



HAL
open science

Systemes antioxydants versus prooxydants lors d'évènements dermatologiques : nouvelle approche par RPE pour étudier les espèces radicalaires induites par des xénobiotiques de la peau

Yannick Port-Lougarre

► **To cite this version:**

Yannick Port-Lougarre. Systemes antioxydants versus prooxydants lors d'évènements dermatologiques : nouvelle approche par RPE pour étudier les espèces radicalaires induites par des xénobiotiques de la peau. Autre. Université de Strasbourg, 2023. Français. NNT : 2023STRAF008 . tel-04204409

HAL Id: tel-04204409

<https://theses.hal.science/tel-04204409>

Submitted on 12 Sep 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 (222)

UMR 7177 – Institut de chimie

THÈSE présentée par :
Yannick PORT-LOUGARRE

soutenue le : **01 mars 2023**

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

Discipline/ Spécialité : **Chimie**

**Systèmes antioxydants *versus* prooxydants
lors d'évènements dermatologiques**

**Nouvelle approche par RPE pour étudier les espèces
radicalaires induites par des xénobiotiques dans la peau**

THÈSE dirigée par :

Mme GIMÉNEZ-ARNAU Elena

Directeur de Recherche CNRS, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme PEYROT Fabienne

M. DU MOULINET D'HARDEMARE Amaury

Maitre de Conférences, Université Paris Cité

Maitre de Conférences, Université Grenoble Alpes

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme GROSDÉMANGE-BILLIARD Catherine

Mme Kerdine-Römer Saadia

Professeur des Universités, Université de Strasbourg

Professeur des Universités, Université Paris-Saclay

MEMBRE INVITÉ :

M. LEPOITTEVIN Jean-Pierre

Professeur des Universités, Université de Strasbourg

CO-ENCADRANT :

M. VILENO Bertrand

Chargé de Recherche CNRS, Université de Strasbourg

Remerciements

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit a été réalisé au sein du laboratoire de Dermatochimie (UMR 7177, Institut de Chimie de Strasbourg). Ce laboratoire est dirigé par le Professeur Jean-Pierre Lepoittevin. Cette thèse a été réalisée sous la direction du Docteur Elena Giménez-Arnau et a été co-encadrée par le Docteur Bertrand Vileno du laboratoire POMAM (UMR 7177, Institut de Chimie de Strasbourg).

Pour commencer, mes remerciements s'adressent aux membres du jury de thèse qui ont accepté d'être témoin de ce travail de thèse. Les rapporteurs, Docteur Fabienne Peyrot et Docteur Amaury du Moulinet d'Hardemare, ainsi que les examinateurs, Professeur Saadia Kerdine-Römer et Professeur Catherine Grodemange-Billiard, merci pour avoir accepté de faire partie du jury de thèse. Vous m'avez fait l'honneur de m'accorder votre temps pour lire et juger mon travail. Puis, vous avez partagé avec moi votre expertise et m'avez fait part de réflexions pertinentes au cours de la soutenance pour enfin m'accorder le titre de Docteur de l'Université de Strasbourg.

Ensuite, je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Jean-Pierre Lepoittevin. En effet, je souhaite vous remercier pour m'avoir accueilli dans votre équipe mais aussi pour les agréables moments que l'on a pu partager durant ces trois années et demi. Nous avons pu avoir des conversations riches et variées, tant dans le partage de votre grand savoir, que d'un point de vue nutritionnel durant les pauses de midi dû à ma gastronomie qui peut être qualifiée comme étant originale. J'espère que vous en garderez un bon souvenir, notamment de mes recettes spéciales de croque-monsieur.

Je voudrais poursuivre en m'adressant et remerciant de tout mon cœur Elena Giménez-Arnau et Bertrand Vileno. Mille mercis pour tout ce que vous avez fait pour moi, pour tout ce que vous m'avez apporté et pour votre patience. Vous m'avez offert une thèse, une aide précieuse, une ambiance perpétuellement agréable et de nombreux apprentissages tant scientifiques qu'humains. Vous avez été présents, disponibles et m'avez apporté une aide précieuse tout au long de ma thèse et de la rédaction du manuscrit. Grâce à vous, j'ai notamment pu parfaire mon orthographe et ma grammaire, même s'il m'est encore nécessaire de m'améliorer et de me relire davantage.

