, dans le cinquième chapitre concernant l'analyse protéomique.

2.3. Réactivité du 4,4'-méthylènediphényldiisocyanate substitué au carbone 13, (¹³C)-3, sur les RHE EpiSkin™

Le 4,4'-méthylènediphényldiisocyanate (4,4'-MDI **3**) contient deux groupements -N=C=O très réactifs. L'isocyanate est bien connu comme groupement très sensible à l'eau, aux thiols et aux alcools. Ainsi, l'éthanol et l'isopropanol ne peuvent pas être sélectionnés comme véhicule pour (¹³C)-3. L'acylisocyanate a montré une réactivité avec le DMSO pour former un composé de type *S,S*-diméthylsulfonylimine (**Schéma IV-1**)^[277]. De plus, le DMSO est considéré comme solvant inapproprié pour les études des isocyanates à cause des traces d'eau, toujours présentes dans le DMSO, ayant la capacité d'hydrolyser le groupement isocyanate^[278].

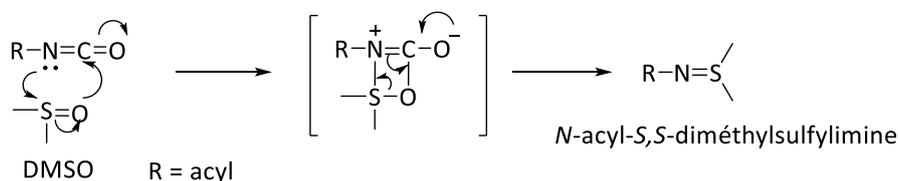


Schéma IV-1. Réaction entre l'acylisocyanate et le DMSO

Pour notre étude, nous avons choisi dans un premier temps l'acétone comme solvant pour solubiliser (¹³C)-3 afin de l'appliquer sur l'épiderme. Malheureusement, comme dans le cas de la DCP **2**, (¹³C)-3 semble précipiter à la surface de l'épiderme et sur la paroi du support. Le spectre 1D ¹³C RMN HRMAS de l'épiderme traité par (¹³C)-3 ne montre aucune différence par rapport à celui de l'épiderme témoin (**Figure IV-15**). L'acétonitrile (ACN), solvant utilisé dans l'analyse RMN liquide du 4,4'-MDI **3**, a également été testé comme véhicule pour faire pénétrer (¹³C)-3 dans l'épiderme. Malheureusement, à nouveau, (¹³C)-3 ne pénètre pas dans l'épiderme comme pour l'acétone (**Figure IV-15**). Dans la littérature, l'AOO (4 : 1) a été utilisé comme véhicule dans le test d'asthme chez les rats provoqué par le 4,4'-MDI par application topique^[279]. Nous avons donc essayé d'utiliser l'AOO dans notre étude pour faire pénétrer (¹³C)-3 dans l'épiderme reconstitué. Malheureusement, encore une fois, (¹³C)-3 reste toujours à la surface de l'épiderme et sur le support en polycarbonate. Aucun signal de (¹³C)-3 ou d'adduits n'est observé dans le spectre 1D ¹³C RMN HRMAS (**Figure IV-15**).

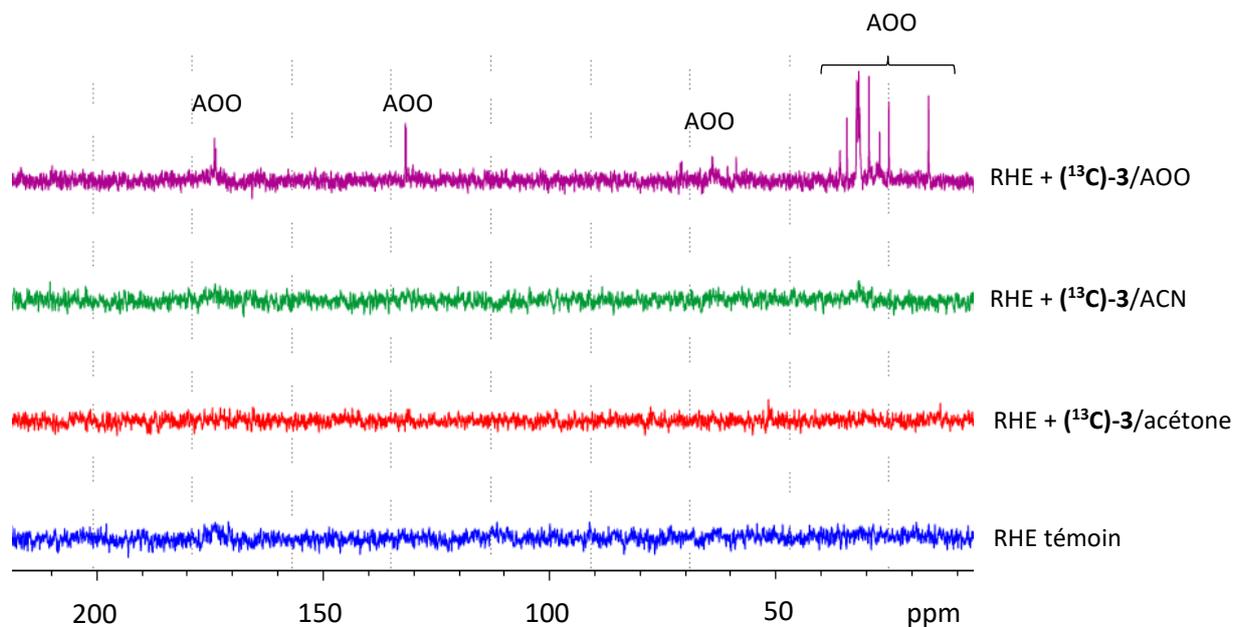


Figure IV-15. Les spectres 1D ^{13}C RMN HRMAS des épidermes traités par $(^{13}\text{C})\text{-3}$ dans les solvants différents (*volume d'application : 30 μL , concentration de $(^{13}\text{C})\text{-3}$: 0,4 M, temps d'incubation : 24 heures*)

La mauvaise pénétration de $(^{13}\text{C})\text{-3}$ peut être causée par la taille de la molécule. De plus, dans une atmosphère humidifiée de l'incubation, le 4,4'-méthylènediphényldiisocyanate a la capacité de s'hydrolyser en diamine correspondante et/ou de former des produits de polymérisation de type urée (**Chapitre III**). Ces produits couvrent la surface de l'épiderme et entravent la pénétration du MDI.

Dans la partie suivante de ce chapitre, nous étudierons la réactivité d'un petit isocyanate, le *p*-tolylisocyanate en espérant qu'il pourra plus facilement pénétrer dans l'épiderme.

2.4. Réactivité du *p*-tolylisocyanate substitué au carbone 13, $(^{13}\text{C})\text{-4}$, sur les RHE EpiSkin™

La dernière molécule étudiée dans notre étude est un monoisocyanate, le *p*-tolylisocyanate **4**, qui a une taille plus petite que le diisocyanate 4,4'-MDI **3**.

Une solution de $(^{13}\text{C})\text{-4}$ dans l'acétone (30 μL , 0,4 M) est appliquée sur chaque épiderme EpiSkin™. Les temps d'incubations choisis sont 1 heure, 8 heures et 24 heures. L'échantillon témoin est traité par de l'acétone (30 μL) à la place de la solution de $(^{13}\text{C})\text{-4}$ et laissé sous incubation pendant 24 heures. Cette fois-ci, $(^{13}\text{C})\text{-4}$ semble bien pénétrer dans l'épiderme. Nous n'avons pas observé la précipitation à la surface de l'épiderme ainsi que sur le support en polycarbonate comme dans le cas de $(^{13}\text{C})\text{-3}$.

Le spectre 1D ^1H CPMG des épidermes traités par $(^{13}\text{C})\text{-4}$ montre clairement l'apparition d'un nouveau signal à 2,23 ppm par rapport à celui de l'échantillon témoin (**Figure IV-16**). Ce signal pourrait correspondre au groupement $-\text{CH}_3$ dans $(^{13}\text{C})\text{-4}$ ou les adduits formés correspondants. Ceci confirme la pénétration de $(^{13}\text{C})\text{-4}$ dans l'épiderme.

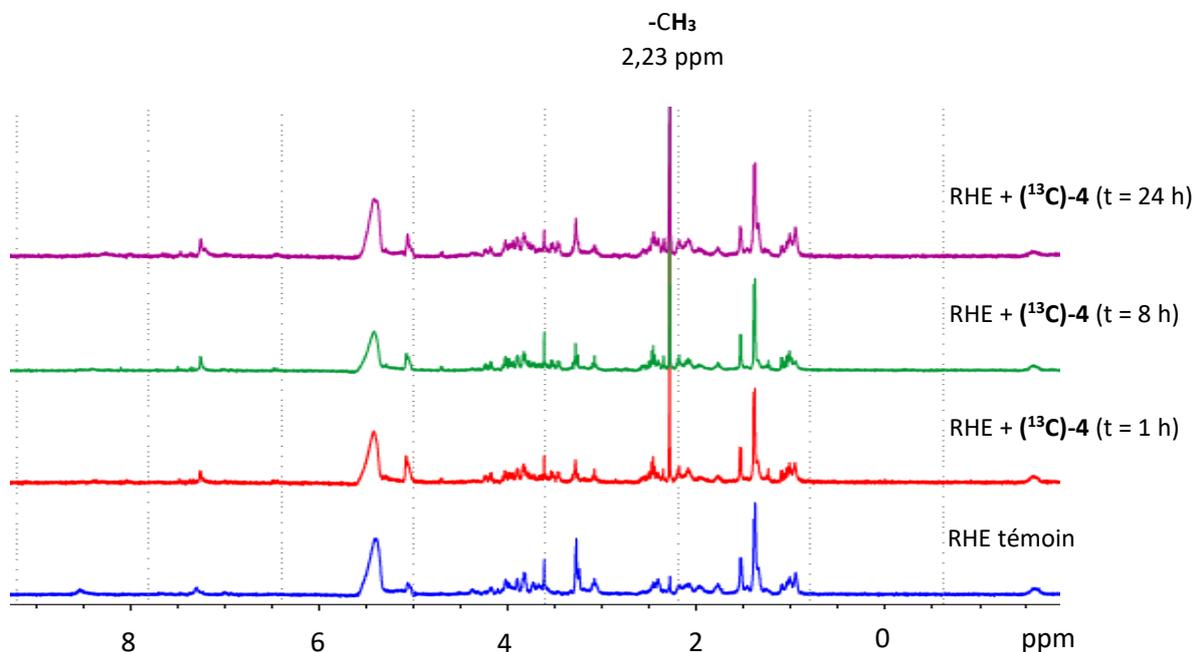


Figure IV-16. Superposition des spectres 1D ^1H CPMG RMN HRMAS de l'échantillon RHE témoin et des échantillons RHE traités par $(^{13}\text{C})\text{-4}$

En analysant le spectre 1D ^{13}C des épidermes traités par $(^{13}\text{C})\text{-4}$ aux temps d'incubation différents, nous avons trouvé l'apparition d'un nouveau signal du carbone à 160,1 ppm (**Figure IV-17**). Basé sur les résultats de la réactivité de $(^{13}\text{C})\text{-4}$ vis-à-vis d'acides aminés en solution, ce signal à 160,1 ppm pourrait être attribué au carbone substitué de l'adduit de type urée résultant de la réaction entre $(^{13}\text{C})\text{-4}$ et les résidus lysines des protéines épidermiques.

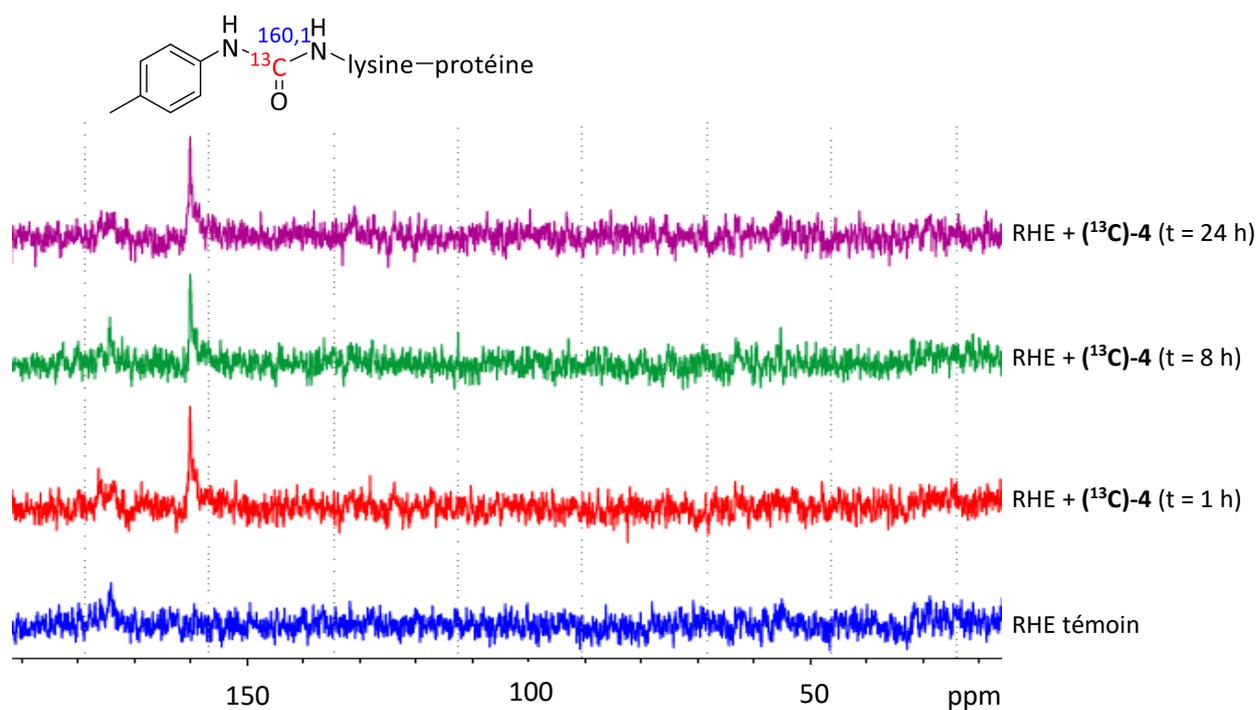


Figure IV-17. Superposition des spectres 1D ^{13}C RMN HRMAS de l'échantillon RHE témoin et des échantillons RHE traités par $(^{13}\text{C})\text{-4}$

Le *p*-tolylisocyanate **4** ou les composés isocyanates en général sont des allergènes mixtes ayant la capacité de réagir à la fois avec les résidus lysines et cystéines pour former des adduits de type urée ou thiocarbamate, respectivement. Cette réactivité a été observée par Fleischel *et al.*^[280] qui ont réalisé la réaction du *p*-tolylisocyanate et du phénylisocyanate avec les acides aminés nucléophiles et les peptides modèles. De plus, la réaction de compétition entre la *N*-Ac-Lys et la *N*-Ac-Cys a montré que le *p*-tolylisocyanate réagit préférentiellement avec la *N*-Ac-Cys qu'avec la *N*-Ac-Lys. Toutefois, dans notre étude, les adduits de type thiocarbamate du *p*-tolylisocyanate avec les résidus cystéines des protéines épidermiques n'ont pas été observés par RMN HRMAS. Pour expliquer cette différence de la réaction du *p*-tolylisocyanate avec des acides aminés, des peptides modèles dans un milieu liquide et des protéines épidermiques dans un milieu biologique, nous proposons quelques arguments.

Premièrement, la réactivité avec les résidus nucléophiles inclus dans une protéine dans un environnement vivant complexe pourrait être différente de celle observée avec des acides aminés isolés en solution. En effet, les protéines doivent être considérées comme un mélange de nucléophiles ayant des caractéristiques électroniques différentes. De plus, les systèmes expérimentaux simples utilisés dans les tests *in vitro* avec les acides aminés ou les peptides

différent du milieu complexe de la peau de plusieurs façons telles que la compétition entre de nombreuses protéines, la différence de pH biologique local ou la micro-biodisponibilité.

Deuxièmement, dans l'épiderme humain, le pourcentage des résidus lysines est de 5,7% tandis que celui des résidus cystéines libres n'est que de 0,9%^[276]. Comme dans le cas de la 2,3-diphénylcyclopropénone, le faible taux des résidus thiolés pourrait conduire à la faible réactivité du *p*-tolylisocyanate avec la cystéine dans l'épiderme humain reconstitué.

Enfin, la majorité des liaisons formées entre les haptènes électrophiles et les résidus nucléophiles des protéines sont irréversibles dans des conditions physiologiques. Cependant, une exception est la réaction des isocyanates avec des groupements thiol, dont les produits sont stables dans des conditions acides mais totalement réversibles dans des conditions de pH légèrement alcalin^[281]. Fleischel *et al.* ont observé que, en présence de la *N*-Ac-Lys et à pH alcalin, les adduits de type thiocarbamate de la *N*-Ac-Cys sont convertis en adduits de type urée de la *N*-Ac-Lys irréversibles^[280]. Ainsi, dans notre étude avec l'épiderme humain reconstitué, les adduits de type thiocarbamate des résidus cystéines pourraient être formés et transformés en adduits de type urée des résidus lysines.

V. Conclusions

Ce chapitre étudie la réactivité des différents allergènes vis-à-vis de protéines dans les épidermes humains reconstitués par RMN HRMAS. Les résultats obtenus en milieu biologique sur des épidermes sont analysés et comparés avec ceux obtenus par les tests en solution avec les acides aminés ou la protéine modèle.

Pour l'allergène respiratoire, l'anhydride phtalique (**¹³C**)-1 a montré une réactivité avec les résidus lysines des protéines épidermiques pour former les adduits de type amide et imide. Ces résultats sont en accord avec la réactivité *in vitro* de l'anhydride phtalique avec les acides aminés ou la protéine modèle en solution. Ces résultats ont également confirmé l'hypothèse de la réactivité de cet allergène respiratoire vis-à-vis de résidus lysines.

La 2,3-diphénylcyclopropénone (**¹³C**)-2, un allergène cutané, pénétrée difficilement dans l'épiderme malgré plusieurs véhicules testés. Le mélange l'acétone – l'huile olive (4 : 1) a permis d'améliorer légèrement sa pénétration dans les épidermes reconstitués.

Malheureusement, avec une quantité relativement faible entrée dans l'épiderme, nous n'avons pas pu observer de modifications protéiques par RMN HRMAS.

La même difficulté a été rencontrée avec le 4,4'-méthylènediphényldiisocyanate (^{13}C)-3, un allergène mixte. Bien que différents solvants aient été utilisés, nous n'avons pas pu faire pénétrer (^{13}C)-3 dans l'épiderme reconstitué. Ce problème peut être dû au volume de la structure de (^{13}C)-3 ou encore à sa polymérisation sous condition humide de l'incubation.

Enfin, le *p*-tolylisocyanate (^{13}C)-4, qui est un monoisocyanate, a été étudié dans le but de contourner les inconvénients du diisocyanate (^{13}C)-3. L'application de (^{13}C)-4 sur l'épiderme reconstitué nous a permis d'observer les modifications des protéines épidermiques. En effet, l'adduit de type urée, résultant de la réaction entre (^{13}C)-4 et les résidus lysines, est déterminé par RMN HRMAS. Théoriquement, l'allergène mixte (^{13}C)-4 doit réagir à la fois avec la lysine et la cystéine. Toutefois, l'adduit entre (^{13}C)-4 et les résidus cystéines des protéines épidermiques n'a pas été observé dans notre étude. Ceci pourrait être expliqué par sa faible réactivité avec les résidus cystéines dans l'épiderme humain, par l'instabilité des adduits de type thiocarbamate dans un milieu biologique ou encore par la sensibilité insuffisante de la technique d'analyse RMN HRMAS.

La réactivité de l'anhydride phtalique (^{13}C)-1, de la 2,3-diphénylcyclopropénone (^{13}C)-2 et du *p*-tolylisocyanate (^{13}C)-4 sera vérifiée par une autre technique plus sensible, LC-MS/MS, dans la partie d'analyse protéomique.

Chapitre V

Analyse protéomique des épidermes humains reconstitués traités par les allergènes substitués au carbone 13

Chapitre V : Analyse protéomique des épidermes humains reconstitués traités par les allergènes substitués au carbone 13

La suite de notre étude est l'analyse protéomique des épidermes humains reconstitués exposés aux sensibilisants cutanés et respiratoires afin de pouvoir identifier des protéines et les sites modifiés par les haptènes. La caractérisation des protéines et des sites hapténisés par les allergènes cutanés et respiratoires pourrait en effet permettre de comprendre les différents événements intervenant dans le processus de l'allergie induit par ces deux types d'allergènes.

L'une des étapes importantes de l'analyse protéomique est la préparation de l'échantillon protéique. Dans notre étude, les protéines sont tout d'abord extraites à partir des épidermes humains reconstitués exposés aux allergènes. Le mélange des protéines est ensuite analysé par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) afin d'identifier des modifications des protéines.

Ainsi, dans ce chapitre, nous présenterons dans un premier temps l'étape d'extraction des protéines épidermiques. Dans un deuxième temps, nous aborderons l'analyse protéomique des épidermes humains reconstitués.

I. Extraction des protéines à partir des épidermes humains reconstitués

L'extraction des protéines est une étape critique de la préparation des échantillons pour l'analyse protéomique. Il faut en effet libérer les protéines des épidermes dans une solution facilitant l'analyse par LC-MS/MS.

1. Choix du tampon de lyse

Dans la procédure d'extraction des protéines à partir des tissus, le choix d'un tampon de lyse efficace est vraiment important pour obtenir un meilleur rendement et avoir une bonne compatibilité avec les analyses suivantes. Un milieu de lyse typique pour l'extraction des protéines contient souvent un tampon qui joue un rôle dans le maintien d'un pH alcalin pour favoriser la stabilité des protéines ; un agent additif qui joue un rôle de dénaturation et

favorise la solubilité des protéines (le chaotrope, le tensioactif ou le sel).

Le tampon le plus couramment utilisé dans l'extraction des protéines est le tris(hydroxyméthyl)aminométhane HCl (Tris-HCl)^[282].

L'agent chaotropique, aussi appelé le dénaturant, est une molécule qui détruit la structure tridimensionnelle des protéines pour favoriser leur solubilité. L'urée est l'un des dénaturants les plus largement utilisés pour favoriser la solubilisation des protéines. Elle stabilise l'état dénaturé de la protéine en se liant par liaison hydrogène aux groupements amides des protéines (-CO-NH-)^[283]. Cependant, le chauffage des échantillons avec de l'urée peut conduire à la carbamylation des groupements amine de l'acide aminé *N*-terminal et des chaînes latérales de la lysine et de l'arginine dans la protéine^[284]. Ces modifications peuvent entraîner une digestion incomplète des protéines et un changement de masse des peptides modifiés.

Les composés tensioactifs sont des molécules qui présentent deux parties de polarité différente : une partie hydrophile et une partie hydrophobe. Les tensioactifs peuvent être classés comme ioniques, non-ioniques ou zwitterioniques. Les tensioactifs ioniques, ayant une tête chargée cationique ou anionique et un squelette hydrophobe, sont très efficaces pour la solubilisation et la dénaturation des protéines car ils perturbent les interactions hydrophobes des protéines. Parmi eux, le dodécylsulfate de sodium (SDS) est un tensioactif anionique couramment utilisé dans les tampons de lyse avec une concentration variant de 0,1% à 4% pour l'extraction des protéines^[285-288]. Bien que le SDS solubilise fortement les protéines, il s'agit d'un produit chimique incompatible avec la spectrométrie de masse (MS). En effet, il réduit la détection des peptides et entrave l'ionisation par électrospray. Par conséquent, de nombreuses méthodes telles que la précipitation des protéines avec des solvants organiques ou des acides, la filtration sur membrane, l'échange de cations ou les techniques d'électrophorèse sont utilisées pour éliminer le SDS avant l'analyse par la spectrométrie de masse^[289]. Les tensioactifs non-ioniques (Triton X-100, Brij, Tween) et zwitterioniques (3-(3-cholamidopropyldiméthylammonio)-1-propanesulfonate ou CHAPS) sont considérés comme les détergents doux et moins efficaces dans l'extraction des protéines par rapport au SDS.

Les sels les plus souvent utilisés dans l'extraction des protéines sont KCl et NaCl. Les sels non seulement cassent les interactions électrostatiques formées entre des groupements chargés dans les protéines mais aussi affaiblissent les interactions hydrophobes entre elles. L'ajout des sels favorise ainsi leur solubilité.

Dans notre étude, nous avons évalué l'efficacité de tampons de lyse différents lors de la procédure d'extraction des protéines à partir des épidermes humains reconstitués (**Tableau V-1**).

Tableau V-1 : Effet du tampon de lyse dans l'extraction des protéines à partir des épidermes humains reconstitués

Tampon de lyse	Composition	Rdt (μg prot./mg RHE)
UTCT	Urée 7 M, Thiourée 2 M, CHAPS 1%, Tris-HCl 25 mM pH 7,6	25
SDS 0.1%	SDS 0,1%, Tris-HCl 50 mM pH 7,6, NaCl 50 mM	30
SDS 1%	SDS 1%, Tris-HCl 50 mM pH 7,6, NaCl 50 mM	45
Triton X-100 1%	Triton X-100 1%, Tris-HCl 50 mM pH 7,6, NaCl 50 mM	21

Condition d'extraction des protéines : volume du tampon de lyse/quantité de RHE : 70 μL /1 mg, 2 cycles de broyage à sec (2 x 30 s, vitesse : 6500 rpm, pause : 45 s), 1 cycle avec tampon de lyse (350 μL) (30 s, vitesse : 6500 rpm)

Nous avons testé quatre tampons de lyse (UTCT, SDS 0,1%, SDS 1% et Triton X-100 1%). Ces tampons de lyse sont composés par le tampon Tris-HCl à pH 7,6 et les agents additifs tels que l'urée, la thiourée, le CHAPS, le SDS, le triton X-100 et le sel NaCl. Comme nous l'avons indiqué précédemment, le SDS est un composé tensioactif ayant une bonne capacité à solubiliser les protéines. En effet, nous avons obtenu le meilleur rendement en protéines (45 μg protéines/1 mg RHE) en utilisant le tampon de lyse SDS 1% (**Tableau V-1**). Ainsi, nous avons choisi le SDS 1% comme le tampon de lyse dans notre procédure d'extraction des protéines à partir des épidermes humains reconstitués.

2. La procédure d'extraction des protéines

2.1. Mode opératoire

L'épiderme humain reconstitué est décongelé sur de la glace et coupé en quatre morceaux. Chaque morceau est placé dans un tube renforcé de 2 mL contenant des billes en céramique

de 1,4 mm (Soft tissue homogenizing CK14, Bertin Technologies). Les échantillons épidermiques sont ensuite broyés par un broyeur Precellys (Bertin Technologies) pendant 2 cycles de 30 secondes avec une vitesse de 6500 rpm et une pause de 45 secondes entre 2 cycles. Les échantillons sont refroidis sur de la glace et le tampon de lyse SDS 1% (ratio tampon de lyse/quantité RHE : 70 μ L/1 mg) est ensuite ajouté. À nouveau, les échantillons sont broyés pendant 30 secondes avec une vitesse de 6500 rpm. Les matières insolubles sont sédimentées par centrifugation à 12000 x g pendant 15 minutes à 4 °C. Les protéines obtenues en solution sont quantifiées par un test de Bradford et stockées à -80 °C jusqu'à ce que cela soit nécessaire (Figure V-1).

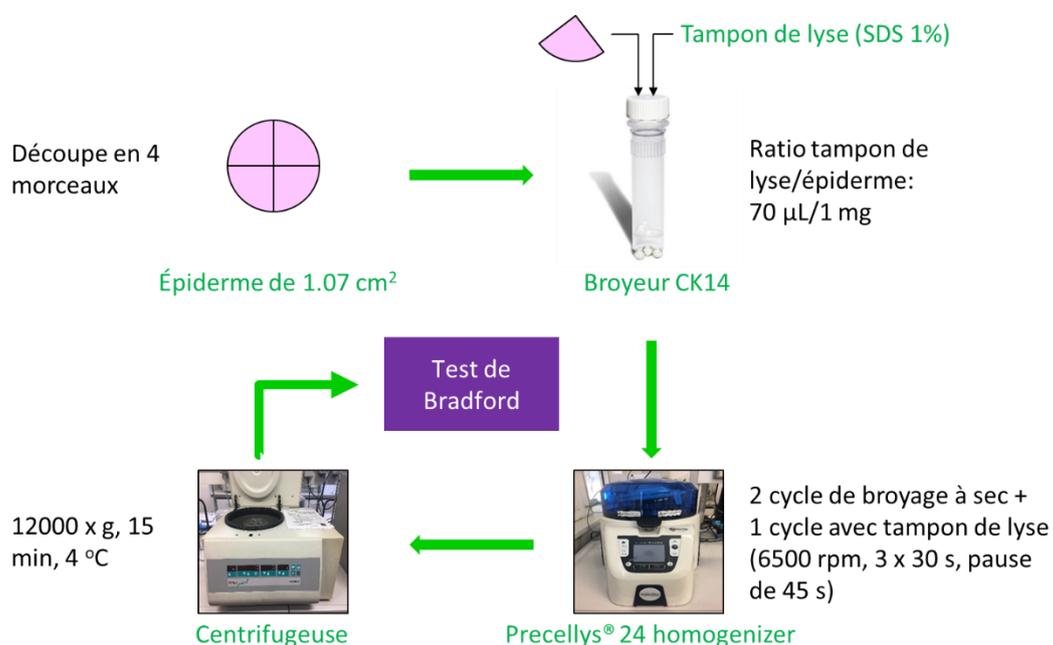


Figure V-1. Procédure d'extraction des protéines à partir des épidermes humains reconstitués

2.2. Estimation de la concentration des protéines par la méthode de Bradford

La concentration protéique des lysats est déterminée par la méthode de Bradford^[290]. Cette méthode est un dosage colorimétrique basé sur le changement de couleur du colorant de Coomassie G-250 du rouge au bleu après liaison par interactions avec les résidus basiques (arginine, histidine, lysine) et aromatiques (tryptophane, tyrosine, phénylalanine) présents dans les protéines^[291]. Le colorant de Coomassie G-250 existe sous trois formes : cationique, neutre et anionique. La forme cationique est rouge et possède un spectre d'absorption

maximal à 470 nm. La forme neutre est verte et absorbe à 650 nm. La forme anionique est bleue avec une absorbance à 595 nm. Le réactif de Bradford est une solution acidifiée de Coomassie G-250. Le colorant est protoné et existe donc sous forme cationique. Lors du contact avec la protéine, le colorant donne ses protons à des groupements ionisables sur la protéine. Ainsi, le colorant devient chargé négativement (forme anionique) et la protéine devient chargée positivement. Cela perturbe la structure de la protéine, entraînant une exposition des poches hydrophobes. Le colorant se lie donc à la protéine par les interactions hydrophobes et ioniques qui stabilisent la forme anionique bleue du colorant. Ainsi, l'absorbance maximale passe de 470 nm à 595 nm lors de la liaison à la protéine. Le changement d'absorbance, qui est proportionnel à la quantité de colorant de Coomassie G-250 lié, indique donc la concentration des protéines dans l'échantillon.

La concentration protéique dans l'échantillon est déterminée par extrapolation à partir d'une courbe standard. Cette courbe est construite en mesurant l'absorbance d'une série de dilutions d'une protéine standard (l'albumine sérique bovine, BSA) de concentrations connues dans la gamme de réponse linéaire du test de Bradford.

Pour éviter l'influence de tampon de lyse SDS sur le dosage des protéines par la méthode de Bradford, les protéines sont tout d'abord précipitées en utilisant une solution glaciale d'acétate d'ammonium 0,1 M dans du méthanol 100% (12 h, -20 °C). Après centrifugation de l'échantillon (15 min, 12000 x g, 4 °C), le culot protéique est lavé 2 fois (acétate d'ammonium 0,1 M dans du méthanol 80%) et séché dans une centrifugeuse sous vide. Les protéines sont ensuite resolubilisées dans un tampon de bicarbonate d'ammonium 50 mM pour la quantification par la méthode de Bradford.

Dans le but de réaliser le duplicata de l'analyse protéomique, pour chaque échantillon nous avons extrait des protéines à partir de deux épidermes différents traités par un même allergène ou non traités (le témoin). Les résultats sont résumés dans le **Tableau V-2** ci-dessous :

Tableau V-2 : Extraction des protéines à partir des épidermes humains reconstitués

Entrée	Echantillon	RHE (mg)	Conc. Prot. ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Quantité Prot. (μg)	Prot./RHE ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
1	RHE + PA 1	5,8	0,6030	211,05	36
2	RHE + PA 2	5,0	0,6085	212,97	42
3	RHE + DCP 1	5,0	0,4838	169,33	34
4	RHE + DCP 2	4,3	0,4332	151,62	35
5	RHE + pTLI 1	5,7	0,5650	197,75	35
6	RHE + pTLI 2	4,9	0,6200	217,00	44
7	RHE blanc 1	4,8	0,4930	172,55	36
8	RHE blanc 2	4,9	0,5870	205,45	42

Condition d'extraction des protéines : volume SDS 1%/quantité de RHE : 70 $\mu\text{L}/1$ mg, 2 cycles de broyage à sec (2 x 30 s, vitesse : 6500 rpm, pause : 45 s), 1 cycle avec tampon de lyse (350 μL) (30 s, vitesse : 6500 rpm)

Le rendement d'extraction des protéines (μg protéine/mg RHE) pour les 8 échantillons différents montre l'efficacité et la reproductibilité de la méthode d'extraction développée. Cela est nécessaire pour l'étape d'analyse protéomique qui suit.

II. Analyse protéomique

Décrite pour la première fois en 1995^[93, 94], l'analyse protéomique est la science qui étudie les protéomes. Un protéome est défini comme l'ensemble des PROTEINES exprimées par un génOME d'une cellule, d'un tissu ou d'un organisme qui se caractérise par sa localisation, ses interactions, ses modifications post-traductionnelles à un moment donné et sous des conditions données. La plupart des informations fonctionnelles des gènes sont caractérisées par le protéome. Ainsi, une description complète du protéome d'un organisme fournit non seulement un catalogue de toutes les protéines codées par le génome, mais également des données sur l'expression des protéines dans des conditions définies. L'analyse protéomique permet d'obtenir une description qualitative et quantitative de l'expression des protéines et de ses modifications sous l'influence de perturbations biologiques telles que la maladie, le traitement médicamenteux ou l'exposition à des produits chimiques^[292]. L'analyse protéomique joue donc un rôle essentiel dans le diagnostic précoce, le pronostic, la surveillance du développement de la maladie ou même dans le développement de médicaments^[293]. Dans notre étude, l'analyse protéomique permet de caractériser des protéines épidermiques et d'identifier leurs modifications provoquées par les allergènes cutanés et respiratoires.

Généralement, une procédure d'analyse protéomique standard est composée de trois étapes : (1) la séparation des protéines, (2) l'identification des protéines et (3) l'analyse par des outils bioinformatiques.

1. Séparation des protéines

Le protéome des cellules est extrêmement complexe, composé de plusieurs milliers de protéines. En effet, il existe approximativement 100 000 formes de protéines codées par environ 20 325 gènes du génome humain^[294], et la détermination de la fonction explicite de chaque forme sera un défi. En raison de la complexité des échantillons protéomiques, la séparation de protéines ou de peptides avant leur détermination est importante. Parmi les méthodes de séparation de protéines, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) et l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide bidimensionnelle (2D-PAGE) sont utilisées comme méthodes standards de séparation et d'affichage des protéines.

1.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE)

La SDS-PAGE est l'une des techniques largement utilisées pour la séparation des protéines en fonction de leur taille, facilitant ainsi l'approximation du poids moléculaire. Les protéines ont une charge électrique nette dans un milieu ayant un pH différent de leur point isoélectrique (pI). Elles ont donc la capacité de se déplacer lorsqu'elles sont soumises à un champ électrique. La vitesse de migration des protéines est proportionnelle au rapport de leur charge et de leur masse. Plus la charge par unité de masse est élevée, plus la migration est rapide. Par ailleurs, les protéines ont une structure tertiaire imprévisible et donc leurs vitesses de migration ne sont pas similaires les unes aux autres. Elles ne peuvent même pas migrer lorsqu'on applique une force électromotrice si elles sont dans leur point isoélectrique. Dans ces cas, les protéines sont dénaturées par ajout d'un détergent tel que le dodécylsulfate de sodium (SDS) pour les séparer exclusivement en fonction du poids moléculaire. Le SDS est un agent réducteur qui rompt les ponts disulfures, sépare la protéine en ses sous-unités et donne également une charge négative nette qui leur permet de migrer à travers le gel en relation directe avec leur taille. De plus, la dénaturation fait perdre la structure tertiaire des protéines

et donc leur vitesse de migration est proportionnelle à la taille et non à la structure tertiaire.

1.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide bidimensionnelle (2D-PAGE)

La 2D-PAGE ou l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide bidimensionnel^[295] est basée sur la séparation des protéines selon deux propriétés moléculaires, la masse et la charge, chacune dans une dimension. Dans une première dimension, les protéines sont séparées en fonction de leur pI par la technique de focalisation isoélectrique (IEF). Cette technique est basée sur le mouvement de protéines dans un milieu ayant un gradient de pH sous un champ électrique. Dans une seconde dimension, la séparation est réalisée par la technique SDS-PAGE en fonction de leur poids moléculaire.

Cependant, les inconvénients de ces méthodes comprennent l'utilisation d'une grande quantité d'échantillon, une gamme dynamique limitée qui défavorise l'observation des protéines de faible abondance^[296, 297] et la difficulté à séparer des protéines hydrophobes telles que les protéines membranaires^[298]. Pour que la protéine soit choisie, elle doit être visible par coloration ou fluorescence. Ainsi les protéines à des concentrations inférieures à la limite de détection ne sont pas sélectionnées. De plus, après séparation sur gel, les protéines subissent une étape de digestion enzymatique « in-gel » pour générer des peptides protéolytiques. Ces peptides sont ensuite soumis à une procédure d'extraction à partir du gel avant d'être analysés par des méthodes d'identification telles que la spectrométrie de masse. Cependant, l'efficacité de l'extraction des peptides à partir du gel peut varier et peut ainsi entraîner la perte d'échantillon. Dans ce contexte, la chromatographie liquide (LC) a émergé comme méthode alternative pour la séparation des protéines^[299-303].

1.3. Chromatographie liquide (LC)

Découverte en 1903 par Tswett pour la séparation des pigments, la chromatographie liquide est aujourd'hui utilisée dans l'analyse protéomique, permettant de séparer et d'isoler efficacement des protéines ou des peptides obtenus après digestion des protéines en phase liquide. Ces protéines et peptides peuvent être plus facilement analysés par spectrométrie de masse. En séparant rapidement des protéines dans un échantillon complexe, l'utilisation de la chromatographie liquide permet également d'économiser le temps de manipulation par rapport à la séparation sur gel^[304]. Les analytes, solubilisés dans un solvant, sont séparés par

une phase mobile (éluant) à travers une phase stationnaire (colonne chromatographique). La séparation se fait suivant des interactions chimiques ou physiques des analytes avec la phase stationnaire et la phase mobile. Cette technique, qui permet d'analyser des composés indépendamment de leur masse moléculaire, est ainsi bien adaptée à la séparation des mélanges biologiques complexes. Pour la séparation des peptides, la chromatographie liquide en phase inverse (RPLC), technique utilisée dans notre travail, est le mode le plus fréquemment utilisé^[302].

La RPLC est composée de 2 phases mobiles et d'une phase stationnaire. Les phases mobiles comprennent un solvant aqueux A (acide formique 0,1% dans de l'eau ultrapure, dans notre cas) et un solvant organique B (acide formique 0,1% dans de l'acétonitrile ultrapure, dans notre cas). La phase stationnaire hydrophobe est composée de petites particules de silice greffées de chaînes alkyles 18 (C18). L'élution se fait par une augmentation du pourcentage de solvant organique B au cours du temps pour pouvoir éluer progressivement les peptides retenus. Les peptides protéolytiques sont séparés en fonction de leur hydrophobicité : plus les peptides sont hydrophobes, plus ils seront retenus fortement sur la phase hydrophobe.

2. Identification des protéines

Traditionnellement, l'analyse protéomique utilisait l'électrophorèse sur gel monodimensionnelle (SDS-PAGE) ou bidimensionnelle (2D-PAGE) pour la séparation des protéines, suivi d'une détection des protéines avec des colorants organiques (Colloidal Coomassie Blue ou CCB)^[305], la coloration à l'argent^[306] ou la fluorescence^[307]. Puis, l'analyse d'image peut être réalisée sur le gel pour déterminer des spots d'intérêt pour des analyses ultérieures. Les protéines sont ensuite identifiées par le séquençage d'Edman, l'analyse des acides aminés ou l'immuno- empreinte.

La dégradation d'Edman est une méthode de séquençage des acides aminés dans un peptide. Dans cette méthode, l'acide aminé *N*-terminal est couplé avec le phénylthiocyanate et clivé en présence d'un acide perfluoré fort, généralement l'acide trifluoroacétique, sous la forme d'un dérivé de thiazolinone. Ce dernier est ensuite extrait et traité avec de l'acide pour former un acide aminé phénylthiohydantoïne (PTH) qui est stable et peut être identifié par chromatographie ou électrophorèse. Ce procédé peut être répété à nouveau afin d'identifier l'acide aminé suivant. Les peptides identifiés sont ensuite comparés avec ceux dans les

banques de données pour identifier des protéines.

L'analyse des acides aminés, quant à elle, repose sur l'hydrolyse par l'acide d'une protéine en acides aminés qui sont ensuite analysés par chromatographie. Toutes les données chromatographiques sont collectées et l'aire sous chaque pic d'acide aminé est calculée et comparée à un acide aminé standard connu. Le pourcentage de chaque acide aminé dans la protéine est calculé et comparé avec celui dans les banques de données afin d'identifier des protéines^[308].

L'immuno-empreinte (également appelé « western blot » ou « immunoblotting ») est une méthode largement utilisée en biologie moléculaire et en biochimie permettant de détecter et d'identifier des protéines dans un échantillon biologique à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines à identifier. Brièvement, les protéines séparées sur gel sont transférées vers une membrane, en nitrocellulose ou en polyvinylidène difluorure (PVDF), où elles sont examinées à l'aide d'anticorps spécifiques à la protéine.

Cependant, le coût et le temps de manipulation empêche ces méthodes de traiter un grand nombre de protéines à analyser^[308]. L'apparition des nouvelles techniques d'analyse telles que la spectrométrie de masse a favorisé le progrès de l'analyse protéomique permettant de mieux couvrir le protéome humain en particulier et le protéome de toutes les espèces en général. La spectrométrie de masse, méthode sélectionnée dans notre étude, sera présentée de manière détaillée dans ce manuscrit.

2.1. Analyse par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une méthode d'analyse physico-chimique qui permet d'identifier et de quantifier des molécules grâce à la mesure de leur masse. Le principe de la spectrométrie de masse est basé sur la séparation en phase gazeuse d'ions en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). La spectrométrie de masse peut aussi fragmenter ces molécules pour élucider leur structure chimique. Un spectromètre de masse est toujours constitué des 4 éléments suivants (**Figure V-2**) :

- Une source d'ionisation qui produit des ions en phase gazeuse.
- Un analyseur de masse qui sépare les ions selon leur rapport masse sur charge (m/z).
- Un détecteur qui enregistre les ions séparés et convertit un courant ionique en

courant électrique dont l'intensité est corrélée au nombre d'ions détectés.

- Un traitement du signal qui représente des données dans un spectre de masse.

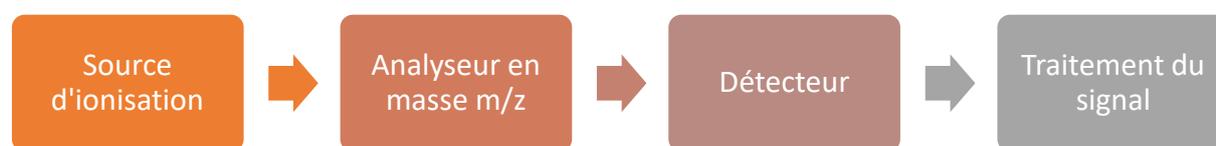


Figure V-2. Structure principale d'un spectromètre de masse

a) Source d'ionisation : électrospray (ESI)

Etant fondamentale dans la spectrométrie de masse, l'ionisation entraîne la formation des ions chargés. Actuellement, plusieurs techniques d'ionisation sont disponibles, répertoriées dans le **Tableau V-3**. Parmi elles, l'électrospray (ESI) et la désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI, Matrix-assisted laser desorption ionization) sont utilisés dans l'analyse protéomique. Seule la technique d'ionisation ESI, utilisée dans notre travail, sera détaillée dans ce manuscrit.

Tableau V-3 : Différentes techniques d'ionisation utilisées dans la spectrométrie de masse

	Technique d'ionisation	Convient pour la protéomique	Ions typiques	Limite de la masse détectée	Application
1	Electrospray (ESI)	Oui	$[M + nH]^{n+}$	$10^5 - 10^6$ u	Large
2	Désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI)	Oui	$[M + H]^+$	$10^5 - 10^6$ u	Large
3	Ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI)	Non	$[M + H]^+$	< 2000 u	Petits produits chimiques
4	Photo-ionisation à pression atmosphérique (APPI)	Non	M^+	< 2000 u	Petits produits chimiques
5	Ionisation par impact électronique	Non	M^+	< 3000 u	Synthèse organique
6	Ionisation chimique	Non	$M + NH_4^+$	< 2000 u	Synthèse organique

Décrit pour la première fois en 1989 par Fenn *et al.*, cette technique d'ionisation par spray a pour avantage de pouvoir former des ions multichargés, majoritairement des peptides tryptiques porteurs de 2 ou 3 charges positives. Le nombre de charges dépend de la taille et

de la composition du composé analysé, du solvant utilisé et des paramètres de la source d'ionisation.

Le processus d'ESI est divisé en trois étapes : (1) formation de gouttelettes chargées, (2) évaporation/fissions des gouttelettes chargées en plusieurs petites gouttelettes et (3) formation d'ions gazeux (**Figure V-3**)^[309].

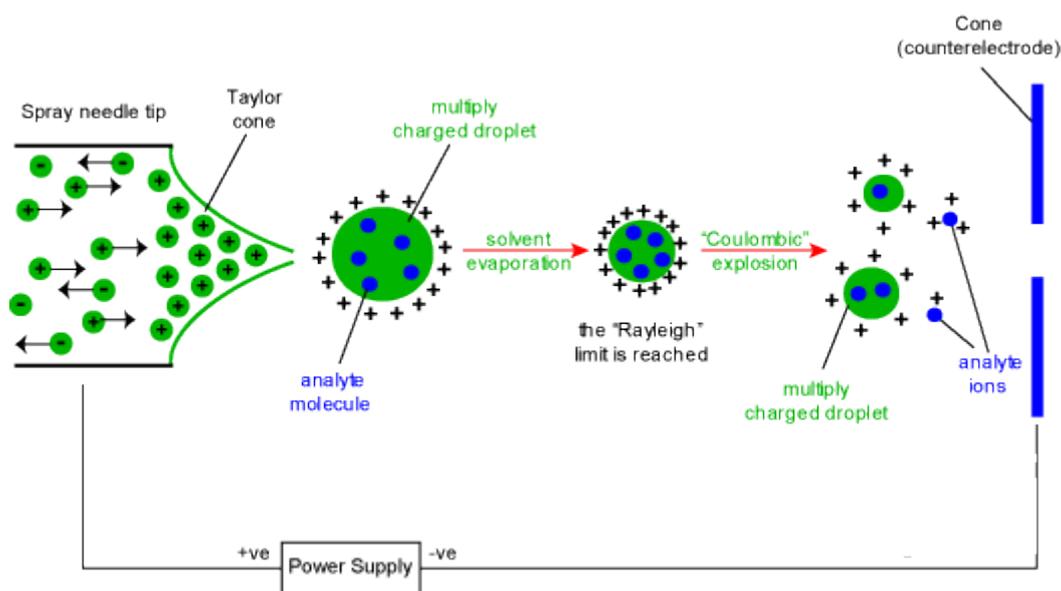


Figure V-3. Procédure d'ionisation par l'électrospray^[310]

En électrospray, l'échantillon sous forme liquide est introduit dans un capillaire métallique à pression atmosphérique. Un champ électrique, typiquement entre +/-3 et +/-5 kV, est appliqué entre ce capillaire et l'entrée du spectromètre de masse, la contre-électrode. Sous l'effet de ce champ électrique, les ions positifs et négatifs migrent dans le capillaire d'électrospray dans des directions opposées^[311]. Les ions de même charge que le champ électrique migrent alors vers la contre-électrode, soit vers l'extrémité du capillaire. En supposant un potentiel positif, les ions positifs en solution vont s'accumuler à la surface du liquide, qui est ainsi tirée vers le bas pour former un cône dynamique, appelé « cône de Taylor », à la sortie du capillaire. A un champ suffisamment élevé, le cône s'allonge formant un filament liquide qui se rompt sous forme de gouttelettes (« spray ») chargées positivement lorsque la tension de surface est dépassée par la force électrostatique appliquée^[309, 312]. Le diamètre des gouttelettes formées est influencé par un certain nombre de paramètres, y compris le potentiel appliqué, le débit de la solution et les propriétés du solvant^[313].

L'introduction d'un gaz neutre, généralement de l'azote, peut assister la nébulisation. L'évaporation du solvant des gouttelettes initialement formées, au fur et à mesure qu'elles traversent un gradient de champ électrique et un gradient de pression dans l'analyseur du spectromètre de masse, conduit à une diminution de la taille des gouttelettes et à une augmentation de la densité de charge à l'intérieur. Lorsque cette densité devient trop forte pendant la désolvatation, il y a un phénomène de répulsion électrostatique de Coulomb et la goutte explose en de petites gouttelettes secondaires. Ce phénomène est appelé fission coulombienne à la limite de Rayleigh auquel la force de répulsion électrostatique coulombienne, qui déstabilise la forme sphérique de gouttelette, surmonte la tension superficielle qui maintient la forme ronde^[309]. Après des cycles successifs d'évaporation et explosion des gouttelettes, les ions en phase gazeuse sont formés et guidés vers la contre-électrode. Les ions en phase gazeuse vont ensuite cheminer à travers les différentes parties internes du spectromètre de masse. Ce trajet s'effectuera de la source d'ionisation à pression atmosphérique jusqu'à l'analyseur dans une zone de pression de plus en plus réduite.

b) Les analyseurs

L'analyseur permet de séparer les ions en phase gazeuse selon leur rapport masse sur charge. Un analyseur de spectromètre de masse est caractérisé par quelques paramètres importants tels que la résolution, la précision, la gamme de masse, la vitesse d'acquisition et la gamme dynamique.

La résolution de masse est le pouvoir d'un analyseur à séparer deux pics adjacents avec deux masses différentes. Plus la résolution est élevée, plus la performance d'un spectromètre de masse est élevée. La résolution de masse est calculée par le rapport $R = m_1/\Delta m$, où m_1 est la masse du premier pic, Δm est la différence de masse entre les 2 pics adjacents. De plus, on admet que 2 pics adjacents de même hauteur sont bien résolus s'ils forment entre eux une vallée d'environ 10% par rapport à leur hauteur (**Figure V-4A**). Pour un pic isolé, la résolution à mi-hauteur (FWHM, Full Width at Half Maximum) est définie par le rapport $m/\Delta m_{50\%}$ où m est la masse du pic et $\Delta m_{50\%}$ est la largeur du pic à mi-hauteur (**Figure V-4B**).

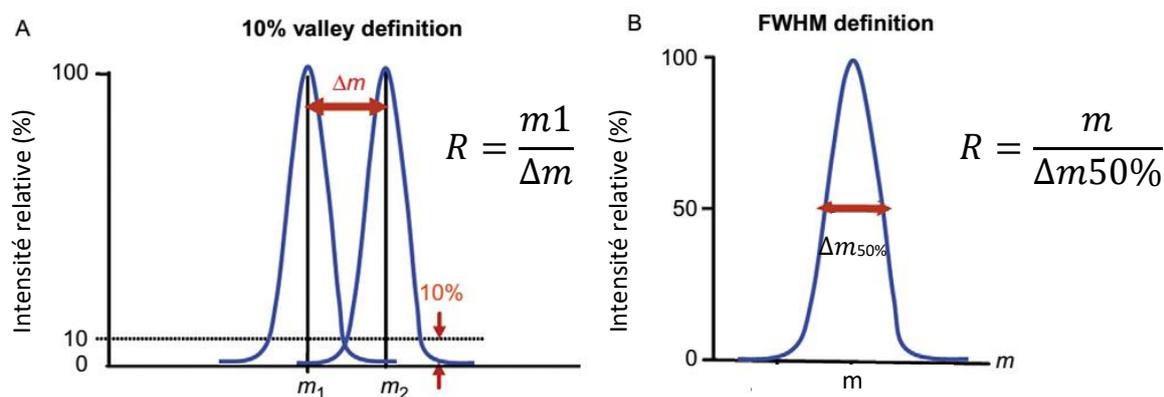


Figure V-4. Définition de la résolution de masse^[314]

La précision est la capacité d'un analyseur à fournir des masses qui sont proches de la valeur vraie. Elle dépend du pouvoir de résolution de l'analyseur. Une mesure ayant une bonne précision est obtenue avec un analyseur ayant un pouvoir de résolution élevé. Dans l'analyse protéomique, un grand nombre de peptides sont générés. Ces peptides sont ensuite comparés avec plusieurs dizaines de milliers de séquences dans la banque des données. Ceci provoque un risque d'augmentation de nombre de faux positifs. Ainsi, un spectromètre de masse ayant la capacité de fournir des masses exactes est indispensable pour limiter le nombre de candidats possibles^[315].

La gamme de masse est la valeur limite m/z que l'analyseur est capable de mesurer. La gamme de masse requise est moins importante en ESI qu'en MALDI car la formation des espèces multichargées en ESI diminue l'étendue des valeurs m/z des analytes.

La vitesse d'acquisition exprime le nombre de spectres enregistrés par unité de temps. La grande vitesse d'acquisition de l'analyseur permet d'identifier un grand nombre de protéines dans un échantillon. Ainsi, la couverture du protéome augmente. Cependant, il est important de noter que la très haute vitesse provoque souvent la diminution de la résolution de masse.

La gamme dynamique d'un analyseur représente l'étendue des concentrations relatives détectables simultanément. Autrement dit, c'est la capacité à détecter simultanément un analyte peu abondant et un analyte très abondant. Dans l'analyse protéomique, la détection des protéines moins abondantes est importante, car les biomarqueurs des maladies sont généralement présents en de très faibles quantités.

Actuellement, il existe cinq types principaux d'analyseur de masse qui peuvent être couplés à

l'ESI et utilisés dans l'analyse protéomique : le quadrupôle (Q), le temps de vol (TOF), la trappe ionique, l'Orbitrap et le cyclotron à résonance des ions à transformée de Fourier (FT-ICR). Chaque analyseur présente des caractéristiques différentes, qui peuvent être résumées dans le **Tableau V-4**.

Tableau V-4 : Types principaux d'analyseur de masse

Analyseur	Résolution	Précision	Gamme m/z	Vitesse d'acquisition	Gamme dynamique
Quadrupôle (Q)	2000	100 ppm	8000	élevée	10 ⁶
Temps de vol (TOF)	20000	5-10 ppm	500000	très élevée	10 ⁴
Trappe ionique	5000	100 ppm	6000	élevée	10 ⁴
Orbitrap	150000	1-2 ppm	6000	moyen	10 ⁴
Cyclotron à résonance des ions à transformée de Fourier (FT-ICR)	1000000	1-2 ppm	4000	moyen	10 ⁴

Le quadrupôle et la trappe ionique sont très robustes, peu coûteux, mais n'offrent qu'une faible résolution de masse. Le TOF, l'Orbitrap et le FT-ICR fournissent une masse précise. De plus, le TOF a une gamme de m/z plus élevée, voire illimitée dans la théorie. Dans notre étude, nous avons utilisé l'analyseur Orbitrap (Thermo Scientific), qui sera présenté dans la partie suivante.

Des domaines de recherche tels que la protéomique et la métabolomique demandent des spectromètres de masse qui ont une haute performance mais avec une taille et un coût modeste. Développé par Makarov à la fin des années 1990^[316], l'Orbitrap est un instrument qui répond à ces normes. Cet analyseur permet de fournir des spectres de masse à très haute résolution sans avoir recours à un champ magnétique intense coûteux et encombrant.

L'Orbitrap fonctionne en piégeant radialement des ions autour d'une électrode centrale en forme de fuseau qui est placée coaxialement à l'intérieur d'une électrode creuse externe (**Figure V-5**). L'application d'une tension continue et opposée aux ions entre ces deux électrodes génère un champ électrostatique suivant l'axe z. Les ions injectés ayant un même m/z vont former un anneau autour de l'électrode centrale de l'Orbitrap. Ce mouvement des ions se décompose en un mouvement circulaire dans le plan (xy) et un mouvement oscillatoire selon l'axe z avec une fréquence qui est spécifique à ce m/z. La fréquence d'oscillation axiale

va créer un courant, qui sera transformé en spectre de fréquence grâce à une transformation de Fourier, puis en valeur m/z . On obtient ainsi un spectre MS.

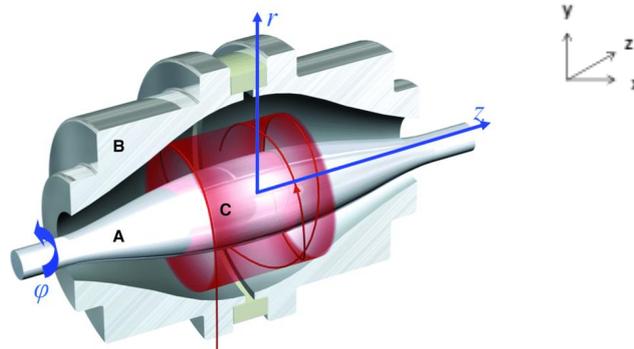


Figure V-5. Structure de l'Orbitrap

2.2. La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

Lorsque deux ou plusieurs analyseurs sont couplés de manière séquentielle, on parle de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Dans ce cas, un ion « parent » ou ion « précurseur » est isolé dans un premier analyseur. Puis, cet ion est fragmenté dans un deuxième analyseur par collision avec un gaz inerte pour générer des ions « fils » ou « fragments ». Les ions fragments sont enfin séparés suivant leur rapport masse sur charge (m/z) pour donner un spectre MS/MS, dit spectre de fragmentation.

Une analyse par spectrométrie de masse en analyse protéomique comprend généralement 2 phases : (1) scan MS et (2) scan MS/MS. Selon les instruments utilisés, ces 2 phases de l'analyse protéomique ont lieu de manière différente. Dans ce manuscrit, nous ne présenterons que le fonctionnement du spectromètre de masse utilisé dans notre travail, le QExactive+ (Thermo Scientific) (**Figure V-6**). Cet instrument est un couplage d'un filtre de masse quadripolaire, appelé « Quadrupôle », à un analyseur Orbitrap. Le quadrupôle permet d'isoler des peptides avant la fragmentation par collision à plus haute énergie (HCD). Avec un isolement et une fragmentation presque instantanés, le QExactive+ permet de raccourcir le temps d'analyse et aussi d'augmenter le nombre des protéines identifiées^[317]. Avec une résolution de masse améliorée, le QExactive+ devient ainsi un instrument robuste dans l'analyse protéomique, surtout dans les échantillons complexes tels que les cellules humaines.

Phase I = Scan MS :

Les peptides élués à un instant t de la chromatographie liquide sont tout d'abord transportés tous ensemble dans la « C-trap » (**Figure V-6**) qui est en quelque sorte l'antichambre de l'analyseur Orbitrap. Cet endroit, qui est incurvé (forme en « C »), est un piège pour les ions qui arrivent en continu de la source et qui seront arrêtés par une porte électrostatique et une électrode spéciale (« C-Trap Exit Lens »). Suivant les paramètres de l'instrument, on peut piéger jusqu'à plusieurs millions d'ions dans la C-trap en quelques centaines de nanosecondes.

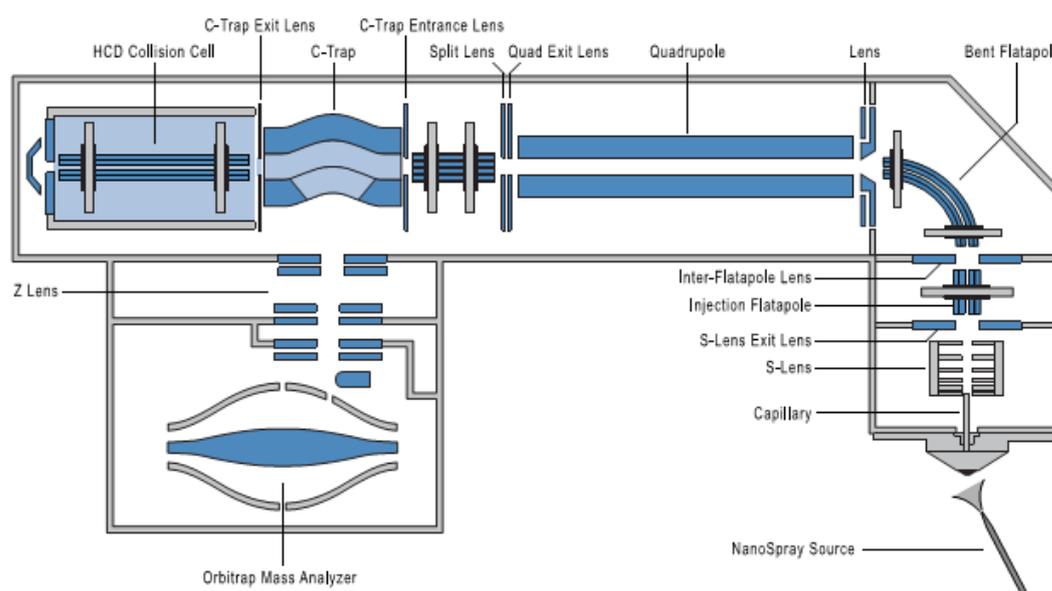


Figure V-6. Détails de construction d'un spectromètre de masse QExactive+

Les ions sont ensuite injectés tangentiellement et sous forme d'un paquet pulsé compact dans l'Orbitrap. Comme décrit précédemment, le mouvement axial de ces ions dans l'Orbitrap est finalement transformé en valeur m/z des peptides. On obtient ainsi un spectre de masse, avec en abscisse le rapport m/z et en ordonnées l'intensité du signal de tous les ions peptidiques élués à l'instant t (**Figure V-7**).

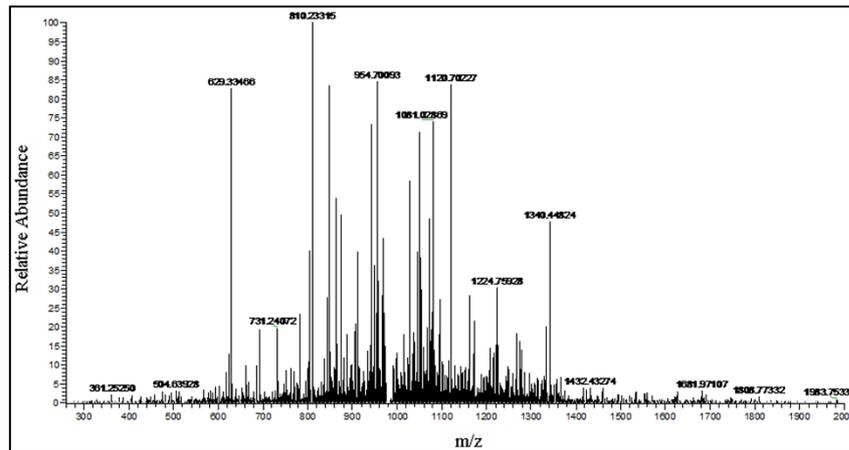


Figure V-7. Exemple d'un spectre de masse

Phase II = Scan MSMS :

Après avoir obtenu la masse intacte des peptides co-élués (première information importante à considérer), il faut ensuite séquencer le plus de peptides possibles pour connaître l'enchaînement des acides aminés qui le composent (deuxième information qui sera utile pour identifier la protéine dont il est issu). Pour ce faire, avant de piéger l'ion que l'on souhaite séquencer dans la « C-trap », il faut d'abord le sélectionner après son entrée dans l'instrument. Cette sélection est possible dans la partie appelée « Quadrupôle » (**Figure V-8**). La trajectoire des ions peptidiques est oscillante dans cet analyseur composé de 4 barres métalliques. Une tension continue et une tension alternative sont appliquées entre les 4 électrodes, et le réglage de ces 2 tensions va permettre de ne choisir qu'un seul ion de m/z voulu. Cet ion aura une trajectoire stable oscillante dans le quadrupôle, alors que les autres ions auront des oscillations de plus grande amplitude qui iront heurter les barres métalliques.

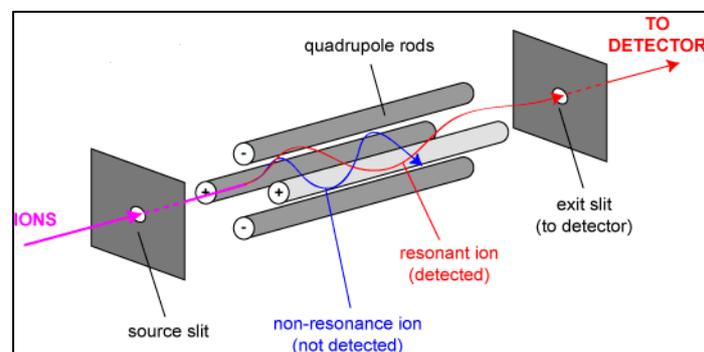


Figure V-8. Structure d'un quadrupôle

Une fois le peptide sélectionné, celui-ci sera piégé et accumulé pendant plusieurs centaines de nanosecondes dans la « C-trap » comme lors du scan MS expliqué précédemment. La cellule « C-trap » sert de transition entre le quadropôle et la cellule de collision appelée « HCD collision cell » (**Figure V-6**). Après avoir transféré le paquet d'ions de même m/z dans la cellule de collision, un gaz inerte (l'azote ultrapure dans notre cas) est injecté dans ce compartiment. Il va alors entrer en collision avec les ions peptidiques dits « précurseurs » ou « parents » qui subiront une augmentation de leur énergie interne. Ce procédé aboutit à la dissociation de l'ion intact lorsque son énergie interne sera supérieure à l'énergie d'activation nécessaire à sa fragmentation. On obtient ainsi des morceaux de l'ion parent, que l'on appelle des ions « fils » ou « fragments ».

Lorsque le peptide sélectionné dans le quadropôle a été fragmenté dans la cellule HCD, les ions fragments sont à nouveau piégés dans la « C-trap ». Il ne reste plus qu'à les injecter tangentiellement et en paquet dans l'Orbitrap pour connaître leur fréquence d'oscillation et pour avoir accès à leur m/z . On obtient alors un spectre MS/MS dit « spectre de fragmentation » sur lequel chaque pic correspondra à un fragment du peptide précurseur intact (**Figure V-9**).

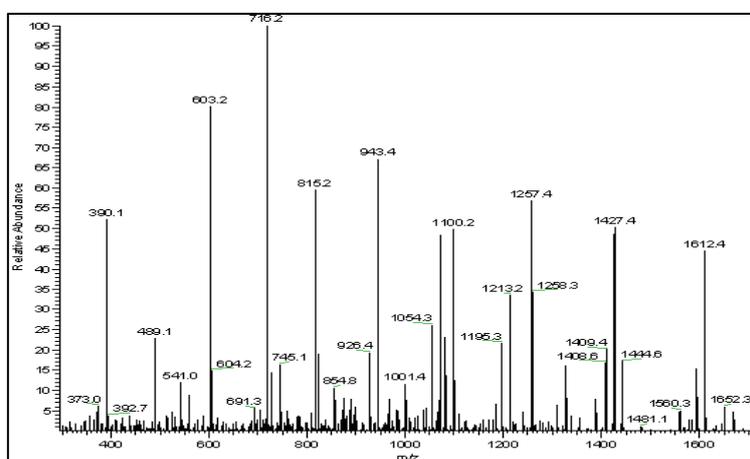
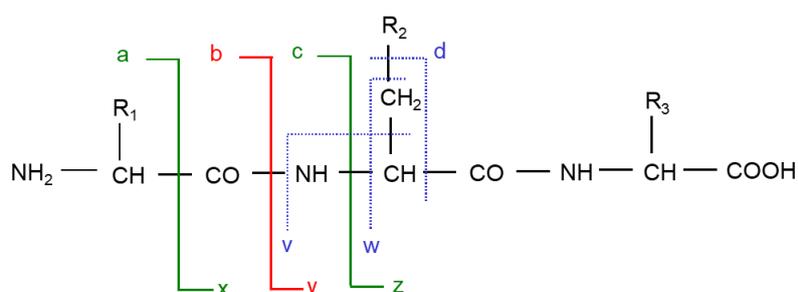


Figure V-9. Exemple d'un spectre de fragmentation MS/MS

2.3. Interprétation d'un spectre de fragmentation

Les différents types de fragments formés sont dépendants de plusieurs facteurs tels que l'énergie de collision, la pression, la séquence peptidique ou encore l'état de charge des peptides. Une nomenclature des fragmentations peptidiques a été établie suivant où se

produit la fragmentation du précurseur sur le squelette peptidique (**Figure V-10**)^[318, 319]. Avec l'instrument QExactive+, les ions y et b sont majoritairement observés. Ces fragments sont obtenus par clivage de la liaison peptidique entre le carbone (-CO-) et l'azote (-NH-) : le fragment y contient l'extrémité C-terminal du peptide tryptique et le fragment b contient l'extrémité N-terminal du peptide.



Ions de série a , b et c : charge localisée sur le fragment N-terminal

Ions de série x , y et z : charge localisée sur le fragment C-terminal

Ions de série d , v et w : fragmentation des chaînes latérales

Figure V-10. Nomenclature des fragmentations peptidiques

L'observation des distances entre différents pics de fragments y ou b sur le spectre de fragmentation MS/MS permet de lire la séquence en acide aminé du peptide précurseur. En effet, chaque différence de masse entre 2 fragments adjacents correspond à la masse d'un acide aminé (**Figure V-11**).

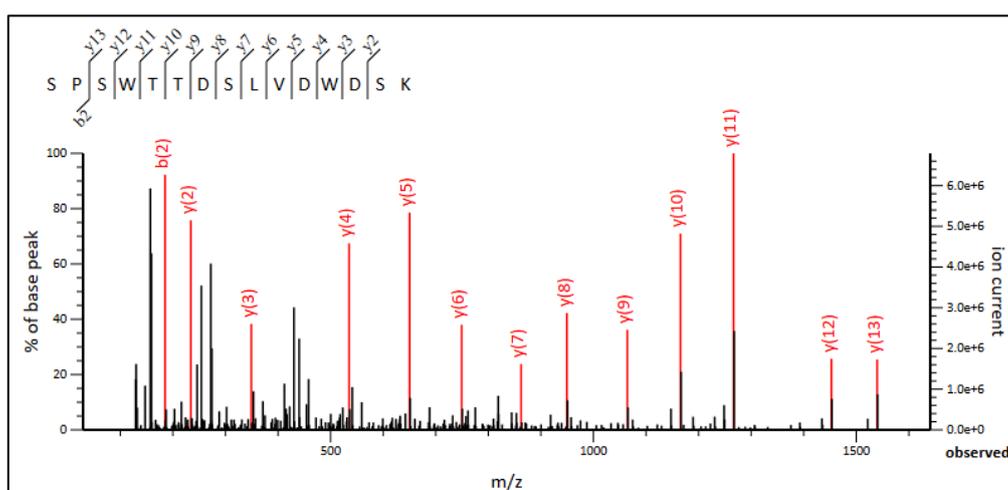


Figure V-11. Déduction de la séquence peptidique à partir d'un spectre MS/MS

Lorsqu'on recherche une modification sur un résidu acide aminé, on recherche les ions y et b encadrant cet acide aminé pour valider sa localisation.

3. Analyse bioinformatique

L'identification des protéines s'effectue par combinaison des informations obtenues en spectre MS des peptides intacts et en spectre de fragmentation MS/MS de chaque peptide sélectionné avec un m/z donné. Ces données expérimentales sont confrontées aux données présentes dans les banques de données grâce à un algorithme de recherche. Le degré de similitude entre les données expérimentales et théoriques, ainsi que l'application d'une méthode de calcul du taux de faux-positifs, permettra d'être sûr de l'identification du peptide et de la protéine à laquelle il est relié.

3.1. Outil bioinformatique

De nombreux outils bioinformatiques et algorithmes permettent d'attribuer automatiquement des séquences peptidiques aux spectres de fragmentation MS/MS. Ces outils peuvent être classés en trois groupes :

- **Séquençage *de novo*** permet l'identification de peptides, dont la séquence n'est pas présente dans la base de données recherchée, à partir des spectres de fragmentation MS/MS. Le séquençage *de novo* est une approche importante dans l'étude des organismes avec des génomes non séquencés ou partiellement séquencés. Pourtant, le séquençage *de novo* n'est pas une approche prioritaire dans l'analyse protéomique car il est intensif en calcul et nécessite des spectres MS/MS de haute qualité. Dans le cas où l'organisme étudié a été séquencé, l'analyse commence par une recherche dans les bases de données, puis, le séquençage *de novo* est appliqué pour interroger les spectres non attribués restants si on le souhaite. Plusieurs logiciels sont disponibles pour faciliter ce processus tels que le PepNovo^[320], le PEAKS^[321].

- **Recherche dans des banques de données** est la méthode dominante pour attribuer des séquences peptidiques aux spectres MS/MS. Les spectres de fragmentation MS/MS expérimentaux sont confrontés aux spectres théoriques prédits pour chaque peptide qui est issu de la digestion *in silico* des protéines présentes dans une banque de données. De nombreux outils (Mascot^[322], Sequest^[323], X! Tandem^[324], ProteinProspector^[325], OMSSA^[326],

etc...) ont été développés permettant de réaliser ce processus de recherche. Parmi eux, le logiciel Mascot est utilisé dans notre étude.

- **Approche hybride** est une approche qui combine le séquençage *de novo* et la recherche dans les banques de données. Cette approche commence par l'identification de courts fragments de séquence (3 à 5 acides aminés) qui sont susceptibles de faire partie de la véritable séquence peptidique. La recherche dans la base de données pour chaque spectre MS/MS est ensuite effectuée uniquement sur les peptides qui contiennent l'un des fragments de séquence extraite de ce spectre, réduisant ainsi le nombre de comparaisons à effectuer et le temps de recherche. Les approches hybrides sont particulièrement utiles pour l'identification de peptides post-traductionnels ou modifiés chimiquement. L'InsPecT^[327] et le TagRecon^[328] sont deux des outils d'identification de peptides utilisés dans cette approche.

Dans notre travail, nous étudions le génome humain qui a été séquencé. Ainsi, la recherche dans des banques de données a été utilisée et sera présentée dans la suite.

3.2. Stratégie d'analyse bioinformatique

Le traitement bioinformatique réalisé dans notre travail se divise en 4 étapes. La recherche dans la banque de données est tout d'abord réalisée permettant d'identifier des protéines présentes dans l'échantillon biologique. Le résultat de la recherche est ensuite validé et l'abondance des protéines identifiées dans l'échantillon est calculée. Ces étapes sont réalisées sur Mascot (Matrix Science). Enfin, les résultats bruts des recherches Mascot sont importés et traités par Proline afin d'exporter des données protéomiques permettant la caractérisation des protéines ainsi que l'identification de leurs modifications.

a) Recherche dans des banques de données

Plusieurs dizaines d'algorithmes existent dans la littérature (open-source et commerciaux) pour effectuer cette étape. L'algorithme Mascot est celui que nous avons utilisé. Cet algorithme permet de calculer la probabilité qu'il y ait une correspondance produite au hasard entre les données expérimentales et une ou plusieurs peptides répertoriés dans une banque de référence. Chaque masse de peptide qui a donné lieu à un spectre MS/MS est comparée aux masses de tous les peptides théoriques générés par la digestion *in silico* des protéines dans la banque de données. Puis, les spectres de fragmentation MS/MS

expérimentaux sont confrontés aux spectres théoriques. Le résultat de l'algorithme est une liste de peptides potentiels correspondant à chaque spectre MS/MS (Peptide-Spectrum Matches, PSMs), auquel Mascot a assigné un score de correspondance avec les masses théoriques. Plus le score est élevé, plus la correspondance du spectre avec sa séquence peptidique est élevée. Dans la plupart des cas, seul le PSM ayant le meilleur score est considéré comme l'identification du peptide pour chaque spectre MS/MS. Cette étape a lieu au niveau peptidique. Un regroupement de tous les peptides permet de déduire les protéines présentes dans l'échantillon biologique.

L'algorithme Mascot permet également de détecter les déviations de masse générées par la présence de modifications (post-traditionnelles, chimiques, etc...) sur certains résidus. Dans notre cas, nous recherchons des modifications provoquées par des sensibilisants cutanés ou respiratoires utilisés, mais aussi des modifications protéiques générées lors de la préparation de l'échantillon telles que l'acétylation de l'acide aminé *N*-terminal, l'oxydation de la méthionine et la carbamidométhylation de la cystéine.

b) Validation des données par le taux de faux-positifs (FDR)

L'identification d'une protéine présente dans l'échantillon biologique dépend de l'identification de ses peptides. L'une des étapes les plus importantes de la validation de ces peptides est l'estimation du taux de faux-positifs (FDR, False-Discovery Rate). La stratégie « target-decoy »^[329] est actuellement la plus utilisée pour estimer le FDR. Les spectres expérimentaux sont confrontés non seulement aux spectres d'une banque de données « cible » (target database) mais aussi aux spectres d'une banque de données « leurre » (decoy database). Cette banque contient le même nombre de séquences que la banque cible mais avec un mélange aléatoire ou non (séquences inversées) des acides aminés pour chacune des protéines. Cette approche suppose que tous les PSMs obtenus par comparaison des spectres expérimentaux aux spectres de la banque de données « leurre » sont faux. Le nombre de faux PSMs identifiés dans la banque « cible » est ainsi estimé par confrontation aux PSMs issus de la banque « leurre » (**Figure V-12**).

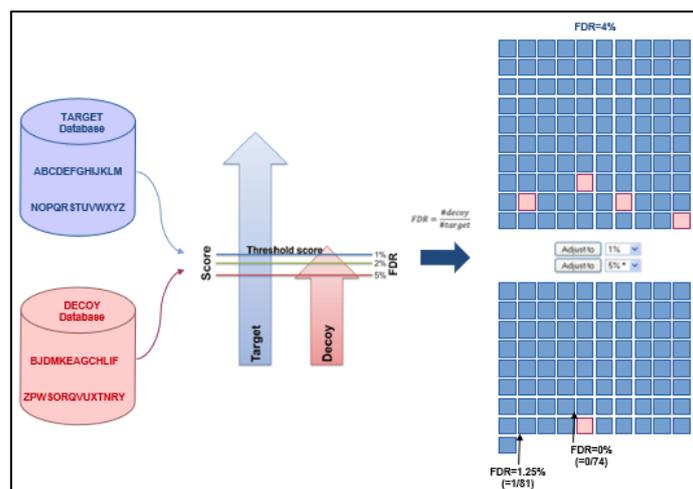


Figure V-12. Estimation du taux de faux-positifs par stratégie « target-decoy »

Grâce à cette stratégie, le taux de faux-positifs peut être calculé comme la proportion de faux PSMs parmi tous les PSMs acceptés. Dans les règles actuelles de protéomique, le taux de faux-positifs accepté est inférieur à 1% (FDR < 1%).

$$FDR (\%) = \frac{\text{Faux PSMs}}{\text{Faux PSMs} + \text{Vrais PSMs}}$$

c) Détermination de l'abondance des protéines

L'abondance des protéines est un paramètre fondamental car la cinétique et la dynamique de la cellule dépendent du changement de concentration des protéines dans des compartiments particuliers^[330]. Ainsi, outre le profilage global des protéines présentes dans un système à un moment donné, des informations sur le niveau d'expression des protéines sont de plus en plus nécessaires dans les études protéomiques. Liu *et al.*^[331] ont démontré que le nombre total de spectres montre une forte corrélation linéaire avec l'abondance des protéines. Par conséquent, un comptage du nombre de spectres par peptide, puis le comptage du nombre total de spectres pour une protéine donnée est une indication quantitative de l'abondance des protéines dans un échantillon protéomique. Cette technique est appelée « Spectral Count ».

En 2002, Rappsilber *et al.*^[332] ont calculé l'abondance des protéines en utilisant le PAI (Protein Abundance Index), qui représente le nombre de peptides identifiés divisé par le nombre de peptides tryptiques théoriquement observables pour chaque protéine.

$$PAI = \frac{\text{Nombre de peptides observés}}{\text{Nombre de peptides observables}}$$

En 2005, Ishihama *et al.*^[333] ont rapporté que les valeurs PAI obtenues à différentes concentrations d'albumine sérique montrent une relation linéaire avec le logarithme de la concentration des protéines. Ainsi, dans le but de quantifier des protéines dans l'échantillon, ils ont converti le PAI en emPAI qui est directement proportionnelle à la teneur en protéines d'un échantillon.

$$emPAI = 10^{PAI} - 1$$

$$\text{Teneur en protéine (mol\%)} = \frac{emPAI}{\sum(emPAI)} \times 100$$

Actuellement, la valeur emPAI des protéines identifiées peut être obtenue par l'algorithme Mascot ou calculée par une « open-source » emPAI Calc^[330].

d) Extraction des données par Proline

La recherche dans la banque des données par Mascot fournit un résultat brut qui comporte une liste des peptides permettant d'identifier des protéines présentes dans l'échantillon. Les résultats bruts des recherches par Mascot sont importés et traités dans le logiciel Proline, développé par le consortium ProFI (Proteomics French Infrastructure)^[334]. Les tâches principales de Proline, qui sont présentées dans la **Figure V-13** ci-dessous, comportent la validation et l'identification de peptides et de protéines, et la quantification de ces peptides et protéines sur la base du comptage spectral.

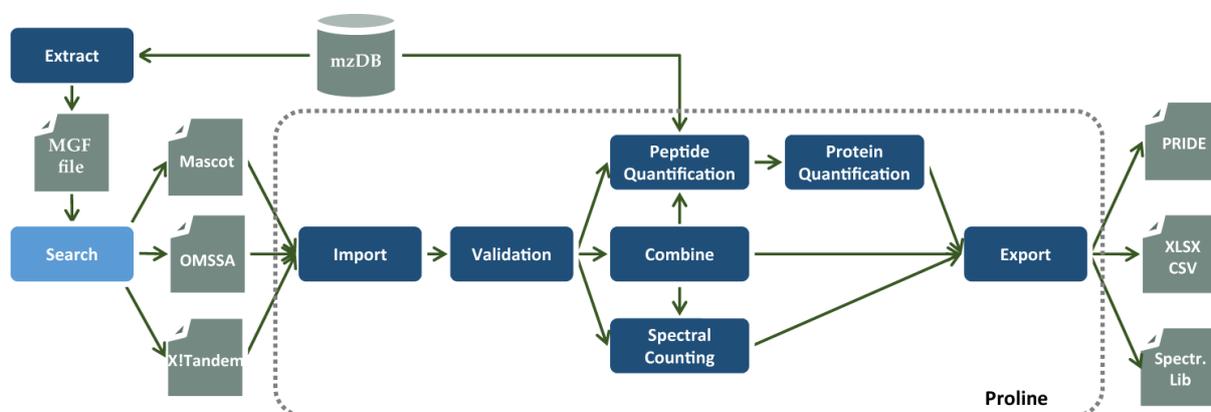


Figure V-13. Un flux de travail dans Proline^[334]

La validation peut être effectuée indépendamment aux niveaux des PSMs et des protéines. Un ensemble de filtres peut être appliqué pour accepter ou rejeter un PSM ou un ensemble de protéines en fonction des valeurs seuils définies par l'utilisateur appliquées à divers critères tels que le score, la longueur du peptide pour le PSM, le nombre de peptides pour l'identification des protéines, etc... La validation par le taux de faux-positifs (FDR) peut également être effectuée à chaque niveau pour atteindre une valeur définie par l'utilisateur (Figure V-14).

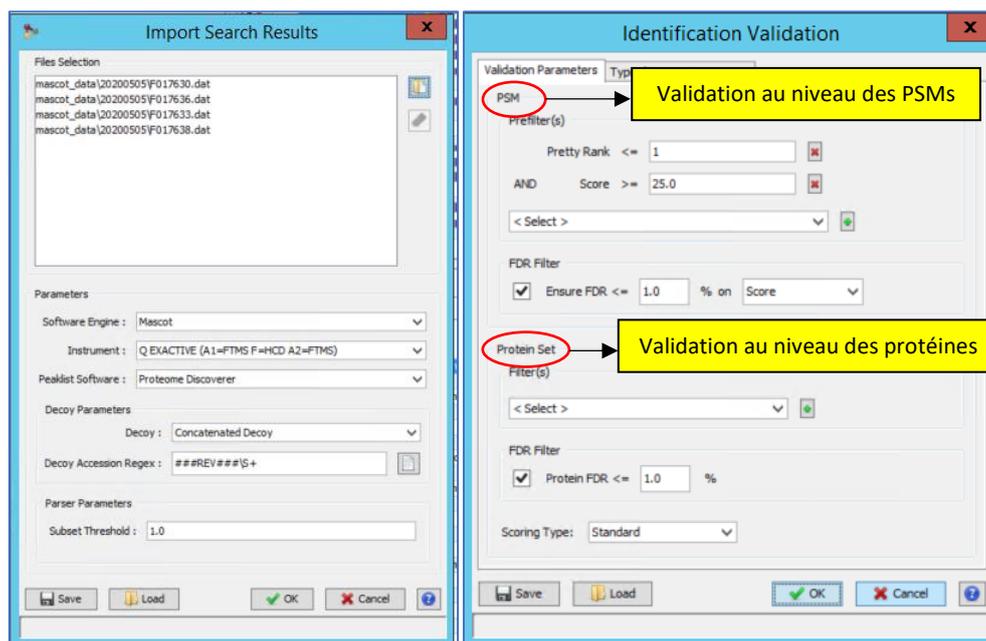


Figure V-14. Importation et validation des données protéomiques dans le Proline

Après la validation, la liste complète des PSMs et des protéines correspondantes, appelée « résumé d'identification », est créée et conservée dans la base de données Proline pour le traitement ultérieur des données. Par exemple, la combinaison des résumés d'identification ou la quantification des protéines. Enfin, les résultats d'identification et de quantification peuvent être exportés sous forme de fichiers texte ou Excel, au niveau des peptides ou des protéines. Ainsi, des modifications protéiques peuvent être identifiées grâce à leur localisation sur la séquence peptidique.

4. Stratégie d'analyse protéomique utilisée dans notre étude : « shotgun proteomics »

Actuellement, la spectrométrie de masse est devenue une méthode essentielle dans la

science biologique moderne, permettant d'identifier rapidement les protéines, d'étudier des modifications protéiques, des interactions protéines-protéines ou encore de fournir des informations structurales^[335]. Il existe deux approches complémentaires en analyse protéomique par spectrométrie de masse : l'approche « top-down » et l'approche « bottom-up » (**Figure V-15**)^[336]. L'approche « top-down » consiste à analyser des protéines intactes et les fragmenter dans un spectromètre de masse pour fournir une description de la structure primaire de la protéine et révéler ainsi ses modifications. Le « bottom-up », quant à lui, est une approche dans laquelle les protéines sont digérées par une enzyme telle que la trypsine en petits peptides qui sont ensuite analysés par un spectromètre de masse permettant de déterminer la séquence de la protéine et ses modifications.

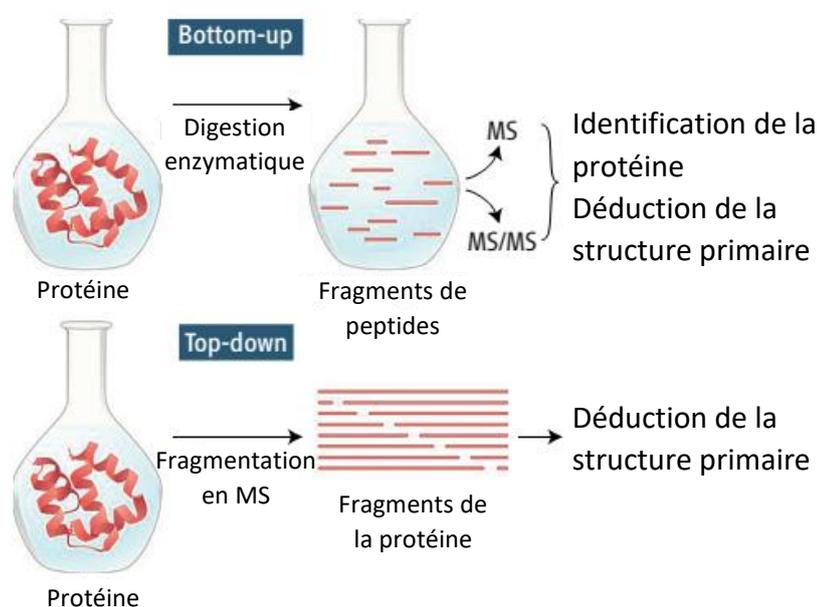


Figure V-15. Approche « top-down » et approche « bottom-up » en analyse protéomique^[336]

Du fait qu'aucun traitement des protéines n'est réalisé, l'approche « top-down » a des avantages pour la détermination des isoformes de la protéine. Cependant, cette approche présente des limites importantes en raison des difficultés d'ionisation et de fragmentation des protéines intactes en phase gazeuse. De plus, les protéines ont une grande masse moléculaire, il est donc nécessaire d'avoir des instruments à haute résolution avec une grande gamme de masse. L'approche « bottom-up », qui reste de loin la plus utilisée dans les plateformes protéomiques, a été choisie dans notre travail car elle permet d'analyser des mélanges plus complexes.

Dans l'approche « bottom-up », les protéines subissent une étape de digestion enzymatique en solution avant séparation par la chromatographie liquide pour générer des peptides protéolytiques. Ces peptides sont ensuite séparés par la chromatographie liquide avant d'être analysés par la spectrométrie de masse. Les spectres de masse des peptides obtenus sont enfin confrontés aux spectres théoriques des peptides obtenus par digestion *in silico* des protéines dans la banque de données pour l'identification des protéines.

L'identification des protéines en utilisant une combinaison de séparation par chromatographie liquide de peptides générés par digestion enzymatique et leur analyse ultérieure par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS), suivi d'une recherche dans les bases de données, est appelée la méthode « shotgun proteomics »^[337]. Cette stratégie permet l'identification de manière efficace des protéines dans un mélange complexe et devient désormais une méthode standard en analyse protéomique grâce à sa robustesse et à sa précision^[335, 337].

III. Mode opératoire

Nous analysons le protéome des épidermes humains reconstitués (RHE) exposés aux différents allergènes : l'anhydride phtalique (sensibilisant respiratoire), la 2,3-diphénylcyclopropénone (sensibilisant cutané) et le *p*-tolylisocyanate (sensibilisant mixte). Pour chaque sensibilisant, nous réalisons l'analyse protéomique en duplicata biologique. C'est-à-dire que deux épidermes différents exposés au même sensibilisant sont parallèlement analysés. Les deux résultats obtenus sont comparés pour confirmer la reproductibilité de la méthode. Par ailleurs, deux échantillons blancs (RHE non exposés aux allergènes) sont analysés afin de servir de témoins.

De plus, une protéine purifiée, la sérum albumine sérique (BSA), exposée aux allergènes est également analysée pour évaluer la fiabilité de la procédure d'analyse.

1. Digestion des protéines

Les protéines extraites (5 µg) sont tout d'abord digérées par une enzyme pour obtenir des fragments protéiques appelés peptides qui sont ensuite analysés par LC-MS/MS. Dans notre étude, la trypsine est utilisée pour la digestion des protéines. Cet enzyme va cliver les

protéines de manière spécifique en C-terminal des résidus lysines (K) et arginines (R), qui sont des acides aminés fréquents dans les séquences protéiques. Pour que les protéines puissent être digérées de manière efficace, il faut tout d'abord s'affranchir du tampon de lyse SDS 1% utilisé dans l'extraction des protéines, incompatible avec la trypsine. Une précipitation des protéines est donc réalisée à l'aide de 5 volumes d'une solution glaciale d'acétate d'ammonium 0,1 M dans du méthanol 100% (12 h, -20 °C). Après centrifugation de l'échantillon (15 min, 12000 x g, 4 °C), le culot protéique est lavé 2 fois (acétate d'ammonium 0,1 M dans du méthanol 80%) et séché dans un évaporateur (SpeedVac). La préparation des échantillons se poursuit par une étape de resolubilisation du culot protéique sec (avec du bicarbonate d'ammonium 50 mM), la réduction des ponts disulfures (DTT 0,1 M, dithiothréitol, 10 min à 95 °C) et l'alkylation des fonctions thiols des cystéines libérées (IAA 0,1 M, iodoacétamide, 30 min à température ambiante et à l'obscurité). L'iodoacétamide va alors ajouter un groupement « carbamidométhyle » sur les cystéines réduites. Les protéines, réduites et alkylées, peuvent alors être incubées avec de la trypsine (1 nuit, 37 °C). Après une nuit de digestion à 37 °C, les peptides sont mis à sécher dans un évaporateur (SpeedVac) et ils peuvent être congelés à sec à -20 °C en attendant leur injection en spectrométrie de masse.

2. Analyse par la LC-MS/MS

Les peptides séchés (500 à 1000 ng pour l'échantillon épidermique, 250 ng pour la BSA) sont resolubilisés avec de l'acide formique 0,1%. Ainsi, les peptides tryptiques vont pouvoir être protonés, au niveau des fonctions protonables telles que le NH₂ terminal, l'extrémité tryptique C-terminal (K ou R), et éventuellement d'autres résidus internes protonables. Le mélange peptidique est ensuite transféré dans un insert en verre, qui est lui-même déposé dans un pilulier et installé dans le passeur d'échantillons de la chromatographie liquide couplée en amont du spectromètre de masse (**Figure V-16**).

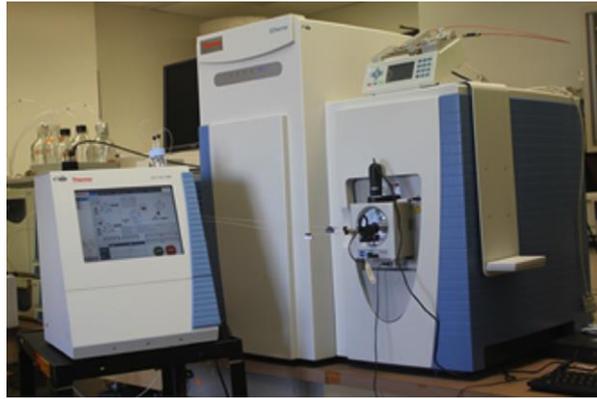


Figure V-16. Chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse

La chromatographie liquide utilisée est composée de 2 phases mobiles et d'une phase stationnaire. Les phases mobiles comprennent un solvant aqueux A (acide formique 0,1% dans de l'eau ultrapure, qualité LC-MS) et un solvant organique B (acide formique 0,1% dans de l'acétonitrile ultrapur, qualité LC-MS). La phase stationnaire est une colonne à phase inverse C18 (Acclaim PepMap, 2 μm , 25 cm x 75 μm , Thermo Scientific). Les peptides tryptiques sont fractionnés sur un gradient de 160 min de 2 à 40% d'acétonitrile + 0,1% d'acide formique, à un débit de 300 nL/min.

Les peptides élués par la colonne chromatographique passent ensuite dans un spectromètre de masse (QExactive+, Thermo Scientific). Ces peptides sont ionisés en phase gazeuse par électrospray (ESI, ElectroSpray Ionization). Les spectres MS sont acquis de 350 à 1500 m/z par le détecteur Orbitrap. Les peptides intacts sont ensuite fragmentés dans une cellule de collision HCD (Higher-energy Collisional Dissociation). Les spectres de fragmentation MS/MS sont enfin enregistrés par le détecteur Orbitrap.

3. Recherches dans la base de données

Les spectres de masse expérimentaux sont confrontés aux données présentes dans une banque de séquences SwissProt *Homo sapiens* (le cas des protéines épidermiques) ou *Mammalia* (le cas de la BSA) grâce à un algorithme de recherche Mascot 2.5 (Matrix Science) pour générer une liste des peptides et des protéines correspondantes présentes dans l'échantillon. Un maximum de 3 clivages manqués (missed cleavages) est autorisé pour la digestion tryptique. Les modifications recherchées sont l'acétylation de l'acide aminé N-terminal, l'oxydation de la méthionine, la carboxyamidométhylation de la cystéine ainsi que

des modifications variables sur les résidus nucléophiles (lysine (K), cystéine (C), histidine (H), arginine (R) et tyrosine (Y)) dues aux traitements par les sensibilisants étudiés. La tolérance de masse des peptides précurseurs et des fragments est fixée à 10,0 ppm et à 0,02 Da, respectivement. Et enfin, le taux de faux-positifs de protéines autorisé est inférieur 1% (FDR < 1%).

4. Traitement des données

Les données de la recherche par Mascot sont ensuite importées dans le logiciel Proline-Zero 2.0 (<http://proline.profiroteomics.fr/>). Ces résultats bruts sont validés aux niveaux des PSMs (score ≥ 40 , FDR < 1%) et des protéines (FDR < 1%). La liste des peptides et des protéines identifiées est exportée sous forme de fichiers Excel. Enfin, les modifications des protéines provoquées par les sensibilisants étudiés sont évaluées et recensées sur ces fichiers.

Afin de valider la localisation d'une modification, les spectres de fragmentation de peptides précurseurs modifiés sont inspectés manuellement. Une modification est validée dans le cas où le spectre de fragmentation montre la présence des ions fragments (ions y et b dans notre cas) autour du site modifié. Par contre, si le spectre de fragmentation ne présente pas des ions fragments encadrants l'acide aminé modifié, la localisation exacte de la modification est ambiguë dans le peptide observé, auquel cas il s'agit d'une modification non-validée.

IV. Résultats

Dans cette partie, nous présenterons tout d'abord des modifications d'une protéine purifiée, la BSA, exposée aux trois allergènes différents (anhydride phtalique, 2,3-diphénylcyclopropénone et *p*-tolylisocyanate). Puis nous étudierons des changements du protéome des épidermes humains reconstitués provoqués par ces trois allergènes pour avoir une vue générale du processus d'allergie cutanée et respiratoire.

1. Modifications de la protéine purifiée (BSA) exposée aux différents allergènes

1.1. Modifications de la BSA par l'anhydride phtalique

Comme nous l'avons présenté précédemment dans le chapitre 3, l'anhydride phtalique est capable de former deux types d'adduit avec l'acide aminé lysine : l'adduit de type amide (+149

Da) et l'adduit cyclisé de type imide (+131 Da) (**Schéma V-1**).

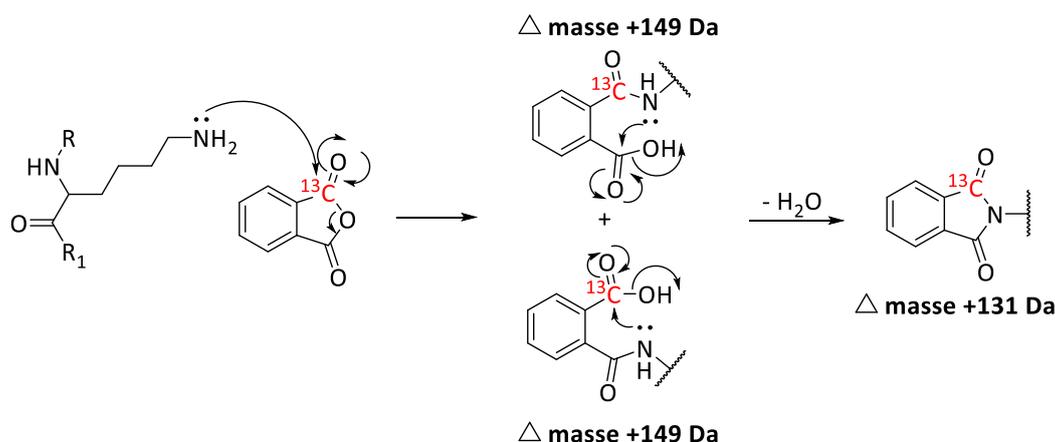


Schéma V-1. Types de modification de l'anhydride phthalique

Dans l'analyse protéomique par LC-MS/MS, nous avons cherché ces deux types de modification (+149 Da et +131 Da) sur les résidus nucléophiles modifiables (K, C, H, R, Y)^[95] dans la protéine afin de couvrir toutes les possibilités. Un total de 45 résidus de la BSA ont été modifiés par l'anhydride phthalique. Parmi eux, 15 modifications sont validées par la présence des ions fragments encadrants de site modifié (**Figure V-17**).

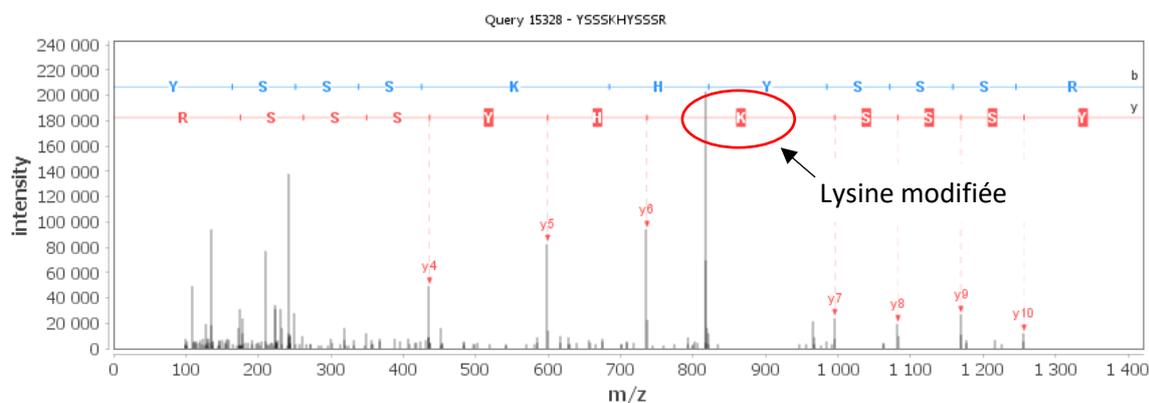


Figure V-17. Spectre MS/MS d'un peptide contenant la lysine modifiée confirmée par deux fragments y6 et y7

L'anhydride phthalique forme initialement l'adduit +149 Da avec les résidus lysines, histidines et tyrosines. Ces adduits peuvent ensuite être transformés en adduits cyclisés (+131 Da) en éliminant une molécule d'eau. L'adduit cyclisé n'est observé que sur les résidus lysines. Nous avons trouvé que la majorité des modifications de l'anhydride phthalique se forment sur les

résidus lysines (35 modifications, dont 14 sont validées par la présence des ions fragments encadrants). Un petit nombre des résidus histidines (3 modifications, dont aucune n'est validée) et tyrosine (7 modifications, dont 1 est validée) sont hapténisés par l'anhydride phtalique. Alors qu'aucune cystéine et arginine modifiée n'est détectée (**Figure V-18**).

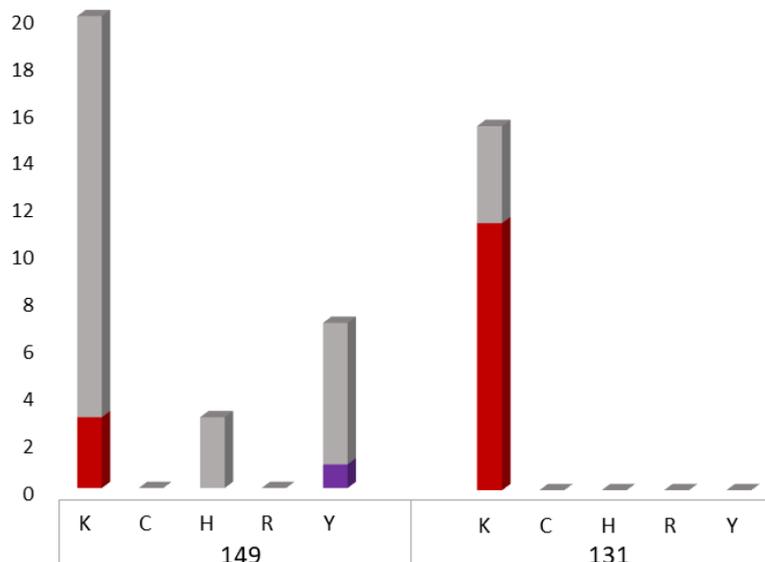


Figure V-18. Nombre de résidus de la BSA modifiés par le PA (barres colorées : modifications validées par la présence des ions fragments encadrants, barres grises : modifications non-validées par la présence des ions fragments encadrants)

L'anhydride phtalique est connu comme un allergène respiratoire fort et a montré une réactivité avec la lysine dans le test du DPRA ainsi que dans notre étude avec des acides aminés isolés. Ainsi, ce résultat obtenu en analyse par LC-MS/MS est en accord avec la théorie car la majorité des modifications identifiées sont trouvées sur les résidus lysines tandis qu'aucune cystéine n'est modifiée. Par ailleurs, quelques résidus histidines et tyrosines hapténisés par l'anhydride phtalique sont également détectés. Cette différence peut être due à la réactivité différente entre des acides aminés isolés et une protéine composée par plusieurs acides aminés différents, ou à la haute sensibilité de la spectrométrie de masse par rapport à la RMN permettant de détecter des modifications même en petite quantité.