Plus spécifiquement, Elena, merci pour tout ce que tu as pu m'apporter. Tu m'as permis de forger des souvenirs qui resteront indélébiles. Nous avons pu traverser des aventures que je n'aurais pas pu soupçonner avant, comme par exemple le retour de Amsterdam avec l'avion annulé et le train de nuit à boire des Gin-Tonic ou encore l'appel depuis l'Hôpital de Saverne et non pas de Haute-pierre etc... On a pu partager de nombreuses conversations très agréables, alors merci pour ta joie communicative et ta bienveillance.

De la même manière, Bertrand, merci aussi pour ce que tu as pu m'apporter. Toi aussi, tu m'as permis de murir tant humainement que scientifiquement. Merci pour m'avoir transmis ta passion en RPE et m'avoir énormément appris. Merci aussi pour les bons moments que nous avons pu passer, ton humour et ta bonne humeur toujours présente, que ce soit lors du travail, autour d'un verre durant les pots et apéros ou même dans un bar/boîte pour le moins original à Amsterdam.

Pour continuer, j'aimerais aussi remercier tous les membres des deux laboratoires dans lesquels j'ai eu la chance de travailler durant cette thèse.

Pour le laboratoire de Dermatochimie j'adresse mes remerciements à Valérie avec qui j'ai eu la chance de beaucoup échanger, et qui a su apporter conseil et participer à l'ambiance au sein du laboratoire. Je remercie aussi les autres membres « éphémères » au sein du laboratoire. Il y a eu Marie et Alexis, Post-Docs, avec qui j'ai eu la chance de passer de très agréables moments. Nous avons pu partager de nombreuses conversations, délires et pu partager de nombreux apéros ensemble, notamment durant notre bouteille du vendredi soir, alors merci pour tous ces moments. Comme promis je remercie Henri, fils de Marie, qui a notamment été au cœur de certaines conversations. Il y a eu les

anciens doctorants, Fatma et Salen, qui sont les pionniers du travail de thèse que j'ai effectué, et que j'ai pu rencontrer et que je remercie pour leur gentillesse. Minh un autre doctorant avec qui j'ai eu l'occasion de travailler. Enfin, je remercie les stagiaires qui ont été présents et dont j'ai eu la chance de participer à l'encadrement durant la thèse.

En parallèle, pour le laboratoire POMAM, je remercie les différents membres que j'ai eu la chance de côtoyer tels que Sylvie et Athanassios. Aussi, principalement mes remerciements sont attribués au Docteur Nolwenn Le Breton qui m'a inculqué les bases de la RPE. Merci pour avoir été patiente, présente, pédagogue et avoir accepté de me faire confiance avec les appareils suites aux formations que tu m'as apporté, donc un grand merci pour tout ce que tu as fait pour moi.

Outre ces laboratoires, je tiens aussi à remercier le laboratoire avec lequel nous partageons le demi-étage de l'Institut Le Bel (5^{ème} Nord), soit les membres du laboratoire CBMB. J'ai eu la chance d'y effectuer deux stages durant mes études universitaires avant la thèse et ils m'ont toujours fait m'y sentir comme intégré. Ainsi, un merci à Catherine pour ta présence, ta générosité et tout ce que tu m'as apporté durant toutes ces années. Merci aussi à Didier pour toutes ces conversations que tu as su illustrer avec des mimes, des bruitages et des imitations à toute épreuve qui arrivent à donner le sourire à tout le monde. Merci à Michel pour avoir partagé ses connaissances. Également merci à Katia et Alizée, doctorantes avec qui on a pu partager de nombreuses pauses déjeuner devant les mots fléchés. Merci aussi aux autres stagiaires que j'ai pu côtoyer.