1.2. Modifications de la BSA par la 2,3-diphénylcyclopropénone

On rappelle que la 2,3-diphénylcyclopropénone (DCP) est un sensibilisant cutané fort qui a montré une réactivité principalement avec la cystéine d'après les résultats du DPRA. Décrit précédemment dans le chapitre 3, selon Eicher et Weber^[226], la DCP réagit avec la cystéine par addition nucléophile du groupement thiol sur le groupement carbonyle de la DCP, accompagnée de l'ouverture du cycle cyclopropénique pour former des adduits entraînant

une augmentation de masse de +207 Da (**Schéma V-2**). Par ailleurs, d'après Parkinson *et al.*^[227], la DCP réagit avec la cystéine par addition nucléophile du groupement thiol sur la double liaison dans le cycle cyclopropénique pour former des dérivés de cyclopropanone instables. Ceux-ci subissent soit une oxydation du soufre pour former des adduits d'oxydation (+223 Da), soit une addition d'eau sur le carbonyle impliquant l'ouverture du cycle cyclopropanique pour former des adduits avec l'augmentation de masse de +225 Da (**Schéma V-2**).

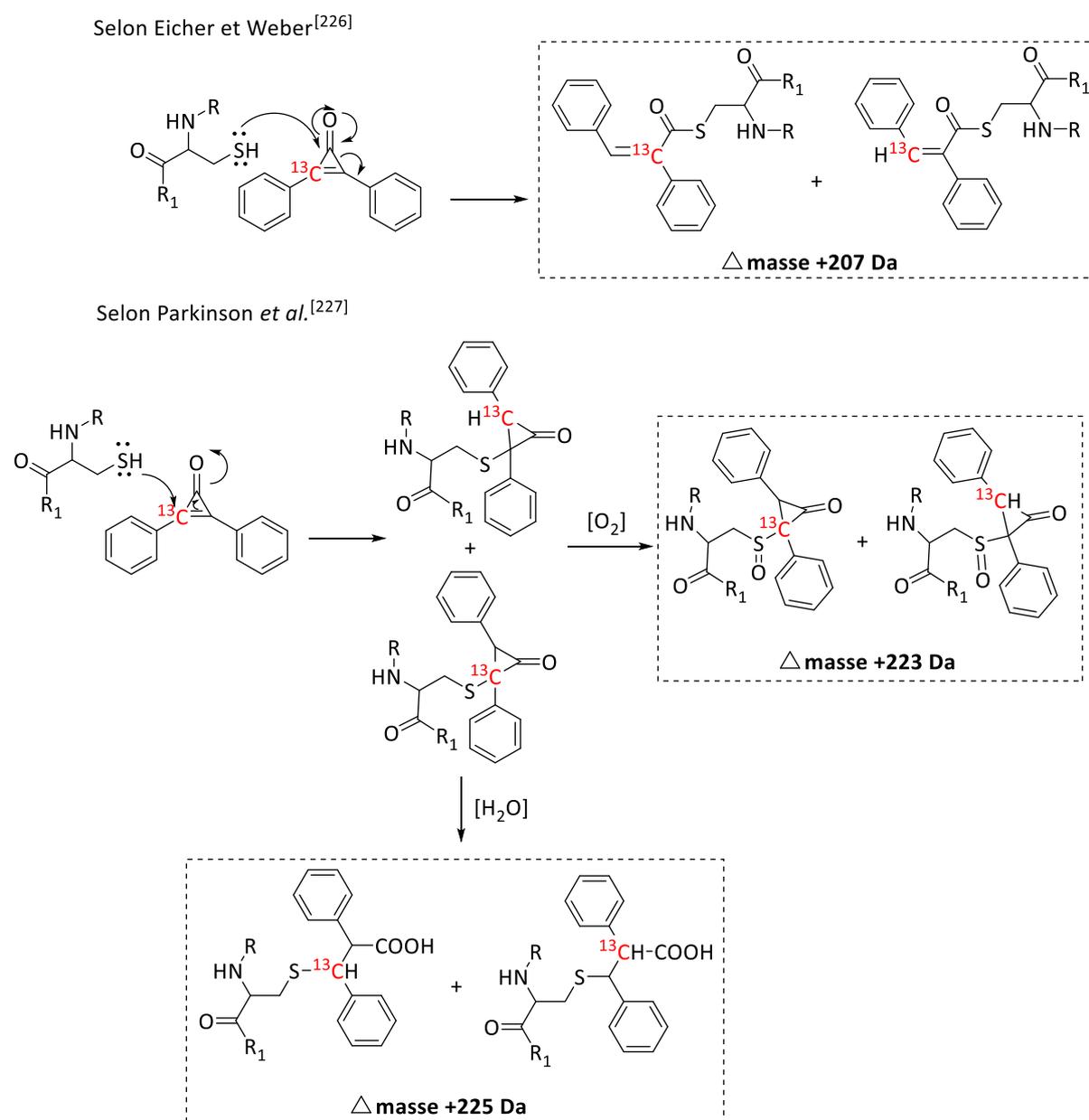


Schéma V-2. Types de modification de la 2,3-diphénylcyclopropénone

Ainsi, dans l'analyse des spectres MS/MS de la BSA exposée à la DCP, nous avons cherché

toutes ces modifications possibles (+207 Da, +223 Da et +225 Da) sur les résidus nucléophiles modifiables (K, C, H, R, Y).

Nous avons identifié 34 résidus modifiés par la DCP dont 14 modifications confirmées par les ions fragments encadrants. Ce niveau de modification est comparable à celui de deux allergènes cutanés forts, le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (DNCB) et le 5-chloro-2-méthyle-4-isothiazol-3-one (MCI), obtenu dans l'étude de Parkinson *et al.*^[338] dans laquelle ils ont observé 34 modifications du DNCB et 33 modifications du MCI sur l'albumine sérique humaine (HSA), une protéine modèle similaire à la BSA. Cependant, le taux des résidus modifiés par la DCP dans notre étude est moins important que celui rapporté par Parkinson *et al.*^[227] qui ont détecté 49 résidus d'HSA modifiés par la DCP, dont 28 modifications sont validées sur les spectres MS/MS. Cela pourrait potentiellement s'expliquer par des différences de conditions d'incubation telles que le tampon, le temps d'incubation ou la concentration de l'allergène.

Nous avons observé uniquement des adduits +207 Da et +225 Da et aucun adduit d'oxydation +223 Da n'a été détecté (**Figure V-19**). Cela pourrait être expliqué par l'absence d'agents oxydants dans le milieu réactionnel. Nous avons trouvé que les adduits +207 Da se localisent principalement sur les résidus lysines tandis que les adduits +225 Da sont détectés sur les résidus lysines, cystéines, histidines et arginines.



Figure V-19. Nombre des résidus de la BSA modifiés par la DCP (barres colorées : modifications validées par la présence des ions fragments encadrants, barres grises :

modifications non-validées par la présence des ions fragments encadrants)

D'après les résultats du DPRA, la DCP devrait avoir une forte affinité envers les résidus thiolés. Notre étude de sa réactivité vis-à-vis des acides aminés et du GSH est aussi en accord avec le test du DPRA. De plus, la DCP a également montré d'une réactivité avec la *N*-Ac-His. Cependant, la réaction avec la BSA montre que la DCP modifie principalement les résidus lysines (18 modifications, dont 8 sont confirmées par spectre MS/MS) alors qu'il y a 7 résidus cystéines modifiés, dont 3 modifications validées manuellement (C288, C499, C537). Par ailleurs, nous avons également détecté 7 histidines modifiées (2 modifications validées) et 2 arginines modifiées (1 modification validée). Le grand nombre des résidus lysines modifiés par rapport aux autres résidus nucléophiles (C, H, R) pourrait être expliqué par la haute abondance de la lysine (60 résidus) dans la BSA. De manière surprenante, les 7 cystéines hapténisées sont des cystéines impliquées dans les ponts disulfures (C77, C86, C288, C499, C537, C581 et C582) tandis que la seule cystéine libre dans BSA (C58) n'a pas été modifiée. Cela a également été observé dans l'étude de Parkinson *et al.*^[227], dans laquelle l'acrylate d'éthyle (un allergène cutané) a modifié 3 cystéines de l'HSA (C34, C53, C514). Parmi elles, les cystéines C53 et C514 sont impliquées dans les ponts disulfures. Il est probable que les ponts disulfures sont réduits dans le milieu réactionnel pour former des thiols libres avant d'être modifiés par la DCP.

1.3. Modifications de la BSA par le *p*-tolylisocyanate

Comme précédemment décrit, le *p*-tolylisocyanate est un allergène mixte et a montré une réactivité à la fois avec la lysine et la cystéine pour former des adduits de type urée et thiocarbamate, respectivement, avec une augmentation de masse de +134 Da (**Schéma V-3**).

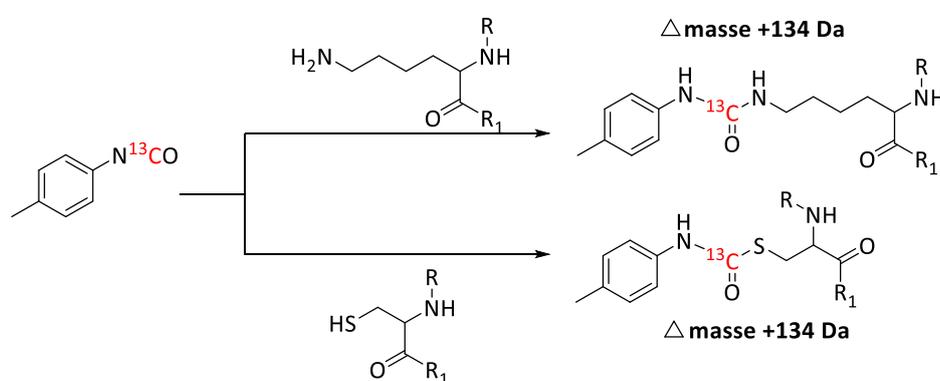


Schéma V-3. Types de modification du *p*-tolylisocyanate

En cherchant cette modification sur les acides aminés nucléophiles (K, C, H, R, Y), nous avons déterminé que 43 résidus de la BSA ont été modifiés par le *p*-tolylisocyanate. Parmi eux, 13 modifications sont validées par les ions fragments encadrants. Les modifications sont principalement trouvées sur les résidus lysines (32 lysines modifiées, 12 modifications validées). Nous avons également observé des modifications sur les autres résidus tels que l'histidine (7 résidus modifiés, 1 modification validée), l'arginine (2 résidus modifiés, aucune modification validée) et la tyrosine (4 résidus modifiés, aucune modification validée). Par contre, aucune cystéine modifiée n'est détectée (**Figure V-20**).

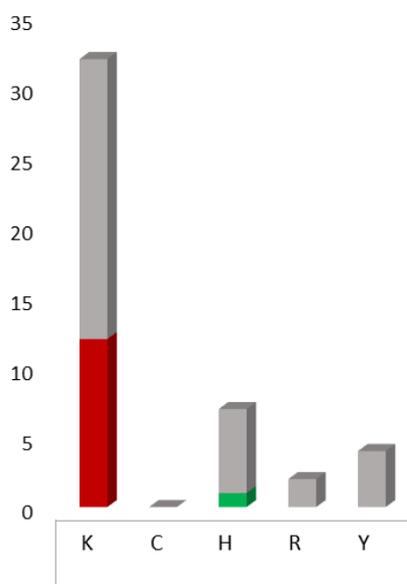


Figure V-20. Nombre des résidus de la BSA modifiés par le *p*-tolylisocyanate (barres colorées : modifications validées par la présence des ions fragments encadrants, barres grises : modifications non-validées par la présence des ions fragments encadrants)

Ce résultat n'est pas tout à fait en accord avec celui obtenu dans les tests avec des acides aminés en solution. En tant que sensibilisant mixte, le *p*-tolylisocyanate devrait réagir à la fois avec les résidus lysines et cystéines. Toutefois, nous n'avons identifié aucun résidu cystéine modifié. Ce résultat anormal pourrait être expliqué par le grand nombre des résidus lysines (60) par rapport à un seul résidu cystéine libre dans la structure de la BSA. De plus, comme nous l'avons dit précédemment, les adduits de type thiocarbamate ne sont pas stables dans des conditions de pH légèrement basique^[281]. En présence de résidus lysines, ces adduits peuvent être transformés en adduits de type urée irréversibles^[280].

2. Etude des changements protéomiques des épidermes humains reconstitués (RHE) exposés aux différents allergènes

Comme dans le cas de la BSA, les modifications possibles sont cherchées sur les résidus

nucléophiles modifiables (K, C, H, R, Y) dans les protéines épidermiques. Les épidermes humains reconstitués « blancs » sont analysés parallèlement aux épidermes exposés aux allergènes.

2.1. Epidermes humains reconstitués « blancs »

En analysant les épidermes « blancs », nous avons identifié 953 protéines. Afin de connaître l'abondance des protéines présentes dans l'épiderme, la teneur des protéines (mol%) a été calculée en utilisant la valeur emPAI obtenue par le logiciel Mascot. La **Figure V-21** ci-dessous montre les 30 protéines les plus abondantes dans l'épiderme « blanc ».

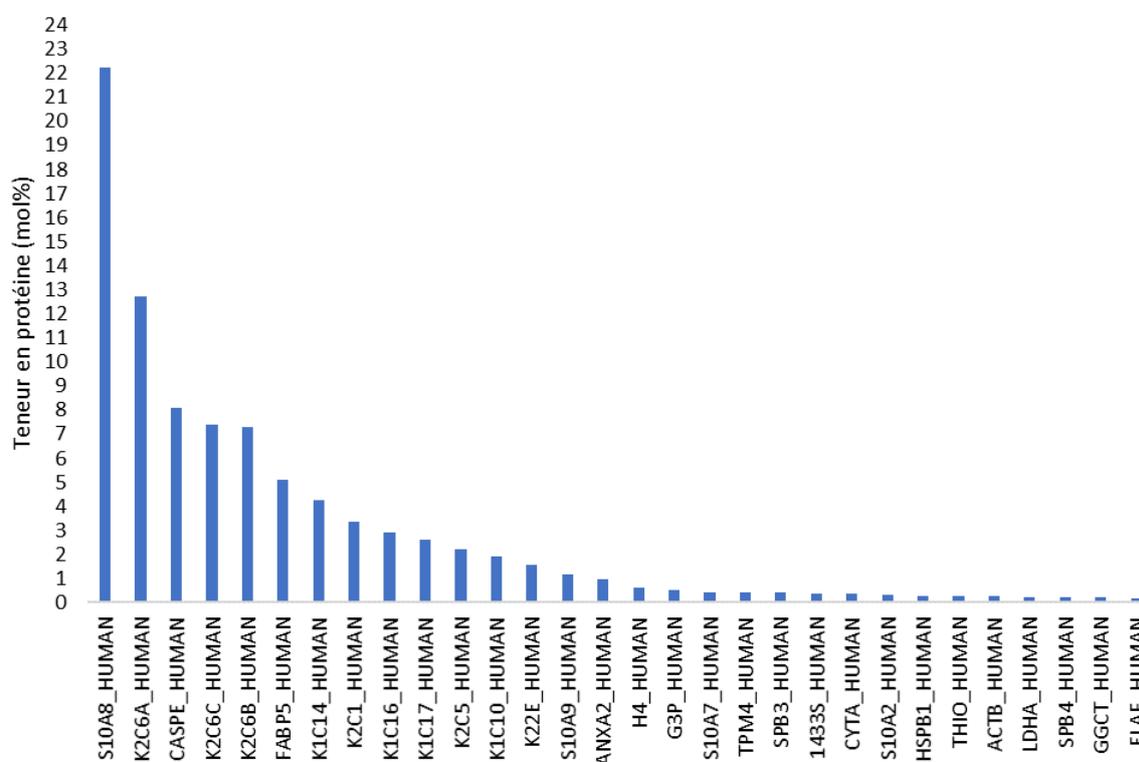


Figure V-21. Liste de 30 protéines les plus abondantes présentes dans l'épiderme « blanc »

Nous avons trouvé que la protéine S100-A8 (S10A8), la caspase (CASPE) et surtout les kératines (K2C6A, K2C6B, K2C6C, K1C14, K2C1, K1C16, K1C17, K2C5, K2C10) sont des protéines très abondantes dans l'épiderme. Par ailleurs, des protéines en très faibles abondances telles que la myosine, le cytochrome P450, les protéines transmembranaires, la glucosamine-6 phosphate, etc... ont également été identifiées. La large gamme dynamique de la spectrométrie de masse, qui permet de détecter simultanément des protéines peu abondantes et très abondantes, pourrait être utile dans notre recherche des protéines

spécifiques modifiées par les différents allergènes.

2.2. Epidermes humains reconstitués exposés à l'anhydride phtalique

Nous avons identifié 948 protéines dans le lysat de l'épiderme EpiSkin™ exposé à l'anhydride phtalique (PA). Parmi ces protéines identifiées, 135 protéines sont modifiées par le PA, équivalant à 14,2% des protéines totales.

Au niveau des acides aminés, le PA modifie principalement des résidus lysines alors qu'aucune modification de cystéine n'a été détectée. Le profil de réactivité du PA a été observé dans les études de Gerberick *et al.* qui ont montré que le PA réagit avec le peptide lysine mais pas avec le peptide cystéine^[4, 5]. De plus, nous avons également observé d'autres résidus nucléophiles hapténisés tels que l'histidine, l'arginine et la tyrosine. Ainsi, un total de 886 acides aminés dans la protéome de l'épiderme EpiSkin™ ont été modifiés par PA, dont 211 modifications sont validées par la présence des ions fragments encadrants.

Concrètement, nous avons identifié 475 résidus lysines modifiés (154 modifications validées), associés à 122 protéines (12,9% du protéome épidermique) ; 183 résidus histidines modifiés (22 modifications validées), associés à 42 protéines (4,4%) ; 109 résidus arginines modifiés (5 modifications validées), associés à 25 protéines (2,6%) et 119 résidus tyrosines modifiés (30 modifications validées), associés à 58 protéines (6,1%). Le taux de résidus modifiés par PA en proportion du nombre total de résidus nucléophiles modifiables dans l'épiderme EpiSkin™ est faible. Les modifications de PA sont principalement localisées sur les résidus lysines, tandis que les résidus histidines, arginines et tyrosines sont peu modifiés (**Figure V-22**).

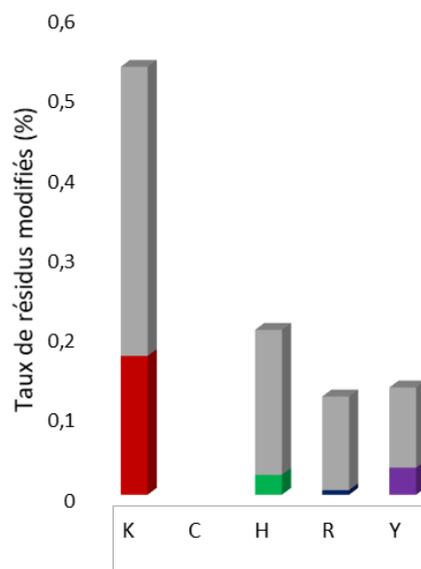


Figure V-22. Pourcentage de résidus nucléophiles modifiables hapténisés par PA dans les épidermes EpiSkin™ (barres colorées : modifications validées par la présence des ions fragments encadrants, barres grises : modifications non-validées par la présence des ions fragments encadrants)

Au niveau des protéines, les protéines principalement modifiées sont des protéines de type kératine (K2C6A, K2C6B, K2C6C, K1C10, K2C1, K1C16, K2C5, K1C14, K22E) et d'autres protéines telles que l'annexine 2 (ANXA2), la serpine (SPB3), etc... qui sont les protéines très abondantes dans l'épiderme. Résultat particulier, la filaggrine (FILA), une grosse protéine, moins abondante (0,0266 mol%) et très riche en histidine et arginine, est fortement modifiée sur plusieurs résidus histidines et arginines. De plus, la trichohyaline (TRHY) et la plakoglobine (PLAK) qui sont également des protéines de faible abondance (0,0115 mol% et 0,0233 mol% respectivement), sont fortement modifiées par le PA (**Figure V-23**).

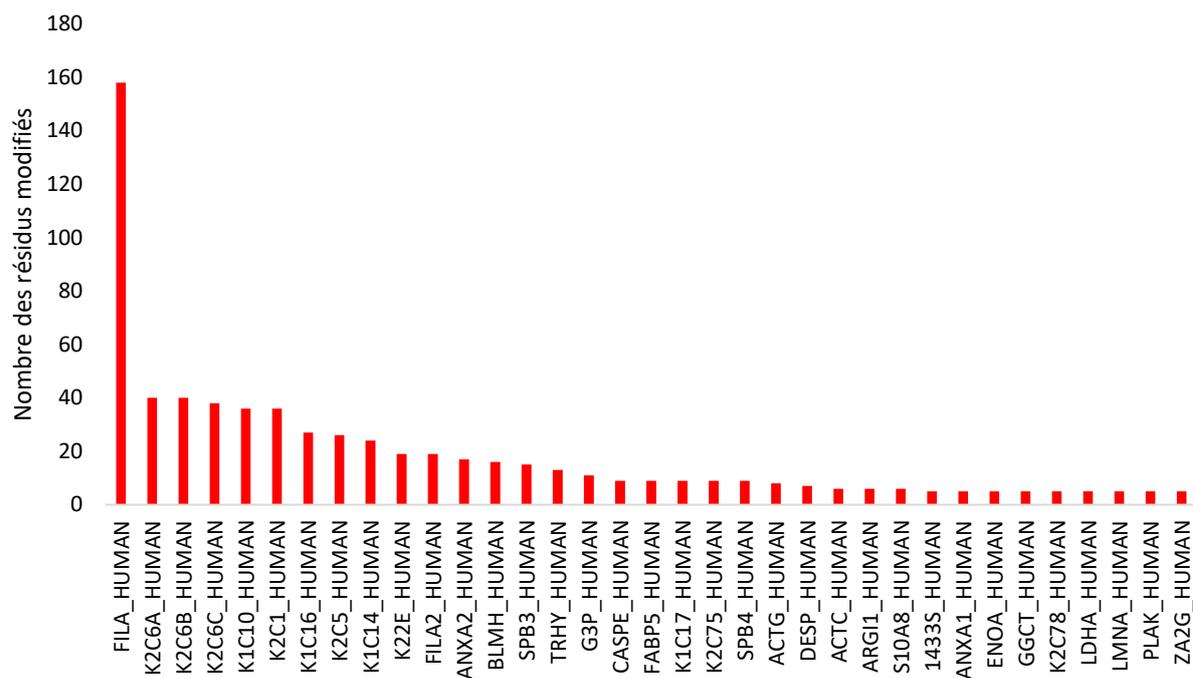


Figure V-23. Liste des protéines fortement modifiées par PA

Le pourcentage des résidus nucléophiles modifiables (K, C, H, R et Y) dans chaque protéine identifiée dans les épidermes EpiSkin™ est calculé et les protéines sont classées dans l'ordre décroissant de leur concentration nucléophile. La cartographie des protéines hapténisées montre qu'il n'y a pas de corrélation entre la modification et la concentration nucléophile des protéines (**Figure V-24A**). En effet, nous avons observé des modifications sur les protéines ayant une haute concentration en résidus nucléophiles ainsi que sur des protéines ayant une faible concentration en résidus nucléophiles. Ainsi, la concentration nucléophile n'est pas un facteur déterminant pour l'hapténation des protéines dans nos conditions expérimentales.

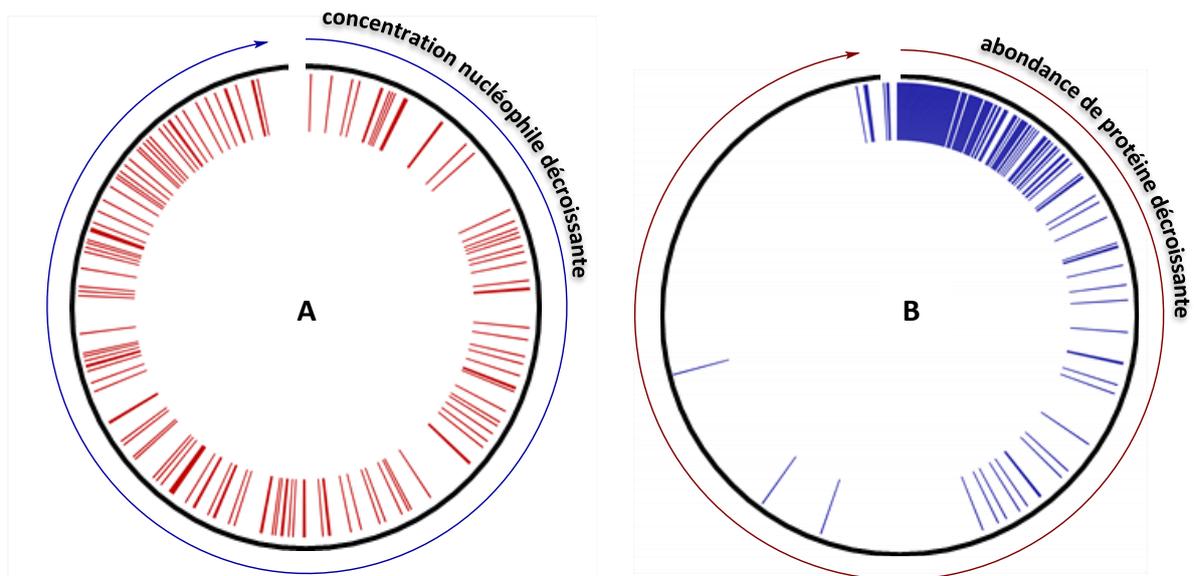


Figure V-24. Représentation circulaire dans le sens décroissant de la concentration nucléophile (A) et de l'abondance (B) de chaque protéine identifiée dans l'épiderme humain reconstitué EpiSkin™. Les protéines modifiées par PA observées dans cette étude sont mises en évidence dans ces représentations circulaires, pour montrer la relation de la concentration nucléophile et de l'abondance des protéines avec l'hapténation par PA.

Afin de tester l'hypothèse de l'influence de l'abondance des protéines sur l'hapténation, nous avons classé les protéines dans un ordre décroissant d'abondance (**Figure V-24B**). Nous avons trouvé que la majorité des protéines modifiées sont des protéines très abondantes, à savoir les kératines (K2C6A, K2C6C, K2C6B, K1C14, K2C1, K1C10, K2C5), l'annexine A2 (ANXA2), la protéine de liaison aux acides gras 5 (FABP5), etc... Cependant, nous avons également observé des protéines moins abondantes hapténisées par le PA telles que la protéine contenant les domaines LRR et PYD 10 (NAL10), l'albumine (ALBU) et la glycogène phosphorylase (PYGL). Par conséquent, l'abondance des protéines influence l'hapténation des protéines, mais ce n'est pas le seul facteur à l'origine de la modification.

En tenant compte du nombre de modifications selon le type des adduits formés, nous avons trouvé que les modifications sont majoritairement les adduits de type amide (adduit +149 Da). Un petit nombre d'adduits de type imide (adduit +131 Da), qui sont formés par la cyclisation des adduits de type amide, sont principalement trouvés sur les résidus lysines (84 lysines modifiées, dont 60 modifications sont validées grâce aux ions fragments encadrants), mais aussi sur les résidus histidines (3 histidines modifiées, aucune modification n'est validée)

et arginines (5 arginines modifiées, aucune modification n'est validée) (**Figure V-25**). Toutefois, d'un point de vue chimique, les adduits cyclisés +131 Da des résidus histidines ne peuvent pas être formés à partir des adduits de type amide tertiaire des résidus histidines comme dans les cas des résidus lysines et arginines (**Schéma V-4**).

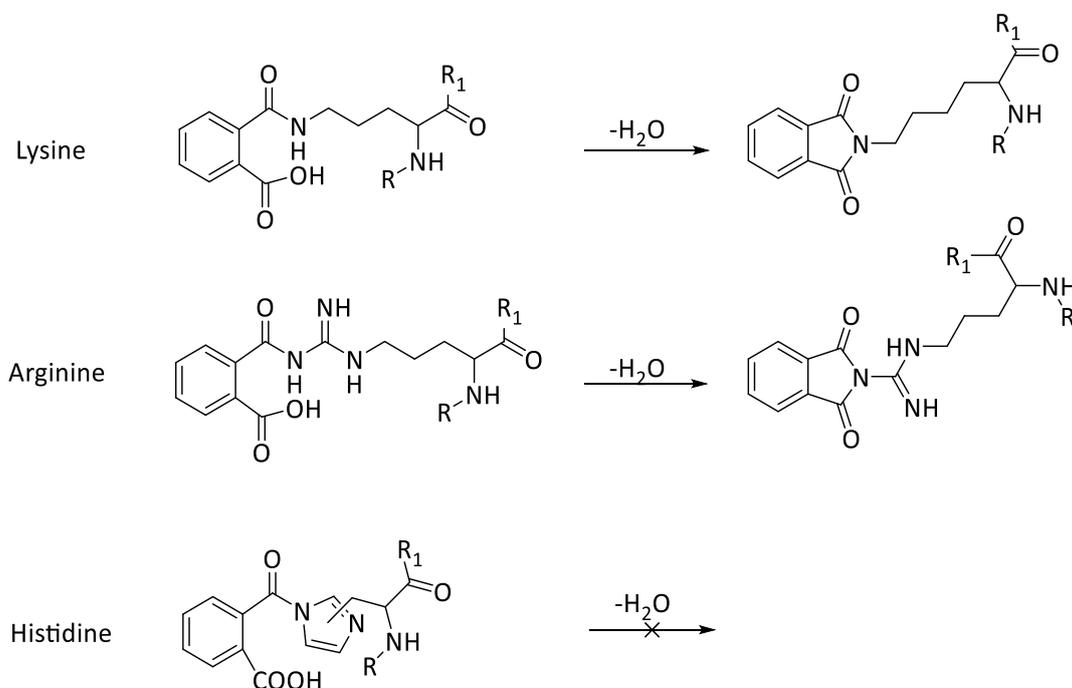


Schéma V-4. Formation des adduits cyclisés sur les résidus lysines et arginines

En observant les peptides précurseurs qui contiennent des modifications +131 Da sur les résidus histidines, nous avons trouvé que ces peptides comportent également les résidus lysines et/ou arginines. Ainsi, les modifications +131 Da observées sur les résidus histidines, dont la localisation exacte sur la séquence peptidique n'a pas été validée sur le spectre MS/MS, pourraient être localisées sur les résidus lysines ou arginines.

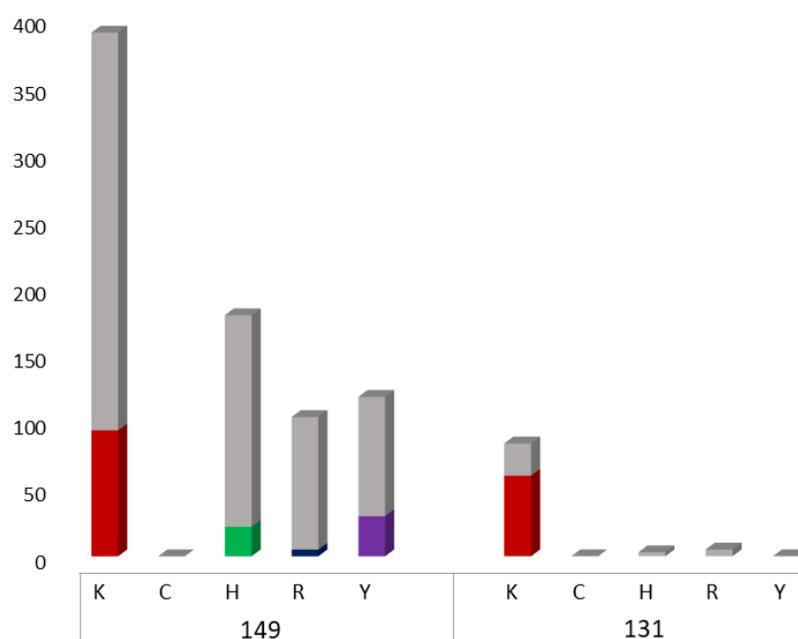


Figure V-25. Nombre des résidus modifiés par PA selon le type de modification (barres colorées : modifications validées par la présence des ions fragments encadrants, barres grises : modifications non-validées par la présence des ions fragments encadrants)

2.3. Epidermes humains reconstitués exposés à la 2,3-diphénylcyclopropénone

En analysant les épidermes EpiSkin™ exposés à la 2,3-diphénylcyclopropénone, nous avons identifié 1052 protéines. Parmi elles, il y a 71 protéines modifiées par la DCP, équivalant à 6,7% des protéines totales.

Au niveau des acides aminés, comme dans le cas de la BSA, nous avons identifié des modifications non seulement sur les résidus cystéines mais aussi sur d'autres acides aminés tels que la lysine, l'histidine, l'arginine et la tyrosine. Ce profil de réactivité de la DCP avec les protéines épidermiques a également été observé par Parkinson *et al.* qui ont étudié la modification des protéines dans la lignée de cellules humaines HaCaT^[227]. Ainsi, un total de 340 acides aminés dans le protéome de l'épiderme EpiSkin™ ont été hapténisés par DCP. Parmi eux, 152 modifications sont confirmées par les spectres de fragmentation à haute qualité MS/MS. De manière détaillée, nous avons identifié 136 résidus lysines modifiés (75 modifications validées), associés à 49 protéines (4,7% du protéome épidermique) ; 103 résidus cystéines modifiés (64 modifications validées), associés à 49 protéines (4,7%) ; 28

résidus histidines modifiés (7 modifications validées), associés à 8 protéines (0,8%) ; 66 résidus arginines modifiés (1 modification validée), associés à 24 protéines (2,3%) et 7 résidus tyrosines modifiés (5 modifications validées), associés à 6 protéines (0,6%).

Par rapport à l'anhydride phtalique, le pourcentage de résidus hapténisés par DCP en proportion du nombre total de résidus nucléophiles modifiables dans l'épiderme EpiSkin™ est plus faible (**Figure V-26**). Les modifications de DCP sont principalement localisées sur les résidus lysines et cystéines, tandis que les résidus histidines, arginines et tyrosines sont peu modifiés.

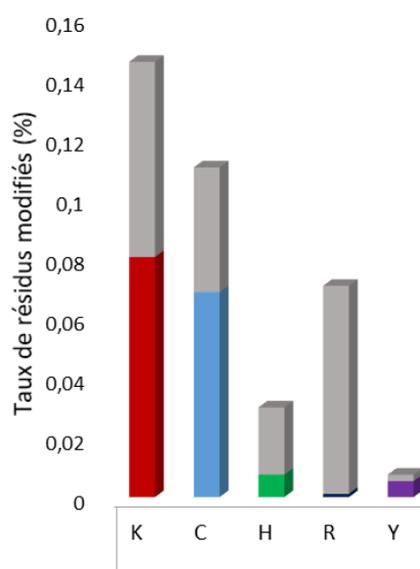


Figure V-26. Pourcentage de résidus nucléophiles modifiables hapténisés par DCP dans les épidermes EpiSkin™ (barres colorées : modifications validées par la présence des ions fragments encadrants, barres grises : modifications non-validées par la présence des ions fragments encadrants)

Comme dans le cas de l'anhydride phtalique, au niveau des protéines, les protéines abondantes de type kératine (K2C6A, K2C6B, K2C6C, K2C5, K1C10, K1C14, K1C17, K22E) sont principalement touchées. À nouveau, la filaggrine (FILA) est fortement modifiée sur plusieurs résidus histidines et arginines (**Figure V-27**).

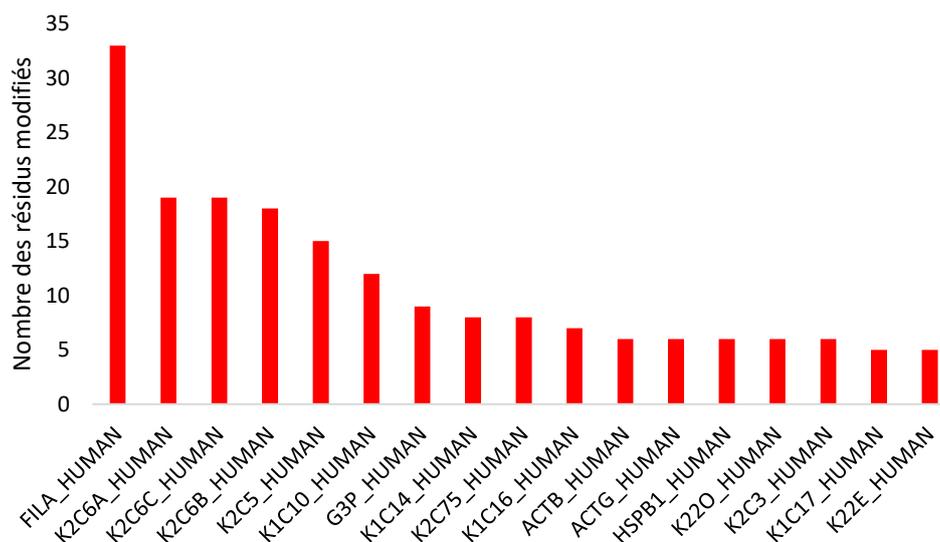


Figure V-27. Liste des protéines fortement modifiées par DCP

L'hapténation par DCP n'est pas dépendante de la concentration nucléophile des protéines (**Figure V-28A**). Elle est influencée par l'abondance des protéines présentes dans l'épiderme (**Figure V-28B**). En effet, bien qu'il y ait des protéines moins abondantes modifiées telles que l' α -fétoprotéine (FETA), la tubuline β -8 (TBB8) et la protéine membranaire (TMED7), les protéines majoritairement modifiées sont les plus abondantes, à savoir les kératines (K2C6A, K2C6B, K2C6C, K1C14), la caspase (CASPE), la protéine de liaison aux acides gras 5 (FABP5) ou l'annexine 2 (ANXA2), etc...

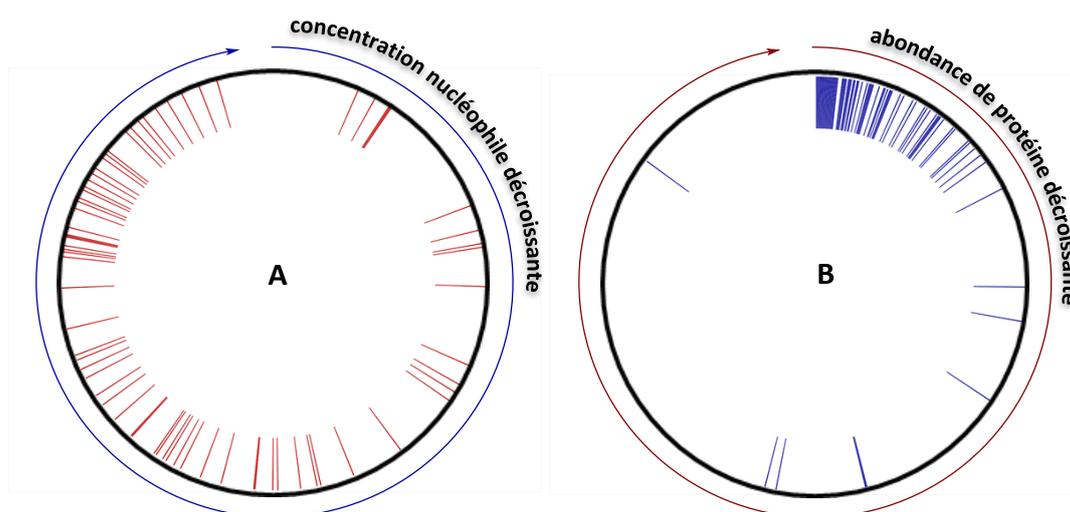


Figure V-28. Représentation circulaire dans le sens décroissant de la concentration nucléophile (A) et de l'abondance (B) de chaque protéine identifiée dans l'épiderme humain reconstitué EpiSkin™. Les protéines modifiées par DCP observées dans cette étude sont

mises en évidence dans ces représentations circulaires, pour montrer la relation de la concentration nucléophile et de l'abondance des protéines avec l'hapténation par DCP.

Au niveau de la nature des modifications, nous avons observé 3 types d'adduits formés, y compris les adduits +207 Da, +223 Da et +225 Da (**Figure V-29**).

Différent de la réactivité de la DCP avec la protéine purifiée (BSA), on observe la formation d'adduits d'oxydation +223 Da qui sont formés dans les épidermes humains reconstitués. Cette formation pourrait être expliquée par la présence de plusieurs enzymes oxydants dans les épidermes tels que les peroxydases et les cytochromes P450. Cependant, contrairement à la théorie où les adduits d'oxydation +223 Da sont trouvés sur les résidus cystéines^[227], dans notre cas, ce type d'adduit se localise sur les résidus histidines (8 modifications) et arginines (13 modifications) de la filaggrine (FILA). La localisation de ces modifications n'a pas pu être confirmée car aucune modification n'est validée par la présence des ions fragments encadrants du site modifié. En observant les peptides précurseurs modifiés, nous avons trouvé que ces peptides contiennent au moins 2 résidus cystéines. Ainsi, il est possible que les adduits d'oxydation observés sur les résidus histidines et arginines sont en réalité localisés sur les résidus cystéines.

Nous avons trouvé que la majorité des adduits +207 Da sont observés sur les résidus lysines (123 modifications, dont 73 sont confirmées), alors que les adduits +225 Da sont formés principalement avec les résidus cystéines (72 modifications, dont 49 sont confirmées) (**Figure V-29**). Cela est en accord avec la littérature mais pas avec le DPRA.

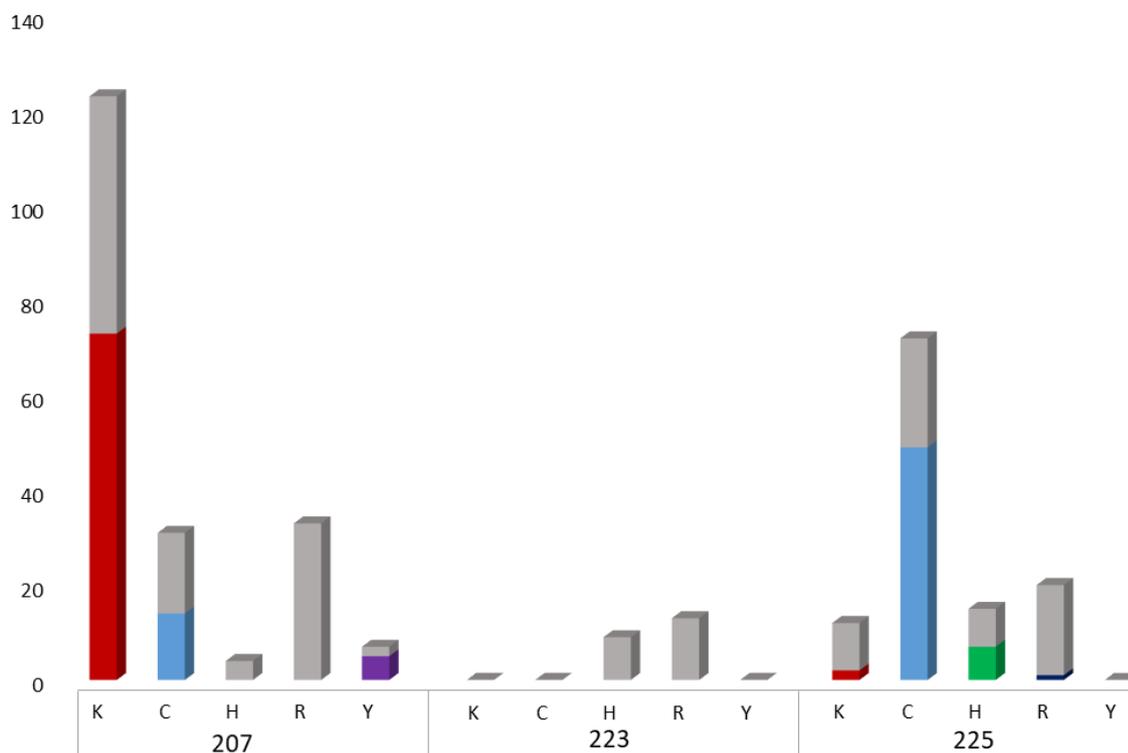


Figure V-29. Nombre des résidus modifiés par DCP selon le type de modification (barres colorées : modifications validées par la présence des ions fragments encadrants, barres grises : modifications non-validées par la présence des ions fragments encadrants)

2.4. Epidermes humains reconstitués exposés au *p*-tolylisocyanate

1036 protéines sont identifiées dans le lysat de l'épiderme EpiSkin™ exposé au *p*-tolylisocyanate. Parmi elles, il y a 153 protéines modifiées par le *p*-tolylisocyanate, équivalant à 14,8% des protéines totales.

Au niveau des acides aminés, le *p*-tolylisocyanate a modifié des résidus lysines, histidines, arginines et tyrosines alors qu'aucune cystéine modifiée n'a été détectée. Ce résultat est en accord avec celui obtenu avec la protéine isolée (BSA). De manière détaillée, un total de 675 résidus nucléophiles (K, H, R, Y) a été hapténisé par le *p*-tolylisocyanate, dont 266 modifications sont validées sur les spectres de fragmentation MS/MS. Parmi eux, il y a 491 résidus lysines modifiés (230 modifications validées), associés à 151 protéines (14,6% du protéome épidermique) ; 82 résidus histidines modifiés (15 modifications validées), associés à 14 protéines (1,4%) ; 52 résidus arginines modifiés (3 modifications validées), associés à 30

protéines (2,9%) et 50 résidus tyrosines modifiés (18 modifications validées), associés à 28 protéines (2,7%).

Le taux de résidus hapténisés par le *p*-tolylisocyanate en proportion du nombre total de résidus nucléophiles modifiables dans l'épiderme EpiSkin™ est équivalent à l'anhydride phtalique. Les modifications du *p*-tolylisocyanate sont principalement localisées sur les résidus lysines, tandis que les résidus histidines, arginines et tyrosines sont peu modifiés (**Figure V-30**).

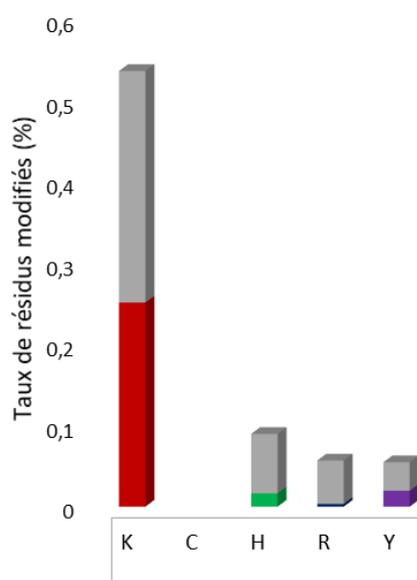


Figure V-30. Pourcentage de résidus nucléophiles modifiables hapténisés par *p*-tolylisocyanate dans les épidermes EpiSkin™ (barres colorées : modifications validées par la présence des ions fragments encadrants, barres grises : modifications non-validées par la présence des ions fragments encadrants)

Comme dans le cas de l'anhydride phtalique et de la 2,3-diphénylcyclopropénone, au niveau des protéines, les protéines de type kératine (K22E, K2C6A, K2C6B, K2C6C, K2C1, K2C5, K1C10, K1C14) sont principalement touchées. Encore une fois, les filaggrines (FILA et FILA2) sont fortement modifiées sur plusieurs résidus histidines et arginines. Une autre protéine moins abondante, la myosine 9 (MYH9) (0,0321 mol%) est très touchée par le *p*-tolylisocyanate (**Figure V-31**).

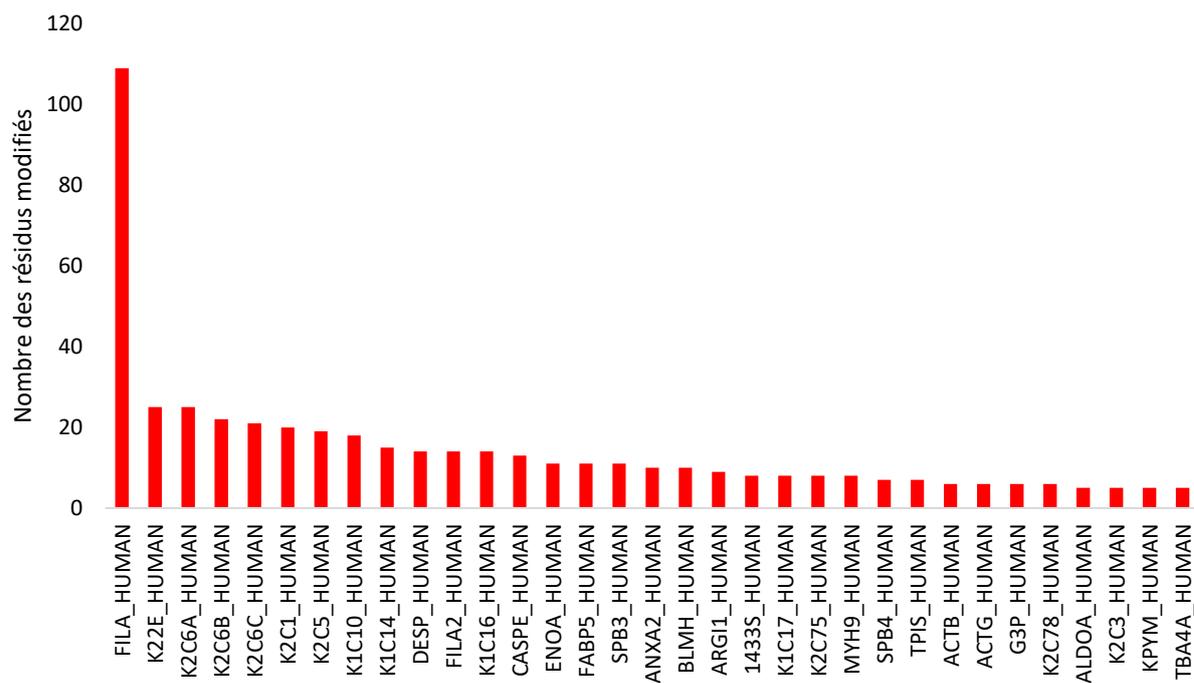


Figure V-31. Liste des protéines fortement modifiées par *p*-tolylisocyanate

À nouveau, nous avons trouvé que l'hapténation par le *p*-tolylisocyanate n'est pas dépendante de la concentration en nucléophile des protéines (**Figure V-32A**). En revanche, la modification des protéines est influencée par l'abondance des protéines présentes dans l'épiderme (**Figure V-32B**).

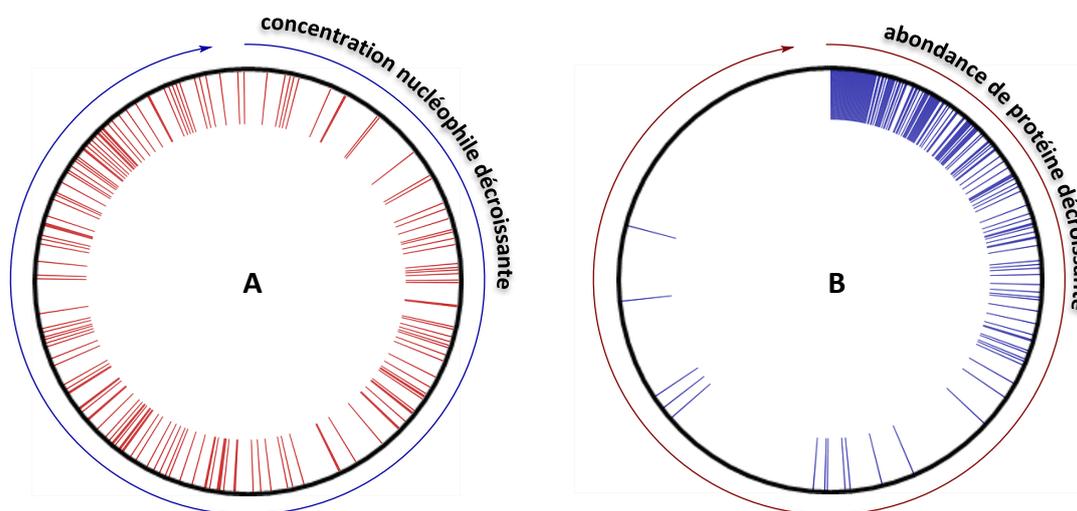


Figure V-32. Représentation circulaire dans le sens décroissant de la concentration nucléophile (A) et de l'abondance (B) de chaque protéine identifiée dans l'épiderme humain reconstitué EpiSkin™. Les protéines modifiées par *p*-tolylisocyanate observées dans cette étude sont mises en évidence dans ces représentations circulaires, pour montrer la relation

de la concentration nucléophile et de l'abondance des protéines avec l'hapténation par *p*-tolylisocyanate.

En effet, la plupart des protéines modifiées par le *p*-tolylisocyanate sont les protéines très abondantes telles que la protéine de liaison aux acides gras 5 (FABP5), la protéine S100-A8 (S10A8), la protéine S100-A9 (S10A9), les kératines (K2C6A, K2C6B, K2C6C, K1C14_HUMAN, K22E), la caspase (CASPE), etc... Néanmoins, comme dans le cas de l'anhydride phtalique et de la 2,3-diphénylcyclopropénone, nous avons également détecté quelques protéines de très faible abondance hapténisées par le *p*-tolylisocyanate, à savoir l'antigène d'histocompatibilité mineur H13 (HM13), la nardilysine (NRDC), la vinculine (VINC) et l'albumine (ALBU), etc... Ainsi, l'abondance des protéines n'est pas le seul facteur qui conduit l'hapténisation des protéines épidermiques par le *p*-tolylisocyanate.