J'adresse maintenant également mes remerciements à tous les services et autres laboratoires que j'ai eu l'occasion de côtoyer et ceux avec qui j'ai eu l'occasion de travailler. Merci au Docteur Christophe Gourlaouen du laboratoire de Chimie Quantique pour les calculs de DFT. Merci aux membres de l'entreprise Cell Alternativ qui nous ont fournis les RHE et fait des tests de conformité lors de modifications de ces épidermes. Merci à Maurice, Bruno et Lionel du service RMN pour leurs analyses. Merci aussi au service de masse et aux membres du magasin de chimie de l'Unistra.

Dans un contexte moins professionnel, mes remerciements se tournent maintenant vers ma famille pour leur soutien perpétuel. Sans vous je n'aurais jamais pu aller aussi loin, vous avez été là pour m'aider et m'encourager toute ma vie alors je n'aurais jamais assez de mots pour vous montrer toute la gratitude que je vous porte.

À mes amis qui m'ont épaulé durant mon parcours, je vous porte aussi une pensée chaleureuse. Merci à Anne-Laure et bébé Lola. Merci aussi aux membres d'ALCANES et partenaires Guigui, Mayou, Erika, Benji, Élodie, Thibault, Thibaut, Capu, Aurélien, Morgane, Lisa, Cédric, Bouclettes, Valentin, Dorian, Marco, Daniel, Cath, Solène, Julie, Camille, Zoé, Brice, Kalbé et bien sûr la princesse Paupau, même si j'en passe encore parmi les anciens ou les petits jeunes encore. Merci à Malt & Houblon, distributeur de boissons, et notamment à Raph, Loïc, et Seb pour tout ce que vous avez fait. Vous êtes des rencontres incroyables. Merci aussi aux personnels du Croque Bedaine, le super bar qui est devenu QG pour l'apéro. Merci aussi au Chariot qui a aussi un autre bar QG. Mille mercis aussi aux meilleurs de la team Relax, Julien/Patrick, Max, Tim, Chloé, Caca, Alan, Edou, Lola, Gwen, Aka, Laura et la petite Serena. Avec vous j'ai pu passer les plus agréables moments mais êtes également présents pour apporter réconfort et soutien lors des mauvais. Toujours présents pour ouvrir la bouteille de pinard et démarrer l'apéro en apportant la bonne humeur et une super ambiance.

Merci à Julien, mon partenaire, pour tous ces moments partagés. Notre relation a débuté au début de cette thèse et je suis heureux d'avoir pu vivre tout ça avec toi, en espérant que cela durera encore longtemps.

Enfin pour finir je remercie la fondation Jean-Marie Lehn, anciennement appelé fondation pour la recherche en chimie, qui a financé ce projet de thèse (projet DERMATOX).

Abréviations

AAPH	2,2'-azobis-2-aminidinopropane
ABTS	2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)
ADC	Allergie de contact
AOP	Adverse outcome pathway
B_0	Champ magnétique externe
br s	<i>Broad singlet</i>
br d	<i>Broad doublet</i>
CAT	Catalase
CmP	3-Carbamoyl proxyl
CMH II	Complexe majeur d'histocompatibilité de type II
Cys	Cystéine
BP	Benzophénone
cw-RPE	<i>Continuous wave-RPE</i>
CxP	3-Carboxy proxyl
d	<i>Doublet</i>
dd	<i>Doublet of doublet</i>
ddq	<i>Doublet of doublet of quadruplet</i>
dq	<i>Doublet of quadruplet</i>
dtd	<i>Doublet of triplet of doublet</i>
DEPMPO	5-(Diéthoxyphosphoryl)-5-méthyl-1-pyrroline- <i>N</i> -oxide
DFT	<i>Density functional theory</i>
DPPH	1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl
DPRA	<i>Direct peptide reactivity assay</i>
ECVAM	Centre européen de validation des méthodes alternatives
Eug	Eugénol
FRS	<i>Free radical scavenging</i>
<i>g</i>	Facteur de Landé
GPX	<i>Glutathion peroxydase</i>
GR	<i>Glutathion reductase</i>