V. Conclusions

Ce chapitre présente les résultats d'analyse protéomique des épidermes humains reconstitués exposés aux allergènes cutanés et respiratoires en utilisant la stratégie « shotgun proteomics ». Cette stratégie a montré l'efficacité et l'adaptation dans l'analyse protéomique des épidermes humains. Elle est capable d'identifier un grand nombre de protéines épidermiques plus ou moins abondantes.

Dans un premier temps, nous avons développé une méthode permettant d'extraire des protéines à partir des épidermes humains reconstitués. La combinaison du broyage à sec et du broyage avec le tampon de lyse SDS 1% permet de libérer et de solubiliser efficacement des protéines épidermiques dans la solution. C'est une étape essentielle dans la procédure d'analyse protéomique par LC-MS/MS.

Avant l'analyse protéomique des épidermes exposés aux allergènes de l'étude, la modification chimique d'une protéine simple (BSA) par les allergènes a tout d'abord été analysée. L'allergène respiratoire, l'anhydride phtalique (PA), a montré une forte affinité pour les résidus lysines. En effet, le PA forme deux types de modification (+149 Da et +131 Da) avec la BSA, principalement avec les résidus lysines, alors qu'aucune cystéine modifiée n'est identifiée. De manière intéressante, les résidus histidines et tyrosines sont de nouvelles cibles pour le PA dans la protéine modèle BSA et non observés auparavant dans les études de

réactivité avec des acides aminés et des peptides. La 2,3-diphénylcyclopropénone (DCP), un allergène cutané, qui a une affinité extrême pour la cystéine dans les tests *in vitro* avec des acides aminés et des peptides, a montré une forte réactivité avec les résidus lysines dans la BSA. En effet, deux types d'hapténation (+207 Da et +225 Da) sont trouvés principalement sur les résidus lysines. En dehors des lysines majoritairement modifiées, un petit nombre de cystéines ainsi que d'autres résidus histidines et arginines sont également modifiés par la DCP. Remarquons que la modification de cystéines, alors qu'il existe qu'une seule cystéine libre dans BSA, a déjà été observée par Parkinson *et al.*^[227] (**Figure V-33**). La réactivité différente de la DCP observée avec la BSA pourrait venir du grand nombre de lysines (60 résidus) par rapport à une seule cystéine libre dans la BSA.

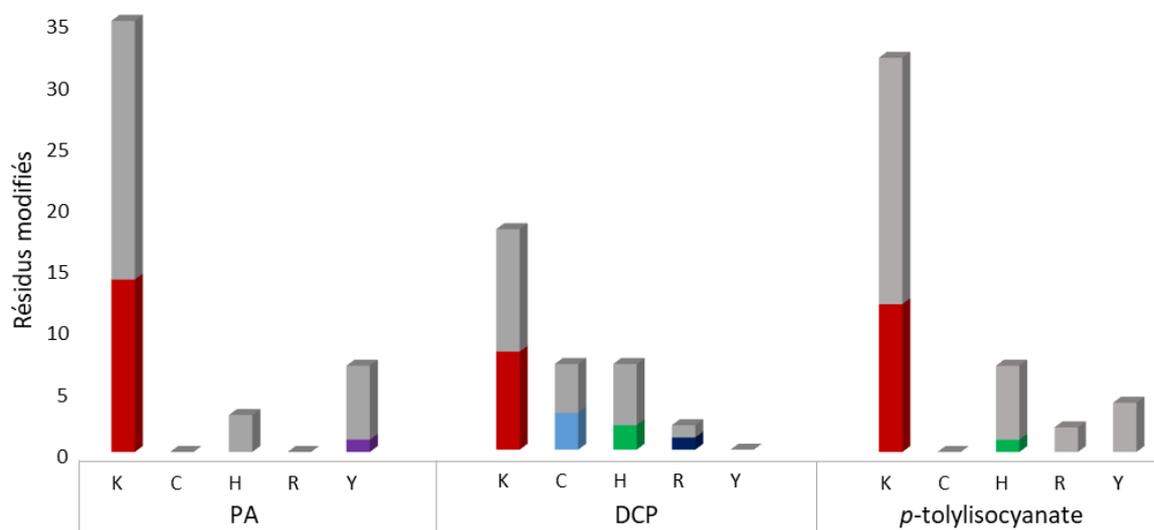


Figure V-33. Nombre de résidus nucléophiles de la BSA modifiés par PA, DCP et *p*-tolylisocyanate (barres colorées : modifications confirmées sur le spectre MS/MS, barres grises : modifications non-confirmées sur le spectre MS/MS)

D'après les tests de réactivité *in vitro* avec des acides aminés, le *p*-tolylisocyanate, un sensibilisant mixte, devrait réagir à la fois avec les résidus lysines et cystéines. Cependant, aucun résidu cystéine dans la BSA n'est modifié. Les modifications sont majoritairement trouvées sur les résidus lysines et un petit nombre sont détectés sur les résidus histidines, arginines et tyrosines. Comme nous l'avons dit précédemment, cette différence pourrait être la conséquence de la proportion des résidus lysines et cystéines libres dans la BSA et de l'instabilité des adduits thiocarbamates dans des conditions de pH légèrement basique. Par

ailleurs, l'effet stérique de la structure tertiaire et la compétition entre de nombreux résidus modifiables dans une protéine pourraient être des facteurs qui influencent l'hapténation des allergènes.

Comme avec la BSA, les allergènes modifient les protéines épidermiques de manière différente par rapport à leur réactivité avec des acides aminés ou des peptides en solution. En effet, l'anhydride phtalique et le *p*-tolylisocyanate modifient principalement les résidus lysines alors qu'aucune cystéine modifiée n'est détectée. La 2,3-diphénylcyclopropénone, quant à elle, modifie les protéines épidermiques à la fois sur les résidus lysines et cystéines. De plus, ces trois allergènes modifient également d'autres résidus nucléophiles tels que l'histidine, l'arginine et la tyrosine (**Figure V-34**).

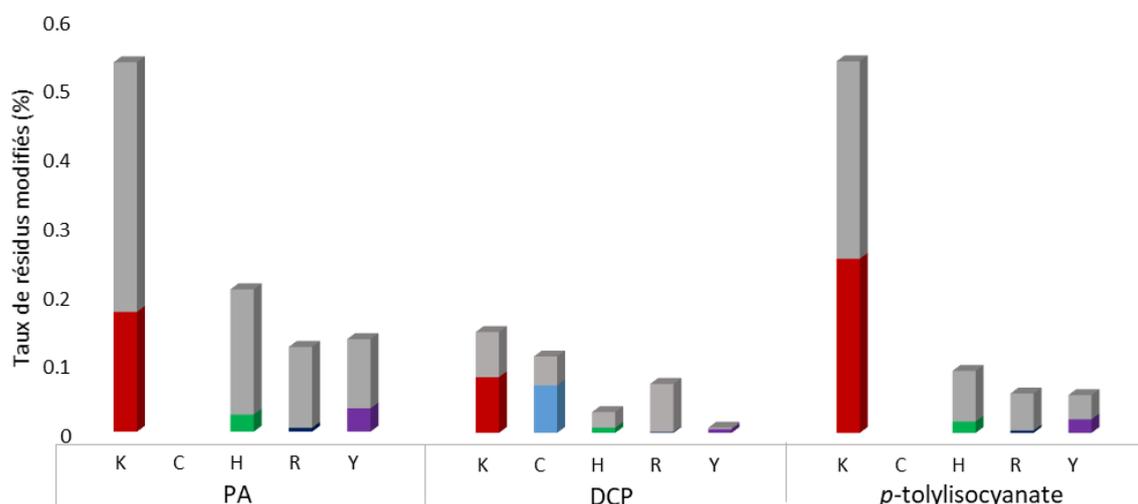


Figure V-34. Pourcentage de résidus nucléophiles dans les épidermes humains reconstitués modifiés par PA, DCP et *p*-tolylisocyanate (barres colorées : modifications confirmées sur le spectre MS/MS, barres grises : modifications non-confirmées sur le spectre MS/MS)

La différence de réactivité des allergènes vis-à-vis des épidermes reconstitués et des acides aminés ou des peptides modèles en solution pourrait être expliquée de plusieurs manières. Premièrement, par la différence du milieu réactionnel, les systèmes expérimentaux simples utilisés dans les tests *in vitro* avec les acides aminés ou les peptides diffèrent du milieu complexe de l'épiderme par la compétition entre les nombreuses protéines, la différence de pH biologique local ou la micro-biodisponibilité. Deuxièmement, le profil nucléophile de l'épiderme présente des niveaux de résidus de type amine considérablement plus élevés par

rapport aux thiols. En effet, le pourcentage des résidus lysines est de 5,7% tandis que celui des résidus cystéines libres n'est que de 0,9% dans l'épiderme humain^[276]. Cela pourrait amener à l'hapténation importante des protéines épidermiques au niveau de la lysine par la 2,3-diphénylcyclopropénone. Enfin, l'absence de la modification des résidus cystéines par l'allergène mixte, le *p*-tolylisocyanate, est également un point intéressant dans notre étude. Décrites dans la littérature, la majorité des liaisons formées entre les haptènes électrophiles et les résidus nucléophiles des protéines sont irréversibles dans des conditions physiologiques, à part les liaisons thiocarbamates qui sont totalement réversibles dans des conditions de pH légèrement alcalin^[281]. Fleischel *et al.* ont observé que, en présence de la *N*-Ac-Lys et à pH alcalin, les adduits de type thiocarbamate formés entre les isocyanates et la *N*-Ac-Cys sont convertis en adduits irréversibles de type urée avec la *N*-Ac-Lys^[280]. Ainsi, dans l'interaction du *p*-tolylisocyanate avec les protéines épidermiques, les adduits de type thiocarbamate formés pourraient être transformés en adduits de type urée des résidus lysines. De plus, comme nous l'avons dit précédemment, le faible taux des résidus cystéines par rapport aux lysines dans l'épiderme pourrait être une autre raison pour expliquer l'absence de la modification des résidus cystéines. En outre, il serait également possible que le *p*-tolylisocyanate, dans les conditions réelles de l'épiderme humain, n'a pas capacité de réagir avec les cystéines. En effet, à notre connaissance, l'adduit thiocarbamate de l'isocyanate avec les protéines n'a jamais été documenté dans la littérature. Les études de réactivité des diisocyanates (2,4-toluènediisocyanate, 1,6-hexaméthylènediisocyanate, 4,4'-méthylènediphényldiisocyanate) avec l'albumine sérique humaine et l'hémoglobine n'ont montré des adduits qu'avec les résidus lysines et certaine valines *N*-terminales^[339, 340].

En ce qui concerne le taux de résidus hapténisés, la **Figure V-34** montre que l'anhydride phtalique et le *p*-tolylisocyanate ont modifié beaucoup plus de résidus nucléophiles des protéines épidermiques que la 2,3-diphénylcyclopropénone. Cette différence pourrait être expliquée par la faible pénétration dans l'épiderme d'une molécule volumineuse telle que la 2,3-diphénylcyclopropénone par rapport à l'anhydride phtalique et au *p*-tolylisocyanate qui sont des petites molécules et pénètrent facilement dans l'épiderme. Par ailleurs, la voie de détoxication cutanée pourrait également influencer l'hapténation de la 2,3-diphénylcyclopropénone. En effet, la 2,3-diphénylcyclopropénone, qui a montré une affinité forte au groupement thiolé de la cystéine et du GSH dans l'essai de réactivité *in vitro*, pourrait

être fixée par une couche riche en thiol dans la couche cornée de l'épiderme. Plusieurs groupes de recherche ont étudié le rôle de cette barrière redox externe de la peau qui semblerait réduire efficacement le niveau de pénétration dans l'épiderme d'un autre allergène cutané, le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (DNCB)^[341]. De plus, en 2013, Migdal *et al.*^[342] ont montré que les sensibilisants chimiques ayant des affinités pour la cystéine et la cystéine/lysine sont capables d'activer la voie Nrf2-ARE et de favoriser par la suite l'expression des systèmes de détoxification/protection associés à l'hème oxygénase 1 (ho-1), la NADPH-quinone oxydoréductase 1 (nqo1) et l'interleukine 8 (IL-8), alors que les substances chimiques réagissant uniquement avec les résidus lysines sont moins efficaces. L'activation de la voie Nrf2-ARE pourrait provoquer la détoxification de la 2,3-diphénylcyclopropénone qui conduirait à une faible quantité pouvant réagir avec les protéines épidermiques et ainsi au faible taux des résidus modifiés. Par ailleurs, le *p*-tolylisocyanate, un allergène ayant une réactivité en solution avec la cystéine et la lysine, et qui n'a pas réagi avec les résidus cystéines dans l'épiderme, pourrait également subir une détoxification par la voie Nrf2-ARE conduisant ainsi à une faible quantité réagissant avec les protéines épidermiques. Ce pourrait être une raison pour laquelle le signal de son adduit dans l'épiderme est faible lors de la caractérisation par RMN HRMAS.

En prenant en compte la nature des modifications induites par les allergènes, l'anhydride phtalique et le *p*-tolylisocyanate ont formé des adduits similaires à ceux observés dans la réaction avec la BSA, c'est-à-dire que l'anhydride phtalique forme 2 types d'adduit +149 Da et +131 Da et que le *p*-tolylisocyanate forme un seul type d'adduit +134 Da. Par contre, la 2,3-diphénylcyclopropénone a formé un nouveau type d'adduit avec les protéines épidermiques, l'adduit d'oxydation +223 Da, à côté des 2 adduits observés avec la BSA (+207 Da et +225 Da). Cette différence pourrait être expliquée par la présence de plusieurs enzymes oxydantes, qui ne sont pas présentes lors de la réaction en solution avec la BSA, dans les épidermes humains reconstitués tels que les peroxydases et les cytochromes P450. La formation de cet adduit d'oxydation, a également été observée dans les travaux de Parkinson *et al.*^[227] qui ont étudié la réactivité de la 2,3-diphénylcyclopropénone sur des lignées cellulaires de kératinocytes HaCaT, et pourrait être une des voies d'interaction de l'haptène 2,3-diphénylcyclopropénone avec des protéines épidermiques.

Au niveau des protéines, nous avons trouvé que la modification par les allergènes dépend en

partie de l'abondance des protéines présentes dans l'épiderme. En effet, les protéines les plus abondantes sont fortement modifiées grâce à une forte exposition aux allergènes. Les protéines les plus abondantes telles que les kératines (K2C6A, K2C6B, K2C6C, K1C10, K1C14), la caspase (CASPE), la protéine de liaison aux acides gras 5 (FABP5), etc...sont touchées par les 3 allergènes. De manière très intéressante, la filaggrine (FILA), une protéine moins abondante (0,0266 mol%) dans l'épiderme, est fortement modifiée par les allergènes, principalement aux positions histidines. En comparant avec les études *ex vivo* de réactivité d'autres allergènes cutanés (5-chloro-2-méthyle-4-isothiazol-3-one (MCI), 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (DNCB), cinnamaldéhyde (CA), 6-méthylcoumarine (6-MC))^[95] et (2,3-diphénylcyclopropénone (DCP) et acrylate d'éthyle (EA))^[227] sur le lysat des modèles *Full Thickness* ou des lignées cellulaires de kératinocytes (HaCaT), nous avons trouvé que la filaggrine modifiée par les allergènes n'a pas été rapportée et que les protéines de type kératine, qui devraient être abondantes dans les modèles *Full Thickness* ou les lignées cellulaires de kératinocytes, n'ont pas été les protéines les plus hapténisées par les allergènes. Ces différences pourraient venir des échantillons épidermiques différents et/ou du milieu réactionnel différent entre des approches *in vivo* et *ex vivo*. L'environnement vivant complexe de l'épiderme semblerait favoriser la modification des kératines et des filaggrines par rapport au milieu réactionnel *ex vivo*. Ces résultats, démontrent bien que les conditions d'interactions entre les haptènes et les protéines sont un paramètre clé. La présence d'un microenvironnement 3D joue un rôle essentiel sur les interactions avec les protéines épidermiques favorisant la modification des kératines et des filaggrines ce qui n'est pas observé lors de réactions sur des protéines en solution.

Le grand nombre d'histidines modifiées dans la filaggrine (**Tableau V-5**), une protéine moins abondante, pose la question de son rôle possible dans le processus d'allergie. Pourquoi la filaggrine est-elle largement modifiée ? Est-ce qu'elle joue un rôle important dans le déclenchement d'une réaction allergique ?

Tableau V-5 : Nombre d'histidines présentes dans l'épiderme modifiée par les allergènes

	Nombre histidines modifiées dans la filaggrine	Nombre histidines modifiées dans les autres protéines	Total
Anhydride phtalique	126	57	183
2,3-Diphénylcyclopropénone	19	16	35
<i>p</i> -Tolylisocyanate	68	14	82

Dans l'épiderme, la filaggrine est une grosse protéine (>400 kDa) très riche en histidine (10% des acides aminés totaux)^[343] qui est importante pour l'agrégation des filaments de kératines dans les cornéocytes, ainsi que pour la rétention d'eau et le maintien du pH de la couche cornée^[344]. Etant la protéine la plus externe de l'épiderme, la filaggrine est exposée en premier aux allergènes appliqués à la surface de l'épiderme. Cela pourrait être une des raisons qui expliquerait le taux élevé des filaggrines modifiées par les allergènes. Nous soupçonnons également que le taux élevé d'histidine dans la filaggrine facilite sa modification. Auparavant, les études en solution, qui utilisent des acides aminés, des peptides ou des protéines modèles, se sont principalement concentrées sur les résidus lysines et cystéines. Par contre, la réactivité de l'histidine n'a jamais été rapportée comme significative dans ces conditions réactionnelles. Le fait que, en solution aqueuse, les adduits d'histidine formés ne soient pas stables, car le groupement imidazole en plus d'être un bon nucléophile est également un très bon groupement partant, conduit à des réactions réversibles en solution. Cependant, dans notre cas, le microenvironnement de l'épiderme reconstitué semblerait stabiliser les adduits d'histidine et empêcher la réaction réversible. Ces dernières années, la modification de l'histidine par les allergènes a été rapportée dans les études en solution utilisant des protéines modèles^[338], les études *ex vivo* utilisant des lysats cellulaires^[95] ou les études *in vivo* utilisant des épidermes reconstitués^[90]. Cependant, l'importance des interactions de l'histidine avec les haptènes dans la réponse immunitaire reste encore obscure. Une seule étude a montré le rôle des résidus histidines dans la sensibilisation au nickel^[345]. En effet, les auteurs ont montré que Ni²⁺ déclenche une réponse inflammatoire en activant directement le récepteur humain de type Toll 4 (TLR4) et que les histidines 456 et 458 de ce récepteur sont cruciales pour cette activation en formant des liaisons de coordination avec le nickel (II). De toute évidence, jusqu'à présent, le rôle de l'histidine dans l'induction de la sensibilisation a été négligé et devrait être pris en compte lors des approches *in chemico* pour la détection et la classification de l'activité des sensibilisants et des études *in*

vivo des mécanismes de l'allergie.

L'hapténation des résidus histidines, surtout dans la filaggrine, pourrait ainsi jouer un rôle crucial dans la réaction allergique. La position différente des histidines modifiées pourrait amener à la formation de différents peptides lors de l'internalisation de la filaggrine dans les cellules de Langerhans. Ces différents peptides modifiés (épitopes) pourraient différemment activer les lymphocytes T conduisant à la formation des Th1 ou Th2 favorisant ainsi l'allergie cutanée ou respiratoire. Dans la littérature, les mutations du gène de la filaggrine sont connues comme un facteur de risque important pour le développement de l'allergie de contact et aussi de l'allergie respiratoire (l'asthme et la rhinite allergique)^[346, 347]. Le lien entre la carence de la filaggrine et le développement de l'allergie n'est pas totalement élucidé mais il est possible que les mutations de la filaggrine entraînent un changement de la structure de la couche cornée permettant ainsi une pénétration accrue des allergènes à travers l'épiderme.

Le **Tableau V-6** ci-dessous résume les 199 protéines épidermiques modifiées par au moins un allergène. Nous avons trouvé que la plupart des protéines abondantes ont été modifiées par les 3 sensibilisants tandis que les protéines de faibles abondances ont majoritairement été modifiées par un seul allergène. Cela montre l'influence de l'abondance sur l'hapténation des protéines et nous permet d'identifier les protéines typiques pour la modification par chaque allergène. Nous avons également observé des protéines très peu abondantes (K2C8 0,015 mol% et K2C7 0,0054 mol%) qui ont été touchées par 3 allergènes tandis qu'il existe des protéines abondantes qui ont été modifiées par un seul allergène. Ainsi la S10A7 (0,4275 mol%), la PROF1 (0,152 mol%), la PRDX1 (0,1401 mol%) n'ont été modifiées que par l'anhydride phtalique, la S10A6 (0,1391 mol%) n'a été modifiée que par le *p*-tolyisocyanate et la SPR1B (0,1009 mol%) n'a été modifiée que par la 2,3-diphénylcyclopropénone. Une question est pourquoi ces protéines qui sont abondantes dans l'épiderme n'ont-elles pas été touchées par les 3 sensibilisants ? Il semblerait que ce soient des protéines spécifiques pour chaque sensibilisant. Les différentes protéines modifiées par chaque allergène pourraient créer des épitopes spécifiques conduisant à l'activation différente du système immunitaire et favorisant ainsi des réactions allergiques différentes, cutanées ou respiratoires. Ainsi, l'identification des protéines spécifiques lors de la modification par les allergènes différents pourrait permettre de comprendre, au niveau moléculaire, le processus de chaque type

d'allergie.

Tableau V-6 : Liste des protéines épidermiques modifiées par au moins d'un allergène (positions roses : protéines modifiées par 3 allergènes, positions vertes : protéines modifiées que par l'anhydride phtalique (PA), positions jaunes : protéines modifiées que par la 2,3-diphénylcyclopropénone (DCP), positions bleues : protéines modifiées que par le *p*-tolylisocyanate (pTLI), positions turquoise : protéines abondantes modifiées par un seul allergène et protéines très peu abondantes modifiées par 3 allergènes)

Protéine	Abondance (mol%)	PA	DCP	pTLI
S10A8	22,2348	x	x	x
K2C6A	12,6977	x	x	x
CASPE	8,0929	x	x	x
K2C6C	7,3776	x	x	x
K2C6B	7,2819	x	x	x
FABP5	5,1113	x	x	x
K1C14	4,2756	x	x	x
K22O	3,3830	x	x	x
K2C1	3,3830	x	x	x
K1C16	2,9276	x	x	x
K1C17	2,6230	x	x	x
K2C5	2,1902	x	x	x
K1C10	1,8972	x	x	x
K22E	1,5696	x	x	x
S10A9	1,1574	x	x	x
ANXA2	0,9534	x	x	x
H4	0,6401	x		x
G3P	0,5382	x	x	x
S10A7	0,4275	x		
TPM4	0,4054	x	x	x
SPB3	0,4042	x		x
1433S	0,3921	x	x	x
CYTA	0,3479	x		x
S10A2	0,3343	x	x	x
HSPB1	0,2695	x	x	x
THIO	0,2670	x		x
ACTB	0,2633		x	x
LDHA	0,2239	x	x	x
SPB4	0,2218	x	x	x
GGCT	0,2037	x	x	x
ENOA	0,1539	x		x

Protéine	Abondance (mol%)	PA	DCP	pTLI
LEG7	0,1520		x	x
PROF1	0,1520	x		
PPIA	0,1437	x	x	x
PRDX1	0,1401	x		
S10A6	0,1391			x
S10AE	0,1347	x	x	
S10AG	0,1307	x		x
SBSN	0,1298	x		x
BLMH	0,1288	x		x
KPYM	0,1287	x	x	x
K2C75	0,1256	x	x	x
ARGI1	0,1150	x	x	x
K2C79	0,1031	x	x	x
SPR1B	0,1009		x	
ZA2G	0,0936	x		x
GLRX1	0,0907			x
ALDOA	0,0887	x	x	x
TPIS	0,0844	x	x	x
ACTG	0,0834	x	x	x
PRDX2	0,0796			x
ANXA1	0,0741	x		x
1433Z	0,0711	x		x
S10AA	0,0709	x		x
K2C78	0,0679	x	x	x
PRDX2	0,0650			x
S10AB	0,0625	x		
HUTH	0,0582	x		x
TBB3	0,0573	x	x	x
TBB4B	0,0573	x	x	x
PGK1	0,0568	x	x	x
CALL5	0,0563			x

Protéine	Abondance (mol%)	PA	DCP	pTLI
PGAM1	0,0551	x		x
EF2	0,0537	x		x
ADT2	0,0532	x		x
TBB2A	0,0522	x	x	x
K1C15	0,0491	x	x	
BIP	0,0457	x		x
GSTP1	0,0451	x	x	x
RNAS7	0,0448	x		x
DESP	0,0443	x		x
ACTC	0,0429	x	x	x
PDIA1	0,0411			x
LMNA	0,0403	x	x	x
TBB4A	0,0399	x		x
TBB5	0,0399	x	x	x
EF1A1	0,0389	x	x	x
SPB5	0,0380	x		x
TERA	0,0375	x	x	x
K2C1B	0,0371		x	x
HSP7C	0,0366	x		x
RL40	0,0357			x
ACTN4	0,0338	x	x	
1433E	0,0325	x		
TBA4A	0,0323	x	x	x
MYH9	0,0321	x		x
TBA1B	0,0318	x	x	x
GDIB	0,0313			x
1433B	0,0297	x		x
ADT3	0,0297			x
TBA1C	0,0292	x		x
CYC	0,0283	x		
IF4A1	0,0278	x		x
CH60	0,0276	x		
K2C3	0,0268	x	x	x
FILA	0,0266	x	x	x
HS71A	0,0263	x		
TKT	0,0261	x		x
ILEU	0,0258	x		x
KLK7	0,0258			x
RS27A	0,0241	x		
LDHB	0,0237	x	x	x
PLAK	0,0233	x	x	x
DYL1	0,0232	x		
RAB14	0,0229			x

Protéine	Abondance (mol%)	PA	DCP	pTLI
PNPH	0,0227	x		x
PDIA3	0,0225			x
HS90B	0,0214		x	
ROA1	0,0213	x		
1433T	0,0211	x		x
K2C4	0,0209	x		
H2B1C	0,0205	x		
CYTB	0,0203	x		
SPB8	0,0202			x
MYL6	0,0201	x	x	
K1C13	0,0194	x		x
SAP3	0,0183			x
TPM3	0,0183	x		x
SPB12	0,0174	x		x
EF1G	0,0170	x	x	
RLA0	0,0170	x		
FILA2	0,0167	x		x
TGM3	0,0165	x		x
TPM2	0,0155			x
PKP1	0,0154	x		
G6PI	0,0153			x
K2C8	0,0150	x	x	x
PPIB	0,0145	x		
TALDO	0,0145			x
NUDT5	0,0140	x		
RS29	0,0140	x		
RS25	0,0139			x
VDAC2	0,0139		x	
ATPB	0,0138	x		
1433G	0,0136	x		x
TBB6	0,0136		x	x
TMED7	0,0134		x	x
RL12	0,0133		x	
K2C73	0,0132	x	x	
KCRU	0,0132			x
KLK10	0,0122	x		x
RAB10	0,0122			x
PSB1	0,0121			x
TGM1	0,0117	x		x
H31T	0,0115	x		
TRHY	0,0115	x		x
BAP31	0,0111	x		x
NPM	0,0108			x

Protéine	Abondance (mol%)	PA	DCP	pTLI
APRV1	0,0107			x
PTMA	0,0105			x
PSB4	0,0104			x
A2ML1	0,0103			x
DHC24	0,0100	x		x
DSG1	0,0098			x
TBA8	0,0097			x
FAS	0,0090			x
IDHC	0,0088			x
KLK8	0,0087			x
PYGL	0,0084	x		
PLEC	0,0082			x
GSDMA	0,0081	x		
CAN1	0,0077	x		x
RL11	0,0077	x		
DMKN	0,0074			x
RS24	0,0074			x
MAOX	0,0072	x		
G6PD	0,0071	x		
SPB7	0,0071	x		
PEPD	0,0070	x		
HMOX1	0,0070			x
RSSA	0,0069			x
COX5A	0,0066			x
CBPA4	0,0062			x
CBPA3	0,006			x

Protéine	Abondance (mol%)	PA	DCP	pTLI
TPD52	0,0059			x
POF1B	0,0059	x		
CAPZB	0,0057	x		
MIF	0,0057	x		x
KLK5	0,0056			x
VINC	0,0055			x
K2C7	0,0054	x	x	x
ALDOC	0,0054	x		
RB33B	0,0042			x
RB39A	0,0039			x
TBB8	0,0038		x	
LAMP1	0,0036	x		x
PDIA4	0,0030			x
DLDH	0,0029			x
ALBU	0,0026	x		x
CREG1	0,0025			x
NRDC	0,0023			x
TBA1A	0,0021			x
NAL10	0,0015	x		
FETA	0,0015		x	
K2C72	0,0015		x	
HM13	0,0013			x
EIF3I	0,0011			x
SURF4	0,0009	x		x
MYH14	0,0005			x
ADT1	0,0003			x

Les protéines, modifiées spécifiquement par un seul allergène, sont résumées dans le **Tableau V-7** ci-dessous. Ces protéines contiennent au moins une modification qui est validée par la présence des ions fragments encadrants. Nous appelons ainsi les protéines modifiées validées.

Tableau V-7 : Liste des protéines modifiées par un seul allergène (**positions vertes** : protéines modifiées que par l'anhydride phtalique, **positions jaunes** : protéines modifiées que par la 2,3-diphénylcyclopropénone, **positions bleues** : protéines modifiées que par le *p*-tolylisocyanate, **lignes rouges** : protéines dont les rôles dans l'allergie ont été documentés dans la littérature, **acide aminé en gras** : modification validée sur le spectre MS/MS)

	Protéine	Nom	Longueur (aa)	Abondance (mol%)	Acide aminé modifié
1	S10AB	Protéine S100-A11	105	0,0625	Y24
2	1433E	Protéine 14-3-3 epsilon	255	0,0325	Y49
3	H2B1C	Histone H2B type 1-C	126	0,0205	K35, H110
4	H31T	Histone H3.1t	136	0,0115	Y55, K57
5	GSDMA	Gasdermine-A	445	0,0081	K44
6	SPB7	Serpine B7	380	0,0071	K367
7	CAPZB	Protéine de coiffage F-actine	277	0,0057	K95
8	SPR1B	Cornifine-B	89	0,1009	C73
9	RL12	Protéine ribosomale L12 60S	165	0,0133	C17
10	TBB8	Tubuline beta-8	444	0,0038	K252
11	K2C72	Kératine, type II de cytosquelette 72	511	0,0015	K142, R144, K243
12	PRDX2	Peroxi-rédoxine-2	198	0,0796	K26
13	RL40	Protéine ribosomale L40	128	0,0357	K6, Y59
14	ADT3	ADP/ATP translocase 3	298	0,0297	K33, K63
15	KLK7	Kallikréine-7	253	0,0258	K117
16	SAP3	Activateur du ganglioside GM2	193	0,0183	K179, K185
17	G6PI	Glucose-6-phosphate isomérase	558	0,0153	K12, K454
18	TALDO	Transaldolase	337	0,0145	K277
19	KCRU	Créatine kinase de type U	417	0,0132	K199
20	PSB1	Protéasome bêta de type 1	241	0,0121	K164, K204
21	APRV1	Protéase aspartique de type rétroviral 1	343	0,0107	K165, K269
22	PTMA	Prothymosine alpha	111	0,0105	K15
23	FAS	Acide gras synthase	2511	0,0090	K436
24	IDHC	Isocitrate déshydrogénase [NADP] cytoplasmique	414	0,0088	K115
25	PLEC	Plectine	4684	0,0082	K1975
26	DMKN	Dermokine	476	0,0074	K66
27	RSSA	Protéine ribosomale 40S SA	295	0,0069	K89
28	CBPA4	Carboxypeptidase A4	421	0,0062	K297
29	TPD52	Protéine tumorale D52	224	0,0059	K100
30	KLK5	Kallikréine-5	293	0,0056	K235
31	VINC	Vinculine	1134	0,0055	K830
32	NRDC	Nardilysine	1151	0,0023	K326
33	MYH14	Myosine-14	1995	0,0005	K1105

Une question est quels sont les rôles de ces protéines dans le développement de l'allergie ? Dans la littérature, les rôles des modifications d'histones dans l'asthme, à partir d'études humaines et murines, ont été documentés. Deux revues de Kidd *et al.*^[348] et d'Alhamwe *et al.*^[349] ont montré qu'avec la méthylation de l'ADN, les modifications d'histones (y compris l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination) ont des rôles importants dans le développement des maladies allergiques, surtout de l'asthme. En général, les modifications d'histones sont catalysées par des enzymes spécifiques qui agissent au niveau des acides aminés *N*-terminaux ou des résidus basiques (lysine, arginine, sérine, thréonine, tyrosine) des histones^[350]. Ces modifications, qui changent la structure des histones, participent à l'activation des cellules dendritiques et à favoriser le développement des cellules immunitaires Th2 et Th17, caractéristiques de l'asthme. Parmi les modifications des histones, l'acétylation de l'histone 3 (H3) (sur la lys4, lys14, lys27), la méthylation de l'H3 (lys4, lys9, lys27, lys36) ont montré des effets dans le processus d'asthme. Similaire aux études de la littérature, dans notre étude, nous avons trouvé que l'histone est une des protéines spécifiquement modifiées par l'anhydride phtalique (allergène respiratoire) sur des différentes positions (lys35, his110 de l'H2B1C et tyr55, lys57 de l'H31T). Ainsi, les histones pourraient être des protéines cibles pour l'anhydride phtalique et pour les allergènes respiratoires en général. Les études des modifications d'histones et leurs enzymes associées ont des objectifs prometteurs dans l'étude des mécanismes de l'allergie respiratoire et de son traitement. En effets, les inhibiteurs des enzymes modifiant les histones peuvent potentiellement être utilisés comme médicaments anti-allergiques.

De plus, dans la littérature, quelques protéines de type protéine liée au calcium (S100-A7, S100-A8, S100-A9, S100-A11)^[351, 352] et les serpinines (B3, B4 et B10)^[353-355] sont citées comme des biomarqueurs dans l'asthme. En effet, plusieurs études ont identifié une augmentation de l'expression des gènes de ces protéines chez les patients atteints de l'asthme. Cette augmentation a également été observée dans l'activation des cytokines IL-4, IL-13 qui jouent un rôle important dans la différenciation des lymphocytes Th2 impliqués dans l'allergie respiratoire. De plus, Yu *et al.*^[356] ont rapportés que les gènes des protéines de la famille de gasdermine (GSDMA et GSDMB) sont associés à la sensibilité de l'asthme chez les enfants coréens. Cependant, le mécanisme de cette association entre l'asthme et les gasdermines n'est pas encore étudié. De manière intéressante, notre étude a identifié les modifications de

ces protéines spécifiques par l'anhydride phtalique, à savoir que l'hapténation à la tyrosine 24 de la protéine S100-A11, l'hapténation à la lysine 44 de la gasdermine A et l'hapténation à la lysine 367 de la serpine B7. Ces modifications pourraient être des suggestions importantes dans les études ultérieures du mécanisme au niveau moléculaire de l'asthme.

Les peroxirédoxines sont une famille d'enzymes antioxydante omniprésente, également appelées thiorédoxine peroxydases^[357]. Les peroxirédoxines sont répartis dans le cytosol, les mitochondries, le peroxisome et le plasma, où les espèces réactives de l'oxygène sont produites. Il existe six types de peroxirédoxine : peroxirédoxine 1, 2, 3, 4, 5 et 6. Toutes les peroxirédoxines partagent le même mécanisme catalytique de base dans lequel la cystéine du site actif (cystéine peroxydatique) est oxydée en acide sulfinique par un substrat peroxyde^[357]. Parmi elles, la peroxirédoxine 1 est importante pour se protéger contre l'inflammation, notamment par la suppression de l'activation du NF- κ B, une protéine impliquée dans la réponse au stress cellulaire et la réponse immunitaire. En 2009, Inoue *et al.*^[358] ont montré que la peroxirédoxine 1 endogène protège contre l'inflammation et la réaction d'hypersensibilité de type Th2 liée aux allergènes respiratoires, probablement par l'inhibition de l'activation et la prolifération des lymphocytes T spécifiques aux allergènes. Dans notre étude, nous avons trouvé que la peroxirédoxine 2 (PRDX2) est modifiée spécifiquement par le *p*-tolylisocyanate, un allergène mixte qui est bien connu comme un déclencheur d'asthme. Les modifications de la peroxirédoxine 2 changent sa structure initiale. Cela pourrait changer ses fonctions dans la protection contre la réaction d'hypersensibilité provoquée par un allergène respiratoire.

Les kallikréines sont une famille de sérine protéases, des enzymes capables de couper les liaisons peptidiques dans les protéines. Les kallikréines sont divisées en kallikréine plasmatique (KLKB1) et kallikréine tissulaire (KLK). Les kallikréines tissulaires humaines comprennent 15 sérine protéases codées sur le chromosome 19q13.4^[359]. Parmi elles, 13 kallikréines (KLK1, 4-15) ont été identifiées et sont présentes dans la peau^[360]. Dans l'épiderme, les kallikréines sont sécrétées par les kératinocytes^[361]. La KLK5 s'est avérée être la plus abondante, suivi par KLK7, 9, 10, 11, 1, 6, 8, 14 et 15^[362]. La KLK5 et la KLK7 ont été les premières kallikréines identifiées dans la peau après avoir été purifiées à partir de la couche cornée^[363]. Les kallikréines jouent des rôles dans l'homéostasie et l'inflammation cutanée^[364]. Pour le rôle dans l'inflammation cutanée, les kallikréines clivent le récepteur PAR2

(proteinase-activated receptor) provoquant une libération de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'interleukine-8 (IL-8), l'interleukine-13 (IL-13), la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM-1) et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α). Les cytokines permettent une amplification de la réponse inflammatoire en signalant les cellules immunitaires. Les kallikréines orchestrent le fonctionnement vital de l'épiderme et, par conséquent, sont étroitement régulées pour assurer le bon maintien des fonctions de la barrière cutanée. Une dérégulation de l'activité de la kallikréine contribuerait à la formation de plusieurs troubles inflammatoires de la peau. De manière critique, lorsque ces enzymes deviennent non régulées (en raison de changement génétique et/ou de la modification par les molécules environnementales), ils peuvent déclencher un dysfonctionnement de la barrière épidermique et activer des mécanismes inflammatoires. Ainsi, les modifications de ces protéines par les allergènes pourraient jouer un rôle important dans l'initiation d'une réaction allergique. Dans notre étude, le *p*-tolylisocyanate a provoqué des modifications de la KLK5 (sur la lysine 235) et de la KLK7 (sur la lysine 117), qui sont les deux kallikréines plus abondantes dans l'épiderme. Ainsi, la KLK5 et la KLK7 pourraient être les protéines cibles importantes pour l'allergène mixte, le *p*-tolylisocyanate.

Jusqu'à présent, nous ne savons pas encore le rôle de toutes ces protéines mais il serait possible qu'elles soient spécifiques et très importantes pour chaque type d'allergie. L'identification des protéines spécifiques pour chaque sensibilisant pourrait être un progrès important permettant d'orienter des recherches ultérieures ou d'établir des études *in chemico* ou *in silico* sur ces protéines avec l'objectif de déterminer et d'évaluer le potentiel sensibilisant des composés.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

En tant qu'interface avec l'extérieur, la peau est considérée comme une première barrière de protection de l'organisme contre les molécules de l'environnement. Cependant, la peau n'est pas une barrière infranchissable. Ainsi, le contact avec certains composés peut conduire à des effets indésirables tels que des allergies, principalement cutanées mais parfois respiratoires. De nos jours, l'allergie est une pathologie incurable qui touche de nombreuses personnes dans le monde et devient un problème majeur de santé publique. Elle a des conséquences psychosociales et économiques importantes pour les personnes touchées entraînant une réduction considérable de leur qualité de vie. A l'heure actuelle, il n'existe aucune thérapie pour soigner cette maladie à part le traitement des symptômes cliniques chez patients. C'est pourquoi, il est nécessaire de pouvoir évaluer le potentiel sensibilisant des allergènes en comprenant les mécanismes à l'origine des allergies.

I. Problématique de thèse

A l'échelle moléculaire, le processus de l'allergie commence par la formation d'un complexe antigénique haptène-protéine, qui active le système immunitaire de l'organisme à travers les lymphocytes T. Elle est considérée comme une étape clé dans la réaction allergique^[38]. D'un point de vue immunologique, les allergènes cutanés favorisent principalement une réponse des lymphocytes Th1, associée à la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IFN- γ , IL-2 et TNF- β , tandis que les allergènes respiratoires induisent principalement une réponse des lymphocytes Th2, associée à la sécrétion de cytokines IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et IL-13. Ces profils distincts contribuent à des différences importantes. L'activation des cellules Th1 induit principalement une réponse immunitaire à médiation cellulaire, y compris la réaction d'hypersensibilité retardée, tandis que la différenciation des cellules Th2 est associée à une réponse humorale et à la production d'immunoglobuline E spécifique. Pendant longtemps, la voie d'exposition, la peau ou les voies respiratoires, a été utilisée pour définir le type d'allergie qu'elle provoque. A savoir que les allergènes entrés dans l'organisme par voie cutanée, provoqueraient l'allergie de contact alors que les allergènes entrés dans l'organisme par voie respiratoire, induiraient l'allergie respiratoire. Cependant, les recherches plus récentes ont démontré que l'orientation Th1/Th2 de la réponse était intrinsèque au produit chimique et

non au site d'exposition car les sensibilisants respiratoires peuvent également induire une réponse Th2 lorsqu'ils sont appliqués sur la peau^[23]. Néanmoins, cette différence d'orientation de la réponse immunitaire par les molécules sensibilisantes est encore inexplicée. L'étape clé pour le déclenchement d'une réaction allergique cutanée ou respiratoire pourrait résulter de la nature des interactions chimiques entre l'allergène et les résidus nucléophiles sur les chaînes latérales des protéines épidermiques. D'un point de vue chimique, les études *in vitro* ont montré que les sensibilisants respiratoires réagissaient principalement avec les résidus lysines tandis que les sensibilisants cutanés réagissaient principalement avec les résidus cystéines^[3]. Néanmoins, le lien entre cette sélectivité chimique et l'orientation immunitaire (réponse Th1/Th2) n'est pas encore compris. Dans ce contexte, ce travail de thèse envisage donc d'étudier la façon dont les allergènes cutanés et respiratoires interagissent avec les protéines épidermiques dans un environnement vivant complexe, et comment cela pourrait orienter de manière différente la réponse immunitaire.

II. Hypothèse de travail et objectifs

La première hypothèse de ce travail de thèse est basée sur des résultats issus d'études *in vitro* sur la différence de réactivité entre différents types d'allergènes vis-à-vis des acides aminés ou des peptides modèles. Après expositions sur l'épiderme, l'allergène respiratoire, l'anhydride phtalique dans notre cas, réagirait avec les résidus lysines tandis que l'allergène cutané, la 2,3-diphénylcyclopropénone, modifierait les résidus cystéines et enfin, l'allergène mixte, le *p*-tolylisocyanate, hapténiserait à la fois les résidus lysines et cystéines. Nous avons également émis une deuxième hypothèse à savoir que les différents sensibilisants pourraient modifier des protéines épidermiques différentes conduisant à la formation d'épitopes différents après la présentation aux cellules présentatrices d'antigènes. Cela pourrait orienter l'activation et la différenciation des lymphocytes Th0 en Th1 ou Th2 favorisant ainsi l'allergie cutanée ou respiratoire.

Afin de se rapprocher le plus possible de l'environnement vivant, nous avons choisi de travailler sur des épidermes humains reconstitués, modèle EpiSkin™. Nous avons combiné la technique d'analyse par RMN HRMAS et la spectrométrie de masse dans le but d'identifier les protéines et les sites modifiés dans les épidermes humains reconstitués exposés aux allergènes cutanés et respiratoires. Ce travail s'est décomposé en trois grandes parties :

d'abord la synthèse des molécules étudiées, puis l'étude de leur réactivité face aux épidermes reconstitués par RMN HRMAS, et enfin l'analyse protéomique par spectrométrie de masse.

III. Chimie

L'étude du devenir des composés appliqués sur les épidermes humains reconstitués par RMN HRMAS nécessite l'utilisation de molécules substituées au carbone 13, idéalement au niveau des positions réactives.

De nouvelles voies de synthèse des quatre allergènes substitués au carbone 13 (anhydride phtalique, 2,3-diphénylcyclopropénone, 4,4'-méthylènediphényldiisocyanate, *p*-tolylisocyanate) ont été développées à partir de précurseurs commerciaux simples dont le prix est abordable ($K^{13}CN$, $C_6H_5^{13}COOH$). En effet, l'anhydride phtalique substitué au carbone 13 (**^{13}C -1**) a été synthétisé à partir de KCN (^{13}C , 99%) en trois étapes avec un bon rendement global de 81%. Grâce à l'utilisation de l'amide de Weinreb, la synthèse de la 2,3-diphénylcyclopropénone substituée au carbone 13 (**^{13}C -2**) a été améliorée avec un rendement global de 31% en 6 étapes à partir de l'acide benzoïque (carboxyle- ^{13}C , 99%). En ce qui concerne les isocyanates, une nouvelle synthèse « non-phosgène » a été mise au point permettant de préparer le 4,4'-méthylènediphényldiisocyanate (**^{13}C -3**) et le *p*-tolylisocyanate (**^{13}C -4**) à partir de KCN (^{13}C , 99%) avec des rendements globaux de 44% et 65%, respectivement (**Figure 1**).

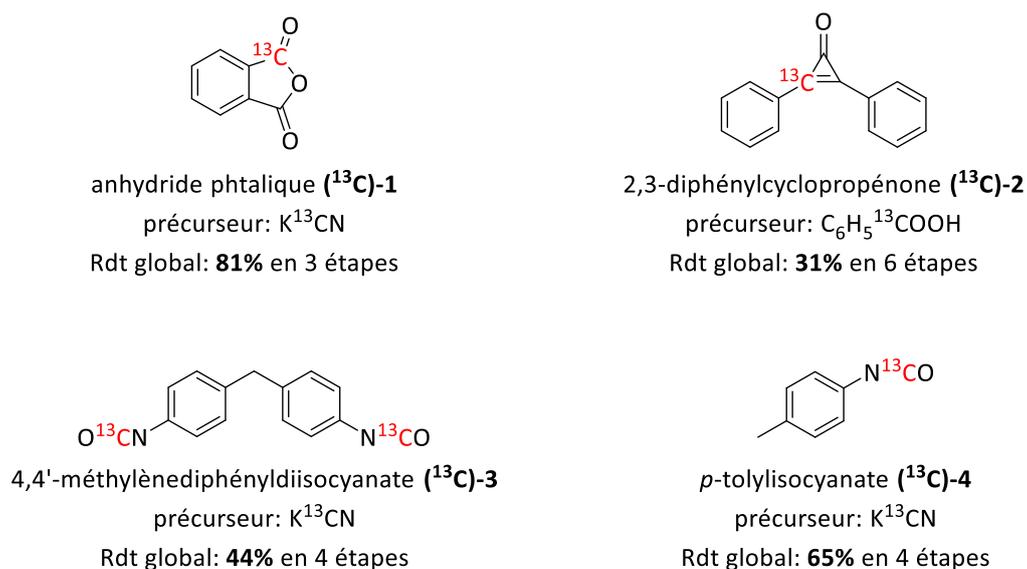


Figure 1. Quatre allergènes substitués au carbone 13 ont été synthétisés dans notre travail

Dès que les allergènes substitués au carbone 13 ont été obtenus, ils ont été appliqués sur les épidermes humains reconstitués. Parmi ces allergènes, le 4,4'-méthylènediphényldiisocyanate (^{13}C)-3 n'a pas pu pénétrer dans l'épiderme, à cause du volume de sa structure et/ou de sa polymérisation à la surface de l'épiderme sous condition humide de l'incubation, pour permettre une détection significative. Nous avons ainsi étudié la réactivité de trois allergènes (l'anhydride phtalique, la 2,3-diphénylcyclopropénone et le *p*-tolylisocyanate) dans les épidermes reconstitués.

IV. Résultats obtenus en RMN HRMAS

Avant de faire l'analyse par RMN HRMAS, les études *in vitro* de la réactivité des allergènes avec des acides aminés, des peptides modèles en solution ont été réalisées afin de servir de références. Dans ces études, l'anhydride phtalique, un allergène respiratoire, a montré une réactivité spécifique avec la lysine alors que l'allergène cutané, la 2,3-diphénylcyclopropénone, a montré une forte réactivité avec le groupement thiol de la cystéine. Enfin, l'allergène mixte, le *p*-tolylisocyanate, a réagi à la fois avec les résidus aminés et thiolés de la lysine et de la cystéine.

Pour les études avec les épidermes reconstitués par la RMN HRMAS, l'anhydride phtalique a confirmé une réactivité avec les résidus lysines des protéines épidermiques en formant les adduits de type amide et imide. Par contre, pour la 2,3-diphénylcyclopropénone, nous n'avons pas pu observer d'adduits formés par RMN HRMAS en raison de sa faible pénétration dans les épidermes. Seul le signal du carbone 13 de la 2,3-diphénylcyclopropénone a été observé. Enfin, le *p*-tolylisocyanate, a montré une réactivité avec les résidus lysines des protéines présentes dans les épidermes.

Les expériences réalisées avec les différents types d'allergènes ont montré la spécificité de chaque composé pour certains résidus dans les épidermes. En effet, l'utilisation de la technique RMN HRMAS pour l'étude des modifications d'épidermes reconstitués nous permet de mettre en évidence la réactivité des allergènes. Nous avons pu observer des similitudes avec les études réalisées en solution. Cependant, nous avons également observé des différences. En effet, les études avec le *p*-tolylisocyanate n'ont montré que la formation d'adduits avec les résidus lysines présents dans les épidermes reconstitués tandis que dans les études avec les acides aminés en solution, l'allergène mixte *p*-tolylisocyanate a montré

une réactivité à la fois avec la lysine et la cystéine. Il semblerait que la RMN HRMAS atteigne sa limite de sensibilité lors de l'étude de ce type de composés dans les épidermes qui sont composés de manière complexe par de nombreuses molécules différentes. Les signaux d'adduits de types thiocarbamates avec les cystéines, qui sont larges et moins nets que ceux d'adduits de types urées avec les lysines, pourraient ne pas sortir du bruit de fond des spectres des épidermes. De plus, les adduits formés entre l'anhydride phtalique et le *p*-tolylisocyanate avec les résidus de l'épiderme ont des carbones substitués quaternaires. Ainsi, nous n'avons pu réaliser que des expériences monodimensionnelles (^{13}C RMN) pour déterminer des déplacements chimiques qui ont ensuite été comparés avec des valeurs obtenues dans les études avec des acides aminés, des peptides ou des protéines modèles en solution pour caractériser les adduits formés. Aucune expérience bidimensionnelle (HSQC) n'a pu être effectuée afin d'élucider leur structure.

Ainsi, la technique RMN HRMAS peut apporter les premiers renseignements mais ne suffit pas à elle seule pour la caractérisation complète des adduits formés, surtout dans le cas de la 2,3-diphénylcyclopropénone et du *p*-tolylisocyanate. Des études complémentaires de lyse cellulaire et d'analyse protéomique par spectrométrie de masse ont donc été réalisées afin de connaître la position exacte des acides aminés modifiés dans la protéine épidermique. Une identification de l'ensemble des protéines pourrait nous amener à confirmer la réactivité générale des différents allergènes dans l'allergie cutanée et respiratoire.

V. Résultats obtenus en analyse protéomique

Dans un premier temps, la modification chimique d'une protéine isolée, la BSA, a tout d'abord été testée. L'allergène respiratoire, l'anhydride phtalique (PA), a montré une forte affinité pour les résidus lysines. En effet, le PA modifie principalement les résidus lysines de la BSA, alors qu'aucune cystéine modifiée n'est identifiée. Tandis que la 2,3-diphénylcyclopropénone (DCP), un allergène cutané, qui a une affinité extrême pour la cystéine dans les tests *in vitro* avec des acides aminés et des peptides, a montré une réactivité avec les résidus lysines et cystéines dans la BSA. D'après les tests de réactivité *in vitro* avec des acides aminés, le *p*-tolylisocyanate, un sensibilisant mixte, devrait réagir à la fois avec les résidus lysines et cystéines. Cependant, aucun résidu cystéine dans la BSA n'est modifié. Les modifications sont majoritairement trouvées sur les résidus lysines. De manière intéressante, tous ces 3

allergènes modifient également un petit nombre d'autres résidus nucléophiles tels que l'histidine, l'arginine et la tyrosine.

Dans un deuxième temps, l'analyse protéomique des RHE exposés aux allergènes montre que l'anhydride phtalique et le *p*-tolylisocyanate modifient principalement les résidus lysines alors qu'aucun résidu cystéine n'est touché. La 2,3-diphénylcyclopropénone, quant à elle, modifie les protéines épidermiques à la fois sur les résidus lysines et cystéines. De plus, ces trois allergènes hapténisent également d'autres cibles nucléophiles comme l'histidine, l'arginine et la tyrosine. Ces résultats différents de ceux obtenus en test *in vitro* peuvent être la conséquence de la différence du milieu réactionnel. En effet, les systèmes expérimentaux simples utilisés dans les tests *in vitro* avec les acides aminés ou les peptides diffèrent du milieu complexe de la peau de plusieurs façons telles que la compétition entre de nombreuses protéines, la différence de pH biologique local ou la micro-biodisponibilité^[90, 95, 227].

Bien que ce résultat d'analyse ne soit pas totalement en accord avec la première hypothèse posée, nous pouvons facilement voir que la différence entre le profil des résidus nucléophiles modifiés par la 2,3-diphénylcyclopropénone et par l'anhydride phtalique/le *p*-tolylisocyanate est la cystéine. En effet, **l'anhydride phtalique (un sensibilisant respiratoire) et le *p*-tolylisocyanate, un allergène mixte** mais sensibilisant respiratoire connu sous le nom « asthme-isocyanate », et moins souvent rapporté pour sa sensibilisation cutanée, n'ont modifié **aucun résidu cystéine présent dans l'épiderme**. Par contre, la **2,3-diphénylcyclopropénone, un sensibilisant strictement cutané**, a hapténisé **un nombre significatif de résidus cystéines des protéines épidermiques**. Ainsi, cette chimiosélectivité pourrait avoir un impact sur l'activation et/ou la régulation de la réponse immunitaire aux allergènes chimiques. En effet, la modification de différents acides aminés va conduire à la formation de différents peptides antigéniques lors du traitement des protéines modifiées par des cellules présentatrices d'antigène. Les résidus cystéines pourraient être des sites cruciaux pour l'allergie cutanée. La modification des cystéines présentes dans l'épiderme par les sensibilisants cutanés pourrait ainsi former des épitopes spécifiques pour déclencher une allergie de contact. Pour la lysine, un grand nombre des résidus lysines modifiés par l'anhydride phtalique et le *p*-tolylisocyanate pourrait nous renseigner sur leur rôle important dans le processus de l'allergie respiratoire comme le cas de la cystéine dans l'allergie cutanée. De plus, de nouvelles cibles nucléophiles comme l'histidine, l'arginine et la tyrosine devraient

être prises en compte et examinées soigneusement lors de l'étude des mécanismes de l'allergie.

Au niveau des protéines, cette étude a identifié les protéines épidermiques modifiées par les allergènes. Les protéines modifiées sont majoritairement les protéines abondantes présentes dans l'épidermes telles que les kératines, la caspase, les annexines, etc... Nous avons également identifié les protéines spécifiquement modifiées par chaque type d'allergènes. Ces protéines sont principalement les protéines très faibles abondantes. L'identification de ces protéines modifiées est importante dans l'analyse protéomique car les biomarqueurs des maladies sont généralement présents en très faibles quantités. De plus, la modification de ces protéines spécifiques pourrait conduire à la formation des épitopes spécifiques et nécessaires pour déclencher une réaction allergique différente (allergie de contact ou allergie respiratoire). Ainsi, l'identification des protéines spécifiques pour chaque type d'allergène joue un rôle crucial dans l'orientation initiale qui pourrait ouvrir des portes importantes dans l'étude ultérieure du mécanisme de l'allergie au niveau moléculaire.

VI. Discussion

Malgré la prévalence des allergies cutanées et respiratoires, nos connaissances sur le processus d'hapténation des protéines, un événement clé, sont limitées. Les connaissances mécanistiques actuelles de l'hapténation sont dérivées d'études en solution utilisant des peptides modèles, des protéines isolées ou récemment des études *ex vivo* utilisant des lysats cellulaires. Comme première étape importante vers la compréhension de la complexité de l'hapténation des protéines dans un environnement vivant complexe, nous avons étudié la réactivité des allergènes différents vis-à-vis des épidermes humains reconstitués, le modèle EpiSkin™. Cette étude a été réalisée en utilisant une nouvelle approche combinant la technique de la RMN HRMAS et l'analyse protéomique par la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) pour étudier la réactivité des sensibilisants cutanés et respiratoires envers des épidermes dans le but de comprendre le mécanisme au niveau moléculaire de l'allergie.

Alors que la RMN HRMAS, avec ses limites dans l'étude de ces allergènes, ne pourrait qu'apporter les premiers renseignements pour la caractérisation des adduits formés entre les allergènes et les épidermes reconstitués, la spectrométrie de masse, avec ses avantages, pourrait nous permettre d'identifier exactement des acides aminés modifiés et des protéines

présentes dans l'épiderme. La méthode d'analyse « shotgun proteomics » de l'approche « bottom-up » nous a permis de caractériser plus de mille protéines épidermiques des plus abondantes aux moins abondantes avec leurs modifications par les allergènes. Cependant, en comparant avec d'autres études telles que les travaux de Parkinson *et al.*^[95], le nombre des protéines identifiées dans ce travail est encore faible car de nombreuses protéines moins abondantes n'ont pas été détectées. Ce problème pourrait être amélioré par la séparation des protéines « in gel » en utilisant le SDS-PAGE avant l'analyse par LC-MS/MS. La séparation par SDS-PAGE permettrait de regrouper des protéines en petits groupes de masse moléculaire similaire facilitant ainsi la séparation par la chromatographie liquide. Cela pourrait permettre de détecter beaucoup plus de protéines, surtout les protéines les moins abondantes.

L'hapténation de chaque molécule allergisante est influencée par des facteurs tels que les mécanismes de réaction, l'abondance des protéines présentes dans l'épiderme, le rôle de la détoxification de la couche cornée ou encore les propriétés physico-chimiques des allergènes, etc... Chaque type d'allergène a montré une réactivité différente avec les protéines dans un environnement vivant complexe de l'épiderme reconstitué. L'anhydride phtalique (allergène respiratoire) et le *p*-tolylisocyanate (allergène mixte), réagissent préférentiellement avec les résidus lysines, tandis que la 2,3-diphénylcyclopropénone (allergène cutané) modifie à la fois les résidus lysines et cystéines. Par ailleurs, de nouvelles cibles d'hapténation telles que l'histidine, l'arginine et la tyrosine sont également détectées dans l'épiderme. En dehors des protéines communes modifiées par 3 allergènes, chaque allergène a également montré une réactivité spécifique avec certaines protéines différentes. La modification des acides aminés et des protéines différentes pourrait conduire à la formation des épitopes différents induisant aux réponses immunitaires spécifiques pour chaque sensibilisant. Ces réponses immunitaires de l'organisme favoriseraient le type d'allergie différente, cutanée ou respiratoire.

Faire progresser nos connaissances sur le protéome cutané, le type de nucléophile spécifique, les protéines cibles de modification et l'immunogénicité de ces modifications protéiques nous permettra de mieux comprendre l'AOP de sensibilisation cutanée et respiratoire. Cette compréhension sera nécessaire pour le développement de modèles mathématiques pour l'évaluation des risques et la prédiction de la sensibilisation. Bien qu'il y ait encore des choses à améliorer, la méthodologie utilisée dans ce travail pourrait être applicable dans une gamme de domaines de recherche biologique pour étudier les événements d'hapténation des

protéines, tels que l'étude de l'allergie médicamenteuse ou encore au-delà de la recherche sur les allergies.

Partie expérimentale

Experimental section

General informations

All air- and moisture-sensitive reactions were carried out in flame-dried glassware under an atmosphere of dry argon.

Potassium cyanide (^{13}C , 99%), benzoic acid (carboxyl- ^{13}C , 99%) and deuterated solvents were purchased from Eurisotop (Saint Aubin, France). All other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) and used as received.

Tetrahydrofuran (THF), dichloromethane (CH_2Cl_2) and diethyl ether (Et_2O) were dried by passing through activated alumina under argon pressure using Glass Technology GTS100 devices. All the following distillation were carried out under an atmosphere of dry argon. Triethylamine (Et_3N) was distilled from KOH. Benzene was distilled from CaH_2 and stored over 4 Å molecular sieves. Ultrapure water milli-Q was obtained by filtration on ion exchanges cartridges (R3, M3 and ORC, Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France).

All extractive procedures were performed using technical grade solvents. All aqueous solutions were saturated.

Analytical Thin Layer Chromatography (TLC) was carried out on Merck 60 F254 aluminium- or glass-backed silica gel plates. Ultraviolet light (254 nm) and cerium phosphomolybdic acid (PMA/Ce) solutions were used to visualize components. PMA/Ce was prepared by mixing cerium (IV) sulfate (0.8 g), phosphomolybdic acid (2 g), sulfuric acid (4.8 mL) and water (72.5 mL).

Compounds were purified by column chromatography using silica gel 60 (particle size 40 - 63 μm , Merck).

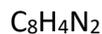
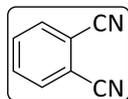
Melting points were measured using a Büchi 510 apparatus.

^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on the following 300, 400 or 500 MHz spectrometer (Bruker Avance). Spectra were recorded in deuteriochloroform referenced to residual CHCl_3 (^1H , 7.26 ppm; ^{13}C , 77.2 ppm), in hexadeuterodimethyl sulfoxide referenced to residual DMSO (^1H , 2.50 ppm; ^{13}C , 39.5 ppm) and in trideuteroacetonitrile referenced to residual CH_3CN (^1H , 1.94 ppm; ^{13}C , 1.32/118.26 ppm). Chemical shifts (δ) are reported in part per million (ppm) and coupling constants (J) are reported in Hertz (Hz). Multiplicities are indicated by s (singlet), br s (broad singlet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet) and m (multiplet). Data are reported as followed: chemical shift, multiplicity, coupling constant, integration. HSQC and HMBC experiments were performed when necessary to complete spectral assignment.

Chapter II: Synthesis of carbon-13 substituted allergens

Synthesis of (¹³C)-phthalic anhydride, (¹³C)-1

Phthalonitrile **5**

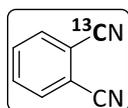


$$\text{MW} = 128.13 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

TLC R_f = 0.42 (petroleum ether/ethyl acetate: 60/40), rev: PMA/Ce

Into a round-bottom pressure flask, 2-chlorobenzonitrile (2.11 g, 15.35 mmol, 1.00 eq.), potassium cyanide (1.00 g, 15.35 mmol, 1.00 eq.), tetramethylethylenediamine (0.46 mL, 3.07 mmol, 0.20 eq.), palladium (II) acetate (69 mg, 0.31 mmol, 0.02 eq.), 1,5-bis(diphenylphosphino)pentane (272 mg, 0.60 mmol, 0.04 eq.) and dry toluene (20 mL) were added. The flask was evacuated and refilled with argon. The reaction mixture was stirred at 170 °C for 20 h. The resulting solution was filtered and concentrated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography (petroleum ether/ethyl acetate: 60/40) to give the phthalonitrile **5** (1.88 g, 96%) as a pale green solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.75-7.78 (m, 2H, 2 x CH), 7.81-7.85 (m, 2H, 2 x CH). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 115.4 (2 x CN), 116.2 (2 x C_{IV}), 133.3 (2 x CH), 133.7 (2 x CH). **Mp**: 138 °C – 140 °C (litt. 137 °C – 140 °C).

(¹³C)-Phthalonitrile, (¹³C)-5



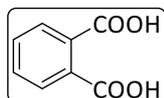
$$\text{MW} = 129.13 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

TLC R_f = 0.42 (petroleum ether/ethyl acetate: 60/40), rev: PMA/Ce

The same procedure as for the synthesis of phthalonitrile **5** was repeated starting from 2-chlorobenzonitrile (2.11 g, 15.12 mmol, 1.00 eq.), (¹³C)-potassium cyanide (1.00 g, 15.12 mmol, 1.00 eq.), tetramethylethylenediamine (0.46 mL, 3.07 mmol, 0.20 eq.), palladium (II) acetate (69 mg, 0.30 mmol, 0.02 eq.) and 1,5-bis(diphenylphosphino)pentane (272 mg, 0.60 mmol, 0.04 eq.) to give (¹³C)-**5** (1.84 g, 95%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.76-7.79 (m,

2H, 2 x CH), 7.82-7.85 (m, 2H, 2 x CH). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 115.5 (CN and ^{13}CN), 115.8 (C_{IV}), 115.8 (d, $^1J_{\text{CC}} = 40.0$ Hz, C_{IV}), 133.3 (d, $^2J_{\text{CC}} = 5.5$ Hz, CH), 133.3 (d, $^3J_{\text{CC}} = 1.4$ Hz, CH), 133.7 (d, $^3J_{\text{CC}} = 4.2$ Hz, CH), 133.7 (d, $^4J_{\text{CC}} = 1.9$ Hz, CH). **Mp**: 138 °C – 140 °C (litt. 137 °C – 140 °C).

Phthalic acid **6**

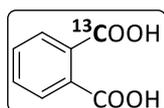


$\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_4$

MW = 166.13 g.mol⁻¹

A suspension of phthalonitrile **5** (1.89 g, 14.74 mmol, 1.00 eq.) and potassium hydroxide (6.62 g, 117.92 mmol, 8.00 eq.) in water (50 mL) was heated at reflux for about 90 h. The resulting solution was cooled to room temperature and filtered to remove any possible insoluble impurities. Then filtrate was acidified by hydrochloric acid to pH = 1 and extracted with ethyl acetate (3 x 30 mL). The combined organic layers were washed with brine (50 mL), dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under vacuum to give phthalic acid **6** (2.35 g, 96%) as a white solid. ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 7.56-7.60 (m, 2H, 2 x CH), 7.65-7.69 (m, 2H, 2 x CH), 13.10 (br s, 2H, 2 x COOH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 128.4 (2 x CH), 130.8 (2 x CH), 132.9 (2 x C_{IV}), 168.7 (2 x COOH). **Mp**: 206 °C – 208 °C (litt. 206 °C – 208 °C).

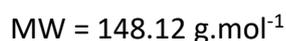
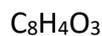
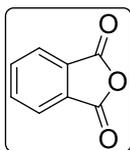
(^{13}C)-Phthalic acid, (^{13}C)-**6**



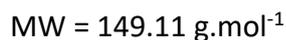
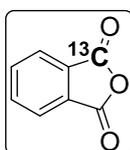
$\text{C}_7^{13}\text{CH}_6\text{O}_4$

MW = 167.12 g.mol⁻¹

The same procedure as for the synthesis of phthalic acid **6** was repeated starting from (^{13}C)-**5** (1.84 g, 14.25 mmol, 1.00 eq.) and potassium hydroxide (6.40 g, 114 mmol, 8.00 eq.) to give (^{13}C)-**6** (2.27 g, 95%) as a white solid. ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 7.56-7.60 (m, 2H, 2 x CH), 7.64-7.68 (m, 2H, 2 x CH), 13.10 (br s, 2H, 2 x COOH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 128.8 (d, $^2J_{\text{CC}} = 4.8$ Hz, CH), 128.8 (d, $^3J_{\text{CC}} = 2.2$ Hz, CH), 131.2 (d, $^3J_{\text{CC}} = 4.2$ Hz, CH), 131.2 (d, $^4J_{\text{CC}} = 0.7$ Hz, CH), 133.3 (C_{IV}), 133.3 (d, $^1J_{\text{CC}} = 71.9$ Hz, C_{IV}), 169.1 (COOH and $^{13}\text{COOH}$). **Mp**: 206 °C – 208 °C (litt. 206 °C – 208 °C).

Phthalic anhydride 1

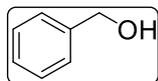
To acetic anhydride (2.68 mL, 28.30 mmol, 2.00 eq.) in a flask equipped with a reflux condenser was added phthalic acid **6** (2.35 g, 14.15 mmol, 1.00 eq.). The mixture was heated to boiling until the acid is completely dissolved and then for about 10 more minutes. The hot mixture was cooled to room temperature. The white solid formed were filtered, washed with petroleum ether and dried under vacuum to give phthalic anhydride **1** (1.89 g, 90%) as white crystals. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 8.00-8.02 (m, 2H, 2 x CH), 8.08-8.10 (m, 2H, 2 x CH). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 125.3 (2 x CH), 131.2 (2 x C_V), 136.2 (2 x CH), 163.2 (2 x CO). **Mp**: 128 °C – 130 °C (litt. 128 °C – 130 °C).

(^{13}C)-Phthalic anhydride, (^{13}C)-1

Starting from (^{13}C)-**6** (2.27 g, 13.58 mmol, 1.00 eq.) and acetic anhydride (2.57 mL, 27.16 mmol, 2.00 eq.), the same procedure as for the synthesis of phthalic anhydride **1** was repeated to give (^{13}C)-**1** (1.82 g, 90%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 8.00-8.03 (m, 2H, 2 x CH), 8.06-8.10 (m, 2H, 2 x CH). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 125.3 (d, $^2J_{\text{CC}} = 4.5$ Hz, CH), 125.3 (d, $^3J_{\text{CC}} = 2.9$ Hz, CH), 131.2 (d, $^1J_{\text{CC}} = 70.2$ Hz, C_V), 131.2 (d, $^2J_{\text{CC}} = 2.7$ Hz, C_V), 136.2 (d, $^4J_{\text{CC}} = 0.9$ Hz, CH), 136.2 (d, $^3J_{\text{CC}} = 5.0$ Hz, CH), 163.2 (C=O and $^{13}\text{C}=\text{O}$). **Mp**: 128 °C – 130 °C (litt. 128 °C – 130 °C).

Synthesis of 2-(¹³C)-2,3-diphenylcycloprop-2-en-1-one, (¹³C)-2

Benzyl alcohol **7**



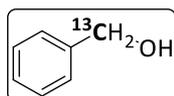
C₇H₈O

MW = 108.14 g.mol⁻¹

TLC R_f = 0.48 (petroleum ether/ethyl acetate: 80/20), rev: PMA/Ce

A solution of benzoic acid (2.00 g, 16.37 mmol, 1.00 eq.) in dry THF (30 mL) was added dropwise to a solution of LiAlH₄ (1.02 g, 27.01 mmol, 1.65 eq.) in THF (30 mL) at 0 °C. The resulting solution was allowed to warm to room temperature and stirred for 16 h. The reaction was quenched by the addition dropwise of a 1 M solution of KOH (30 mL) at 0 °C. Diethyl ether (60 mL) was then added and the mixture was stirred for 30 min at room temperature. The aqueous layer was extracted with diethyl ether (2 × 60 mL). The combined organic layers were washed with 1 M solution of HCl (60 mL), brine (60 mL), dried over MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum to give benzyl alcohol **7** (1.73 g, 98%) as a colorless oil which was used without further purification. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.72 (br s, 1H, OH), 4.70 (s, 2H, CH₂), 7.28-7.38 (m, 5H, 5 × CH). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 65.3 (CH₂), 127.1 (2 × CH), 127.7 (CH), 128.6 (2 × CH), 140.9 (C_{IV}).

Benzyl alcohol-α-¹³C, (¹³C)-**7**

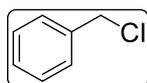


C₆¹³CH₈O

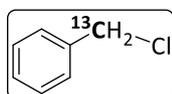
MW = 109.13 g.mol⁻¹

TLC R_f = 0.48 (petroleum ether/ethyl acetate: 80/20), rev: PMA/Ce

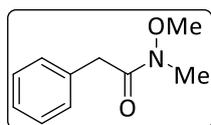
The same procedure as for the synthesis of benzyl alcohol **7** was repeated starting from α-¹³C-benzoic acid (2.00 g, 16.24 mmol) and LiAlH₄ (1.02 g, 26.80 mmol, 1.65 eq.) to give (¹³C)-**7** (1.76 g, 99%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.73 (br s, 1H, OH), 4.68 (d, ¹J_{HC} = 142.5 Hz, 2H, ¹³CH₂), 7.29-7.39 (m, 5H, 5 × CH). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 65.4 (¹³CH₂), 127.1 (d, ³J_{CC} = 3.4 Hz, 2 × CH), 127.7 (d, ⁴J_{CC} = 0.8 Hz, CH), 128.7 (d, ²J_{CC} = 3.9 Hz, 2 × CH), 140.9 (d, ¹J_{CC} = 46.7 Hz, C_{IV}).

Benzyl chloride **8** C_7H_7Cl MW = 126.58 g.mol⁻¹TLC R_f = 0.54 (petroleum ether), rev: PMA/Ce

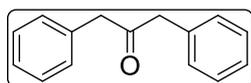
Thionyl chloride (2.21 mL, 30.40 mmol, 1.90 eq.) was added dropwise to a solution of benzyl alcohol **7** (1.73 g, 16.00 mmol, 1.00 eq.) in dry diethyl ether (15 mL). Pyridine (0.06 mL) was then added, and the resulting mixture was stirred at reflux for 1 h. The same quantity of thionyl chloride and pyridine was added again. After another 1 h of stirring at reflux, the mixture was quenched with water (15 mL) and extracted with diethyl ether (3 x 15 mL). The resulting organic layers were washed with brine (30 mL), dried over MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. The resulting benzyl chloride **8** (1.83 g, 90%) was obtained as a clear oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.44 (s, 2H, CH₂), 7.16-7.26 (m, 5H, 5 x CH). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 46.4 (CH₂), 128.5 (CH), 128.7 (2 x CH), 128.9 (2 x CH), 137.6 (C_{IV}).

Benzyl chloride-α-¹³C, (¹³C)-8**** $C_6^{13}CH_7Cl$ MW = 127.58 g.mol⁻¹TLC R_f = 0.54 (petroleum ether), rev: PMA/Ce

The same procedure as for the synthesis of benzyl chloride **8** was repeated starting from (¹³C)-**7** (1.76 g, 16.12 mmol, 1.00 eq.) and thionyl chloride (4.44 mL, 61.25 mmol, 3.80 eq.) to give (¹³C)-**8** (1.73 g, 84%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.60 (d, ¹J_{HC} = 150.0 Hz, 2H, ¹³CH₂), 7.31-7.41 (m, 5H, 5 x CH). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 46.4 (¹³CH₂), 128.5 (d, ⁴J_{CC} = 0.9 Hz, CH), 128.7 (d, ³J_{CC} = 3.9 Hz, 2 x CH), 128.9 (d, ²J_{CC} = 4.3 Hz, 2 x CH), 137.6 (d, ¹J_{CC} = 47.5 Hz, C_{IV}).

***N*-methoxy-*N*-methyl-2-phenylacetamide 10** $C_{10}H_{13}NO_2$ MW = 179.21 g.mol⁻¹TLC R_f = 0.40 (petroleum ether/ethyl acetate: 50/50), rev: PMA/Ce

To phenylacetic acid (1.63 g, 12.00 mmol, 1.00 eq.) in dry CH₂Cl₂ (30 mL) was added 1,1'-carbonyldiimidazole (2.53g, 15.60 mmol, 1.30 eq.). The reaction mixture was stirred for 1 h. Then *N,O*-Dimethylhydroxylamine hydrochloride (2.34 g, 24.00 mmol, 2.00 eq.) was added and the solution was stirred overnight. The reaction was treated with water (30 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3 x 30 mL). The combined organic layers were washed with brine (60 mL), dried over MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography (petroleum ether/ethyl acetate: 50/50) to afford *N*-methoxy-*N*-methyl-2-phenylacetamide **10** (2.10 g, 98%) as a colorless oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.13 (s, 3H, CH₃), 3.53 (s, 3H, OCH₃), 3.71 (s, 2H, CH₂) 7.17-7.27 (m, 5H, 5 x CH). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 32.2 (CH₃), 39.4 (CH₂), 61.3 (OCH₃), 126.8 (CH), 128.5 (2 x CH), 129.3 (2 x CH), 135.0 (C_{IV}), 172.4 (C=O).

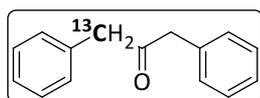
1,3-diphenylpropan-2-one 11 $C_{15}H_{14}O$ MW = 210.28 g.mol⁻¹TLC R_f = 0.44 (petroleum ether/ethyl acetate: 90/10), rev: PMA/Ce

A solution of benzyl chloride **8** (1.83 g, 14.46 mmol, 1.00 eq.) in dry diethyl ether (5 mL) was added dropwise to diethyl ether (10 mL) containing magnesium turnings (1.04 g, 43.37 mmol, 3.00 eq.). At the end of the addition, the resulting mixture was stirred at room temperature for 2 h. The benzylmagnesium chloride formed was used directly without purification for the next step.

N-methoxy-*N*-methyl-2-phenylacetamide **10** (2.16 g, 12.05 mmol, 1.00 eq.) in dry THF (60 mL) was cooled to 0 °C and benzylmagnesium chloride (2.20 g, 14.46 mmol, 1.20 eq.) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 30 min and at room temperature for 1

h. The reaction was then quenched with water (40 mL), a solution of 2 M HCl (4 mL) and extracted with diethyl ether (2 x 40 mL). The combined organic layers were washed with brine (60 mL), dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography (petroleum ether/ethyl acetate: 90/10) to afford 1,3-diphenylpropan-2-one **11** (2.00 g, 79%) as a colorless oil. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3.74 (s, 4H, 2 x CH_2), 7.19 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.3$ Hz, 4H, 4 x CH), 7.28-7.37 (m, 6H, 6 x CH). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 49.0 (2 x CH_2), 127.0 (2 x CH), 128.6 (4 x CH), 129.5 (4 x CH), 134.0 (2 x C_{IV}), 205.4 ($\text{C}=\text{O}$).

1-(^{13}C)-1,3-diphenylpropan-2-one, (^{13}C)-**11**



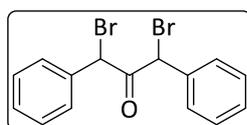
$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}$

MW = 211.27 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

TLC R_f = 0.44 (petroleum ether/ethyl acetate: 90/10), rev: PMA/Ce

Starting from (^{13}C)-**8** (1.73 g, 13.56 mmol, 1.20 eq.) and *N*-methoxy-*N*-methyl-2-phenylacetamide **10** (2.03 g, 11.30 mmol, 1.00 eq.), the same procedure as for the synthesis of 1,3-diphenylpropan-2-one **11** was repeated to give (^{13}C)-**11** (1.98 g, 83%). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3.72 (s, 2H, CH_2), 3.72 (d, $^1J_{\text{HC}} = 127.9$ Hz, 2H, $^{13}\text{CH}_2$), 7.14-7.16 (m, 4H, 4 x CH), 7.21-7.34 (m, 6H, 6 x CH). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 49.2 (CH_2 and $^{13}\text{CH}_2$), 127.2 (2 x CH), 128.9 (2 x CH), 128.9 (d, $^3J_{\text{CC}} = 3.7$ Hz, 2 x CH), 129.6 (2 x CH), 129.6 (d, $^3J_{\text{CC}} = 2.8$ Hz, 2 x CH), 134.1 (C_{IV}), 134.1 (d, $^1J_{\text{CC}} = 43.1$ Hz, C_{IV}), 205.9 (d, $^1J_{\text{CC}} = 38.6$ Hz, $\text{C}=\text{O}$).

1,3-Dibromo-1,3-diphenylpropan-2-one **12**



$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{Br}_2\text{O}$

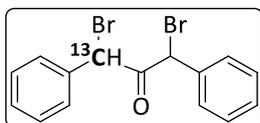
MW = 368.07 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

TLC R_f = 0.58 (petroleum ether/ethyl acetate: 90/10), rev: PMA/Ce

A flask containing a solution of 1,3-diphenylpropan-2-one **11** (2.00 g, 9.51 mmol, 1.00 eq.) in acetic acid (8 mL) was equipped with an addition funnel, and a solution of bromine (0.98 mL, 19.02 mmol, 2.00 eq.) in acetic acid (16 mL) was added over a period of approximately 15 minutes. After stirring for another 15 minutes, water (20 mL) was added into the reaction

mixture. Then solid sodium thiosulfate was added until the color of bromine disappeared. After one hour of stirring, CH_2Cl_2 (30 mL) was added and the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 30 mL). The organic layers were washed with brine (60 mL), dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under vacuum. The crude solid was recrystallized from petroleum ether to give 1,3-dibromo-1,3-diphenylpropan-2-one **12** (2.63 g, 75%) as white needles crystals. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5.79 (s, 2H, 2 x CHBr), 7.36-7.43 (m, 10H, 10 x CH). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 51.1 (2 x CHBr), 129.1 (4 x CH), 129.3 (4 x CH), 129.7 (2 x CH), 134.4 (2 x C_{IV}), 192.1 ($\text{C}=\text{O}$). **Mp**: 110 °C – 114 °C (litt. 112 °C – 114 °C).

1-(^{13}C)-1,3-Dibromo-1,3-diphenylpropan-2-one, (^{13}C)-**12**



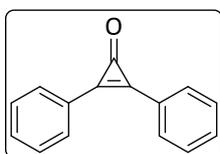
$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{Br}_2\text{O}$

MW = 369.06 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

TLC R_f = 0.58 (petroleum ether/ethyl acetate: 90/10), rev: PMA/Ce

Starting from (^{13}C)-**11** (1.98 g, 9.37 mmol, 1.00 eq.) and bromine (0.97 mL, 18.74 mmol, 2.00 eq.), the same procedure as for the synthesis of 1,3-dibromo-1,3-diphenylpropan-2-one **12** was repeated to give (^{13}C)-**12** (2.52 g, 73%). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5.79 (s, 1H, CHBr), 5.79 (d, $^1J_{\text{HC}} = 155.0$ Hz, 1H, $^{13}\text{CHBr}$), 7.35-7.38 (m, 6H, 6 x CH), 7.41-7.43 (m, 4H, 4 x CH). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 51.1 (CHBr and $^{13}\text{CHBr}$), 129.1 (2 x CH), 129.1 (d, $^2J_{\text{CC}} = 4.1$ Hz, 2 x CH), 129.3 (2 x CH), 129.3 (d, $^3J_{\text{CC}} = 3.4$ Hz, 2 x CH), 129.7 (2 x CH), 134.4 (C_{IV}), 134.4 (d, $^1J_{\text{CC}} = 46.5$ Hz, C_{IV}), 192.1 (d, $^1J_{\text{CC}} = 43.8$ Hz, $\text{C}=\text{O}$).

2,3-diphenylcycloprop-2-en-1-one **2**



$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}$

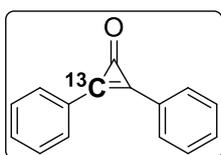
MW = 206.24 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

TLC R_f = 0.34 (petroleum ether/ethyl acetate: 50/50), rev: PMA/Ce

A flask containing a solution of triethylamine (2.63 mL, 18.85 mmol, 2.64 eq.) in CH_2Cl_2 (5 mL) was equipped with an addition funnel, and a solution of the crude 1,3-dibromo-1,3-diphenylpropan-2-one **12** (2.63 g, 7.14 mmol, 1.00 eq.) in CH_2Cl_2 (10 mL) was added over a

period of 1 hour. The resulting deep red solution was stirred for 30 minutes, then washed with a 3 M solution of HCl (3 x 10 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with brine (60 mL), dried over MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography (petroleum ether/ethyl acetate: 50/50) to give a white solid which was recrystallized from *n*-hexane (30 mL) and a minimum of benzene (6 mL). Diphenylcyclopropenone **2** was isolated as a white powder (912 mg, 62%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.55-7.60 (m, 6H, 6 x CH), 7.97-7.99 (m, 4H, 4 x CH). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 124.2 (2 x C_{IV}), 129.5 (4 x CH), 131.6 (4 x CH), 132.8 (2 x CH), 148.6 (2 x C_{IV}), 155.9 (C=O). **Mp**: 118 °C – 120 °C (litt. 118 °C – 122 °C).

2-(¹³C)-2,3-diphenylcycloprop-2-en-1-one, (¹³C)-2



C₁₅H₁₀O

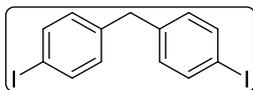
MW = 207.24 g.mol⁻¹

TLC R_f = 0.34 (petroleum ether/ethyl acetate: 50/50), rev: PMA/Ce

Starting from (¹³C)-**12** (2.52 g, 6.83 mmol, 1.00 eq.) and triethylamine (2.51 mL, 18.03 mmol, 2.64 eq.), the same procedure as for the synthesis of 2,3-diphenylcycloprop-2-en-1-one **2** was repeated to give (¹³C)-**2** (877 mg, 62%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.57-7.61 (m, 6H, 6 x CH), 7.99-8.02 (m, 4H, 4 x CH). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 124.2 (d, ²J_{CC} = 4.8 Hz, C_{IV}), 124.2 (d, ¹J_{CC} = 64.0 Hz, C_{IV}), 129.5 (2 x CH), 129.5 (d, ²J_{CC} = 4.9 Hz, 2 x CH), 131.7 (2 x CH), 131.7 (d, ³J_{CC} = 4.5 Hz, 2 x CH), 132.9 (2 x CH), 148.5 (C_{IV} and ¹³C_{IV}), 156.0 (d, ¹J_{CC} = 24.7 Hz, C=O).

Synthesis of (¹³C)-4,4'-Methylenediphenyldiisocyanate, (¹³C)-3

4,4'-Diiododiphenylmethane **13**



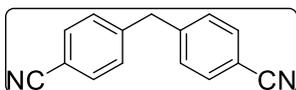
C₁₃H₁₀I₂

MW = 420.03 g.mol⁻¹

TLC R_f = 0.50 (petroleum ether), rev: PMA/Ce

A mixture of 4,4'-diaminodiphenylmethane (9.91 g, 50 mmol, 1.00 eq.), hydrochloric acid 37% (15 mL) and water (85 mL) was cooled to 0°C. A solution of NaNO₂ (8.62 g, 125 mmol, 2.50 eq.) in water (20 mL) was added dropwise and stirred for 10 min. The resulting diazonium salt was treated with a solution of KI (20.75 g, 125 mmol, 2.50 eq.) in water (20 mL). The resulting brown foamy mixture was stirred for 30 min at room temperature and heated to reflux for 30 min. After cooling to room temperature, the reaction mixture was diluted with water (150 mL) and neutralized by slow addition of a saturated solution of Na₂S₂O₃. The mixture was extracted with dichloromethane (3 x 250 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by column chromatography to give 4,4'-diiododiphenylmethane **13** (12.81 g, 61%) as a white solid. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.85 (s, 2H, CH₂), 6.90 (d, ³J_{HH} = 8.3 Hz, 4H, 4 x CH), 7.60 (d, ³J_{HH} = 8.3 Hz, 4H, 4 x CH). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 41.0 (CH₂), 91.7 (2 x C_{IV}), 131.1 (4 x CH), 137.8 (4 x CH), 140.2 (2 x C_{IV}). **Mp**: 88 °C – 90 °C (litt. 89 °C – 91 °C).

4,4'-Methylenedibenzonitrile **14**



C₁₅H₁₀N₂

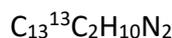
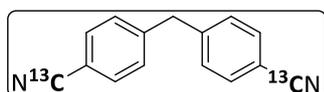
MW = 218.26 g.mol⁻¹

TLC R_f = 0.42 (petroleum ether/ethyl acetate: 80/20), rev: PMA/Ce

Into a round-bottom pressure flask, 4,4'-diiododiphenylmethane **13** (2.93 g, 6.98 mmol, 1.00 eq.), potassium cyanide (1.00 g, 15.35 mmol, 2.20 eq.), copper (I) iodide (266 mg, 1.39 mmol, 0.20 eq.), 1,10-phenanthroline (505 mg, 2.79 mmol, 0.4 eq.) and dry DMF (8.4 mL) were added. The flask was evacuated and refilled with argon. The reaction mixture was stirred at 120 °C for 48 h. The resulting solution was diluted with ethyl acetate (20 mL), filtered on Celite[®] and concentrated under vacuum. The crude product was purified by column

chromatography (petroleum ether/ethyl acetate: 80/20) to give the 4,4'-methylenedibenzonitrile **14** (1.45 g, 95%) as a white solid. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 4.07 (s, 2H, CH_2), 7.25 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.3$ Hz, 4H, 4 x CH), 7.59 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.3$ Hz, 4H, 4 x CH). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 42.0 (CH_2), 110.9 (2 x C_{IV}), 118.8 (2 x CN), 129.8 (4 x CH), 132.7 (4 x CH), 144.9 (2 x C_{IV}). **Mp**: 131 °C – 133 °C (litt. 131 °C – 133 °C).

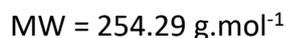
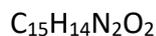
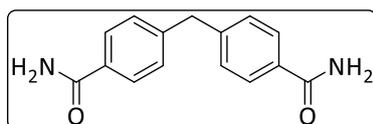
(^{13}C)-4,4'-Methylenedibenzonitrile, (^{13}C)-**14**



TLC $R_f = 0.42$ (petroleum ether/ethyl acetate: 80/20), rev: PMA/Ce

Starting from 4,4'-diiododiphenylmethane **13** (2.89 g, 6.87 mmol, 1.00 eq.), (^{13}C)-potassium cyanide (1.00 g, 15.12 mmol, 2.2 eq.), copper (I) iodide (262 mg, 1.37 mmol, 0.20 eq.) and 1,10-phenanthroline (495 mg, 2.75 mmol, 0.4 eq.), the same procedure as for the synthesis of 4,4'-methylenedibenzonitrile **14** was repeated to give (^{13}C)-**14** (1.47 g, 97%) as a white solid. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 4.09 (s, 2H, CH_2), 7.26 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.2$ Hz, 4H, 4 x CH), 7.59 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8.2$ Hz, $^3J_{\text{HC}} = 5.3$ Hz, 4H, 4 x CH). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 42.0 (CH_2), 110.8 (d, $^1J_{\text{CC}} = 81.5$ Hz, 2 x C_{IV}), 118.8 (CN and ^{13}CN), 129.8 (d, $^2J_{\text{CC}} = 5.6$ Hz, 4 x CH), 132.7 (d, $^3J_{\text{CC}} = 2.7$ Hz, 4 x CH), 144.9 (d, $^4J_{\text{CC}} = 1.6$ Hz, 2 x C_{IV}). **Mp**: 131 °C – 133 °C (litt. 131 °C – 133 °C).

4,4'-Methylenedibenzamide **15**

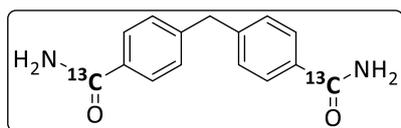


TLC $R_f = 0.38$ (ethyl acetate/methanol: 95/5), rev: PMA/Ce

4,4'-methylenedibenzonitrile **14** (1.45 g, 6.64 mmol, 1.00 eq.) was dissolved in ethanol (70 mL) and DMSO (0.94 mL, 13.28 mmol, 2.00 eq.) was then added. The reaction mixture was cooled to 0 °C. Then a 1 M solution of NaOH (6.7 mL) and a 30% solution of H_2O_2 (15.8 mL) were added, stirred for 30 min at room temperature and quenched by a saturated solution of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (20 mL). Ethanol was removed by evaporation from the resulting mixture before being filtered. The filtrate was extracted with ethyl acetate (3 x 50 mL). The organic layer was

concentrated under vacuum. The residue was purified by column chromatography (ethyl acetate/methanol: 95/5) to give 4,4'-methylenedibenzamide **15** (1.60 g, 95%) as a white solid. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 4.03 (s, 2H, CH_2), 7.30-7.33 (m, 6H, 4 x CH and 2 x NH), 7.79 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.3$ Hz, 4H, 4 x CH), 7.91 (br s, 2H, 2 x NH). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 40.6 (CH_2), 127.8 (4 x CH), 128.6 (4 x CH), 132.2 (2 x C_{IV}), 144.2 (2 x C_{IV}), 167.7 (2 x $\text{C}=\text{O}$). **Mp**: 260 °C – 262 °C.

(^{13}C)-4,4'-Methylenedibenzamide, (^{13}C)-15



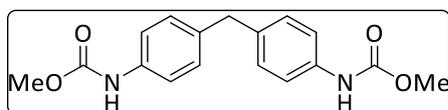
$\text{C}_{13}^{13}\text{C}_2\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$

MW = 256.27 g.mol $^{-1}$

TLC R_f = 0.38 (ethyl acetate/methanol: 95/5), rev: PMA/Ce

The same procedure as for the synthesis of 4,4'-methylenedibenzamide **15** was repeated starting from (^{13}C)-**14** (1.47 g, 6.67 mmol, 1.00 eq.), DMSO (0.95 mL, 13.34 mmol, 2.00 eq.), 1 M solution of NaOH (6.7 mL), 30% solution of H_2O_2 (16 mL) and ethanol (67 mL) to give (^{13}C)-**15** (1.63 g, 95%) as a white solid. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 4.03 (s, 2H, CH_2), 7.31 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.2$ Hz, 6H, 4 x CH and 2 x NH), 7.79 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8.2$ Hz, $^3J_{\text{HC}} = 3.7$ Hz, 4H, 4 x CH), 7.90 (br s, 2H, 2 x NH). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 40.6 (CH_2), 127.8 (d, $^3J_{\text{CC}} = 2.6$ Hz, 4 x CH), 128.6 (d, $^2J_{\text{CC}} = 4.1$ Hz, 4 x CH), 132.2 (d, $^1J_{\text{CC}} = 61.9$ Hz, 2 x C_{IV}), 144.2 (2 x C_{IV}), 167.7 (2 x $^{13}\text{C}=\text{O}$). **Mp**: 260 °C – 262 °C.

Dimethyl [methylenebis(4,1-phenylene)]dicarbamate **16**



$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$

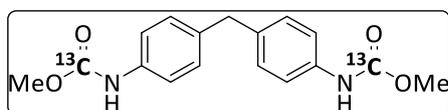
MW = 314.34 g.mol $^{-1}$

TLC R_f = 0.40 (petroleum ether/ethyl acetate: 60/40), rev: PMA/Ce

4,4'-methylenedibenzamide **15** (1.60 g, 6.29 mmol, 1.00 eq.) was dissolved in methanol (90 mL). To the solution 1,8-diazabicyclo-[5.4.0]undec-7-ene (DBU) (4.23 mL, 28.30 mmol, 4.5 eq.) and *N*-bromosuccinimide (NBS) (1.12 g, 6.29 mmol, 1.00 eq.) were then added. The mixture was allowed to stir at room temperature for 15 min and additional NBS (1.12 g, 6.29 mmol, 1.00 eq.) was added. The reaction mixture was stirred at reflux for 16 h, cooled to room

temperature and methanol was removed by evaporation. The residue was dissolved in ethyl acetate (50 mL), treated with a 5% solution of HCl (50 mL) and a saturated solution of NaHCO₃ (50 mL). The organic layer was washed with brine (50 mL), dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography (petroleum ether/ethyl acetate: 60/40) to give dimethyl [methylenebis(4,1-phenylene)]dicarbamate **16** (1.94 g, 98%) as a white solid. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 3.63 (s, 6H, 2 x OCH₃), 3.78 (s, 2H, CH₂), 7.10 (d, ³J_{HH} = 8.3 Hz, 4H, 4 x CH), 7.34 (d, ³J_{HH} = 8.3 Hz, 4H, 4 x CH), 9.55 (br s, 2H, 2 x NH). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 40.2 (CH₂), 51.6 (2 x CH₃), 118.3 (4 x CH), 128.9 (4 x CH), 135.5 (2 x C_{IV}), 137.1 (2 x C_{IV}), 154.0 (2 x CO). **Mp**: 178 °C – 180 °C (litt. 178.5 °C – 179.5 °C).

(¹³C)-Dimethyl [methylenebis(4,1-phenylene)]dicarbamate, (¹³C)-16



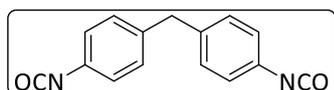
C₁₅¹³C₂H₁₈N₂O₄

MW = 316.33 g.mol⁻¹

TLC R_f = 0.40 (petroleum ether/ethyl acetate: 60/40), rev: PMA/Ce

Starting from (¹³C)-**15** (1.63 g, 6.40 mmol, 1.00 eq.), 1,8-diazabicyclo-[5.4.0]undec-7-ene (DBU) (4.3 mL, 28.80 mmol, 4.5 eq.) and *N*-bromosuccinimide (NBS) (2.28 g, 12.80 mmol, 2.00 eq.), the same procedure as for the synthesis of dimethyl [methylenebis(4,1-phenylene)]dicarbamate **16** was repeated to give (¹³C)-**16** (1.92 g, 95%) as a white solid. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 3.64 (d, ³J_{HC} = 4.1 Hz, 6H, 2 x OCH₃), 3.78 (s, 2H, CH₂), 7.10 (d, ³J_{HH} = 8.3 Hz, 4H, 4 x CH), 7.35 (d, ³J_{HH} = 8.3 Hz, 4H, 4 x CH), 9.56 (br s, 2H, 2 x NH). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 40.1 (CH₂), 51.6 (d, ²J_{CC} = 1.8 Hz, 2 x CH₃), 118.4 (4 x CH), 128.9 (4 x CH), 135.6 (2 x C_{IV}), 137.1 (d, ²J_{CC} = 1.6 Hz, 2 x C_{IV}), 154.1 (2 x ¹³C=O). **Mp**: 178 °C – 180 °C (litt. 178.5 °C – 179.5 °C).

4,4'-Methylenediphenyldiisocyanate **3**



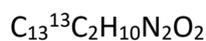
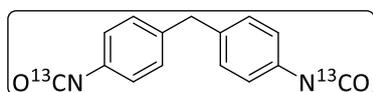
C₁₅H₁₀N₂O₂

MW = 250.26 g. mol⁻¹

Dimethyl [methylenebis(4,1-phenylene)]dicarbamate **16** (1.94 g, 6.17 mmol, 1.00 eq.) was dissolved in benzene (30 mL) and triethylamine (1.89 mL, 13.57 mmol, 2.20 eq.) was then

added. The reaction mixture was stirred at reflux for 30 min, cooled to room temperature and a 1 M solution of boron trichloride in *n*-heptane (4.57 mL, 4.57 mmol, 0.74 eq.) was added. The reaction mixture was stirred at reflux for another 30 min before being cooled to room temperature and evaporated under vacuum. The residue was distilled in a Kugelrohr (1 mbar, 160 °C) to give a mixture of 4,4'-methylenediphenylisocyanate **3** and triethylamine hydrochloride. This mixture was washed rapidly with water and dried under vacuum to give 4,4'-methylenediphenyldiisocyanate **3** (864 mg, 56%) as a white solid. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, acetonitrile- d_3) δ (ppm): 3.91 (s, 2H, CH_2), 7.06-7.08 (m, 4H, 4 x CH), 7.17-7.19 (m, 4H, 4 x CH). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, acetonitrile- d_3) δ (ppm): 41.0 (CH_2), 125.5 (2 x NCO), 125.8 (4 x CH), 130.8 (4 x CH), 132.4 (2 x C_IV), 140.1 (2 x C_IV). **Mp**: 38 °C – 40 °C (litt. 37 °C – 40 °C).

(^{13}C)-4,4'-Methylenediphenyldiisocyanate, (^{13}C)-3****

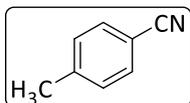


$$\text{MW} = 252.24 \text{ g. mol}^{-1}$$

The same procedure as for the synthesis of 4,4'-methylenediphenyldiisocyanate **3** was repeated starting from (^{13}C)-**16** (1.92 g, 6.10 mmol, 1.00 eq.), triethylamine (1.87 mL, 13.42 mmol, 2.20 eq.), 1 M solution of boron trichloride in *n*-heptane (4.5 mL, 4.50 mmol, 0.74 eq.) to give (^{13}C)-**3** (769 mg, 50%) as a white solid. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, acetonitrile- d_3) δ (ppm): 3.92 (s, 2H, CH_2), 7.07-7.08 (m, 4H, 4 x CH), 7.18-7.19 (m, 4H, 4 x CH). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, acetonitrile- d_3) δ (ppm): 40.9 (CH_2), 125.4 (2 x N^{13}CO), 125.8 (d, $^3J_{\text{CC}} = 3.4 \text{ Hz}$, 4 x CH), 130.8 (4 x CH), 132.3 (d, $^2J_{\text{CC}} = 6.3 \text{ Hz}$, 2 x C_IV), 140.0 (2 x C_IV). **Mp**: 38 °C – 40 °C (litt. 37 °C – 40 °C).

Synthesis of (¹³C)-*p*-Tolylisocyanate, (¹³C)-4

4-methylbenzonitrile **17**



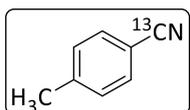
C₈H₇N

MW = 117.06 g.mol⁻¹

TLC R_f = 0.44 (petroleum ether/ethyl acetate: 95/5), rev: PMA/Ce

Into a round-bottom pressure flask, 4-iodotoluene (3.04 g, 13.96 mmol, 1.00 eq.), potassium cyanide (1.00 g, 15.35 mmol, 1.10 eq.), copper (I) iodide (266 mg, 1.39 mmol, 0.10 eq.), 1,10-phenanthroline (503 mg, 2.79 mmol, 0.2 eq.) and dry DMF (8.4 mL) were added. The flask was evacuated and back filled with argon. The reaction mixture was stirred at 120 °C for 24 h. The resulting solution was diluted with ethyl acetate (20 mL), filtered on Celite[®] and concentrated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography (petroleum ether/ethyl acetate: 95/5) to give the 4-methylbenzonitrile **17** (1.57 g, 96%) as a white solid. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2.40 (s, 3H, CH₃), 7.25 (d, ³J_{HH} = 8.3 Hz, 2H, 2 x CH), 7.51 (d, ³J_{HH} = 8.3 Hz, 2H, 2 x CH). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 21.8 (CH₃), 109.3 (C_{IV}), 119.2 (CN), 129.9 (2 x CH), 132.0 (2 x CH), 143.7 (C_{IV}). Mp: 26 °C – 28 °C (litt. 26 °C – 28 °C).

(¹³C)- 4-methylbenzonitrile, (¹³C)-17

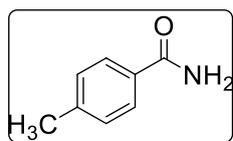


C₇¹³CH₇N

TLC R_f = 0.44 (petroleum ether/ethyl acetate: 95/5), rev: PMA/Ce

The same procedure as for the synthesis of 4-methylbenzonitrile **17** was repeated starting from 4-iodotoluene (3.00 g, 13.75 mmol, 1.00 eq.), (¹³C)-potassium cyanide (1.00 g, 15.12 mmol, 1.10 eq.), copper (I) iodide (262 mg, 1.37 mmol, 0.10 eq.) and 1,10-phenanthroline (496 mg, 2.75 mmol, 0.2 eq.) to give (¹³C)-**17** (1.31 g, 95%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2.41 (s, 3H, CH₃), 7.24-7.27 (m, 2H, 2 x CH), 7.51-7.55 (m, 2H, 2 x CH). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 22.0 (CH₃), 109.8 (d, ¹J_{CC} = 81.4 Hz, C_{IV}), 119.3 (¹³CN), 130.0 (d, ²J_{CC} = 5.6 Hz, 2 x CH), 132.2 (d, ³J_{CC} = 2.7 Hz, 2 x CH), 143.8 (d, ⁴J_{CC} = 1.7 Hz, C_{IV}). Mp: 26 °C – 28 °C (litt. 26 °C – 28 °C).

4-Methylbenzamide **18**



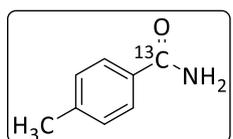
C₈H₉NO

MW = 135.17 g.mol⁻¹

TLC R_f = 0.47 (ethyl acetate), rev: PMA/Ce

4-methylbenzamide **17** (1.57 g, 13.40 mmol, 1.00 eq.) was dissolved in ethanol (67 mL) and DMSO (0.95 mL, 13.40 mmol, 1.00 eq.) was then added. The reaction mixture was cooled to 0 °C. A 1 M solution of NaOH (6.7 mL) and a 30% solution of H₂O₂ (16.0 mL) were then added, stirred for 30 min at room temperature and quenched by a saturated solution of Na₂S₂O₃ (20 mL). Ethanol was removed by evaporation from the resulting mixture before being filtered. The filtrate was extracted with ethyl acetate (3 x 50 mL). The organic layer was concentrated under vacuum. The residue was purified by column chromatography (ethyl acetate) to give 4-methylbenzamide **18** (1.72 g, 95%) as a white solid. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 2.34 (s, 3H, CH₃), 7.24 (d, ³J_{HH} = 8.3 Hz, 2H, 2 x CH), 7.28 (br s, 1H, NH), 7.77 (d, ³J_{HH} = 8.3 Hz, 2H, 2 x CH), 7.90 (br s, 1H, NH). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 21.0 (CH₃), 127.5 (2 x CH), 128.8 (2 x CH), 131.5 (C_V), 141.1 (C_{IV}), 167.8 (C=O). Mp: 160 °C – 162 °C (litt. 159 °C – 162 °C).