GSH	Glutathion
GSSH	Disulfure de glutathion, glutathion oxydé
GST	<i>Glutathion transferase</i>
hfcc	<i>Hyperfine coupling constant</i>
His	Histidine
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IsoEug	Isoeugénol
J	Constante de couplage en RMN
KP	Kétoprofène
LLNA	<i>Local lymph node assay</i>
logP	Lipophilie, coefficient de répartition octanol/eau
Lys	Lysine
M	<i>Multiplet</i>
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
MW	<i>Molecular weight</i>
OBZ	Oxybenzone
OCDE	Organisation de coopération et de développement économiques
OCT	Octocrylène
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
PADC	Photo-allergie de contact
PhO[•]	Radical phénoxy
PhOH	Phénol
PMA/Ce	<i>Phosphomolybdic acid on cerium</i>
PPD	<i>para</i> -Phénylènediamine
ppm	Partie par million
PPRA	<i>Peroxidase peptide reactivity assay</i>
q	Quadruplet
R[•]	Radical carboné
REACH	<i>Registration, evaluation, authorization and restriction of chemicals</i>
RHE	<i>Reconstructed human epidermis</i>

RMN	Résonance magnétique nucléaire
RNS	<i>Reactive nitrogen species</i>
RO[·]	Radical alcoxyle
ROH	Alcool
ROOH	Hydroperoxyde
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPE	Résonance paramagnétique électronique
s	<i>Singlet</i>
S/N	Rapport signal sur bruit
SC	<i>Spin scavenger</i>
SET	Transfert électronique, <i>Single electron transfer</i>
SOD	Superoxyde dismutase
ST	<i>Spin Trap</i>
t	<i>Triplet</i>
td	<i>Triplet of doublet</i>
TEER	Résistance transépithéliale
TLC	<i>Thin layer chromatography</i>
tt	<i>Triplet of triplet</i>
TRAP	<i>Total radical-trapping antioxidant parameter</i>
Trp	Tryptophane
Tyr	Tyrosine
UV	Ultra-violet
XO	Xanthine oxydase
δ	Déplacement chimique
ΔG	Différence d'enthalpie libre
λ	Longueur d'onde
ν	Fréquence

Liste des figures

Figure 1 : Schéma de biosynthèse des phénylpropanoïdes (notamment de l'eugénol et de l'isoeugénol) à partir de phénylalanine ou dans certains cas de tyrosine. ¹⁻³	1
Figure 2 : Schéma de production des différentes espèces radicalaires réactives dérivées de l'oxygène et de l'azote (ROS et RNS) ¹⁶	3
Figure 3 : Origines extra- ou intracellulaires de ROS et RNS au sein d'une cellule	4
Figure 4 : Schéma illustrant la structure du GSH et son équilibre rédox formant le dimère GSSG relié par un pont disulfure	6
Figure 5 : Illustration du fonctionnement des mécanismes de détoxification, (A) chimique et (B) biologique, d'un xénobiotique par le GSH	7
Figure 6 : Mécanismes catalytiques concertés des enzymes GPX, GR et G6PD permettant la régénération du GSH après son action antioxydante vis-à-vis des peroxydes. L'ATP représentant la source d'énergie essentielle au métabolisme pour réaliser, entre autres, les réactions biochimiques thermodynamiquement défavorables, la régénération du GSH représente en conséquence un coût moins cher en énergie.	8
Figure 7 : Les différentes vitamines antioxydantes et la source de leur pouvoir antioxydant (encerclée en jaune)	10
Figure 8 : Mécanisme de neutralisation des radicaux libres R* (entouré en jaune) par les polyphénols tel que l'eugénol et l'isoeugénol et évolution du radical PhO* (produits de dimérisation des intermédiaires carbonés en rouge).....	15
Figure 9 : Mécanismes d'oxydation des ortho-alkoxyphénols menant à (a) une ortho-quinone suite à l'action d'une déméthylase pour former un cœur catéchol qui peut s'autoxyder ou à (b) une ortho-quinone formée par β -scission radicalaire ou encore à (c) une para-méthylène quinone dans le cas de l'eugénol	15
Figure 10 : Mesure du pouvoir antioxydant par Free Radical Scavenging (FRS) du DPPH* ou de l'ABTS*	17
Figure 11 : Réaction de décomposition thermique du AAPH pour former le radical peroxyde AAPH* impliqué dans les mesures du pouvoir antioxydant TRAP et ORAC	18
Figure 12 : Exemples de symptômes qui font suite à une dermatite de contact allergique induite par des produits cosmétiques (González-Muñoz et al.) ⁷⁰	19
Figure 13 : Coupe histologique schématisée de la peau et pénétration des rayonnements allant de l'UV au proche infrarouge (IR)	20
Figure 14 : Mécanisme menant à l'ADC adapté de Vileno et al. ⁸⁰	21
Figure 15 : Apprêtement de l'haptène après son internalisation par les cellules dendritiques menant à la formation du réceptosome.....	23
Figure 16 : Classement des liaisons chimiques en fonction des niveaux d'énergie ⁷⁵	24
Figure 17 : Exemples de complexes de coordination formés entre un métal (Co ^{II} , Ni ^{II} , Cr ^{III}) et des ligands L.....	25
Figure 18 : Classification et exemples des types d'haptènes organiques en fonction de leur réactivité menant à la formation d'un complexe antigénique	26
Figure 19 : L'alcool cinnamique, un exemple de pro-haptène susceptible d'être oxydé en substances allergènes par des actions enzymatiques (ADH et AIDH) formant des fonctions électrophiles réactives à l'origine des propriétés allergisantes (aldéhyde α,β -insaturé et acide carboxylique)	27
Figure 20 : Autoxydation du limonène et produits d'oxydation primaire Lim-1-OOH et Lim-2-OOH. À titre d'exemple, radicaux carbonés potentiellement formés par dégradation radicalaire du Lim-1-OOH.	29
Figure 21 : Formation de formes sensibilisantes de la PPD après oxydation et dimérisation	29
Figure 22 : Étapes clé de la sensibilisation cutanée définies par l'AOP et méthodes d'évaluation du pouvoir sensibilisant associées.....	31
Figure 23 : Schéma du protocole expérimental du LLNA.....	32