(¹³C)-4-Methylbenzamide, (¹³C)-**18**



C₇¹³CH₉NO

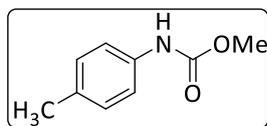
MW = 136.16 g.mol⁻¹

TLC R_f = 0.47 (ethyl acetate), rev: PMA/Ce

Starting from (¹³C)-**17** (1.31 g, 11.09 mmol, 1.00 eq.), DMSO (0.79 mL, 11.09 mmol, 1.00 eq.), 1 M solution of NaOH (5.6 mL), 30% solution of H₂O₂ (13.3 mL) and ethanol (56 mL), the same procedure as for the synthesis of 4-methylbenzamide **18** was repeated to give (¹³C)-**18** (1.58 g, 100%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 2.34 (s, 3H, CH₃), 7.25 (d, ³J_{HH} = 8.2 Hz, 2H, 2 x CH), 7.27 (br s, 1H, NH), 7.77 (dd, ³J_{HH} = 8.2 Hz, ³J_{HC} = 3.8 Hz, 2H, 2 x CH), 7.90 (br s, 1H, NH). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 21.0 (CH₃), 127.5 (d, ³J_{CC} = 2.6 Hz, 2 x CH), 128.7 (d, ²J_{CC} = 4.1 Hz, 2 x CH), 131.5 (d, ¹J_{CC} = 62.1 Hz, C_V), 141.1 (d, ⁴J_{CC} = 1.0 Hz, C_{IV}), 167.8 (¹³C=O).

Mp: 160 °C – 162 °C (litt. 159 °C – 162 °C).

Methyl *p*-tolylcarbamate **19**



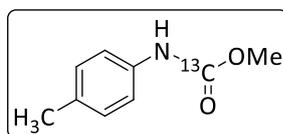
$C_9H_{11}NO_2$

MW = 165.19 g.mol⁻¹

TLC R_f = 0.60 (petroleum ether/ethyl acetate: 70/30), rev: PMA/Ce

4-methylbenzamide **18** (1.72 g, 12.70 mmol, 1.00 eq.) was dissolved in methanol (90 mL). To the solution 1,8-diazabicyclo-[5.4.0]undec-7-ene (DBU) (4.27 mL, 28.60 mmol, 2.25 eq.) and *N*-bromosuccinimide (NBS) (1.13 g, 6.35 mmol, 0.50 eq.) were then added. The mixture was allowed to stir at room temperature for 15 min and additional NBS (1.13 g, 6.35 mmol, 0.50 eq.) was added. The reaction mixture was stirred at reflux for 16 h, cooled to room temperature and methanol was removed by evaporation. The residue was dissolved in ethyl acetate (50 mL), treated with a 5% solution of HCl (50 mL) and a saturated solution of NaHCO₃ (50 mL). The organic layer was washed with brine (50 mL), dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography (petroleum ether/ethyl acetate: 70/30) to give methyl *p*-tolylcarbamate **19** (1.32 g, 73%) as a white solid. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 2.22 (s, 3H, CH₃), 3.64 (s, 3H, OCH₃), 7.07 (d, ³J_{HH} = 8.3 Hz, 2H, 2 x CH), 7.34 (d, ³J_{HH} = 8.3 Hz, 2H, 2 x CH), 9.52 (br s, 1H, NH). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 20.3 (CH₃), 51.5 (OCH₃), 118.2 (2 x CH), 129.1 (2 x CH), 131.2 (C_{IV}), 136.6 (C_{IV}), 154.0 (C=O).

(¹³C)-Methyl *p*-tolylcarbamate, (¹³C)-**19**



$C_8^{13}CH_{11}NO_2$

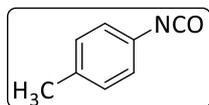
MW = 166.18 g.mol⁻¹

TLC R_f = 0.60 (petroleum ether/ethyl acetate: 70/30), rev: PMA/Ce

The same procedure as for the synthesis of methyl *p*-tolylcarbamate **19** was repeated starting from (¹³C)-**18** (1.58 g, 11.09 mmol, 1.00 eq.), 1,8-diazabicyclo-[5.4.0]undec-7-ene (DBU) (3.73 mL, 24.95 mmol, 2.25 eq.) and *N*-bromosuccinimide (NBS) (1.97 g, 11.09 mmol, 1.00 eq.) to

give (^{13}C)-**19** (1.58 g, 86%) as a white solid. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 2.22 (s, 3H, CH_3), 3.64 (d, $^3J_{\text{HC}} = 4.0$ Hz, 3H, OCH_3), 7.07 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.2$ Hz, 2H, 2 x CH), 7.33 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.2$ Hz, 2H, 2 x CH), 9.52 (br s, 1H, NH). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 20.4 (CH_3), 51.5 (d, $^2J_{\text{CC}} = 1.9$ Hz, OCH_3), 118.2 (2 x CH), 129.2 (2 x CH), 131.2 (C_{IV}), 136.6 (C_{IV}), 154.0 ($\text{C}=\text{O}$).

p-Tolylisocyanate **4**

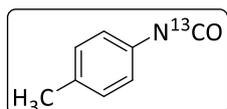


$\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}$

MW = 133.15 g. mol $^{-1}$

Methyl *p*-tolylcarbamate **19** (1.32 g, 7.99 mmol, 1.00 eq.) was dissolved in benzene (20 mL) and triethylamine (1.22 mL, 8.79 mmol, 1.10 eq.) was then added. The reaction mixture was stirred at reflux for 2 h, cooled to room temperature and a 1 M solution of boron trichloride in *n*-heptane (2.96 mL, 2.96 mmol, 0.37 eq.) was then added. The reaction mixture was stirred at reflux for another 2 h before being cooled to room temperature and concentrated under vacuum. The residue was distilled in a Kugelrohr (1 mbar, 90 °C) to give *p*-tolylisocyanate **4** (691 mg, 65%) as a clear oil. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, acetonitrile- d_3) δ (ppm): 2.30 (s, 3H, CH_3), 7.04 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.3$ Hz, 2H, 2 x CH), 7.16 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.3$ Hz, 2H, 2 x CH). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, acetonitrile- d_3) δ (ppm): 20.9 (CH_3), 125.4 (NCO), 125.5 (2 x CH), 131.1 (2 x CH), 131.6 (C_{IV}), 136.8 (C_{IV}).

(^{13}C)-*p*-Tolylisocyanate, (^{13}C)-**4**



$\text{C}_7^{13}\text{CH}_7\text{NO}$

MW = 134.14 g. mol $^{-1}$

The same procedure as for the synthesis of *p*-tolylisocyanate **4** was repeated starting from (^{13}C)-**19** (332 mg, 2.00 mmol, 1.00 eq.), triethylamine (0.61 mL, 4.40 mmol, 2.20 eq.), 1 M solution of boron trichloride in *n*-heptane (0.74 mL, 0.74 mmol, 0.37 eq.) to give (^{13}C)-**4** (211 mg, 79%) as a clear oil. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, acetonitrile- d_3) δ (ppm): 2.30 (s, 3H, CH_3), 7.05 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.3$ Hz, 2H, 2 x CH), 7.17 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.3$ Hz, 2H, 2 x CH). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, acetonitrile- d_3) δ (ppm): 20.9 (CH_3), 125.4 (N^{13}CO), 125.5 (d, $^3J_{\text{CC}} = 3.2$ Hz, 2 x CH), 131.1 (2 x CH), 131.6 (d, $^2J_{\text{CC}} = 6.0$ Hz, C_{IV}), 136.8 (C_{IV}).

Chapter III: Reactivity studies in solution

Buffers preparation

Phosphate buffer solution (PBS, 0.1 M, pH = 7.4)

- 40.5 mL of a solution of 0.2 M Na₂HPO₄
- 9.5 mL of a solution of 0.2 M NaH₂PO₄·2H₂O
- 50 mL of milli-Q H₂O

NMR acquisition

Experiments with amino acids

The reactions were followed by ¹³C NMR spectra. Adducts formed were identified thanks to HSQC and HMBC experiments. All NMR spectra (¹H, ¹³C, HSQC and HMBC) were recorded on a Bruker Avance 500 MHz spectrometer in a mixture of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) and CD₃CN. The solvent residual signals were used as reference values. For ¹H NMR: CH₃CN = 1.94 ppm, for ¹³C NMR: CH₃CN = 1.32/118.26 ppm.

Experiments with BSA

All NMR spectra (¹H and ¹³C) were recorded on a Bruker Avance 500 MHz spectrometer in a mixture of H₂O and D₂O with a drop of CH₃CN as internal reference, or a mixture of H₂O, D₂O, CH₃CN and trifluoroacetic acid. The solvent residual signals were used as reference values. For ¹H NMR: CH₃CN = 1.94 ppm, for ¹³C NMR: CH₃CN = 1.32/118.26 ppm.

LC-HRMS

All liquid chromatography-mass spectrometry analyses were recorded at 40 °C on a LC Agilent 1200 equipped with a C18 reverse phase column (Zorbax SB-C18, 1.8 μm, 2.1 x 50 mm). The samples were eluted in a water/acetonitrile gradient (**Table 1**) at flow 0.5 mL/min. Mass spectra were recorded on an Agilent Accurate Mass QToF 6520 spectrometer equipped with an electrospray (ESI). The parent ions [M+H]⁺ or [M+Na]⁺ are quoted.

Table 1: Gradient used for eluting adducts formed by LC

t (min)	Water + 0.05% formic acid	Acetonitrile + 0.05% formic acid
0	98%	2%
8	0%	100%
12.5	0%	100%
12.6	98%	2%
13	98%	2%

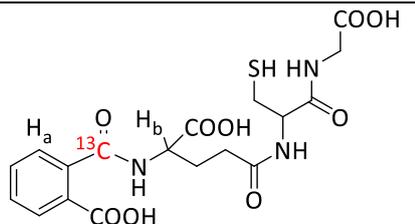
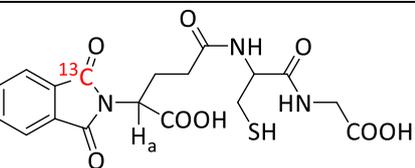
Coupling of carbon-13 substituted phthalic anhydride (¹³C)-1 to amino acids or GSH in PBS/CD₃CN

To a solution of *N*-acetylamino or GSH (67 μmol, 10 eq.) in PBS (pH 7.4, 0.1 M, 300 μL) was added a solution of (¹³C)-1 (1.0 mg, 6.7 μmol, 1 eq.) in CD₃CN (300 μL). The mixture was transferred into an NMR tube for analysis. After one month, the reaction mixture was analyzed by high resolution LC-MS.

Amino acid <i>N</i> -Ac-Aa/GSH	Quantity (mg)	Adducts
<i>N</i> -Ac-Arginine	14	x
<i>N</i> -Ac-Cysteine	11	x
<i>N</i> -Ac-Histidine	13	x
<i>N</i> -Ac-Lysine	13	(¹³ C)-20, (¹³ C)-21, (¹³ C)-22
<i>N</i> -Ac-Methionine	13	x
<i>N</i> -Ac-Serine	10	x
<i>N</i> -Ac-Tryptophane	16	x
<i>N</i> -Ac-Threonine	11	x
<i>N</i> -Ac-Tyrosine	15	x
GSH	21	(¹³ C)-23, (¹³ C)-24, (¹³ C)-25

Characterized adducts in PBS/CD₃CN

	Adduct	δ (ppm) ¹³ C	δ (ppm) ¹ H HMBC	m/z	Proposed structure
<i>N</i> -Ac-Lysine	(¹³ C)-20	174.8	7.52 (H _a)	338.1430	
	(¹³ C)-21	171.9	7.91 (H _a) 7.36 (H _b) 3.25 (H _c)	338.1430	
	(¹³ C)-22	169.7	7.83 (H _a) 3.59 (H _b)	320.1325	
GSH	(¹³ C)-23	174.9	7.96 (H _a)	439.1008	

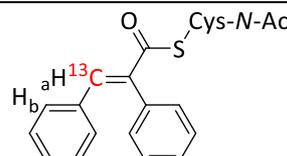
	(¹³C)-24	172.4	7.81 (H _a) 4.66 (H _b)	439.1008	
	(¹³C)-25	171.2	4.10 (H _a)	-	

Coupling of carbon-13 substituted 2,3-diphenylcyclopropenone (**(¹³C)-2**) to amino acids or GSH in PBS/CD₃CN

To a solution of *N*-acetylamino or GSH (48 μmol, 10 eq.) in PBS (pH 7.4, 0.1 M, 300 μL) was added a solution of (**(¹³C)-2**) (1.0 mg, 4.8 μmol, 1 eq.) in CD₃CN (300 μL). The mixture was transferred into an NMR tube for analysis. After one month, the reaction mixture was analyzed by high resolution LC-MS.

Amino acid <i>N</i> -Ac-Aa/GSH	Quantity (mg)	Adducts
<i>N</i> -Ac-Arginine	10	x
<i>N</i> -Ac-Cysteine	8	(¹³C)-26, (¹³C)-27, (¹³C)-28, (¹³C)-29, (¹³C)-30, (¹³C)-31
<i>N</i> -Ac-Histidine	9	(¹³C)-36, (¹³C)-37
<i>N</i> -Ac-Lysine	10	x
<i>N</i> -Ac-Methionine	9	x
<i>N</i> -Ac-Serine	7	x
<i>N</i> -Ac-Tryptophane	12	x
<i>N</i> -Ac-Threonine	8	x
<i>N</i> -Ac-Tyrosine	11	x
GSH	15	(¹³C)-32, (¹³C)-33, (¹³C)-34, (¹³C)-35

Characterized adducts in PBS/CD₃CN

Adduct	δ (ppm) ¹³ C	δ (ppm) ¹ H HSQC	δ (ppm) ¹ H HMBC	m/z	Proposed structure
(¹³C)-26	141.3	7.79 (H _a)	7.01 (H _b)	371.1130	

	(¹³ C)- 27	134.0	-	7.79 (H _a) 7.16 (H _b)	371.1130	
	(¹³ C)- 28	52.4	-	7.43 (H _a /H _b) 7.17 (H _a /H _b) 4.02 (H _c) 2.76 (H _d)	534.1425	
	(¹³ C)- 29	58.5	-	7.45 (H _a /H _b) 7.22 (H _a /H _b) 4.50 (H _c)	534.1425	
	(¹³ C)- 30	Not detected in NMR			389.1234	
	(¹³ C)- 31	Not detected in NMR			389.1234	
GSH	(¹³ C)- 32	141.1	7.79 (H _a)	7.27 (H _b /H _c) 7.13 (H _b /H _c) 7.01 (H _d)	515.1683	
	(¹³ C)- 33	134.1	-	7.79 (H _a) 7.14 (H _b)	515.1683	
	(¹³ C)- 34	48.6	4.30 (H _a)	7.16 (H _b) 4.44 (H _c) 4.14 (H _d) 3.45 (H _e) 3.32 (H _f)	533.1803	
	(¹³ C)- 35	54.4	4.44 (H _a)	7.56 (H _b /H _c) 6.92 (H _b /H _c) 4.30 (H _d)	533.1803	

N-Ac-Histidine	(¹³C)-36	136.0	7.55 (H _a)	7.17 (H _b) 7.02 (H _c)	405.1645	
	(¹³C)-37	140.4	-	7.55 (H _a) 7.36 (H _b) 7.16 (H _c)	405.1645	

Coupling of carbon-13 substituted 4,4'-methylenediphenyldiisocyanate (¹³C)-3 to amino acids or GSH in PBS/CD₃CN

To a solution of *N*-acetylamino or GSH (40 μmol, 10 eq.) in PBS (pH 7.4, 0.1 M, 300 μL) was added a solution of (¹³C)-3 (1.0 mg, 4.0 μmol, 1 eq.) in CD₃CN (300 μL). The mixture was transferred into an NMR tube for analysis. After one month, the reaction mixture was analyzed by high resolution LC-MS.

Amino acid <i>N</i> -Ac-Aa/GSH	Quantity (mg)	Adducts
<i>N</i> -Ac-Arginine	9	x
<i>N</i> -Ac-Cysteine	6	(¹³ C)-39, (¹³ C)-44
<i>N</i> -Ac-Histidine	8	x
<i>N</i> -Ac-Lysine	7	(¹³ C)-38, (¹³ C)-41, (¹³ C)-42, 43, (¹³ C)-44
<i>N</i> -Ac-Methionine	8	x
<i>N</i> -Ac-Serine	6	x
<i>N</i> -Ac-Tryptophane	10	x
<i>N</i> -Ac-Threonine	6	x
<i>N</i> -Ac-Tyrosine	9	x
GSH	12	(¹³ C)-40, (¹³ C)-46

Characterized adducts in PBS/CD₃CN

	Adduct	δ (ppm) ¹³ C	δ (ppm) ¹ H HMBC	m/z	Proposed structure
N-Ac-Lysine	(¹³C)-38	158.2	7.89 (H _a) 7.20 (H _b /H _c) 7.11 (H _b /H _c) 5.95 (H _d) 3.08 (H _e)	629.3201	
	(¹³C)-41	160.8	-	-	

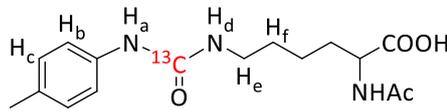
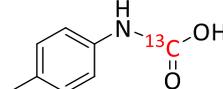
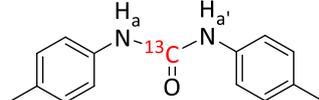
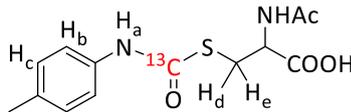
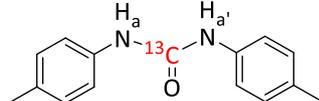
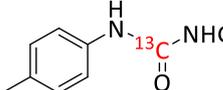
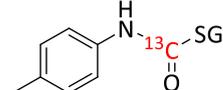
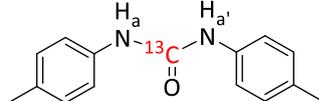
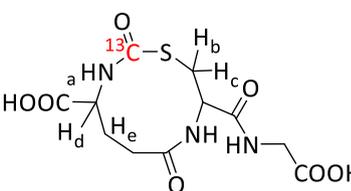
	⁽¹³ C)- 42	160.8	-	-	
	⁽¹³ C)- 44	155.0	8.04 (H _a /H _{a'})	-	
N-Ac-Cysteine	⁽¹³ C)- 39	167.2	9.52 (H _a) 7.29 (H _b /H _c) 7.12 (H _b /H _c) 3.38 (H _d) 3.13 (H _e)	579.1484	
	⁽¹³ C)- 44	155.0	8.02 (H _a /H _{a'})	-	
GSH	⁽¹³ C)- 40	167.1	-	533.1898	
	⁽¹³ C)- 46	168.8	4.07 (H _a) 3.77 (H _b) 3.65 (H _c) 2.95 (H _d)	-	

Coupling of carbon-13 substituted *p*-tolylisocyanate (⁽¹³C)-**4** to amino acids or GSH in PBS/CD₃CN

To a solution of *N*-acetylamino or GSH (75 μmol, 10 eq.) in PBS (pH 7.4, 0.1 M, 300 μL) was added a solution of (⁽¹³C)-**4** (1.0 mg, 7.5 μmol, 1 eq.) in CD₃CN (300 μL). The mixture was transferred into an NMR tube for analysis. After one month, the reaction mixture was analyzed by high resolution LC-MS.

Amino acid <i>N</i> -Ac-Aa/GSH	Quantity (mg)	Adducts
<i>N</i> -Ac-Arginine	16	x
<i>N</i> -Ac-Cysteine	12	⁽¹³ C)- 48 , ⁽¹³ C)- 53
<i>N</i> -Ac-Histidine	15	x
<i>N</i> -Ac-Lysine	14	⁽¹³ C)- 47 , ⁽¹³ C)- 41 , ⁽¹³ C)- 53
<i>N</i> -Ac-Methionine	14	x
<i>N</i> -Ac-Serine	11	x
<i>N</i> -Ac-Tryptophane	18	x
<i>N</i> -Ac-Threonine	12	x
<i>N</i> -Ac-Tyrosine	17	x
GSH	23	⁽¹³ C)- 46 , ⁽¹³ C)- 49 , ⁽¹³ C)- 50 , ⁽¹³ C)- 53

Characterized adducts in PBS/CD₃CN

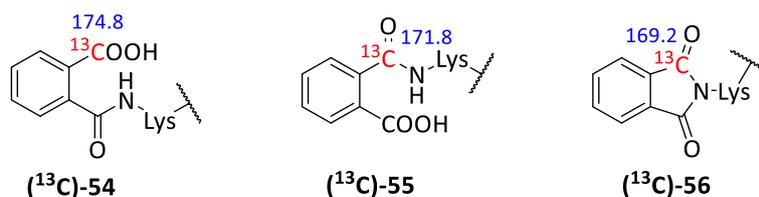
	Adduct	δ (ppm) ¹³ C	δ (ppm) ¹ H HMBC	m/z	Proposed structure
N-Ac-Lysine	(¹³ C)- 47	158.3	7.84 (H _a) 7.16 (H _b /H _c) 7.05 (H _b /H _c) 5.94 (H _d) 3.07 (H _e) 2.22 (H _f)	323.1799	
	(¹³ C)- 51	160.8	-	-	
	(¹³ C)- 53	155.2	7.97 (H _a /H _{a'})	242.1382	
N-Ac-Cysteine	(¹³ C)- 48	166.9	9.43 (H _a) 7.24 (H _b /H _c) 7.08 (H _b /H _c) 3.38 (H _d) 3.12 (H _e)	298.0940	
	(¹³ C)- 53	155.2	7.95 (H _a /H _{a'})	242.1375	
GSH	(¹³ C)- 49	157.5	-	442.1475	
	(¹³ C)- 50	166.8	-	442.1475	
	(¹³ C)- 53	155.2	7.90 (H _a /H _{a'})	242.1385	
	(¹³ C)- 46	168.7	8.29 (H _a) 4.05 (H _b) 3.77 (H _c) 3.68 (H _d) 2.92 (H _e)	-	

Coupling of carbon-13 substituted phthalic anhydride (¹³C)-1 to BSA

To a solution of BSA (100 mg, 1.5 μ mol, 1.0 eq.) in phosphate buffer (10 mL, 0.1 M, pH 7.4) degassed for 15 min was added a solution of (¹³C)-1 (44.7 mg, 300 μ mol, 200 eq.) in a minimal

amount of ethanol (1 mL). The reaction mixture was incubated at 37 °C for 9 days, and the solution was dialyzed against water (5 x 5 L), then lyophilized to give a white solid (90 mg). This solid was dissolved in a mixture of H₂O (0.3 mL) and D₂O (0.1 mL). A drop of CH₃CN was added as internal reference and the mixture was filtered into an NMR tube for further analysis. 1D ¹³C NMR was carried out and the chemical shifts of the adducts formed were compared with those of reaction of (¹³C)-**1** and nucleophilic amino acids in order to determine their adducts formed.

Detected adducts



Coupling of carbon-13 substituted 2,3-diphenylcyclopropenone (¹³C)-2 to BSA

To a solution of BSA (100 mg, 1.5 μmol, 1.0 eq.) in phosphate buffer (10 mL, 0.1 M, pH 7.4) degassed for 15 min was added a solution of (¹³C)-**2** (62.2 mg, 300 μmol, 200 eq.) in a minimum of acetonitrile (3.3 mL). The reaction mixture was incubated at 37 °C for 9 days, and the solution was dialyzed against water (5 x 5 L), then lyophilized to give a yellow solid (108 mg). The modified protein was dissolved in (0.3 mL of H₂O, 0.1 mL of D₂O, 10 μL of trifluoroacetic acid and a drop of CH₃CN as internal reference) and filtered into an NMR tube for further analysis. 1D ¹³C NMR was carried out and the chemical shifts of the adducts formed were compared with those of reaction of (¹³C)-**2** and nucleophilic amino acids in order to determine adducts formed.

Chapter IV: Reactivity studies in EpiSkin™ model by HRMAS NMR

Reconstructed Human Epidermis

For this study, the large 1.07 cm² EpiSkin™ Reconstructed Human Epidermis (EpiSkin, Lyon, France, <http://www.episkin.com/>) was selected. This 3D epidermal skin model is an *in vitro* reconstructed human epidermis from normal human keratinocytes cultured on a collagen matrix at the air-liquid interface for 13 days. EpiSkin™ RHE were received on day 14, aseptically removed from the transport medium, and pre-incubated for 24 hours in a growth culture medium (EpiSkin, Lyon, France) at 37 °C, 5 % CO₂ and under humidified atmosphere, according to EpiSkin's protocol.

Treatment of Episkin™ RHE with carbon-13 substituted allergens

(¹³C)-phthalic anhydride (¹³C)-1

Episkin™ RHE were treated with (¹³C)-1 in acetone (0.4 M, 30 μL) and incubated for 1 h, 8 h, and 24 h, respectively. RHE negative controls were treated with acetone (30 μL) and incubated for 24 h. After incubation, the RHE were separated from the collagen matrix simply using sterile tweezers. To allow easy NMR sample preparation, two large 1.07 cm² EpiSkin™ RHE (same incubation time) are combined in one microcentrifuge tube and stored at -80 °C.

(¹³C)-2,3-diphenylcyclopropenone (¹³C)-2

Episkin™ RHE were treated 4 times every 15 minutes with 30 μL of (¹³C)-2 in AOO (acetone – olive oil: 4/1 v/v) (0.1 M, 120 μL) and incubated for 1 h, 8 h, and 24 h, respectively. RHE negative controls were treated with AOO (4 x 30 μL) and incubated for 24 h. After incubation, the RHE were separated from the collagen matrix simply using sterile tweezers. To allow easy NMR sample preparation, two large 1.07 cm² EpiSkin™ RHE (same incubation time) are combined in one microcentrifuge tube and stored at -80 °C.

(¹³C)-tolylisocyanate (¹³C)-4

Episkin™ RHE were treated with (¹³C)-4 in acetone (0.4 M, 30 μL) and incubated for 1 h, 8 h, and 24 h, respectively. RHE negative controls were treated with acetone (30 μL) and incubated for 24 h. After incubation, the RHE were separated from the collagen matrix simply using sterile tweezers. To allow easy NMR sample preparation, two large 1.07 cm² EpiSkin™ RHE (same incubation time) are combined in one microcentrifuge tube and stored at -80 °C.

HRMAS NMR insert preparation and Rotor preparation

The procedure of insert preparation was carried out following the procedure developed in our laboratory. Briefly, each sample was prepared at -20 °C by introducing 15 to 20 mg of

frozen RHE into a disposable 30 μL Kelf insert. For the NMR spectrometer lock frequency, 10 μL of D_2O was also added to the insert. The insert was then sealed with a plug and stored at $-80\text{ }^\circ\text{C}$ until the HRMAS NMR analysis.

Before the HRMAS NMR analysis, the insert was placed into a standard 4 mm ZrO_2 rotor and closed with a cap. The HRMAS NMR experiments were performed at $4\text{ }^\circ\text{C}$. Upon completion of all experiments, the insert was taken out of the rotor and stored back at $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

HRMAS NMR analysis: data acquisition

HRMAS NMR spectra were recorded on a Bruker Avance II WB 500 spectrometer (Institut de Chimie, Strasbourg) operating at a proton frequency of 500.13 MHz, equipped with a 4 mm triple resonance (^1H , ^{13}C and ^{31}P) gradient HRMAS probe. A Bruker Cooling Unit (BCU) was used to regulate the temperature at $4\text{ }^\circ\text{C}$ by cooling down the bearing air flowing into the probe. All NMR experiments were conducted on samples spinning at 3501 Hz in order to keep the rotation sidebands out of the spectral region of interest. For each sample, 1D ^1H experiment using a Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) pulse sequence coupled with water presaturation, and 1D ^{13}C experiment were acquired. All spectra were referenced by setting the lactate doublet chemical shift to 1.33 ppm in ^1H and to 22.7 ppm in ^{13}C .

CPMG sequence allows a better observation of signals by reducing the intensity of those macromolecules and lipids in the spectrum. The 1D ^1H 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 processed using automatic base line correction routines.

The ^{13}C NMR spectra were acquired using a single-pulse experiment, with decoupling performed during the cycle delay and during acquisition (WALTZ-16 pulse sequence). The 1D ^{13}C experiments were acquired with the following parameters: spectral width 220 ppm, number of points 64 k, relaxation delay of 1 s, acquisition time of 1.18 s. A total of 16 k FID were acquired resulting in an acquisition time of 21 hours. All spectra were processed using automatic base line correction routines.

Chapter V: Proteomics analysis

Buffer preparation

HEPES saline buffer (0.1 M, pH = 7.4)

- 25 mL of a solution of 0.1 M HEPES
- 8.7 mL of a solution of 0.1 M NaOH
- 16.3 mL of milli-Q H₂O

Coupling of carbon-13 substituted phthalic anhydride (¹³C)-1 to BSA

To 10 µL of solution of 1 mg/mL of BSA (10 µg, 1.5×10^{-4} µmol, 1 eq.) in HEPES buffer (0.1 M, pH 7.4) was added 2 µL of solution of 2.23 mg/mL of (¹³C)-1 (4.46 µg, 0.03 µmol, 200 eq.) in DMSO. The reaction mixture was completed with 88 µL of HEPES buffer (0.1 M, pH 7.4) and incubated at 37 °C for 24 hours.

Coupling of carbon-13 substituted 2,3-diphenylcyclopropanone (¹³C)-2 to BSA

To 10 µL of solution of 1 mg/mL of BSA (10 µg, 1.5×10^{-4} µmol, 1 eq.) in HEPES buffer (0.1 M, pH 7.4) was added 2 µL of solution of 3.1 mg/mL of (¹³C)-2 (6.2 µg, 0.03 µmol, 200 eq.) in DMSO. The reaction mixture was completed with 88 µL of HEPES buffer (0.1 M, pH 7.4) and incubated at 37 °C for 24 hours.

Coupling of carbon-13 substituted *p*-tolylisocyanate (¹³C)-4 to BSA

To 10 µL of solution of 1 mg/mL of BSA (10 µg, 1.5×10^{-4} µmol, 1 eq.) in HEPES buffer (0.1 M, pH 7.4) was added 2 µL of solution of 2.01 mg/mL of (¹³C)-4 (4.02 µg, 0.03 µmol, 200 eq.) in DMSO. The reaction mixture was completed with 88 µL of HEPES buffer (0.1 M, pH 7.4) and incubated at 37 °C for 24 hours.

Extraction of proteins from Reconstructed Human Epidermis (RHE)

The RHE was thawed on ice and cut into 4 pieces. Each piece was placed into reinforced 2 mL tube containing 1.4 mm ceramic beads (Soft tissue homogenizing CK14, Bertin Technologies). The RHE samples were then processed using a Precellys Evolution homogenizer (Bertin Technologies) for 2 cycles of 30 s with a speed of 6500 rpm and a pause of 45 s between 2 cycles. The samples were chilled on ice and 1% SDS lysis buffer (ratio of lysis buffer / amount RHE: 70 µL / 1 mg) was then added. Again, the samples were homogenized for 30 seconds with a speed of 6500 rpm. Insoluble material was sedimented by centrifugation at 12000 x g for 15 min at 4 °C. Proteins obtained in solution were quantified using the Bradford test and stored at -80 °C until required.

Proteins digestion

Proteins were first precipitated from the protein lysate. To 10 µg of protein lysate 5 volumes of an ice-cold solution of 0.1 M ammonium acetate in 100% methanol. The sample was vortexed and incubated at -20 °C for 12 h. The sample was centrifuged at 12000 x g at 4 °C for 15 min. The aqueous layer was removed. Proteins precipitated were washed twice by a solution of 0.1 M ammonium acetate in 80% methanol and dried in a vacuum centrifuge (SpeedVac). Proteins were then resolubilized in 50 nM ammonium bicarbonate. Proteins were reduced with 0.1 M dithiothreitol (DTT) for 10 min at 95 °C, alkylated with 0.1 M iodoacetamide (IAA) for 30 min in the dark at room temperature. Proteins, reduced and alkylated, were then incubated with trypsin overnight at 37 °C. After digestion, peptides obtained were dried in a vacuum centrifuge (SpeedVac) and stored at -20 °C until the analysis by LC-MS/MS.

LC-MS/MS analysis

All liquid chromatography were carried out on a C18 reverse phase column (Acclaim PepMap, 2 µm, 25 cm x 75 µm, Thermo Scientific). Peptides were fractionated over a 160 min gradient of 2 to 40% acetonitrile + 0.1% formic acid, at a flow 300 nL/min.

Mass spectra were recorded on a QExactive+ spectrometer (Thermo Scientific) equipped with an electrospray (ESI). MS spectra were acquired from 350 to 1500 m/z by the Orbitrap detector. The intact peptides were then fragmented in an HCD (Higher-energy Collisional Dissociation) collision cell. The MS/MS spectra were finally recorded by the Orbitrap detector.

Table 2: List of allergen-modified residues of BSA (**blue position**: non-confirmed modification, **yellow position**: confirmed modification)

Amino acid	PA (+131)	PA (+149)	DCP (+207)	DCP (+225)	pTLI (+134)
H27					
K36					
K75					
C77					
H83					
C86					
K88					
H91					
K100					
Y108					
K117					
K138					
K140					
K155					
K156					

Amino acid	PA (+131)	PA (+149)	DCP (+207)	DCP (+225)	pTLI (+134)
K160					
R168					
H169					
Y180					
K183					
Y184					
K197					
K228					
K245					
K248					
K256					
K263					
H265					
K266					
H270					
K285					
Y286					
C288					
K297					
K299					
K304					
K309					
H311					
K318					
Y342					
R360					
K374					
Y376					
K401					
H402					
K412					
K420					
K437					
R451					
Y475					
H487					
K489					
K495					
K498					
C499					
H533					
C537					
R541					

Amino acid	PA (+131)	PA (+149)	DCP (+207)	DCP (+225)	pTLI (+134)
K544					
K547					
K548					
K557					
H558					
K559					
K568					
K580					
C581					
C582					
K587					

Table 3: List of epidermal proteins modified by allergens (blue position: non-confirmed modification, yellow position: confirmed modification)

Gene Name	Uniprot ID	Protein Name	Amino acid	PA (+149)	PA (+131)	DCP (+207)	DCP (+223)	DCP (+225)	pTlI (+134)
1433B_HUMAN	P31946	14-3-3 protein beta/alpha	K11						
			Y50						
			K51						
			K160						
1433E_HUMAN	P62258	14-3-3 protein epsilon	Y49						
1433G_HUMAN	P61981	14-3-3 protein gamma	Y49						
			K50						
1433S_HUMAN	P31947	14-3-3 protein sigma	K9						
			K11						
			Y19						
			K27						
			K32						
			C38						
			R41						
			Y48						
			K49						
			K68						
			K77						
			K87						
			H106						
			Y130						
1433T_HUMAN	P27348	14-3-3 protein theta	Y48						
			K49						
			K158						
1433Z_HUMAN	P63104	14-3-3 protein zeta/delta	Y48						
			K49						
			K68						
			K158						
A2ML1_HUMAN	A8K2U0	Alpha-2-macroglobulin-like protein 1	K1217						
ACTB_HUMAN	P60709	Actin, cytoplasmic 1	K50						
			K61						
			R62						
			K113						
			H173						
			C272						
			K291						
			Y294						
			K315						
K326									

Gene Name	Uniprot ID	Protein Name	Amino acid	PA (+149)	PA (+131)	DCP (+207)	DCP (+223)	DCP (+225)	pTLI (+134)
			K328						
ACTC_HUMAN	P68032	Actin, alpha cardiac muscle 1	H42						
			K52						
			Y55						
			K63						
			R64						
			K70						
			Y190						
			K317						
			K328						
			K330						
ACTG_HUMAN	P63261	Actin, cytoplasmic 2	H40						
			K50						
			Y53						
			K61						
			R62						
			H101						
			K113						
			H161						
			H173						
			Y188						
			C272						
			K291						
			Y294						
			K315						
			K326						
K328									
ACTN4_HUMAN	O43707	Alpha-actinin-4	C499						
			K760						
ADT1_HUMAN	P12235	ADP/ATP translocase 1	K33						
ADT2_HUMAN	P05141	ADP/ATP translocase 2	K33						
			K63						
			K147						
			K245						
ADT3_HUMAN	P12236	ADP/ATP translocase 3	K33						
			K63						
ALBU_HUMAN	P02768	Albumin	K438						
ALDOA_HUMAN	P04075	Fructose-bisphosphate aldolase A	K28						
			K42						
			R43						
			K153						
			H157						
			Y204						

Gene Name	Uniprot ID	Protein Name	Amino acid	PA (+149)	PA (+131)	DCP (+207)	DCP (+223)	DCP (+225)	pTLI (+134)
ALDOC_HUMAN	P09972	Fructose-bisphosphate aldolase C	Y204						
ANXA1_HUMAN	P04083	Annexin A1	K128						
			K166						
			R213						
			K214						
			Y319						
ANXA2_HUMAN	P07355	Annexin A2	K10						
			K49						
			K104						
			K115						
			K119						
			Y147						
			K148						
			Y151						
			K152						
			K157						
			K169						
			R179						
			K212						
			Y232						
			K233						
			Y235						
C262									
K302									
Y311									
APRV1_HUMAN	Q53RT3	Retroviral-like aspartic protease 1	K165						
			K269						
ARGI1_HUMAN	P05089	Arginase-1	K17						
			K48						
			K75						
			K83						
			K155						
			C168						
			K196						
			K223						
			K224						
			R225						
			H228						
K284									
ATPB_HUMAN	P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	K133						
BAP31_HUMAN	P51572	B-cell receptor-associated protein 31	K138						
			K204						

Gene Name	Uniprot ID	Protein Name	Amino acid	PA (+149)	PA (+131)	DCP (+207)	DCP (+223)	DCP (+225)	pTLI (+134)
BIP_HUMAN	P11021	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	K185						
			K326						
			K326						
			K447						
			K621						
BLMH_HUMAN	Q13867	Bleomycin hydrolase	K10						
			H55						
			K62						
			K68						
			K163						
			K184						
			H197						
			K202						
			K238						
			K240						
			Y242						
			H257						
			R275						
			H278						
			K279						
			Y280						
			K282						
			Y284						
K297									
H372									
CALL5_HUMAN	Q9NZT1	Calmodulin-like protein 5	K42						
CAN1_HUMAN	P07384	Calpain-1 catalytic subunit	H31						
			K86						
			K229						
			K365						
CAPZB_HUMAN	P47756	F-actin-capping protein subunit beta	K95						
CASPE_HUMAN	P31944	Caspase-14	K11						
			K27						
			R29						
			K53						
			R54						
			K67						
			C81						
			K104						
			K115						
			C117						
			K123						
			K125						

Gene Name	Uniprot ID	Protein Name	Amino acid	PA (+149)	PA (+131)	DCP (+207)	DCP (+223)	DCP (+225)	pTLI (+134)
suite	suite	suite	K199						
			H201						
			K223						
			R225						
			K226						
CBPA4_HUMAN	Q9UI42	Carboxypeptidase A4	K297						
CH60_HUMAN	P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	Y223						
COX5A_HUMAN	P20674	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	K72						
CREG1_HUMAN	O75629	Protein CREG1	K179						
CYC_HUMAN	P99999	Cytochrome c	H27						
			K28						
CYTA_HUMAN	P01040	Cystatin-A	K24						
			Y35						
			K37						
			K56						
			K71						
CYTB_HUMAN	P04080	Cystatin-B	K34						
DESP_HUMAN	P15924	Desmoplakin	Y153						
			K444						
			K829						
			K1033						
			K1413						
			K1434						
			Y1465						
			K1626						
			K1700						
			K1802						
			K1818						
			K1999						
			K2251						
			K2430						
			Y2483						
			K2484						
K2485									
K2523									
DHC24_HUMAN	Q15392	Delta	K496						
DLDH_HUMAN	P09622	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	K430						
DMKN_HUMAN	Q6E0U4	Dermokine	K66						
DSG1_HUMAN	Q02413	Desmoglein-1	K72						
DYL1_HUMAN	P63167	Dynein light chain 1, cytoplasmic	Y32						
EF1A1_HUMAN	P68104	Elongation factor 1-alpha 1	K41						

Gene Name	Uniprot ID	Protein Name	Amino acid	PA (+149)	PA (+131)	DCP (+207)	DCP (+223)	DCP (+225)	pTLI (+134)
suite	suite	suite	K146						
			K255						
			K273						
			K395						
			C411						
EF1G_HUMAN	P26641	Elongation factor 1-gamma	C194						
			K401						
			Y416						
EF2_HUMAN	P13639	Elongation factor 2	K42						
			K152						
			K275						
			Y634						
			K648						
EIF3I_HUMAN	Q13347	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	K2						
ENOA_HUMAN	P06733	Alpha-enolase	K28						
			K81						
			K197						
			Y200						
			K202						
			K228						
			K233						
			Y236						
			K239						
			K256						
			Y257						
			K262						
			K326						
K335									
FABP5_HUMAN	Q01469	Fatty acid-binding protein 5	K17						
			K34						
			K40						
			K50						
			K55						
			K61						
			K72						
			K82						
			C87						
			K103						
			K110						
			K112						
			K115						
C127									
R129									

Gene Name	Uniprot ID	Protein Name	Amino acid	PA (+149)	PA (+131)	DCP (+207)	DCP (+223)	DCP (+225)	pTLI (+134)
FAS_HUMAN	P49327	Fatty acid synthase	K436						
FETA_HUMAN	P02771	Alpha-fetoprotein	H362						
FILA_HUMAN	P20930	Filaggrin	K34						
			K46						
			K91						
			R151						
			H152						
			K162						
			R203						
			K207						
			Y215						
			K266						
			R275						
			H276						
			H384						
			H388						
			R396						
			H428						
			K442						
			H506						
			H541						
			H545						
			H546						
			H548						
			R612						
			H630						
			R636						
			H645						
			H670						
			H684						
			H697						
			H722						
			R735						
			H807						
			H831						
H856									
H857									
R863									
H866									
H870									
H871									
H873									
H925									

Gene Name	Uniprot ID	Protein Name	Amino acid	PA (+149)	PA (+131)	DCP (+207)	DCP (+223)	DCP (+225)	pTLI (+134)	
suite	suite	suite	R941							
			H955							
			R961							
			H995							
			R1045							
			Y1119							
			H1155							
			H1180							
			H1181							
			R1187							
			H1190							
			H1194							
			H1195							
			H1197							
			H1237							
			H1249							
			R1261							
			R1278							
			R1369							
			H1479							
			Y1517							
			H1521							
			H1573							
			K1585							
			H1657							
			R1674							
			R1680							
			H1681							
			R1684							
			Y1767							
			R1793							
			H1794							
			R1798							
			R1802							
			H1803							
			H1886							
			R1891							
			R1896							
			H1897							
			R1909							
H1927										
R1933										
H1967										

Gene Name	Uniprot ID	Protein Name	Amino acid	PA (+149)	PA (+131)	DCP (+207)	DCP (+223)	DCP (+225)	pTLI (+134)
			H1969						
			R1975						
			R1980						
			H1981						
			R1987						
			H2005						
			H2008						
			H2009						
			H2019						
			R2032						
			H2068						
			H2118						
			R2139						
			H2141						
			R2146						
			H2153						
			H2163						
			H2167						
			H2168						
			H2170						
			K2192						
			Y2194						
			K2196						
			H2222						
			H2252						
			H2267						
			H2305						
			H2306						
			H2319						
			H2330						
			H2333						
			H2334						
			H2343						
			R2356						
			Y2416						
			H2452						
			H2465						
			H2477						
			H2487						
			H2491						
			H2492						
			H2494						
			H2546						

Gene Name	Uniprot ID	Protein Name	Amino acid	PA (+149)	PA (+131)	DCP (+207)	DCP (+223)	DCP (+225)	pTLI (+134)	
suite	suite	suite	R2558							
			H2616							
			H2630							
			H2643							
			H2654							
			H2657							
			H2658							
			H2667							
			R2680							
			R2766							
			H2767							
			R2775							
			H2776							
			H2858							
			H2870							
			R2882							
			R2886							
			H2900							
			R2906							
			H2940							
			H2954							
			H2967							
			H2978							
			H2981							
			H2982							
			H2991							
			R3004							
			R3090							
			H3091							
			R3099							
			H3182							
			H3194							
			R3206							
			R3210							
			H3224							
			R3230							
			R3277							
			H3278							
			H3291							
			R3295							
R3301										
H3302										
R3305										

Gene Name	Uniprot ID	Protein Name	Amino acid	PA (+149)	PA (+131)	DCP (+207)	DCP (+223)	DCP (+225)	pTLI (+134)
suite	suite	suite	H3306						
			R3314						
			Y3388						
			H3424						
			H3459						
			H3463						
			H3464						
			H3466						
			H3518						
			H3548						
			R3554						
			H3601						
			H3602						
			H3615						
			H3626						
			H3629						
			H3630						
			H3639						
			R3652						
			Y3712						
			H3748						
			H3783						
			H3787						
			H3788						
			H3790						
			R3878						
			H3912						
			K3926						
			H3928						
			H3930						
			K3967						
			H3976						
			Y3979						
			Y3984						
			Y3986						
			R3992						
			Y4001						
			K4009						
			K4016						
			K4022						
FILA2_HUMAN	Q5D862	Filaggrin-2	Y18						
			K20						
			K30						

Gene Name	Uniprot ID	Protein Name	Amino acid	PA (+149)	PA (+131)	DCP (+207)	DCP (+223)	DCP (+225)	pTLI (+134)
suite	suite	suite	K46						
			H108						
			H125						
			K126						
			Y142						
			K179						
			R259						
			K262						
			Y618						
			H621						
			Y770						
			H773						
			K1283						
			H1299						
			Y1300						
			K1302						
			H1553						
			Y1555						
			H1558						
			H1630						
			H1632						
			H1862						
			H1908						
K1917									
H2133									
H2162									
Y2349									
G3P_HUMAN	P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	K3						
			K66						
			K86						
			Y94						
			K107						
			H137						
			K139						
			K145						
			C152						
			C156						
			H165						
			H179						
			K186						
			K194						
			K215						
K219									

Gene Name	Uniprot ID	Protein Name	Amino acid	PA (+149)	PA (+131)	DCP (+207)	DCP (+223)	DCP (+225)	pTLI (+134)
suite	suite	suite	K227						
			C247						
			R248						
			K251						
			Y320						
			R323						
			K334						
G6PD_HUMAN	P11413	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	K205						
G6PI_HUMAN	P06744	Glucose-6-phosphate isomerase	K12						
			K454						
GDIB_HUMAN	P50395	Rab GDP dissociation inhibitor beta	K57						
GGCT_HUMAN	O75223	Gamma-glutamylcyclotransferase	C6						
			K50						
			K88						
			K118						
			Y125						
			Y130						
			K140						
			K141						
			K161						
			Y168						
GLRX1_HUMAN	P35754	Glutaredoxin-1	K9						
GSDMA_HUMAN	Q96QA5	Gasdermin-A	K44						
GSTP1_HUMAN	P09211	Glutathione S-transferase P	R101						
			C102						
			K103						
			K128						
H2B1C_HUMAN	P62807	Histone H2B type 1-C/E/F/G/I	K35						
			H110						
H31T_HUMAN	Q16695	Histone H3.1t	Y55						
			K57						
H4_HUMAN	P62805	Histone H4	K80						
			K92						
HM13_HUMAN	Q8TCT9	Minor histocompatibility antigen H13	K61						
HMOX1_HUMAN	P09601	Heme oxygenase 1	K18						
HS71A_HUMAN	PODMV8	Heat shock 70 kDa protein 1A	K539						
HS90B_HUMAN	P08238	Heat shock protein HSP 90-beta	K624						
			H625						
HSP7C_HUMAN	P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	K56						
			K159						
			K535						

Gene Name	Uniprot ID	Protein Name	Amino acid	PA (+149)	PA (+131)	DCP (+207)	DCP (+223)	DCP (+225)	pTLI (+134)
suite	suite	suite	K539						
HSPB1_HUMAN	P04792	Heat shock protein beta-1	H103						
			K112						
			K114						
			K123						
			K141						
			Y142						
HUTH_HUMAN	P42357	Histidine ammonia-lyase	K131						
			Y134						
			K135						
			K137						
			K172						
			K182						
IDHC_HUMAN	O75874	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	K115						
			K146						
IF4A1_HUMAN	P60842	Eukaryotic initiation factor 4A-I	K146						
ILEU_HUMAN	P30740	Leukocyte elastase inhibitor	K277						
			K301						
K1C10_HUMAN	P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10	Y5						
			K9						
			C25						
			R35						
			K40						
			R59						
			C66						
			Y74						
			R86						
			Y172						
			K177						
			K179						
			Y182						
			K184						
			Y196						
			K198						
			Y199						
			Y200						
			K201						
			K207						
K237									
K266									
K284									
K285									

Gene Name	Uniprot ID	Protein Name	Amino acid	PA (+149)	PA (+131)	DCP (+207)	DCP (+223)	DCP (+225)	pTLI (+134)
suite	suite	suite	H287						
			K292						
			R333						
			K334						
			K343						
			K345						
			Y361						
			K362						
			R369						
			R370						
			K386						
			C427						
			Y432						
			K439						
			R441						
			K580						
K1C13_HUMAN	P13646	Keratin, type I cytoskeletal 13	K135						
			R137						
			K193						
K1C14_HUMAN	P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14	K15						
			C18						
			R30						
			C40						
			R41						
			Y46						
			R56						
			K146						
			R148						
			R155						
			K160						
			Y165						
			K167						
			K175						
			K203						
			K243						
			K251						
			H253						
			R282						
			R299						
K300									
K309									
K328									
K363									

Gene Name	Uniprot ID	Protein Name	Amino acid	PA (+149)	PA (+131)	DCP (+207)	DCP (+223)	DCP (+225)	pTLI (+134)
suite	suite	suite	R365						
			C389						
			K399						
			K405						
			R439						
			K451						
			H456						
K1C15_HUMAN	P19012	Keratin, type I cytoskeletal 15	K194						
			C355						
			R356						
K1C16_HUMAN	P08779	Keratin, type I cytoskeletal 16	K15						
			C18						
			R30						
			C40						
			R41						
			Y46						
			R55						
			K148						
			R150						
			R157						
			K162						
			Y164						
			Y167						
			K169						
			K177						
			K205						
			K245						
			K253						
			H255						
			R284						
			Y293						
			K299						
			K311						
			K317						
			R330						
			K365						
			R367						
			Y400						
			K407						
			H427						
			Y438						
			R441						
K460									

Gene Name	Uniprot ID	Protein Name	Amino acid	PA (+149)	PA (+131)	DCP (+207)	DCP (+223)	DCP (+225)	pTLI (+134)	
K1C17_HUMAN	Q04695	Keratin, type I cytoskeletal 17	K15	Yellow	Yellow	Yellow			Yellow	
			C40			Yellow		Yellow		
			R41					Blue		
			K115						Yellow	
			K144	Blue					Blue	
			K212						Yellow	
			K220	Yellow						
			H222	Blue						
			R268	Blue						
			K269	Yellow					Yellow	
			K297	Blue	Blue	Yellow			Blue	
			C358						Yellow	
			K368							Yellow
			K374		Blue					
			K419	Blue					Blue	
K22E_HUMAN	P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	R34	Blue					Blue	
			R61	Blue						
			K175		Yellow				Yellow	
			K183	Blue					Blue	
			K188	Blue	Yellow	Yellow			Yellow	
			K195			Blue				
			R197			Blue				
			Y264						Yellow	
			K265						Blue	
			K266						Blue	
			K286						Blue	
			K287						Yellow	
			K296						Yellow	
			K302						Blue	
			K353						Yellow	
			K353	Blue						
			K364	Blue	Blue				Blue	
			Y371	Blue					Yellow	
			H372							
			H385	Yellow					Yellow	
			K390	Blue						
			K393	Yellow					Yellow	
			H412						Yellow	
K415	Blue					Blue				
K418	Blue					Yellow				
K441	Blue					Blue				
K453						Yellow				
K482	Yellow									

Gene Name	Uniprot ID	Protein Name	Amino acid	PA (+149)	PA (+131)	DCP (+207)	DCP (+223)	DCP (+225)	pTLI (+134)
suite	suite	suite	C489						
			R490						
			Y532						
			Y539						
			Y573						
			K580						
			Y589						
			K595						
K220_HUMAN	Q01546	Keratin, type II cytoskeletal 2 oral	K188						
			K193						
			K200						
			R202						
			K209						
			K487						
			C494						
			R495						
K2C1_HUMAN	P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1	C49						
			R65						
			K74						
			R181						
			K185						
			K185						
			K197						
			R199						
			K211						
			R239						
			R241						
			K246						
			K257						
			K269						
			K276						
			K288						
			K289						
			Y295						
			K298						
			K355						
			Y358						
			K364						
			K366						
Y373									
K376									
K395									
R409									

Gene Name	Uniprot ID	Protein Name	Amino acid	PA (+149)	PA (+131)	DCP (+207)	DCP (+223)	DCP (+225)	pTLI (+134)
suite	suite	suite	K416	Yellow					Yellow
			K417	Yellow	Blue				Yellow
			K438	Blue					
			K441	Yellow					Yellow
			K443	Blue					Blue
			K455						Yellow
			R463	Blue					
			Y465	Blue					
			R492	Blue					
			Y525	Blue					
			Y532	Yellow					
			Y539	Blue					
			K624	Yellow					
			K633	Yellow					
K2C1B_HUMAN	Q7Z794	Keratin, type II cytoskeletal 1b	K181			Blue			
			R183			Blue			
			K350						Blue
K2C3_HUMAN	P12035	Keratin, type II cytoskeletal 3	K203	Blue					Blue
			K208	Blue	Yellow	Yellow			Yellow
			K215			Blue			
			R217			Blue			
			K224		Yellow	Yellow			Yellow
			K308			Blue			Blue
			K309			Blue			Blue
K2C4_HUMAN	P19013	Keratin, type II cytoskeletal 4	K168	Blue					
K2C5_HUMAN	P13647	Keratin, type II cytoskeletal 5	R29	Blue		Blue			
			C55			Yellow		Yellow	
			R63	Blue					Blue
			K72			Yellow			
			R84	Blue					Blue
			K173	Blue					Blue
			K178	Blue	Yellow	Yellow			Yellow
			K185			Blue			
			R187			Blue			
			K194	Blue	Yellow	Yellow			
			K199	Blue		Yellow			Yellow
			K209	Blue		Yellow			Yellow
			K255	Blue					
			K257	Blue					
			K264		Blue				
			K276						Blue
K277	Yellow					Yellow			
			Y283	Blue				Yellow	

Gene Name	Uniprot ID	Protein Name	Amino acid	PA (+149)	PA (+131)	DCP (+207)	DCP (+223)	DCP (+225)	pTLI (+134)
suite	suite	suite	K286						
			K343						
			R354						
			Y361						
			K364						
			Y365						
			R380						
			K383						
			R397						
			K404						
			K405						
			C407						
			K431						
			K441						
			K443						
			K472						
			C479						
			R480						
K576									
K2C6A_HUMAN	P02538	Keratin, type II cytoskeletal 6A	R42						
			C51						
			R59						
			K68						
			C77						
			Y83						
			R86						
			K168						
			K173						
			K180						
			R182						
			K189						
			K194						
			K204						
			K250						
			K252						
			K259						
			K271						
			K272						
			Y278						
K281									
K287									
H312									
R326									

Gene Name	Uniprot ID	Protein Name	Amino acid	PA (+149)	PA (+131)	DCP (+207)	DCP (+223)	DCP (+225)	pTLI (+134)	
suite	suite	suite	K338	Blue					Yellow	
			R349	Blue						
			Y356	Blue						Blue
			K359		Yellow					Yellow
			Y360			Yellow				
			H370	Blue						
			R375	Blue						
			K378	Yellow	Yellow	Yellow				Blue
			R392	Blue						Blue
			H397	Blue						Blue
			K399	Blue						Blue
			K400	Yellow					Blue	Yellow
			C402			Blue			Yellow	
			K421	Blue						Blue
			K424	Blue	Blue	Blue				Blue
			K426	Blue						Blue
			K436	Blue						Blue
			K438							
			K446		Yellow	Yellow				Yellow
			Y448	Blue						
			K467	Yellow						
			C474			Blue			Blue	
			R475			Blue			Blue	
K550	Blue						Yellow			
K2C6B_HUMAN	P04259	Keratin, type II cytoskeletal 6B	R40	Blue						
			R42	Blue						
			C51			Yellow		Yellow		
			R59	Blue						Blue
			K68		Yellow					
			C77			Yellow		Yellow		
			Y83	Blue						
			R86	Blue						
			K168	Blue						Blue
			K173	Blue	Yellow	Yellow				Yellow
			K180			Blue				
			R182			Blue				
			K189	Blue	Yellow	Yellow				
			K194	Blue			Yellow			Yellow
			K204	Blue			Yellow			Yellow
			K252	Blue						
			K259		Yellow					
R260	Yellow									
K271	Blue			Blue			Blue			

Gene Name	Uniprot ID	Protein Name	Amino acid	PA (+149)	PA (+131)	DCP (+207)	DCP (+223)	DCP (+225)	pTLI (+134)	
suite	suite	suite	K272	Yellow		Blue			Yellow	
			Y278	Yellow						
			K281	Blue	Blue	Yellow				
			K287	Blue					Blue	
			H312	Blue						
			R326	Blue						
			K338	Blue					Yellow	
			R349	Blue						
			Y356	Blue						
			H370	Blue						
			R375	Blue						
			K378	Yellow	Yellow	Yellow			Blue	
			R392	Blue					Blue	
			H397	Blue					Blue	
			K399	Blue					Blue	
			K400	Yellow					Blue	Yellow
			C402					Blue		Yellow
			K421	Blue						Blue
			K424	Blue	Blue	Blue				Blue
			K426	Blue						Blue
			K436	Blue						Blue
			K438	Yellow						
			K446	Blue	Yellow	Yellow				Yellow
			Y448	Blue						
			K467	Yellow						
			C474					Blue		Blue
R475					Blue		Blue			
K550							Yellow			
K2C6C_HUMAN	P48668	Keratin, type II cytoskeletal 6C	R40	Blue						
			R42	Blue						
			C51			Yellow			Yellow	
			R59	Blue						Blue
			K68		Yellow					
			C77			Yellow			Yellow	
			Y83	Blue						
			R86	Blue						
			K168	Blue						Blue
			K173	Blue	Yellow	Yellow				Yellow
			K180				Blue			
			R182				Blue			
			K189	Blue	Yellow	Yellow				
			K194	Blue			Yellow			Yellow
K204	Blue			Yellow			Yellow			

Gene Name	Uniprot ID	Protein Name	Amino acid	PA (+149)	PA (+131)	DCP (+207)	DCP (+223)	DCP (+225)	pTLI (+134)
suite	suite	suite	K252						
			K259						
			R260						
			K271						
			K272						
			Y278						
			K281						
			K287						
			H312						
			R326						
			K338						
			R349						
			Y356						
			K359						
			Y360						
			H370						
			R375						
			K378						
			K400						
			K421						
			K424						
			K426						
			K436						
			K438						
			K446						
			Y448						
			K467						
			C474						
R475									
K550									
K2C7_HUMAN	P08729	Keratin, type II cytoskeletal 7	K101						
			K108						
			R110						
K2C72_HUMAN	Q14CN4	Keratin, type II cytoskeletal 72	K142						
			R144						
			K243						
K2C73_HUMAN	Q86Y46	Keratin, type II cytoskeletal 73	K149						
			R151						
			K436						
			C443						
K2C75_HUMAN	O95678	Keratin, type II cytoskeletal 75	K154						
			K159						

Gene Name	Uniprot ID	Protein Name	Amino acid	PA (+149)	PA (+131)	DCP (+207)	DCP (+223)	DCP (+225)	pTLI (+134)
suite	suite	suite	K166						
			R168						
			K175						
			K258						
			Y264						
			K267						
			R335						
			Y342						
			K345						
			Y346						
			K453						
			C460						
			R461						
K2C78_HUMAN	Q8N1N4	Keratin, type II cytoskeletal 78	K128						
			K137						
			K171						
			K297						
			K307						
			K326						
			K348						
			K374						
			C394						
K2C79_HUMAN	Q5XKE5	Keratin, type II cytoskeletal 79	K147						
			K152						
			K159						
			R161						
			K168						
			K173						
K2C8_HUMAN	P05787	Keratin, type II cytoskeletal 8	K96						
			K101						
			K108						
			R110						
			K178						
			K185						
KCRU_HUMAN	P12532	Creatine kinase U-type, mitochondrial	K199						
KLK10_HUMAN	O43240	Kallikrein-10	R132						
			H136						
			K142						
			Y265						
KLK5_HUMAN	Q9Y337	Kallikrein-5	K235						
KLK7_HUMAN	P49862	Kallikrein-7	K117						
KLK8_HUMAN	O60259	Kallikrein-8	K183						
KPYM_HUMAN	P14618	Pyruvate kinase PKM	C49						

Gene Name	Uniprot ID	Protein Name	Amino acid	PA (+149)	PA (+131)	DCP (+207)	DCP (+223)	DCP (+225)	pTLI (+134)
suite	suite	suite	K66						
			K125						
			K141						
			K207						
			K247						
			K305						
			K322						
			C474						
			K475						
			K498						
LAMP1_HUMAN	P11279	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	K137						
			Y336						
			K337						
LDHA_HUMAN	P00338	L-lactate dehydrogenase A chain	K14						
			K81						
			C163						
			R169						
			H186						
			H193						
			H231						
			K232						
LDHB_HUMAN	P07195	L-lactate dehydrogenase B chain	K7						
			C164						
			R170						
LEG7_HUMAN	P47929	Galectin-7	K65						
LMNA_HUMAN	P02545	Prelamin-A/C [Cleaved into: Lamin-A/C	K32						
			K78						
			K123						
			K135						
			K144						
MAOX_HUMAN	P48163	NADP-dependent malic enzyme	K60						
			Y76						
MIF_HUMAN	P14174	Macrophage migration inhibitory factor	K78						
			K78						
MYH14_HUMAN	Q72406	Myosin-14	K1105						
MYH9_HUMAN	P35579	Myosin-9	K186						
			K909						
			K910						
			K1022						
			K1024						
			H1025						
			K1081						

Gene Name	Uniprot ID	Protein Name	Amino acid	PA (+149)	PA (+131)	DCP (+207)	DCP (+223)	DCP (+225)	pTLI (+134)
suite	suite	suite	K1492						
			K1843						
MYL6_HUMAN	P06660	Myosin light polypeptide 6	K26						
			K81						
NAL10_HUMAN	Q86W26	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 10	Y323						
NPM_HUMAN	P06748	Nucleophosmin	K32						
NRDC_HUMAN	O43847	Nardilysin	K326						
NUDT5_HUMAN	Q9UUK9	ADP-sugar pyrophosphatase	K55						
PDIA1_HUMAN	P07237	Protein disulfide-isomerase	K81						
PDIA3_HUMAN	P30101	Protein disulfide-isomerase A3	K433						
PDIA4_HUMAN	P13667	Protein disulfide-isomerase A4	K582						
PEPD_HUMAN	P12955	Xaa-Pro dipeptidase	K321						
PGAM1_HUMAN	P18669	Phosphoglycerate mutase 1	Y26						
			K100						
			K106						
PGK1_HUMAN	P00558	Phosphoglycerate kinase 1	K97						
			C108						
			K156						
			K353						
			K361						
			C662						
PKP1_HUMAN	Q13835	Plakophilin-1	K715						
PLAK_HUMAN	P14923	Junction plakoglobin	Y322						
			K336						
			K385						
			K448						
			C511						
			K615						
PLEC_HUMAN	Q15149	Plectin	K1975						
PNPH_HUMAN	P00491	Purine nucleoside phosphorylase	K179						
	P00491		K211						
POF1B_HUMAN	Q8WVV4	Protein POF1B	K267						
			Y272						
			K397						
PPIA_HUMAN	P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	C62						
			Y79						
			K133						
PPIB_HUMAN	P23284	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	K98						
PRDX1_HUMAN	Q06830	Peroxiredoxin-1	K16						
PRDX2_HUMAN	P32119	Peroxiredoxin-2	K26						
PROF1_HUMAN	P07737	Profilin-1	K91						

Gene Name	Uniprot ID	Protein Name	Amino acid	PA (+149)	PA (+131)	DCP (+207)	DCP (+223)	DCP (+225)	pTLI (+134)
PSB1_HUMAN	P20618	Proteasome subunit beta type-1	K164						
			K204						
PSB4_HUMAN	P28070	Proteasome subunit beta type-4	K201						
PTMA_HUMAN	P06454	Prothymosin alpha [Cleaved into: Prothymosin alpha, N-terminally processed; Thymosin alpha-1]	K15						
PYGL_HUMAN	P06737	Glycogen phosphorylase, liver form	Y162						
RAB10_HUMAN	P61026	Ras-related protein Rab-10	K59						
RAB14_HUMAN	P61106	Ras-related protein Rab-14	K61						
RB33B_HUMAN	Q9H082	Ras-related protein Rab-33B	K83						
RB39A_HUMAN	Q14964	Ras-related protein Rab-39A	K63						
RL11_HUMAN	P62913	60S ribosomal protein L11	K38						
RL12_HUMAN	P30050	60S ribosomal protein L12	C17						
RL40_HUMAN	P62987	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	K6						
			Y59						
RLA0_HUMAN	P05388	60S acidic ribosomal protein P0	H68						
RNAS7_HUMAN	Q9H1E1	Ribonuclease 7	K40						
			H43						
			K140						
ROA1_HUMAN	P09651	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	Y341						
RS24_HUMAN	P62847	40S ribosomal protein S24	K21						
RS25_HUMAN	P62851	40S ribosomal protein S25	K43						
RS27A_HUMAN	P62979	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	K11						
RS29_HUMAN	P62273	40S ribosomal protein S29	H3						
RSSA_HUMAN	P08865	40S ribosomal protein SA	K89						
S10A2_HUMAN	P29034	Protein S100-A2	H40						
			K41						
			K50						
			K57						
			K58						
S10A6_HUMAN	P06703	Protein S100-A6	K47						
S10A7_HUMAN	P31151	Protein S100-A7	K50						
S10A8_HUMAN	P05109	Protein S100-A8	Y19						
			H27						
			Y30						
			R31						
			K35						
			K36						
			C42						
S10A9_HUMAN	P06702	Protein S100-A9	K4						
			Y22						
			H28						

Gene Name	Uniprot ID	Protein Name	Amino acid	PA (+149)	PA (+131)	DCP (+207)	DCP (+223)	DCP (+225)	pTLI (+134)
suite	suite	suite	K38						
			K54						
			K57						
S10AA_HUMAN	P60903	Protein S100-A10	H7						
S10AB_HUMAN	P31949	Protein S100-A11	Y24						
S10AE_HUMAN	Q9HCY8	Protein S100-A14	K27						
			Y32						
			K38						
			C62						
S10AG_HUMAN	Q96FQ6	Protein S100-A16	K44						
			K57						
			K61						
SAP3_HUMAN	P17900	Ganglioside GM2 activator	K179						
			K185						
SBSN_HUMAN	Q6UWP8	Suprabasin	K49						
			K85						
			K241						
			H283						
			K295						
SPB12_HUMAN	Q96P63	Serpin B12	K107						
			K251						
			H390						
SPB3_HUMAN	P29508	Serpin B3	K54						
			K55						
			K69						
			H82						
			K94						
			K125						
			R144						
			K145						
			K145						
			K146						
			K158						
			K160						
			K189						
			Y207						
			K239						
K265									
K288									
K377									
SPB4_HUMAN	P48594	Serpin B4	H58						
			H82						
			K94						

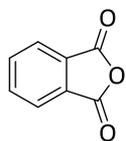
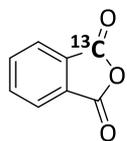
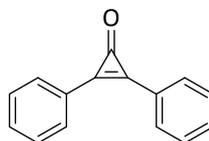
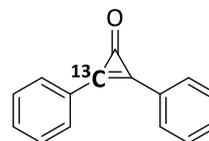
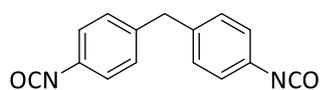
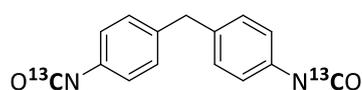
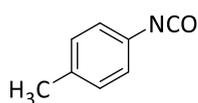
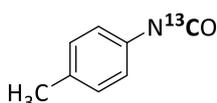
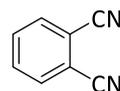
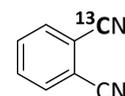
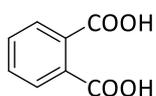
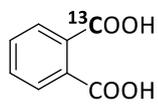
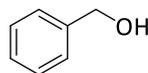
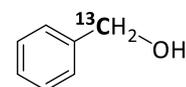
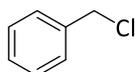
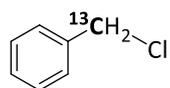
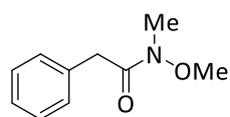
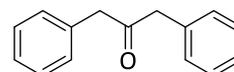
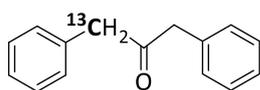
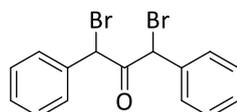
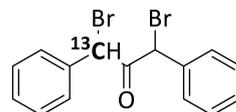
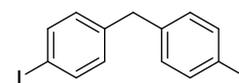
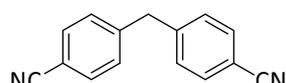
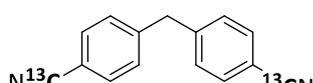
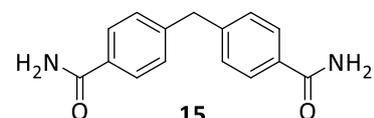
Gene Name	Uniprot ID	Protein Name	Amino acid	PA (+149)	PA (+131)	DCP (+207)	DCP (+223)	DCP (+225)	pTLI (+134)
suite	suite	suite	K125						
			K145						
			K146						
			K158						
			K160						
			K239						
			K265						
			C279						
			K377						
SPB5_HUMAN	P36952	Serpine B5	K268						
			K345						
SPB7_HUMAN	O75635	Serpine B7	K367						
SPB8_HUMAN	P50452	Serpine B8	K272						
SPR1A_HUMAN	P35321	Cornifin-A	C73						
SPR1B_HUMAN	P22528	Cornifin-B	C73						
SURF4_HUMAN	O15260	Surfeit locus protein 4	K139						
TALDO_HUMAN	P37837	Transaldolase	K277						
TBA1A_HUMAN	Q71U36	Tubulin alpha-1A chain	K96						
			H309						
			K311						
			Y312						
TBA1B_HUMAN	P68363	Tubulin alpha-1B chain	K96						
			H107						
			Y108						
			K112						
			H309						
			K311						
			Y312						
			K336						
K338									
TBA1C_HUMAN	Q9BQE3	Tubulin alpha-1C chain	K96						
			H107						
			Y108						
			K112						
			H309						
			K311						
			Y312						
TBA4A_HUMAN	P68366	Tubulin alpha-4A chain	C54						
			K96						
			K112						
			H309						
			K311						
			Y312						

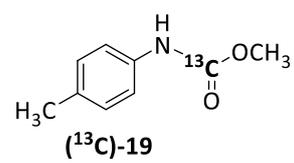
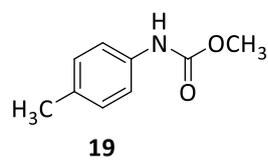
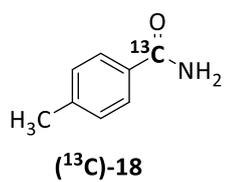
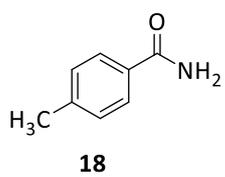
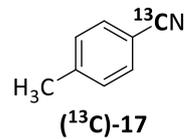
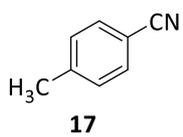
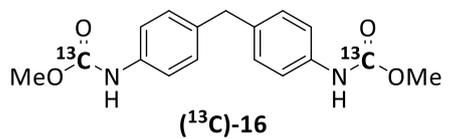
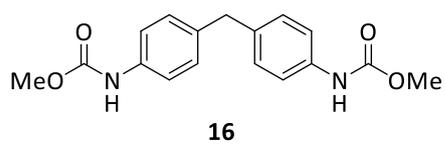
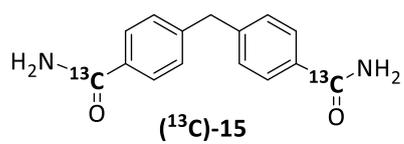
Gene Name	Uniprot ID	Protein Name	Amino acid	PA (+149)	PA (+131)	DCP (+207)	DCP (+223)	DCP (+225)	pTLI (+134)
TBA8_HUMAN	Q9NY65	Tubulin alpha-8 chain	K96						
TBB2A_HUMAN	Q13885	Tubulin beta-2A chain	H6						
			C12						
			Y50						
			K252						
			K324						
TBB3_HUMAN	Q13509	Tubulin beta-3 chain	H6						
			C12						
			K252						
TBB4A_HUMAN	P04350	Tubulin beta-4A chain	H6						
			K252						
TBB4B_HUMAN	P68371	Tubulin beta-4B chain	H6						
			C12						
			Y50						
			K252						
TBB5_HUMAN	P07437	Tubulin beta-5 chain	C12						
			Y50						
			K252						
			K324						
TBB6_HUMAN	Q9BUF5	Tubulin beta-6 chain	K252						
TBB8_HUMAN	Q3ZCM7	Tubulin beta-8 chain	K252						
TERA_HUMAN	P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	C522						
			K524						
			C535						
			K754						
			Y755						
TGM1_HUMAN	P22735	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase K	K634						
			K737						
TGM3_HUMAN	Q08188	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E	Y402						
			K411						
			K439						
THIO_HUMAN	P10599	Thioredoxin	K39						
			K94						
TKT_HUMAN	P29401	Transketolase	K319						
			Y321						
			K538						
TMED7_HUMAN	Q9Y3B3	Transmembrane emp24 domain-containing protein 7	C151						
TMEDA_HUMAN	P49755	Transmembrane emp24 domain-containing protein 10	K143						
TPD52_HUMAN	P55327	Tumor protein D52	K100						
TPIS_HUMAN	P60174	Triosephosphate isomerase	K56						
			H133						

Gene Name	Uniprot ID	Protein Name	Amino acid	PA (+149)	PA (+131)	DCP (+207)	DCP (+223)	DCP (+225)	pTLI (+134)
suite	suite	suite	R136						
			C164						
			K179						
			Y202						
			K212						
			K225						
			K231						
			C255						
			K256						
TPM2_HUMAN	P07951	Tropomyosin beta chain	K112						
TPM3_HUMAN	P06753	Tropomyosin alpha-3 chain	K113						
			K141						
TPM4_HUMAN	P67936	Tropomyosin alpha-4 chain	K13						
			K76						
TRHY_HUMAN	Q07283	Trichohyalin	K901						
			K969						
			K1022						
			K1023						
			K1082						
			R1446						
			K1447						
			R1485						
			K1486						
			K1516						
			K1532						
			K1596						
			K1668						
			R1670						
K1708									
VDAC2_HUMAN	P45880	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	K247						
VINC_HUMAN	P18206	Vinculin	K830						
ZA2G_HUMAN	P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein	K84						
			K149						
			K167						
			K179						
			K198						
			K224						
			Y228						

Formulaire des molécules synthétisées

Formulaire des molécules synthétisées

Anhydride
phtalique **1****(¹³C)-1**2,3-Diphénylcyclopropénone **2****(¹³C)-2**4,4'-Méthylenediphényldiisocyanate **3****(¹³C)-3***p*-Tolylisocyanate **4****(¹³C)-4****5****(¹³C)-5****6****(¹³C)-6****7****(¹³C)-7****8****(¹³C)-8**Amide de Weinreb **10****11****(¹³C)-11****12****(¹³C)-12****13****14****(¹³C)-14****15**



Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1]. Thyssen, J. P.; Linneberg, A.; Menné, T.; Johansen, J. D. The epidemiology of contact allergy in the general population-prevalence and main findings. *Contact Dermatitis* **2007**, *57*, 287-299.
- [2]. Mapp, C. E.; Boschetto, P.; Maestrelli, P.; Fabbri, L. M. Occupational asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2005**, *172*, 280-305.
- [3]. Lalko, J. F.; Kimber, I.; Dearman, R. J.; Gerberick, G. F.; Sarlo, K.; Api, A. M. Chemical reactivity measurements: potential for characterization of respiratory chemical allergens. *Toxicol. in Vitro* **2011**, *25*, 433-445.
- [4]. Gerberick, G. F.; Vassallo, J. D.; Bailey, R. E.; Chaney, J. G.; Morrall, S. W.; Lepoittevin, J.-P. Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicol. Sci.* **2004**, *81*, 332-343.
- [5]. Gerberick, G. F.; Vassallo, J. D.; Foertsch, L. M.; Price, B. B.; Chaney, J. G.; Lepoittevin, J.-P. Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: a classification tree model approach. *Toxicol. Sci.* **2007**, *97*, 417-427.
- [6]. Heydorn, S.; Menné, T.; Andersen, K. E.; Bruze, M.; Svedman, C.; White, I. R.; Basketter, D. A. Citral a fragrance allergen and irritant. *Contact Dermatitis* **2003**, *49*, 32-36.
- [7]. Johnson, R. C.; Elston, D. M. Wrist dermatitis: contact allergy to neoprene in a keyboard wrist rest. *Am. J. Contact Dermat.* **1997**, *8*, 172-174.
- [8]. Rajan, T. V. The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. *Trends Immunol.* **2003**, *24*, 376-379.
- [9]. Wickett, R. R.; Visscher, M. O. Structure and function of the epidermal barrier. *Am. J. Infect. Control* **2006**, *34*, S98-S110.
- [10]. Proksch, E.; Brandner, J. M.; Jensen, J. M. The skin: an indispensable barrier. *Exp. Dermatol.* **2008**, *17*, 1063-1072.
- [11]. Dréno, B. Anatomy and physiology of skin and cutaneous annexes. *Ann. Dermatol. Venereol.* **2009**, *136 Suppl 6*, S247-S251.
- [12]. Kimber, I.; Cumberbatch, M. Dendritic cells and cutaneous immune responses to chemical allergens. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1992**, *117*, 137-146.
- [13]. Cumberbatch, M.; Dearman, R. J.; Griffiths, C. E. M.; Kimber, I. Epidermal Langerhans cell migration and sensitisation to chemical allergens. *APMIS* **2003**, *111*, 797-804.
- [14]. Baroni, A.; Buommino, E.; De Gregorio, V.; Ruocco, E.; Ruocco, V.; Wolf, R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin. Dermatol.* **2012**, *30*, 257-262.

- [15]. Rustemeyer, T.; van Hoogstraten, I. M. W.; von Blomberg, B. M. E.; Gibbs, S.; Scheper, R. J. Mechanisms of irritant and allergic contact dermatitis. *In Contact Dermatitis 5th Ed.* Johansen, J. D.; Frosch, P. J.; Lepoittevin, J.-P. Eds. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **2011**, 43-90.
- [16]. Landsteiner, K.; Jacobs, J. Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. *J. Exp. Med.* **1935**, *61*, 643-656.
- [17]. Lepoittevin, J.-P. Molecular aspects of allergic and irritant contact dermatitis. *In Contact Dermatitis 5th Ed.* Frosch, P. J.; Menné, T.; Lepoittevin, J.-P. Eds. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **2011**, 91-110.
- [18]. 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.
- [19]. Authier, F.; Posner, B. I.; Bergeron, J. J. M. Endosomal proteolysis of internalized proteins. *FEBS Lett.* **1996**, *389*, 55-60.
- [20]. Kapsenberg, M. L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, *3*, 984-993.
- [21]. Ross, D. J.; McDonald, J. C. Asthma following inhalation accidents reported to the SWORD project. *Ann. Occup. Hyg.* **1996**, *40*, 645-650.
- [22]. Bakerly, N. D.; Moore, V. C.; Vellore, A. D.; Jaakkola, M. S.; Robertson, A. S.; Burge, P. S. Fifteen-year trends in occupational asthma: data from the Shield surveillance scheme. *Occup. Med. (Lond.)* **2008**, *58*, 169-174.
- [23]. Dearman, R. J.; Basketter, D. A.; Kimber, I. Differential cytokine production following chronic exposure of mice to chemical respiratory and contact allergens. *Immunology* **1995**, *86*, 545-550.
- [24]. Dearman, R. J.; Skinner, R. A.; Humphreys, N. E.; Kimber, I. Methods for the identification of chemical respiratory allergens in rodents: comparisons of cytokine profiling with induced changes in serum IgE. *J. Appl. Toxicol.* **2003**, *23*, 199-207.
- [25]. Borak, J.; Fields, C.; Andrews, L. S.; Pemberton, M. A. Methyl methacrylate and respiratory sensitization: a critical review. *Crit. Rev. Toxicol.* **2011**, *41*, 230-268.
- [26]. Cochrane, S. A.; Arts, J. H. E.; Ehnes, C.; Hindle, S.; Hollnagel, H. M.; Poole, A.; Suto, H.; Kimber, I. Thresholds in chemical respiratory sensitisation. *Toxicology* **2015**, *333*, 179-194.
- [27]. Kimber, I.; Dearman, R. J.; Basketter, D. A.; Boverhof, D. R. Chemical respiratory allergy: reverse engineering an adverse outcome pathway. *Toxicology* **2014**, *318*, 32-39.
- [28]. Kimber, I.; Poole, A.; Basketter, D. A. Skin and respiratory chemical allergy: confluence and divergence in a hybrid adverse outcome pathway. *Toxicol. Res.* **2018**, *7*, 586-605.

- [29]. Jelinek, D. F. Regulation of B lymphocyte differentiation. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **2000**, *84*, 375-386.
- [30]. Poulsen, L. K.; Hummelshoj, L. Triggers of IgE class switching and allergy development. *Ann. Med.* **2007**, *39*, 440-456.
- [31]. Kehry, M. R.; Hodgkin, P. D. Helper T cells: delivery of cell contact and lymphokine-dependent signals to B cells. *Semin. Immunol.* **1993**, *5*, 393-400.
- [32]. de Vries, J. E.; Punnonen, J.; Cocks, B. G.; Aversa, G. The role of T/B cell interactions and cytokines in the regulation of human IgE synthesis. *Semin. Immunol.* **1993**, *5*, 431-439.
- [33]. Vandebriel, R. J.; van Loveren, H. Non-animal sensitization testing: state-of-the-art. *Crit. Rev. Toxicol.* **2010**, *40*, 389-404.
- [34]. Graham, C.; Rosenkranz, H. S.; Karol, M. H. Structure-activity model of chemicals that cause human respiratory sensitization. *Regul. Toxicol. Pharm.* **1997**, *26*, 296-306.
- [35]. Bos, J. D.; Meinardi, M. M. H. M. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp. Dermatol.* **2000**, *9*, 165-169.
- [36]. Baur, X. A compendium of causative agents of occupational asthma. *J. Occup. Med. Toxicol.* **2013**, *8*, 8-15.
- [37]. Chapman, M. D.; Pomés, A.; Breiteneder, H.; Ferreira, F. Nomenclature and structural biology of allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2007**, *119*, 414-420.
- [38]. Chipinda, I.; Hettick, J. M.; Siegel, P. D. Haptenation: chemical reactivity and protein binding. *J. Allergy* **2011**, *2011*, Article ID 839682, 11 pages.
- [39]. Pichler, W. J. Predictive drug allergy testing: an alternative viewpoint. *Toxicology* **2001**, *158*, 31-41.
- [40]. Burkhart, C.; Britschgi, M.; Strasser, I.; Depta, J. P. H.; Von Greyerz, S.; Barnaba, V.; Pichler, W. J. Non-covalent presentation of sulfamethoxazole to human CD4+ T cells is independent of distinct human leucocyte antigen-bound peptides. *Clin. Exp. Allergy* **2002**, *32*, 1635-1643.
- [41]. Thyssen, J. P.; Menné, T. Metal allergy-a review on exposures, penetration, genetics, prevalence, and clinical implications. *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23*, 309-318.
- [42]. Lepoittevin, J.-P. Les bases chimiques de l'allergie de contact. *Rev. Fr. Allergol.* **2011**, *51*, 208-211.
- [43]. Basketter, D.; Dooms-Goossens, A.; Karlberg, A.-T.; Lepoittevin, J.-P. The chemistry of contact allergy: why is a molecule allergenic? *Contact Dermatitis* **1995**, *32*, 65-73.

- [44]. Magnusson, B.; Kligman, A. M. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J. Invest. Dermatol.* **1969**, *52*, 268-276.
- [45]. Buehler, E. V. Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig. *Arch. Dermatol.* **1965**, *91*, 171-177.
- [46]. Kimber, I.; Basketter, D. A. The murine local lymph node assay: a commentary on collaborative studies and new directions. *Food Chem. Toxicol.* **1992**, *30*, 165-169.
- [47]. Kimber, I.; Dearman, R. J.; Scholes, E. W.; Basketter, D. A. The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicology* **1994**, *93*, 13-31.
- [48]. Basketter, D. A.; Evans, P.; Fielder, R. J.; Gerberick, G. F.; Dearman, R. J.; Kimber, I. Local lymph node assay-validation, conduct and use in practice. *Food Chem. Toxicol.* **2002**, *40*, 593-598.
- [49]. Basketter, D. A.; Lea, L. J.; Dickens, A.; Briggs, D.; Pate, I.; Dearman, R. J.; Kimber, I. A comparison of statistical approaches to the derivation of EC3 values from local lymph node assay dose responses. *J. Appl. Toxicol.* **1999**, *19*, 261-266.
- [50]. Gerberick, G. F.; Ryan, C. A.; Kern, P. S.; Dearman, R. J.; Kimber, I.; Patlewicz, G. Y.; Basketter, D. A. A chemical dataset for evaluation of alternative approaches to skin-sensitization testing. *Contact Dermatitis* **2004**, *50*, 274-288.
- [51]. Gerberick, G. F.; Ryan, C. A.; Kern, P. S.; Schlatter, H.; Dearman, R. J.; Kimber, I.; Patlewicz, G. Y.; Basketter, D. A. Compilation of historical local lymph node data for evaluation of skin sensitization alternative methods. *Dermatitis* **2005**, *16*, 157-202.
- [52]. Kern, P. S.; Gerberick, G. F.; Ryan, C. A.; Kimber, I.; Aptula, A.; Basketter, D. A. Local lymph node data for the evaluation of skin sensitization alternatives: a second compilation. *Dermatitis* **2010**, *21*, 8-32.
- [53]. Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of the 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency. *Off. J. Eur. Union.* **2006**, *L396*, 1-849.
- [54]. 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 - 7th amendment of the European Cosmetics Directive. *Off. J. Eur. Union.* **2003**, *L66*, 26-35.
- [55]. Kos, L.; Conlon, J. An update on *alopecia areata*. *Curr. Opin. Pediatr.* **2009**, *21*, 475-480.
- [56]. OECD. The Adverse Outcome Pathway for skin sensitisation initiated by covalent binding to proteins. Series on testing and assessment No. 168. **2012**, 105 pages.

- [57]. Reisinger, K.; Hoffmann, S.; Alépée, N.; Ashikaga, T.; Barroso, J.; Elcombe, C.; Gellatly, N.; Galbiati, V.; Gibbs, S.; Groux, H.; Hibatallah, J.; Keller, D.; Kern, P.; Klaric, M.; Kolle, S.; Kuehnl, J.; Lambrechts, N.; Lindstedt, M.; Millet, M.; Martinozzi-Teissier, S.; Natsch, A.; Petersohn, D.; Pike, I.; Sakaguchi, H.; Schepky, A.; Tailhardat, M.; Templier, M.; van Vliet, E.; Maxwell, G. Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. in Vitro* **2015**, *29*, 259-270.
- [58]. Benezra, C.; Sigman, C. C.; Perry, L. R.; Helmes, C. T.; Maibach, H. I. A systematic search for structure-activity relationships of skin contact sensitizers: methodology. *J. Invest. Dermatol.* **1985**, *85*, 351-356.
- [59]. Barratt, M. D.; Basketter, D. A.; Chamberlain, M.; Admans, G. D.; Langowski, J. J. An expert system rulebase for identifying contact allergens. *Toxicol. In Vitro* **1994**, *8*, 1053-1060.
- [60]. Enslein, K.; Gombar, V. K.; Blake, B. W.; Maibach, H. I.; Hostynek, J. J.; Sigman, C. C.; Bagheri, D. A quantitative structure-toxicity relationships model for the dermal sensitization guinea pig maximization assay. *Food Chem. Toxicol.* **1997**, *35*, 1091-1098.
- [61]. Aptula, A. O.; Roberts, D. W. Mechanistic applicability domains for nonanimal-based prediction of toxicological end points: general principles and application to reactive toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, *19*, 1097-1105.
- [62]. Aptula, A. O.; Patlewicz, G.; Roberts, D. W. Skin sensitization: reaction mechanistic applicability domains for structure-activity relationships. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 1420-1426.
- [63]. Wong, C. L.; Ghassabian, S.; Smith, M. T.; Lam, A. L. *In vitro* methods for hazard assessment of industrial chemicals-opportunities and challenges. *Front. Pharmacol.* **2015**, *6*, Article 94, 13 pages.
- [64]. Casati, S.; Griesinger, C.; Whelan, M. EURL ECVAM Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for skin sensitisation testing. **2013**, 38 pages.
- [65]. OECD. *Test Guideline No. 442C: in chemico* skin sensitisation: assays addressing the adverse outcome pathway key event on covalent binding to proteins. OECD Guidelines for the testing of chemicals, Section 4, OECD Publishing, **2019**, 40 pages.
- [66]. Gerberick, G. F.; Troutman, J. A.; Foertsch, L. M.; Vassallo, J. D.; Quijano, M.; Dobson, R. L.; Goebel, C.; Lepoittevin, J. P. Investigation of peptide reactivity of pro-hapten skin sensitizers using a peroxidase-peroxide oxidation system. *Toxicol. Sci.* **2009**, *112*, 164-174.
- [67]. Weltzien, H. U.; Corsini, E.; Gibbs, S.; Lindstedt, M.; Borrebaeck, C.; Budde, P.; Schulz-Knappe, P.; Thierse, H.-J.; Martin, S. F.; Roggen, E. L. Safe cosmetics without animal testing? Contributions of the EU Project Sens-it-iv. *J. Consum. Prot. Food. S.* **2009**, *4*, 41-48.
- [68]. Corsini, E.; Mitjans, M.; Galbiati, V.; Lucchi, L.; Galli, C. L.; Marinovich, M. Use of IL-18 production in a human keratinocyte cell line to discriminate contact sensitizers from irritants and low molecular weight respiratory allergens. *Toxicol. in Vitro* **2009**, *23*, 789-796.

- [69]. Natsch, A.; Emter, R. Skin sensitizers induce antioxidant response element dependent genes: application to the *in vitro* testing of the sensitization potential of chemicals. *Toxicol. Sci.* **2008**, *102*, 110-119.
- [70]. Gildea, L. A.; Ryan, C. A.; Foertsch, L. M.; Kennedy, J. M.; Dearman, R. J.; Kimber, I.; Gerberick, G. F. Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. *J. Invest. Dermatol.* **2006**, *126*, 1813-1822.
- [71]. Ryan, C. A.; Gildea, L. A.; Hulette, B. C.; Dearman, R. J.; Kimber, I.; Gerberick, G. F. Gene expression changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. *Toxicol. Lett.* **2004**, *150*, 301-316.
- [72]. EURL ECVAM Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing. **2014**, 40 pages.
- [73]. OECD. *Test No. 442D: in vitro skin sensitisation: in vitro skin sensitisation assays addressing the aop key event on keratinocyte activation*. OECD Guidelines for the testing of chemicals, Section 4, OECD Publishing, **2018**, 51 pages.
- [74]. Yoshida, Y.; Sakaguchi, H.; Ito, Y.; Okuda, M.; Suzuki, H. Evaluation of the skin sensitization potential of chemicals using expression of co-stimulatory molecules, CD54 and CD86, on the naive THP-1 cell line. *Toxicol. in Vitro* **2003**, *17*, 221-228.
- [75]. Casati, S.; Whelan, M. EURL ECVAM Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. **2015**, 44 pages.
- [76]. OECD. *Test No. 442E: in vitro skin sensitisation: in vitro skin sensitisation assays addressing the key event on activation of dendritic cells on the adverse outcome pathway for skin sensitisation*. OECD Guidelines for the testing of chemicals, Section 4, OECD Publishing, **2018**, 65 pages.
- [77]. Dearman, R. J.; Smith, S.; Basketter, D. A.; Kimber, I. Classification of chemical allergens according to cytokine secretion profiles of murine lymph node cells. *J. Appl. Toxicol.* **1997**, *17*, 53-62.
- [78]. Hilton, J.; Dearman, R. J.; Boylett, M. S.; Fielding, I.; Basketter, D. A.; Kimber, I. The mouse IgE test for the identification of potential chemical respiratory allergens: considerations of stability and controls. *J. Appl. Toxicol.* **1996**, *16*, 165-170.
- [79]. Rheinwald, J. G.; Green, H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* **1975**, *6*, 331-343.
- [80]. Cannon, C. L.; Neal, P. J.; Southee, J. A.; Kubilus, J.; Klausner, M. New epidermal model for dermal irritancy testing. *Toxicol. in Vitro* **1994**, *8*, 889-891.

- [81]. Hoffmann, J.; Heisler, E.; Karpinski, S.; Losse, J.; Thomas, D.; Siefken, W.; Ahr, H. J.; Vohr, H. W.; Fuchs, H. W. Epidermal-skin-test 1,000 (EST-1,000) - a new reconstructed epidermis for *in vitro* skin corrosivity testing. *Toxicol. in Vitro* **2005**, *19*, 925-929.
- [82]. Kandárová, H.; Liebsch, M.; Spielmann, H.; Genschow, E.; Schmidt, E.; Traue, D.; Guest, R.; Whittingham, A.; Warren, N.; Gamer, A. O.; Remmele, M.; Kaufmann, T.; Wittmer, E.; De Wever, B.; Rosdy, M. Assessment of the human epidermis model SkinEthic RHE for *in vitro* skin corrosion testing of chemicals according to new OECD TG 431. *Toxicol. in Vitro* **2006**, *20*, 547-559.
- [83]. 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.
- [84]. Niwa, M.; Nagai, K.; Oike, H.; Kobori, M. Evaluation of the skin irritation using a DNA microarray on a reconstructed human epidermal model. *Biol. Pharm. Bull.* **2009**, *32*, 203-208.
- [85]. Netzlaff, F.; Lehr, C. M.; Wertz, P. W.; Schaefer, U. F. The human epidermis models EpiSkin®, SkinEthic® and EpiDerm®: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2005**, *60*, 167-178.
- [86]. Elbayed, K.; Dillmann, B.; Raya, J.; Piotto, M.; Engelke, F. Field modulation effects induced by sample spinning: application to high-resolution magic angle spinning NMR. *J. Magn. Reson.* **2005**, *174*, 2-26.
- [87]. Dhalluin, C.; Boutillon, C.; Tartar, A.; Lippens, G. Magic angle spinning nuclear magnetic resonance in solid-phase peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10494-10500.
- [88]. Cheng, L. L.; Lean, C. L.; Bogdanova, A.; Wright, S. C., Jr.; 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.
- [89]. Elbayed, K.; Berl, V.; Debeuckelaere, C.; Moussallieh, F.-M.; Piotto, M.; Namer, I. J.; Lepoittevin, J.-P. HR-MAS NMR spectroscopy of reconstructed human epidermis: potential for the *in situ* investigation of the chemical interactions between skin allergens and nucleophilic amino acids. *Chem. Res. Toxicol.* **2013**, *26*, 136-145.
- [90]. Debeuckelaere, C.; Berl, V.; Elbayed, K.; Moussallieh, F.-M.; Namer, I. J.; Lepoittevin, J.-P. Matrix effect of human reconstructed epidermis on the chemoselectivity of a skin sensitizing α -methylene- γ -butyrolactone: consequences for the development of *in chemico* alternative methods. *Chem. Res. Toxicol.* **2015**, *28*, 2192-2198.

- [91]. 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.
- [92]. 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.
- [93]. Wilkins, M. R.; Sanchez, J. C.; Gooley, A. A.; Appel, R. D.; Humphery-Smith, I.; Hochstrasser, D. F.; Williams, K. L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **1996**, *13*, 19-50.
- [94]. Wasinger, V. C.; Cordwell, S. J.; Cerpa-Poljak, A.; Yan, J. X.; Gooley, A. A.; Wilkins, M. R.; Duncan, M. W.; Harris, R.; Williams, K. L.; Humphery-Smith, I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: mycoplasma genitalium. *Electrophoresis* **1995**, *16*, 1090-1094.
- [95]. Parkinson, E.; Aleksic, M.; Cubberley, R.; Kaur-Atwal, G.; Vissers, J. P. C.; Skipp, P. Determination of protein haptentation by chemical sensitizers within the complexity of the human skin proteome. *Toxicol. Sci.* **2018**, *162*, 429-438.
- [96]. Bliss, E.; Heywood, W. E.; Benatti, M.; Sebire, N. J.; Mills, K. An optimised method for the proteomic profiling of full thickness human skin. *Biol. Proced. Online* **2016**, *18*, 7 pages.
- [97]. Fletcher, S. T.; Basketter, D. A. Proteomic analysis of the response of EpiDerm™ cultures to sodium lauryl sulphate. *Toxicol. in Vitro* **2006**, *20*, 975-985.
- [98]. Wisniak, J. Auguste Laurent. Radical and radicals. *Educación química* **2009**, 166-175.
- [99]. Moffitt, D. L.; Sansom, J. E. Allergic contact dermatitis from phthalic anhydride/trimellitic anhydride/glycols copolymer in nail varnish. *Contact Dermatitis* **2002**, *46*, 236.
- [100]. Minamoto, K.; Nagano, M.; Yonemitsu, K.; Futatsuka, M. Allergic contact dermatitis from unsaturated polyester resin consisting of maleic anhydride, phthalic anhydride, ethylene glycol and dicyclopentadiene. *Contact Dermatitis* **2002**, *46*, 62-63.
- [101]. Ryan, C. A.; Gerberick, G. F.; Cruse, L. W.; Basketter, D. A.; Lea, L.; Blaikie, L.; Dearman, R. J.; Warbrick, E. V.; Kimber, I. Activity of human contact allergens in the murine local lymph node assay. *Contact Dermatitis* **2000**, *43*, 95-102.
- [102]. Basketter, D.; Kimber, I. Predictive tests for irritants and allergens and their use in quantitative risk assessment. *Contact Dermatitis 5th Ed.* Johansen, J. D.; Frosch, P. J.; Lepoittevin, J.-P. Eds. Springer, Berlin, Heidelberg, **2011**, 229-239.

- [103]. Giarola, S.; Romain, C.; Williams, C. K.; Hallett, J. P.; Shah, N. Techno-economic assessment of the production of phthalic anhydride from corn stover. *Chem. Eng. Res. Des.* **2016**, *107*, 181-194.
- [104]. Wainwright, M. S.; Foster, N. R. Catalysts, kinetics and reactor design in phthalic anhydride synthesis. *Cat. Rev. - Sci. Eng.* **1979**, *19*, 211-292.
- [105]. Dias, C. R.; Portela, M. F.; Bond, G. C. Synthesis of phthalic anhydride: catalysts, kinetics, and reaction modeling. *Cat. Rev. - Sci. Eng.* **1997**, *39*, 169-207.
- [106]. Bhat, G. R.; Gupta, S. K. MO optimization of phthalic anhydride industrial catalytic reactors using guided GA with the adapted jumping gene operator. *Chem. Eng. Res. Des.* **2008**, *86*, 959-976.
- [107]. Guldemann, J. Evaluation du potentiel de sensibilisation de produits chimiques en fonction de leur réactivité, *Université de Strasbourg*, **2013**.
- [108]. Kochi, J. K. The mechanism of the Sandmeyer and Meerwein reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 2942-2948.
- [109]. Takagi, K.; Okamoto, T.; Sakakibara, Y.; Oka, S. Palladium(II) catalyzed synthesis of aryl cyanides from aryl halides. *Chem. Lett.* **1973**, *2*, 471-474.
- [110]. Anderson, B. A.; Bell, E. C.; Ginah, F. O.; Harn, N. K.; Pagh, L. M.; Wepsiec, J. P. Cooperative catalyst effects in palladium-mediated cyanation reactions of aryl halides and triflates. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 8224-8228.
- [111]. Sundermeier, M.; Zapf, A.; Beller, M.; Sans, J. A new palladium catalyst system for the cyanation of aryl chlorides. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 6707-6710.
- [112]. Cristau, H.-J.; Ouali, A.; Spindler, J.-F.; Taillefer, M. Mild and efficient copper-catalyzed cyanation of aryl iodides and bromides. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 2483-2492.
- [113]. Zanon, J.; Klapars, A.; Buchwald, S. L. Copper-catalyzed domino halide exchange-cyanation of aryl bromides. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2890-2891.
- [114]. Arvela, R. K.; Leadbeater, N. E. Rapid, easy cyanation of aryl bromides and chlorides using nickel salts in conjunction with microwave promotion. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9122-9125.
- [115]. Amatore, C.; Jutand, A.; Thuilliez, A. Formation of palladium(0) complexes from Pd(OAc)₂ and a bidentate phosphine ligand (dppp) and their reactivity in oxidative addition. *Organometallics* **2001**, *20*, 3241-3249.
- [116]. Anbarasan, P.; Schareina, T.; Beller, M. Recent developments and perspectives in palladium-catalyzed cyanation of aryl halides: synthesis of benzonitriles. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5049-5067.

- [117]. Sundermeier, M.; Zapf, A.; Mutyala, S.; Baumann, W.; Sans, J.; Weiss, S.; Beller, M. Progress in the palladium-catalyzed cyanation of aryl chlorides. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 1828-1836.
- [118]. Lignier, P.; Estager, J.; Kardos, N.; Gravouil, L.; Gazza, J.; Naffrechoux, E.; Draye, M. Swift and efficient sono-hydrolysis of nitriles to carboxylic acids under basic condition: role of the oxide anion radical in the hydrolysis mechanism. *Ultrason. Sonochem.* **2011**, *18*, 28-31.
- [119]. Chemat, F.; Poux, M.; Berlan, J. 'Dry' hydrolysis of nitriles by sodium perborate and copper salts in heterogeneous media. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1996**, 1781-1784.
- [120]. Kumar, S.; Dixit, S. K.; Awasthi, S. K. An efficient one pot method for synthesis of carboxylic acids from nitriles using recyclable ionic liquid [bmim]HSO₄. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 3802-3804.
- [121]. Zhou, Y.; Chen, G.; Wang, W.; Wei, L.; Zhang, Q.; Song, L.; Fang, X. Synthesis and characterization of transparent polyimides derived from ester-containing dianhydrides with different electron affinities. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 79207-79215.
- [122]. Verbeeck, S.; Herrebout, W. A.; Gulevskaya, A. V.; van der Veken, B. J.; Maes, B. U. W. ONSH: optimization of oxidative alkylamination reactions through study of the reaction mechanism. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 5126-5133.
- [123]. Breslow, R.; Haynie, R.; Mirra, J. The synthesis of diphenylcyclopropanone. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 247-248.
- [124]. Nowicka, D.; Maj, J.; Jankowska-Konsur, A.; Hryniewicz-Gwózdź, A. Efficacy of diphenylcyclopropanone in *alopecia areata*: a comparison of two treatment regimens. *Adv. Dermatol. Allergol.* **2018**, *35*, 577-581.
- [125]. McElwee, K. J.; Gilhar, A.; Tobin, D. J.; Ramot, Y.; Sundberg, J. P.; Nakamura, M.; Bertolini, M.; Inui, S.; Tokura, Y.; King Jr., L. E.; Duque-Estrada, B.; Tosti, A.; Keren, A.; Itami, S.; Shoenfeld, Y.; Zlotogorski, A.; Paus, R. What causes *alopecia areata*? *Exp. Dermatol.* **2013**, *22*, 609-626.
- [126]. Mancuso, G.; Balducci, A.; Casadio, C.; Farina, P.; Staffa, M.; Valenti, L.; Milani, M. Efficacy of betamethasone valerate foam formulation in comparison with betamethasone dipropionate lotion in the treatment of mild-to-moderate *alopecia areata*: a multicenter, prospective, randomized, controlled, investigator-blinded trial. *Int. J. Dermatol.* **2003**, *42*, 572-575.
- [127]. Tosti, A.; Iorizzo, M.; Botta, G. L.; Milani, M. Efficacy and safety of a new clobetasol propionate 0.05% foam in *alopecia areata*: a randomized, double-blind placebo-controlled trial. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2006**, *20*, 1243-1247.
- [128]. Porter, D.; Burton, J. L. A comparison of intra-lesional triaminolone hexa-cetonide and triamcinolone acetonide in *alopecia areata*. *Br. J. Derm.* **1971**, *85*, 272-273.

- [129]. Price, V. H. Double-blind, placebo-controlled evaluation of topical minoxidil in extensive *alopecia areata*. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1987**, *16*, 730-736.
- [130]. Price, V. H.; Willey, A.; Chen, B. K. Topical tacrolimus in *alopecia areata*. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2005**, *52*, 138-139.
- [131]. Ring, J.; Mohrenschlager, M.; Henkel, V. The US FDA 'black box' warning for topical calcineurin inhibitors: an ongoing controversy. *Drug Saf.* **2008**, *31*, 185-198.
- [132]. Hoting, E.; Boehm, A. Therapy of *alopecia areata* with diphencyprone. *Br. J. Dermatol.* **1992**, *127*, 625-629.
- [133]. Shapiro, J.; Tan, J.; Ho, V.; Abbott, F.; Tron, V. Treatment of chronic severe *alopecia areata* with topical diphenylcyclopropanone and 5% minoxidil: a clinical and immunopathologic evaluation. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1993**, *29*, 729-735.
- [134]. Alam, M.; Gross, E. A.; Savin, R. C. Severe urticarial reaction to diphenylcyclopropanone therapy for *alopecia areata*. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1999**, *40*, 110-112.
- [135]. Tiwary, A. K.; Mishra, D. K.; Chaudhary, S. S. Comparative study of efficacy and safety of topical squaric acid dibutylester and diphenylcyclopropanone for the treatment of *alopecia areata*. *N. Am. J. Med. Sci.* **2016**, *8*, 237-242.
- [136]. Cai, S.; Zeng, J.; Li, Y.; Liu, X.-W. Polysubstituted pyrrole derivatives via 1,2-alkenyl migration of novel γ -amino- α,β -unsaturated aldehydes and α -diazocarbonyls. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 7275-7278.
- [137]. Poloukhine, A.; Popik, V. V. Highly efficient photochemical generation of a triple bond: synthesis, properties, and photodecarbonylation of cyclopropanones. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 7833-7840.
- [138]. Zhou, P.; Yang, W.-T.; Rahman, A. U.; Li, G.; Jiang, B. Rh(III)-catalyzed [3 + 3] annulation reaction of cyclopropanones and sulfoxonium ylides toward trisubstituted 2-pyrones. *J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 360-366.
- [139]. Breslow, R.; Eicher, T.; Krebs, A.; Peterson, R. A.; Posner, J. Diphenylcyclopropanone. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 1320-1325.
- [140]. Blake, M. E.; Bartlett, K. L.; Jones Jr., M. A *m*-benzyne to *o*-benzyne conversion through a 1,2-shift of a phenyl group. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6485-6490.
- [141]. Yoon, N. M.; Pak, C. S.; Brown Herbert, C.; Krishnamurthy, S.; Stocky, T. P. Selective reductions. XIX. Rapid reaction of carboxylic acids with borane-tetrahydrofuran. A remarkably convenient procedure for the selective conversion of carboxylic acids to the corresponding alcohols in the presence of other functional groups. *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 2786-2792.