Figure 24 : Dérivés de type ortho-quinone et para-méthylène quinone issus de l'eugénol et de l'isoeugénol. Les flèches rouges montrent les centres électrophiles potentiellement réactifs.....	35
Figure 25 : Hypothèse sur les potentielles actions antioxydantes (jaune) et cytotoxiques (rouge) au sein d'un épiderme dérivées des intermédiaires résultant de l'oxydation de l'eugénol et de l'isoeugénol.....	35
Figure 26 : Positions cibles (flèches rouges) pour une substitution isotopique au ^{13}C sur l'eugénol et l'isoeugénol. Les chiffres gris représentent la numérotation des positions qui sera appliquée dans ce manuscrit.	37
Figure 27 : Radicaux potentiels obtenus à partir du kétoprofène et de l'octocrylène. En rouge est représenté le noyau benzophénone.....	38
Figure 28 : Bilan des calculs de DFT en considérant la perte des groupements méthyle ou d'hydrogène à partir du radical phénoxy PhO^{\bullet} de chaque molécule en kcal.mol^{-1}	41
Figure 29 : Énergie de dimérisation des radicaux PhO^{\bullet} par recombinaison radicalaire pour chaque molécule avec en rouge l'enthalpie de dimérisation préférentielle.....	42
Figure 30 : Positions sélectionnées en vue d'une substitution isotopique au ^{13}C , symbolisées par des étoiles jaunes pour les positions principales et rouges pour les positions que nous avons considéré comme secondaires.....	43
Figure 31 : Schéma de synthèse effectuée afin d'obtenir le (^{13}C -MeO)-Eug à partir d'Eug.....	44
Figure 32 : Isomérisation du (^{13}C -MeO)-Eug pour obtenir le (^{13}C -MeO)-IsoEug.....	45
Figure 33 : Schéma de rétrosynthèse menant à l'obtention du β -(^{13}C)-IsoEug à partir de vanilline et d'halogénoéthane (les atomes de ^{13}C sont marqués d'une étoile).....	45
Figure 34 : Schéma de synthèse du β -(^{13}C)-IsoEug.....	46
Figure 35 : Schéma de rétrosynthèse permettant la production d'Eug et d'IsoEug substitués aux atomes de ^{13}C dans les positions ortho-.....	47
Figure 36 : Schéma de synthèse pour produire du guaiacol à partir de phénol.....	47
Figure 37 : Schéma de la réaction permettant l'oxydation du composé 6 pour l'obtention de 7.....	48
Figure 38 : Spectre ^{13}C -RMN (125 MHz) montrant l'obtention d'un mélange d'isotopomères de (^{13}C)-Guaiacol (cf. Partie Expérimentale).....	49
Figure 39 : Proposition de mécanisme d'isomérisation de (^{13}C) ₂ -7 menant au mélange de deux isotopomères (^{13}C) ₂ -8 après méthylation.....	49
Figure 40 : Synthèse de 9 par bromation en para- du guaiacol.....	50
Figure 41 : Protection de la fonction phénolique sous forme d'éther silylé pour former le composé 10.....	50
Figure 42 : Formation d'un réactif de Grignard à partir de 10 pour obtenir l'Eug silylé 11.....	51
Figure 43 : Déprotection de l'éther silylé menant à l'obtention de l'Eug et de l'IsoEug par isomérisation.....	51
Figure 44 : Schéma de rétrosynthèse permettant l'obtention de l'Eug et de l'IsoEug substitués au ^{13}C dans la position 4-C en para- (étoile jaune) et l'obtention de l'Eug substitué au ^{13}C dans la position α -C (étoile rouge) .	53
Figure 45 : Schéma réactionnel de production de vanillate d'éthyle pouvant être obtenu substitué au ^{13}C à partir de diéthyle malonate et d'acide pyroméconique.....	54
Figure 46 : Protection du vanillate d'éthyle sous forme de d'éther silylé suivie de la réduction de la fonction ester et de la substitution de l'alcool obtenu pour obtenir le dérivé bromé 15.....	54
Figure 47 : Schéma de synthèse menant à l'obtention de l'Eug et de l'IsoEug à partir de 15.....	55
Figure 48 : L'électron libre et son moment magnétique résultant de son mouvement angulaire.....	89
Figure 49 : Niveaux d'énergie et spectre RPE pour un système isotrope de spin $S = \frac{1}{2}$ lorsque la condition de résonance est vérifiée.....	90
Figure 50 : Spectre de RPE du radical hydrogène H^{\bullet} résultant de l'interaction hyperfine avec un noyau ^1H ($I = \frac{1}{2}$).....	91