- [142]. Brown, H. C.; Choi, Y. M.; Narasimhan, S. Selective reductions. 29. A simple technique to achieve an enhanced rate of reduction of representative organic compounds by borane-dimethyl sulfide. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 3153-3163.
- [143]. Simek, J. W.; Tuck, T.; Bush, K. C. Reduction of carboxylic acids with sodium borohydride and an electrophile. *J. Chem. Educ.* **1997**, *74*, 107-108.
- [144]. Norris, J. F.; Watt, M.; Thomas, R. The reaction between alcohols and aqueous solutions of hydrochloric and hydrobromic acids. *J. Am. Chem. Soc.* **1916**, *38*, 1071-1079.
- [145]. Gilman, H.; Kirby, J. E. Some rearrangement reactions of alpha-naphthylmethylmagnesium chloride. *J. Am. Chem. Soc.* **1929**, *51*, 3475-3478.
- [146]. Burks, J. E. Phosphorus(V) chloride. *Encyclopedia of reagents for organic synthesis* Paquette, L. (Eds.) John Wiley & Sons, New York, **2001**, 1-4.
- [147]. Anderson Jr, A. G.; Owen, N. E. T.; Freenor, F. J.; Erickson, D. The reaction of primary and secondary alcohols with phosphorus trichloride/dimethylformamide reagents. *Synthesis* **1976**, 398-399.
- [148]. Tipson, R. S. Preparation of *N*-(2-chloroethyl)-4-(phenylazo)aniline. *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 1449.
- [149]. Dubey, A.; Upadhyay, A. K.; Kumar, P. Pivaloyl chloride/DMF: a new reagent for conversion of alcohols to chlorides. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 744-746.
- [150]. Fiandanese, V.; Marchese, G.; Ronzini, L. One-step synthesis of ketones from carboxylic acids and Grignard reagents in the presence of a nickel(II)-phosphine catalyst. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 3677-3680.
- [151]. Fiandanese, V.; Marchese, G.; Martina, V.; Ronzini, L. Iron catalyzed cross-coupling reactions of acyl chlorides with Grignard reagents. A mild, general, and convenient synthesis of aliphatic and aromatic ketones. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 4805-4808.
- [152]. Cardellicchio, C.; Fiandanese, V.; Marchese, G.; Ronzini, L. Functionalized ketones by iron mediated reaction of grignard reagents with acyl chlorides. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 2053-2056.
- [153]. Schiaffo, C. E.; Rottman, M.; Wittlin, S.; Dussault, P. H. 3-Alkoxy-1,2-dioxolanes: synthesis and evaluation as potential antimalarial agents. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 316-319.
- [154]. Khlestkin, V. K.; Mazhukin, D. G. Recent advances in the application of *N,O*-dialkylhydroxylamines in organic chemistry. *Curr. Org. Chem.* **2003**, *7*, 967-993.
- [155]. Ruiz, J.; Sotomayor, N.; Lete, E. Parham-type cycliacylation with Weinreb amides. Application to the synthesis of fused indolizinone systems. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1115-1117.

- [156]. Taillier, C.; Bellosta, V.; Meyer, C.; Cossy, J. Synthesis of ω -hydroxy ketones from ω -benzyloxy Weinreb amides by using a chemoselective nucleophilic addition/birch reduction process. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2145-2147.
- [157]. Gibson, C. L.; Handa, S. An expedient synthesis of (R)-(+)-umbelactone. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 1281-1284.
- [158]. Jaipuri, F. A.; Francisca Jofre, M.; Schwarz, K. A.; Pohl, N. L. Microwave-assisted cleavage of Weinreb amide for carboxylate protection in the synthesis of a (R)-3-hydroxyalkanoic acid. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 4149-4152.
- [159]. Shimizu, T.; Osako, K.; Nakata, T.-i. Efficient method for preparation of *N*-methoxy-*N*-methyl amides by reaction of lactones or esters with $\text{Me}_2\text{AlCl}\cdot\text{MeONHMe}\cdot\text{HCl}$. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 2685-2688.
- [160]. Dineen, T. A.; Zajac, M. A.; Myers, A. G. Efficient transamidation of primary carboxamides by in situ activation with *N,N*-dialkylformamide dimethyl acetals. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16406-16409.
- [161]. Jacobi, P. A.; Kaczmarek, C. S. R.; Udodong, U. E. Bis heteroannulation. 8. Total synthesis of (\pm)-paniculide-A. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 4859-4862.
- [162]. Dechantsreiter, M. A.; Burkhart, F.; Kessler, H. A stereoselective synthesis of a C-glycosylated peptoid building block. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 253-254.
- [163]. Katritzky, A. R.; Yang, H.; Zhang, S.; Wang, M. An efficient conversion of carboxylic acids into Weinreb amides. *Arkivoc* **2002**, 39-44.
- [164]. De Luca, L.; Giacomelli, G.; Taddei, M. An easy and convenient synthesis of Weinreb amides and hydroxamates. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2534-2537.
- [165]. Kim, J.-G.; Jang, D. O. A convenient one-pot method for the synthesis of *N*-methoxy-*N*-methyl amides from carboxylic acids. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2010**, *31*, 171-173.
- [166]. Uma, K.; Lalithamba, H. S.; Raghavendra, M.; Chandramohan, V.; Anupama, C. Synthesis of *N* ^{α} -protected aminoacid/peptide Weinreb amides employing *N,N'*-carbonyldiimidazole as activating agent; studies on docking and antibacterial activities. *Arkivoc* **2016**, 339-351.
- [167]. Gilman, H.; Catlin, W. E. *n*-Propylbenzene. *Org. Synth.* **1941**, *Coll. Vol. 1*, 471-474.
- [168]. Frick-Engfeldt, M.; Zimerson, E.; Karlsson, D.; Skarping, G.; Isaksson, M.; Bruze, M. Is it possible to improve the patch-test diagnostics for isocyanates? A stability study of petrolatum preparations of diphenylmethane-4,4'-diisocyanate and polymeric diphenylmethane diisocyanate. *Contact Dermatitis* **2007**, *56*, 27-34.
- [169]. Goossens, A.; Detienne, T.; Bruze, M. Occupational allergic contact dermatitis caused by isocyanates. *Contact Dermatitis* **2002**, *47*, 304-308.

- [170]. Frick, M.; Björkner, B.; Hamnerius, N.; Zimerson, E. Allergic contact dermatitis from dicyclohexylmethane-4,4'-diisocyanate. *Contact Dermatitis* **2003**, *48*, 305-309.
- [171]. Redlich, C. A.; Karol, M. H. Diisocyanate asthma: clinical aspects and immunopathogenesis. *Int. Immunopharmacol.* **2002**, *2*, 213-224.
- [172]. Kimber, I.; Dearman, R. J.; Basketter, D. A. Diisocyanates, occupational asthma and IgE antibody: implications for hazard characterization. *J. Appl. Toxicol.* **2014**, *34*, 1073-1077.
- [173]. Bernstein, J. A. Overview of diisocyanate occupational asthma. *Toxicology* **1996**, *111*, 181-189.
- [174]. Hur, G. Y.; Koh, D. H.; Choi, G. S.; Park, H. J.; Choi, S. J.; Ye, Y. M.; Kim, K. S.; Park, H. S. Clinical and immunologic findings of methylene diphenyl diisocyanate-induced occupational asthma in a car upholstery factory. *Clin. Exp. Allergy* **2008**, *38*, 586-593.
- [175]. Petsonk, E. L.; Wang, M. L.; Lewis, D. M.; Siegel, P. D.; Husberg, B. J. Asthma-like symptoms in wood product plant workers exposed to methylene diphenyl diisocyanate. *Chest* **2000**, *118*, 1183-1193.
- [176]. Ott, M. G. Occupational asthma, lung function decrement, and toluene diisocyanate (TDI) exposure: a critical review of exposure-response relationships. *Appl. Occup. Environ. Hyg.* **2002**, *17*, 891-901.
- [177]. White, I. R.; Stewart, J. R.; Rycroft, R. J. Allergic contact dermatitis from an organic diisocyanate. *Contact Dermatitis* **1983**, *9*, 300-303.
- [178]. Hamada, H.; Bruze, M.; Zimerson, E.; Isaksson, M.; Engfeldt, M. Sensitization and cross-reactivity patterns of contact allergy to diisocyanates and corresponding amines: investigation of diphenylmethane-4,4'-diisocyanate, diphenylmethane-4,4'-diamine, dicyclohexylmethane-4,4'-diisocyanate, and dicyclohexylmethane-4,4'-diamine. *Contact dermatitis* **2017**, *77*, 231-241.
- [179]. Liippo, J.; Lammintausta, K. Contact sensitization to 4,4'-diaminodiphenylmethane and to isocyanates among general dermatology patients. *Contact Dermatitis* **2008**, *59*, 109-114.
- [180]. Bello, D.; Herrick, C. A.; Smith, T. J.; Woskie, S. R.; Streicher, R. P.; Cullen, M. R.; Liu, Y.; Redlich, C. A. Skin exposure to isocyanates: reasons for concern. *Environ. Health Perspect.* **2007**, *115*, 328-335.
- [181]. Dearman, R. J.; Spence, L. M.; Kimber, I. Characterization of murine immune responses to allergenic diisocyanates. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1992**, *112*, 190-197.
- [182]. Aalto-Korte, K.; Suuronen, K.; Kuuliala, O.; Henriks-Eckerman, M. L.; Jolanki, R. Occupational contact allergy to monomeric isocyanates. *Contact Dermatitis* **2012**, *67*, 78-88.
- [183]. Ozaki, S. Recent advances in isocyanate chemistry. *Chem. Rev.* **1972**, *72*, 457-496.

- [184]. Babad, H.; Zeiler, A. G. The chemistry of phosgene. *Chem. Rev.* **1973**, *73*, 75-91.
- [185]. Charalambides, Y. C.; Moratti, S. C. Comparison of base-promoted and self-catalyzed conditions in the synthesis of isocyanates from amines using triphosgene. *Synth. Commun.* **2007**, *37*, 1037-1044.
- [186]. Fleischel, O. Etude de la réactivité d'allergènes respiratoires vis-à-vis d'acides aminés nucléophile, du glutathion et d'un peptide modèle, *Université de Strasbourg*, **2009**.
- [187]. Eckert, H.; Forster, B. Triphosgene, a crystalline phosgene substitute. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, *26*, 894-895.
- [188]. Cotarca, L.; Geller, T.; Répási, J. Bis(trichloromethyl)carbonate (BTC, Triphosgene): a safer alternative to phosgene? *Org. Process Res. Dev.* **2017**, *21*, 1439-1446.
- [189]. Quan, H.; Zhang, N.; Zhou, X.; Qian, H.; Sekiya, A. Syntheses of isocyanates via amines and carbonyl fluoride. *J. Fluor. Chem.* **2015**, *176*, 26-30.
- [190]. Staab, H. A. New methods of preparative organic chemistry IV. Syntheses using heterocyclic amides (azolides). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1962**, *1*, 351-367.
- [191]. Zhao, X.; Wang, Y.; Wang, S.; Yang, H.; Zhang, J. Synthesis of MDI from dimethyl carbonate over solid catalysts. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2002**, *41*, 5139-5144.
- [192]. Valli, V. L. K.; Alper, H. A simple, convenient, and efficient method for the synthesis of isocyanates from urethanes. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 257-258.
- [193]. Butler, D. C. D.; Alper, H. Synthesis of isocyanates from carbamate esters employing boron trichloride. *Chem. Commun.* **1998**, 2575-2576.
- [194]. Uriz, P.; Serra, M.; Salagre, P.; Castillon, S.; Claver, C.; Fernandez, E. A new and efficient catalytic method for synthesizing isocyanates from carbamates. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 1673-1676.
- [195]. He, Z.; Huang, Y. Diverting C-H annulation pathways: nickel-catalyzed dehydrogenative homologation of aromatic amides. *ACS Catal.* **2016**, *6*, 7814-7823.
- [196]. Theodorou, V.; Paraskevopoulos, G.; Skobridis, K. A mild alkaline hydrolysis of *N*- and *N,N*-substituted amides and nitriles. *Arkivoc* **2015**, *7*, 101-112.
- [197]. Ben Ammar, H.; Miao, X.; Fischmeister, C.; Toupet, L.; Dixneuf, P. H. Bidentate oxazoline-imine ruthenium(ii) complexes: intermediates in the methanolysis/hydration of nitrile groups. *Organometallics* **2010**, *29*, 4234-4238.
- [198]. Goto, A.; Endo, K.; Saito, S. Rh(I)-catalyzed hydration of organonitriles under ambient conditions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3607-3609.

- [199]. Marcé, P.; Lynch, J.; Blacker, A. J.; Williams, J. M. J. A mild hydration of nitriles catalysed by copper(II) acetate. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 1436-1438.
- [200]. Li, Y.; Chen, H.; Liu, J.; Wan, X.; Xu, Q. Clean synthesis of primary to tertiary carboxamides by CsOH-catalyzed aminolysis of nitriles in water. *Green Chem.* **2016**, *18*, 4865-4870.
- [201]. Khalafi-Nezhad, A.; Parhami, A.; Soltani Rad, M. N.; Zarea, A. Efficient method for the direct preparation of amides from carboxylic acids using tosyl chloride under solvent-free conditions. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 6879-6882.
- [202]. Srinivasan, S.; Manisankar, P. Formamide as an ammonia synthon in amination of acid chlorides. *Synth. Commun.* **2010**, *40*, 3538-3543.
- [203]. Owston, N. A.; Parker, A. J.; Williams, J. M. J. Highly efficient ruthenium-catalyzed oxime to amide rearrangement. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3599-3601.
- [204]. Gnanamgari, D.; Crabtree, R. H. Terpyridine ruthenium-catalyzed one-pot conversion of aldehydes into amides. *Organometallics* **2009**, *28*, 922-924.
- [205]. Owston, N. A.; Parker, A. J.; Williams, J. M. J. Iridium-catalyzed conversion of alcohols into amides via oximes. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 73-75.
- [206]. Kim, J. W.; Yamaguchi, K.; Mizuno, N. Heterogeneously catalyzed efficient oxygenation of primary amines to amides by a supported ruthenium hydroxide catalyst. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9249-9251.
- [207]. Midya, G. C.; Kapat, A.; Maiti, S.; Dash, J. Transition-metal-free hydration of nitriles using potassium *tert*-butoxide under anhydrous conditions. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 4148-4151.
- [208]. Zhan, W.; Ji, L.; Ge, Z.-m.; Wang, X.; Li, R.-t. A continuous-flow synthesis of primary amides from hydrolysis of nitriles using hydrogen peroxide as oxidant. *Tetrahedron* **2018**, *74*, 1527-1532.
- [209]. Moriarty, R. M.; Chany, C. J.; Vaid, R. K.; Prakash, O.; Tuladhar, S. M. Preparation of methyl carbamates from primary alkyl- and arylcarboxamides using hypervalent iodine. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 2478-2482.
- [210]. Jevtić, I. I.; Došen-Mićović, L.; Ivanović, E. R.; Ivanović, M. D. Hofmann rearrangement of carboxamides mediated by *N*-bromoacetamide. *Synthesis* **2016**, *48*, 1550-1560.
- [211]. Crane, Z. D.; Nichols, P. J.; Sammakia, T.; Stengel, P. J. Synthesis of methyl-1-(*tert*-butoxycarbonylamino)-2-vinylcyclopropanecarboxylate via a hofmann rearrangement utilizing trichloroisocyanuric acid as an oxidant. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 277-280.
- [212]. Huang, X.; Seid, M.; Keillor, J. W. A mild and efficient modified Hofmann rearrangement. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7495-7496.

- [213]. Borah, A. J.; Phukan, P. Efficient synthesis of methyl carbamate via Hofmann rearrangement in the presence of TsNBr₂. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 3035-3037.
- [214]. Moghaddam, F. M.; Tavakoli, G.; Saeednia, B.; Langer, P.; Jafari, B. Palladium-catalyzed carbamate-directed regioselective halogenation: a route to halogenated anilines. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 3868-3876.
- [215]. Senanayake, C. H.; Fredenburgh, L. E.; Reamer, R. A.; Larsen, R. D.; Verhoeven, T. R.; Reider, P. J. Nature of *N*-bromosuccinimide in basic media: the true oxidizing species in the Hofmann rearrangement. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7947-7948.
- [216]. Peddle, C. J.; Turner, W. E. S. CXXV.—Solubilities of salts of ammonium bases in water and in chloroform. Part I. Solubility as α constitutive property. *J. Chem. Soc., Trans.* **1913**, *103*, 1202-1209.
- [217]. Shkapenko, G.; Gmitter, G. T.; Gruber, E. E. Mechanism of the water-isocyanate reaction. *Ind. Eng. Chem.* **1960**, *52*, 605-608.
- [218]. Chen, Z.; Yang, W.; Yin, H.; Yuan, S. Kinetics of water-isocyanate reaction in *N,N*-dimethylformamide. *Chin. J. Chem. Eng.* **2017**, *25*, 1435-1441.
- [219]. Delebecq, E.; Pascault, J.-P.; Boutevin, B.; Ganachaud, F. On the versatility of urethane/urea bonds: reversibility, blocked isocyanate, and non-isocyanate polyurethane. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 80-118.
- [220]. Karol, M. H.; Kramarik, J. A. Phenyl isocyanate is a potent chemical sensitizer. *Toxicol. Lett.* **1996**, *89*, 139-146.
- [221]. Karol, M. H.; Dixon, C.; Brady, M.; Alarie, Y. Immunologic sensitization and pulmonary hypersensitivity by repeated inhalation of aromatic isocyanates. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1980**, *53*, 260-270.
- [222]. Pauluhn, J.; Rüngeler, W.; Mohr, U. Phenyl isocyanate-induced asthma in rats following a 2-week exposure period. *Fund. Appl. Toxicol.* **1995**, *24*, 217-228.
- [223]. Arrigo, A.-P. Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic. Bio. Med.* **1999**, *27*, 936-944.
- [224]. Dickinson, D. A.; Forman, H. J. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *64*, 1019-1026.
- [225]. Ketterer, B.; Coles, B.; Meyer, D. J. The role of glutathione in detoxication. *Environ. Health Perspect.* **1983**, *49*, 59-69.
- [226]. Eicher, T.; Weber, J. L. Structure and reactivity of cyclopropenones and triafulvenes. *Top. Curr. Chem.* **1975**, *57*, 1-109.

- [227]. Parkinson, E.; Aleksic, M.; Arthur, R.; Regufe Da Mota, S.; Cubberley, R.; Skipp, P. J. Proteomic analysis of haptentation by skin sensitizers: diphencyprone and ethyl acrylate. *Toxicol. in Vitro* **2020**, *62*, Article ID 104697, 9 pages.
- [228]. Majorek, K. A.; Porebski, P. J.; Dayal, A.; Zimmerman, M. D.; Jablonska, K.; Stewart, A. J.; Chruszcz, M.; Minor, W. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Mol. Immunol.* **2012**, *52*, 174-182.
- [229]. Jahanban-Esfahlan, A.; Ostadrahimi, A.; Jahanban-Esfahlan, R.; Roufegarinejad, L.; Tabibiazar, M.; Amarowicz, R. Recent developments in the detection of bovine serum albumin. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *138*, 602-617.
- [230]. Bujacz, A. Structures of bovine, equine and leporine serum albumin. *Acta. Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2012**, *68*, 1278-1289.
- [231]. Alvarez-Sánchez, R.; Divkovic, M.; Basketter, D.; Pease, C.; Panico, M.; Dell, A.; Morris, H.; Lepoittevin, J.-P. Effect of glutathione on the covalent binding of the ¹³C-labeled skin sensitizer 5-chloro-2-methylisothiazol-3-one to human serum albumin: identification of adducts by nuclear magnetic resonance, matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, and nano-electrospray tandem mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, *17*, 1280-1288.
- [232]. Lepoittevin, J.-P.; Benezra, C. ¹³C-enriched methyl alkanesulfonates: new lipophilic methylating agents for the identification of nucleophilic amino acids of proteins by NMR. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3875-3878.
- [233]. Debeuckelaere, C. Synthèses des allergènes substitués au carbone 13 et études par RMN HRMAS de leurs interactions avec des épidermes reconstruits, *Université de Strasbourg*, **2012**.
- [234]. Pruniéras, M.; Régnier, M.; Woodley, D. Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *J. Invest. Dermatol.* **1983**, *81*, 28s-33s.
- [235]. Ponc, M.; Boelsma, E.; Gibbs, S.; Mommaas, M. Characterization of reconstructed skin models. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* **2002**, *15 Suppl 1*, 4-17.
- [236]. Tinois, E.; Tiollier, J.; Gaucherand, M.; Dumas, H.; Tardy, M.; Thivolet, J. *In vitro* and post-transplantation differentiation of human keratinocytes grown on the human type IV collagen film of a bilayered dermal substitute. *Exp. Cell Res.* **1991**, *193*, 310-319.
- [237]. Alépée, N.; Grandidier, M. H.; Cotovio, J. 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]. Dreher, F.; Fouchard, F.; Patouillet, C.; Andrian, M.; Simonnet, J. T.; Benech-Kieffer, F. Comparison of cutaneous bioavailability of cosmetic preparations containing caffeine or alpha-tocopherol applied on human skin models or human skin *ex vivo* at finite doses. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* **2002**, *15 Suppl 1*, 40-58.
- [240]. Alépée, N.; Tornier, C.; Robert, C.; Amsellem, C.; Roux, M.-H.; Doucet, O.; Pachot, J.; Méloni, M.; de Brugerolle de Fraissinette, A. A catch-up validation study on reconstructed human epidermis (SkinEthic™ RHE) for full replacement of the Draize skin irritation test. *Toxicol. in Vitro* **2010**, *24*, 257-266.
- [241]. Groeber, F.; Schober, L.; Schmid, F. F.; Traube, A.; Kolbus-Hernandez, S.; Daton, K.; Hoffmann, S.; Petersohn, D.; Schäfer-Korting, M.; Walles, H.; Mewes, K. R. Catch-up validation study of an *in vitro* skin irritation test method based on an open source reconstructed epidermis (phase II). *Toxicol. in Vitro* **2016**, *36*, 254-261.
- [242]. Newton, R. P.; Brenton, A. G.; Smith, C. J.; Dudley, E. Plant proteome analysis by mass spectrometry: principles, problems, pitfalls and recent developments. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 1449-1485.
- [243]. 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.
- [244]. Lowe, I. J. Free induction decays of rotating solids. *Phys. Rev. Lett.* **1959**, *2*, 285-287.
- [245]. Anderson, R. C.; Jarema, M. A.; Shapiro, M. J.; Stokes, J. P.; Ziliox, M. Analytical techniques in combinatorial chemistry: MAS CH correlation in solvent-swollen resin. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2650-2651.
- [246]. Furrer, J.; Elbayed, K.; Bourdonneau, M.; Raya, J.; Limal, D.; Bianco, A.; Piotto, M. Dynamic and magnetic susceptibility effects on the MAS NMR linewidth of a tetrapeptide bound to different resins. *Magn. Reson. Chem.* **2002**, *40*, 123-132.
- [247]. Elbayed, K.; Bourdonneau, M.; Furrer, J.; Richert, T.; Raya, J.; Hirschinger, J.; Piotto, M. Origin of the residual NMR linewidth of a peptide bound to a resin under magic angle spinning. *J. Magn. Reson.* **1999**, *136*, 127-129.
- [248]. Raya, J.; Bianco, A.; Furrer, J.; Briand, J.-P.; Piotto, M.; Elbayed, K. Proton dipolar recoupling in resin-bound peptides under high-resolution magic angle spinning. *J. Magn. Reson.* **2002**, *157*, 43-51.
- [249]. Power, W. P. High-resolution magic angle spinning-enabling applications of NMR spectroscopy to semi-solid phases. *In Annual reports on NMR spectroscopy* Webb, G. A. Eds. Elsevier Ltd., **2011**, 111-156.
- [250]. Espinosa, J. F. High resolution magic angle spinning NMR applied to the analysis of organic compounds bound to solid supports. *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11*, 74-92.

- [251]. Ramadhar, T. R.; Amador, F.; Ditty, M. J.; Power, W. P. Inverse H-C *ex situ* HRMAS NMR experiments for solid-phase peptide synthesis. *Magn. Reson. Chem.* **2008**, *46*, 30-35.
- [252]. Stöver, H. D. H.; Fréchet, J. M. J. Direct polarization carbon-13 and proton magic angle spinning NMR in the characterization of solvent-swollen gels. *Macromolecules* **1989**, *22*, 1574-1576.
- [253]. 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.
- [254]. Furrer, J.; Piotta, M.; Bourdonneau, M.; Limal, D.; Guichard, G.; Elbayed, K.; Raya, J.; Briand, J.-P.; Bianco, A. Evidence of secondary structure by high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy of a bioactive peptide bound to different solid supports. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4130-4138.
- [255]. Carvalho, L. R.; Corvo, M. C.; Enugala, R.; Marques, M. M. B.; Cabrita, E. J. Application of HR-MAS NMR in the solid-phase synthesis of a glycopeptide using Sieber amide resin. *Magn. Reson. Chem.* **2010**, *48*, 323-330.
- [256]. Valentini, M.; Ritota, M.; Cafiero, C.; Cozzolino, S.; Leita, L.; Sequi, P. The HRMAS-NMR tool in foodstuff characterisation. *Magn. Reson. Chem.* **2011**, *49*, S121-S125.
- [257]. 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.
- [258]. Brescia, M. A.; Jambrenghi, A. C.; di Martino, V.; Daniela Sacco, F. G.; Vonghia, G.; Sacco, A. High resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) studies on meat components: potentialities and prospects. *Ital. J. Anim. Sci.* **2002**, *1*, 151-158.
- [259]. Ritota, M.; Marini, F.; Sequi, P.; Valentini, M. Metabolomic characterization of Italian sweet pepper (*Capsicum annum* L.) by means of HRMAS-NMR spectroscopy and multivariate analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 9675-9684.
- [260]. Sánchez Pérez, E. M.; Iglesias, M. J.; López Ortiz, F.; Sánchez Pérez, I.; Martínez Galera, M. Study of the suitability of HRMAS NMR for metabolic profiling of tomatoes: application to tissue differentiation and fruit ripening. *Food Chem.* **2010**, *122*, 877-887.
- [261]. Beckonert, O.; Coen, M.; Keun, H. C.; Wang, Y.; Ebbels, T. M.; 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.
- [262]. Canese, R.; Iorio, E.; Ricci, A.; Pisanu, M. E.; Giannini, M.; Podo, F. Metabolite quantification in tumours by magnetic resonance spectroscopy: objectives, results and perspectives. *Curr. Med. Imaging* **2009**, *5*, 110-127.
- [263]. Moestue, S.; Sitter, B.; Bathen, T. F.; Tessem, M. B.; Gribbestad, I. S. HR MAS MR spectroscopy in metabolic characterization of cancer. *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11*, 2-26.

- [264]. Greco, M. 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, *Université de Strasbourg*, **2018**.
- [265]. Helaskoski, E.; Kuuliala, O.; Aalto-Korte, K. Occupational contact urticaria caused by cyclic acid anhydrides. *Contact Dermatitis* **2009**, *60*, 214-221.
- [266]. Wasylyszyn, T.; Borowska, K. Possible advantage of imiquimod and diphenylcyclopropenone combined treatment versus diphenylcyclopropenone alone: an observational study of nonresponder patients with *alopecia areata*. *Aust. J. Dermatol.* **2017**, *58*, 219-223.
- [267]. Durdu, M.; Özcan, D.; Baba, M.; Seçkin, D. Efficacy and safety of diphenylcyclopropenone alone or in combination with anthralin in the treatment of chronic extensive *alopecia areata*: a retrospective case series. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2015**, *72*, 640-650.
- [268]. Avgerinou, G.; Gregoriou, S.; Rigopoulos, D.; Stratigos, A.; Kalogeromitros, D.; Katsambas, A. *Alopecia areata*: topical immunotherapy treatment with diphenylcyclopropenone. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2008**, *22*, 320-323.
- [269]. Sotiriadis, D.; Patsatsi, A.; Lazaridou, E.; Kastanis, A.; Vakirlis, E.; Chrysomallis, F. Topical immunotherapy with diphenylcyclopropenone in the treatment of chronic extensive *alopecia areata*. *Clin. Exp. Dermatol.* **2007**, *32*, 48-51.
- [270]. 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.
- [271]. Williams, A. C.; Barry, B. W. Penetration enhancers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 128-137.
- [272]. 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*, 119-29.
- [273]. Trommer, H.; Neubert, R. H. H. Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. A review. *Skin Pharmacol. Physiol.* **2006**, *19*, 106-121.
- [274]. Anzai, T.; Ullmann, L. G.; Hayashi, D.; Satoh, T.; Kumazawa, T.; Sato, K. Effects of strain differences and vehicles on results of local lymph node assays. *Exp. Anim.* **2010**, *59*, 245-249.
- [275]. Basketter, D. A.; Kimber, I. Olive oil: suitability for use as a vehicle in the local lymph node assay. *Contact Dermatitis* **1996**, *35*, 190-191.
- [276]. Parkinson, E.; Skipp, P.; Aleksic, M.; Garrow, A.; Dadd, T.; Hughes, M.; Clough, G.; O'Connor, C. D. Proteomic analysis of the human skin proteome after *in vivo* treatment with sodium dodecyl sulphate. *PLOS ONE* **2014**, *9*, Article ID e97772, 10 pages.

- [277]. Arbuzov, B. A.; Zobova, N. N.; Sofronova, O. V. Reaction of acyl isocyanates with dimethyl sulfoxide. *Russ. Chem. Bull.* **1975**, *24*, 1113-1114.
- [278]. Herbold, B.; Haas, P.; Seel, K.; Walber, U. Studies on the effect of the solvents dimethylsulfoxide and ethyleneglycoldimethylether on the mutagenicity of four types of diisocyanates in the Salmonella/microsome test. *Mutat. Res.* **1998**, *412*, 167-175.
- [279]. Pauluhn, J. Brown Norway rat asthma model of diphenylmethane-4,4'-diisocyanate (MDI): impact of vehicle for topical induction. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2008**, *50*, 144-154.
- [280]. Fleischel, O.; Giménez-Arnau, E.; Lepoittevin, J.-P. Nuclear magnetic resonance studies on covalent modification of amino acids thiol and amino residues by monofunctional aryl ¹³C-isocyanates, models of skin and respiratory sensitizers: transformation of thiocarbamates into urea adducts. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 1106-1115.
- [281]. Stark, G. R. On the reversible reaction of cyanate with sulfhydryl groups and the determination of NH₂-terminal cysteine and cystine in proteins. *J. Biol. Chem.* **1964**, *239*, 1411-1414.
- [282]. Dapic, I.; Baljeu-Neuman, L.; Uwugiaren, N.; Kers, J.; Goodlett, D. R.; Corthals, G. L. Proteome analysis of tissues by mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **2019**, *38*, 403-441.
- [283]. Lim, W. K.; Rösger, J.; Englander, S. W. Urea, but not guanidinium, destabilizes proteins by forming hydrogen bonds to the peptide group. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 2595-2600.
- [284]. Stark, G.; Stein, W.; Moore, S. Reactions of the cyanate present in aqueous urea with amino acids and proteins. *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 3177-3181.
- [285]. Dapic, I.; Uwugiaren, N.; Jansen, P. J.; Corthals, G. L. Fast and simple protocols for mass spectrometry-based proteomics of small fresh frozen uterine tissue sections. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 10769-10775.
- [286]. Craven, R. A.; Cairns, D. A.; Zougman, A.; Harnden, P.; Selby, P. J.; Banks, R. E. Proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded renal tissue samples by label-free MS: assessment of overall technical variability and the impact of block age. *Proteomics Clin. Appl.* **2013**, *7*, 273-282.
- [287]. Gräntzdörffer, I.; Yumlu, S.; Gioeva, Z.; von Wasielewski, R.; Ebert, M. P.; Röcken, C. Comparison of different tissue sampling methods for protein extraction from formalin-fixed and paraffin-embedded tissue specimens. *Exp. Mol. Pathol.* **2010**, *88*, 190-196.
- [288]. Palmer-Toy, D. E.; Krastins, B.; Sarracino, D. A.; Nadol, J. B., Jr.; Merchant, S. N. Efficient method for the proteomic analysis of fixed and embedded tissues. *J. Proteome Res.* **2005**, *4*, 2404-2411.
- [289]. Bereman, M. S.; Egertson, J. D.; MacCoss, M. J. Comparison between procedures using SDS for shotgun proteomic analyses of complex samples. *Proteomics* **2011**, *11*, 2931-2935.

- [290]. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.
- [291]. Compton, S. J.; Jones, C. G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal. Biochem.* **1985**, *151*, 369-374.
- [292]. Anderson, N. L.; Anderson, N. G. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* **1998**, *19*, 1853-1861.
- [293]. Aslam, B.; Basit, M.; Nisar, M. A.; Khurshid, M.; Rasool, M. H. Proteomics: technologies and their applications. *J. Chromatogr. Sci.* **2017**, *55*, 182-196.
- [294]. Gstaiger, M.; Aebersold, R. Applying mass spectrometry-based proteomics to genetics, genomics and network biology. *Nat. Rev. Genet.* **2009**, *10*, 617-627.
- [295]. Issaq, H. J.; Veenstra, T. D. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives. *Biotechniques* **2008**, *44*, 697-700.
- [296]. Gygi, S. P.; Corthals, G. L.; Zhang, Y.; Rochon, Y.; Aebersold, R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 9390-9395.
- [297]. Fountoulakis, M.; Takács, M.-F.; Berndt, P.; Langen, H.; Takács, B. Enrichment of low abundance proteins of *Escherichia coli* by hydroxyapatite chromatography. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 2181-2195.
- [298]. Santoni, V.; Molloy, M.; Rabilloud, T. Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis* **2000**, *21*, 1054-1070.
- [299]. Opiteck, G. J.; Ramirez, S. M.; Jorgenson, J. W.; Moseley, M. A., 3rd Comprehensive two-dimensional high-performance liquid chromatography for the isolation of overexpressed proteins and proteome mapping. *Anal. Biochem.* **1998**, *258*, 349-361.
- [300]. Dai, Y.; Li, L.; Roser, D.; Long, S. Detection and identification of low-mass peptides and proteins from solvent suspensions of *Escherichia coli* by high performance liquid chromatography fractionation and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1999**, *13* 1, 73-78.
- [301]. Stevenson, T. I.; Loo, J. A.; Greis, K. D. Coupling capillary high-performance liquid chromatography to matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and n-terminal sequencing of peptides via automated microblotting onto membrane substrates. *Anal. Biochem.* **1998**, *262*, 99-109.
- [302]. Mirgorodskaya, E.; Braeuer, C.; Fucini, P.; Lehrach, H.; Gobom, J. Nanoflow liquid chromatography coupled to matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: sample preparation, data analysis, and application to the analysis of complex peptide mixtures. *Proteomics* **2005**, *5*, 399-408.

- [303]. McComb, M. E.; Perlman, D. H.; Huang, H.; Costello, C. E. Evaluation of an on-target sample preparation system for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in conjunction with normal-flow peptide high-performance liquid chromatography for peptide mass fingerprint analyses. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 44-58.
- [304]. Chong, B. E.; Lubman, D. M.; Miller, F. R.; Rosenspire, A. J. Rapid screening of protein profiles of human breast cancer cell lines using non-porous reversed-phase high performance liquid chromatography separation with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectral analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1999**, *13*, 1808-1812.
- [305]. Neuhoff, V.; Arold, N.; Taube, D.; Ehrhardt, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **1988**, *9*, 255-262.
- [306]. Chevallet, M.; Lescuyer, P.; Diemer, H.; van Dorsselaer, A.; Leize-Wagner, E.; Rabilloud, T. Alterations of the mitochondrial proteome caused by the absence of mitochondrial DNA: a proteomic view. *Electrophoresis* **2006**, *27*, 1574-1583.
- [307]. Chevalier, F.; Centeno, D.; Rofidal, V.; Tauzin, M.; Martin, O.; Sommerer, N.; Rossignol, M. Different impact of staining procedures using visible stains and fluorescent dyes for large-scale investigation of proteomes by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 512-520.
- [308]. Cordwell, S. J.; Wilkins, M. R.; Cerpa-Poljak, A.; Gooley, A. A.; Duncan, M.; Williams, K. L.; Humphery-Smith, I. Cross-species identification of proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis using matrix-assisted laser desorption ionisation/time-of-flight mass spectrometry and amino acid composition. *Electrophoresis* **1995**, *16*, 438-443.
- [309]. Kebarle, P.; Tang, L. From ions in solution to ions in the gas phase-the mechanism of electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 972A-986A.
- [310]. Bollard, M. E.; Garrod, S.; Holmes, E.; Lindon, J. C.; Humpfer, E.; Spraul, M.; Nicholson, J. K. High-resolution ^1H and ^1H - ^{13}C magic angle spinning NMR spectroscopy of rat liver. *Magn. Reson. Med.* **2000**, *44*, 201-207.
- [311]. Mora, J. F.; Van Berkel, G. J.; Enke, C. G.; Cole, R. B.; Martinez-Sanchez, M.; Fenn, J. B. Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2000**, *35*, 939-952.
- [312]. Gaskell, S. J. Electrospray: principles and practice. *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32*, 677-688.
- [313]. Wilm, M. S.; Mann, M. Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last? *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1994**, *136*, 167-180.
- [314]. Alves, S.; Rathahao-Paris, E.; Tabet, J. C. Potential of Fourier transform mass spectrometry for high-throughput metabolomics analysis. *Adv. Bot. Res.* **2013**, *67*, 219-302.

- [315]. Zubarev, R. A.; Håkansson, P.; Sundqvist, B. Accuracy requirements for peptide characterization by monoisotopic molecular mass measurements. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 4060-4063.
- [316]. Makarov, A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1156-1162.
- [317]. Michalski, A.; Damoc, E.; Hauschild, J. P.; Lange, O.; Wieghaus, A.; Makarov, A.; Nagaraj, N.; Cox, J.; Mann, M.; Horning, S. Mass spectrometry-based proteomics using Q Exactive, a high-performance benchtop quadrupole Orbitrap mass spectrometer. *Mol. Cell Proteomics* **2011**, *10*, Article ID M111.011015, 12 pages.
- [318]. Roepstorff, P.; Fohlman, J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* **1984**, *11*, 601.
- [319]. Biemann, K. Appendix 5. Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions). *Methods Enzymol.* **1990**, *193*, 886-887.
- [320]. Frank, A.; Pevzner, P. PepNovo: *de novo* peptide sequencing via probabilistic network modeling. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 964-973.
- [321]. Ma, B.; Zhang, K.; Hendrie, C.; Liang, C.; Li, M.; Doherty-Kirby, A.; Lajoie, G. PEAKS: powerful software for peptide *de novo* sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17*, 2337-2342.
- [322]. Perkins, D. N.; Pappin, D. J.; Creasy, D. M.; Cottrell, J. S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 3551-3567.
- [323]. Eng, J. K.; McCormack, A. L.; Yates, J. R. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1994**, *5*, 976-989.
- [324]. Craig, R.; Beavis, R. C. TANDEM: matching proteins with tandem mass spectra. *Bioinformatics* **2004**, *20*, 1466-1467.
- [325]. Clauser, K. R.; Baker, P.; Burlingame, A. L. Role of accurate mass measurement (± 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2871-2882.
- [326]. Geer, L. Y.; Markey, S. P.; Kowalak, J. A.; Wagner, L.; Xu, M.; Maynard, D. M.; Yang, X.; Shi, W.; Bryant, S. H. Open mass spectrometry search algorithm. *J. Proteome Res.* **2004**, *3*, 958-964.
- [327]. Tanner, S.; Shu, H.; Frank, A.; Wang, L.-C.; Zandi, E.; Mumby, M.; Pevzner, P. A.; Bafna, V. InsPecT: identification of posttranslationally modified peptides from tandem mass spectra. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4626-4639.

- [328]. Dasari, S.; Chambers, M. C.; Slebos, R. J.; Zimmerman, L. J.; Ham, A.-J. L.; Tabb, D. L. TagRecon: high-throughput mutation identification through sequence tagging. *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 1716-1726.
- [329]. Elias, J. E.; Gygi, S. P. Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nat. Methods* **2007**, *4*, 207-214.
- [330]. Shinoda, K.; Tomita, M.; Ishihama, Y. emPAI Calc-for the estimation of protein abundance from large-scale identification data by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 576-577.
- [331]. Liu, H.; Sadygov, R. G.; Yates, J. R., 3rd A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4193-4201.
- [332]. Rappsilber, J.; Ryder, U.; Lamond, A. I.; Mann, M. Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Res.* **2002**, *12*, 1231-1245.
- [333]. Ishihama, Y.; Oda, Y.; Tabata, T.; Sato, T.; Nagasu, T.; Rappsilber, J.; Mann, M. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol. Cell Proteomics* **2005**, *4*, 1265-1272.
- [334]. Bouyssié, D.; Hesse, A. M.; Mouton-Barbosa, E.; Rompais, M.; Macron, C.; Carapito, C.; Gonzalez de Peredo, A.; Couté, Y.; Dupierris, V.; Burel, A.; Menetrey, J. P.; Kalaitzakis, A.; Poisat, J.; Romdhani, A.; Burlet-Schiltz, O.; Cianférani, S.; Garin, J.; Bruley, C. Proline: an efficient and user-friendly software suite for large-scale proteomics. *Bioinformatics* **2020**, *36*, 3148-3155.
- [335]. Aebersold, R.; Mann, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **2003**, *422*, 198-207.
- [336]. Chait, B. T. Mass spectrometry: Bottom-Up or Top-Down? *Science* **2006**, *314*, 65-66.
- [337]. Wolters, D. A.; Washburn, M. P.; Yates, J. R., 3rd An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5683-5690.
- [338]. Parkinson, E.; Boyd, P.; Aleksic, M.; Cubberley, R.; O'Connor, D.; Skipp, P. Stable isotope labeling method for the investigation of protein haptentation by electrophilic skin sensitizers. *Toxicol. Sci.* **2014**, *142*, 239-249.
- [339]. Mhike, M.; Chipinda, I.; Hettick, J. M.; Simoyi, R. H.; Lemons, A.; Green, B. J.; Siegel, P. D. Characterization of methylene diphenyl diisocyanate-haptentated human serum albumin and hemoglobin. *Anal. Biochem.* **2013**, *440*, 197-204.
- [340]. Mhike, M.; Hettick, J. M.; Chipinda, I.; Law, B. F.; Bledsoe, T. A.; Lemons, A. R.; Nayak, A. P.; Green, B. J.; Beezhold, D. H.; Simoyi, R. H.; Siegel, P. D. Characterization and comparative analysis of 2,4-toluene diisocyanate and 1,6-hexamethylene diisocyanate haptentated human serum albumin and hemoglobin. *J. Immunol. Methods* **2016**, *431*, 38-44.

- [341]. Pickard, C.; Louafi, F.; McGuire, C.; Lowings, K.; Kumar, P.; Cooper, H.; Dearman, R. J.; Cumberbatch, M.; Kimber, I.; Healy, E.; Friedmann, P. S. The cutaneous biochemical redox barrier: a component of the innate immune defenses against sensitization by highly reactive environmental xenobiotics. *J. Immunol.* **2009**, *183*, 7576-7584.
- [342]. Migdal, C.; Botton, J.; El Ali, Z.; Azoury, M. E.; Guldemann, J.; Giménez-Arnau, E.; Lepoittevin, J. P.; Kerdine-Römer, S.; Pallardy, M. Reactivity of chemical sensitizers toward amino acids in cellulose plays a role in the activation of the Nrf2-ARE pathway in human monocyte dendritic cells and the THP-1 cell line. *Toxicol. Sci.* **2013**, *133*, 259-274.
- [343]. Tan, S. P.; Brown, S. B.; Griffiths, C. E.; Weller, R. B.; Gibbs, N. K. Feeding filaggrin: effects of L-histidine supplementation in atopic dermatitis. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* **2017**, *10*, 403-411.
- [344]. Kezic, S.; Jakasa, I. Filaggrin and skin barrier function. *Curr. Probl. Dermatol.* **2016**, *49*, 1-7.
- [345]. Schmidt, M.; Raghavan, B.; Müller, V.; Vogl, T.; Fejer, G.; Tchaptchet, S.; Keck, S.; Kalis, C.; Nielsen, P. J.; Galanos, C.; Roth, J.; Skerra, A.; Martin, S. F.; Freudenberg, M. A.; Goebeler, M. Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nat. Immunol.* **2010**, *11*, 814-819.
- [346]. McAleer, M. A.; Irvine, A. D. The multifunctional role of filaggrin in allergic skin disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2013**, *131*, 280-291.
- [347]. Thyssen, J. P.; Kezic, S. Causes of epidermal filaggrin reduction and their role in the pathogenesis of atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2014**, *134*, 792-799.
- [348]. Kidd, C. D.; Thompson, P. J.; Barrett, L. Histone modifications and asthma. The interface of the epigenetic and genetic landscapes. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2016**, *54*, 3-12.
- [349]. Alaskhar Alhamwe, B.; Khalaila, R.; Wolf, J.; von Bülow, V.; Harb, H.; Alhamdan, F.; Hii, C. S.; Prescott, S. L.; Ferrante, A.; Renz, H.; Garn, H.; Potaczek, D. P. Histone modifications and their role in epigenetics of atopy and allergic diseases. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* **2018**, *14*, 14-39.
- [350]. Latham, J. A.; Dent, S. Y. R. Cross-regulation of histone modifications. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 1017-1024.
- [351]. Howell, M. D.; Fairchild, H. R.; Kim, B. E.; Bin, L.; Boguniewicz, M.; Redzic, J. S.; Hansen, K. C.; Leung, D. Y. Th2 cytokines act on S100/A11 to downregulate keratinocyte differentiation. *J. Invest. Dermatol.* **2008**, *128*, 2248-2258.
- [352]. Gittler, J. K.; Shemer, A.; Suárez-Fariñas, M.; Fuentes-Duculan, J.; Gulewicz, K. J.; Wang, C. Q. F.; Mitsui, H.; Cardinale, I.; de Guzman Strong, C.; Krueger, J. G.; Guttman-Yassky, E. Progressive activation of T(H)2/T(H)22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2012**, *130*, 1344-1354.

- [353]. Ray, R.; Choi, M.; Zhang, Z.; Silverman, G. A.; Askew, D.; Mukherjee, A. B. Uteroglobin suppresses SCCA gene expression associated with allergic asthma. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 9761-9764.
- [354]. Mitsuishi, K.; Nakamura, T.; Sakata, Y.; Yuyama, N.; Arima, K.; Sugita, Y.; Suto, H.; Izuhara, K.; Ogawa, H. The squamous cell carcinoma antigens as relevant biomarkers of atopic dermatitis. *Clin. Exp. Allergy* **2005**, *35*, 1327-1333.
- [355]. Mo, Y.; Zhang, K.; Feng, Y.; Yi, L.; Liang, Y.; Wu, W.; Zhao, J.; Zhang, Z.; Xu, Y.; Hu, Q.; He, J.; Zhen, G. Epithelial SERPINB10, a novel marker of airway eosinophilia in asthma, contributes to allergic airway inflammation. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol.* **2018**, *316*, L245-L254.
- [356]. Yu, J.; Kang, M. J.; Kim, B. J.; Kwon, J. W.; Song, Y. H.; Choi, W. A.; Shin, Y. J.; Hong, S. J. Polymorphisms in GSDMA and GSDMB are associated with asthma susceptibility, atopy and BHR. *Pediatr. Pulmonol.* **2011**, *46*, 701-708.
- [357]. Wood, Z. A.; Poole, L. B.; Karplus, P. A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* **2003**, *300*, 650-653.
- [358]. Inoue, K.; Takano, H.; Koike, E.; Warabi, E.; Yanagawa, T.; Yanagisawa, R.; Ishii, T. Peroxiredoxin I is a negative regulator of Th2-dominant allergic asthma. *Int. Immunopharmacol.* **2009**, *9*, 1281-1288.
- [359]. Yousef, G. M.; Chang, A.; Scorilas, A.; Diamandis, E. P. Genomic organization of the human kallikrein gene family on chromosome 19q13.3–q13.4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *276*, 125-133.
- [360]. Komatsu, N.; Tsai, B.; Sidiropoulos, M.; Saijoh, K.; Levesque, M. A.; Takehara, K.; Diamandis, E. P. Quantification of eight tissue kallikreins in the stratum corneum and sweat. *J. Invest. Dermatol.* **2006**, *126*, 925-929.
- [361]. Ishida-Yamamoto, A.; Deraison, C.; Bonnart, C.; Bitoun, E.; Robinson, R.; O'Brien, T. J.; Wakamatsu, K.; Ohtsubo, S.; Takahashi, H.; Hashimoto, Y.; Dopping-Hepenstal, P. J. C.; McGrath, J. A.; Iizuka, H.; Richard, G.; Hovnanian, A. LEKTI is localized in lamellar granules, separated from KLK5 and KLK7, and is secreted in the extracellular spaces of the superficial stratum granulosum. *J. Invest. Dermatol.* **2005**, *124*, 360-366.
- [362]. Shaw, J. L.; Diamandis, E. P. Distribution of 15 human kallikreins in tissues and biological fluids. *Clin. Chem.* **2007**, *53*, 1423-1432.
- [363]. Ekholm, I. E.; Brattsand, M.; Egelrud, T. Stratum corneum tryptic enzyme in normal epidermis: a missing link in the desquamation process? *J. Invest. Dermatol.* **2000**, *114*, 56-63.
- [364]. Di Paolo, C. T.; Diamandis, E. P.; Prassas, I. The role of kallikreins in inflammatory skin disorders and their potential as therapeutic targets. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2020**, 1-16.

Minh Thuong KHONG
Chimie des systèmes protéiques complexes :
Etude des interactions entre des allergènes
cutanés et respiratoires et des épidermes
humains reconstitués par une nouvelle
approche associant RMN HRMAS et
spectrométrie de masse

Résumé

L'allergie est une pathologie qui touche de nombreuses personnes dans le monde et devient un problème majeur de santé publique. La chimie joue un rôle prédominant dans l'étude des phénomènes qui conduisent à l'allergie de contact et l'allergie respiratoire. En effet, les allergènes cutanés et respiratoires de faible poids moléculaire (haptènes), incapables d'activer directement le système immunitaire, doivent se lier de manière covalente à des protéines endogènes pour former des structures immunogènes qui activent et différencient les lymphocytes T naïfs en Th1 ou Th2, respectivement.

Ce travail propose d'utiliser la RMN HRMAS et l'analyse protéomique par spectrométrie de masse pour étudier l'interaction des allergènes cutanés et respiratoires vis-à-vis des épidermes humains reconstitués dans le but de comprendre la façon dont les allergènes interagissent avec les protéines épidermiques dans un environnement vivant complexe, et comment cela pourrait orienter différemment la réponse du système immunitaire.

Mots clés : allergie de contact, allergie respiratoire, épiderme humain reconstitué, RMN HRMAS, spectrométrie de masse, analyse protéomique

Résumé en anglais

Allergy is a pathology that affects many people around the world and is becoming a major public health problem. The role of the chemistry is predominant in skin/respiratory allergies. Indeed, skin and respiratory chemical allergens have in common to be low molecular weight molecules not able to directly activate the immune system. Both need to bind covalently to endogenous proteins to form immunogenic structures and activate and differentiate a subset of T-cells into Th1 or Th2, respectively.

This work proposes to use HRMAS NMR and MS proteomic analysis to study the interaction of skin and respiratory allergens with reconstructed human epidermis in order to understand how allergens interact with epidermal proteins in a complex living environment, and how this might differently direct the response of immune system.

Keywords : contact allergy, respiratory allergy, reconstructed human epidermis, HRMAS NMR, mass spectrometry, proteomic analysis