Figure 51 : Schéma descriptif illustrant une expérience de spin trapping par le DEPMPO agissant comme ST et permettant la détection indirecte et l'identification du radical R* piégé par l'évaluation des hfccs.....	92
Figure 52 : ST classiques de type nitronne classés en fonction de leur toxicité et lipophilie. En rouge, les atomes avec un spin nucléaire non-nul à l'origine de hfccs de l'adduit de spin formé. Figure reprise de Vilenko et al. ⁸⁰ ...	92
Figure 53 : Description schématique du dédoublement du signal RPE d'un adduit de spin du DEPMPO induit par la présence d'un radical carboné substitué au ¹³ C	93
Figure 54 : Réactions secondaires permettant la formation de radicaux nitroxydes sans piégeage de spin : a) ène-réaction, b) réaction de Forrester-Hepburn et c) piégeage de spin inverse	94
Figure 55 : Schéma de l'approche RPE dite de spin scavenging montrant la décroissance de l'intensité du signal RPE (I/I ₀) associé à une sonde paramagnétique, le SC souvent de type nitroxyde. Cette décroissance enregistrée en fonction du temps ou de tout autre paramètre expérimental (température, pH, irradiation ...) est souvent induite par l'action de ROS.....	95
Figure 56 : Structure du CmP et du CxP qui ne peut franchir les barrières lipidiques à pH physiologique	96
Figure 57 : Schéma de synthèse du DEPMPO.....	96
Figure 58 : Représentation 3D de la structure rayons X de la HRP (isoenzyme C) adaptée de Veitch et al. ¹³ Les sphères bleues représentent des ions calcium maintenant la structure composée d'hélices-α et de feuillets-β représentés en violet. A droite : un zoom sur les acides aminés clés dans la région comportant l'hème (en rouge)	98
Figure 59 : Cycle catalytique enzymatique et bilan de la réaction de la HRP en présence d'H ₂ O ₂ et de substrats antioxydants tels que l'Eug et l'IsoEug.....	98
Figure 60 : Photo-oxydation d'un phénol	99
Figure 61 : Simulateur solaire Oriol Sol 3A lampe Xenon simulant le spectre solaire du soleil ressenti sur Terre (AM 1.5G) repris de Leary et al. ¹⁴⁴	99
Figure 62 : Méthode expérimentale de préparation des échantillons en vue des tests en solution de RPE-spin trapping.....	100
Figure 63 : Spectres RPE-spin trapping en solution du guaiacol, du vétratol, de l'Eug, du méthyleugénol, de l'IsoEug et du méthylisoeugénol suite à une initiation radicalaire par le système enzymatique HRP/H ₂ O ₂	101
Figure 64 : Simulation et déconvolution des systèmes identifiés pour le spectre RPE obtenu en solution avec Eug via l'initiation HRP/H ₂ O ₂ . Un radical centré sur le carbone (spectre bleu) et un radical centré sur l'oxygène de type peroxyde (spectre vert).....	102
Figure 65 : Spectres de RPE obtenus par spin trapping en solution du guaiacol, du vétratol, de l'Eug, du méthyleugénol, de l'IsoEug et du méthylisoeugénol après une exposition lumineuse de 5 min.	103
Figure 66 : Possible photo-oxydation du méthyleugénol et ses formes de résonances	103
Figure 67 : Spectres de RPE combinés au spin trapping en solution du Guaiacol, de l'Eug et de l'IsoEug commerciaux comparés à leurs analogues substitués au ¹³ C avec une initiation radicalaire via le système enzymatique HRP/H ₂ O ₂ . À noter que le (¹³ C)-Guaiacol correspond au mélange 2,6-(¹³ C)-Guaiacol et 1,3-(¹³ C)-Guaiacol dont la synthèse est décrite Chapitre 1. Les étoiles jaunes des structures moléculaires représentent les ¹³ C.....	105
Figure 68 : Spectres de RPE combinés au spin trapping en solution du Guaiacol, de l'Eug et de l'IsoEug commerciaux comparés à leurs analogues substitués au ¹³ C avec une initiation radicalaire via la photo-exposition des échantillons (5 min). À noter que le (¹³ C)-Guaiacol correspond au mélange 2,6-(¹³ C)-Guaiacol et 1,3-(¹³ C)-Guaiacol dont la synthèse est décrite Chapitre 1. Les étoiles jaunes des structures moléculaires représentent les ¹³ C.....	106
Figure 69 : Comparaison des coupes histologiques entre la peau humaine (gauche) et les RHE AlternaSkin™ (droite) au travers de la schématisation de leurs couches cellulaires (figure modifiée venant de cellalternativ.fr)	107
Figure 70 : Schéma de la procédure générale classique permettant les tests de RPE-spin trapping dans les RHE	109

Figure 71 : Spectres RPE préliminaires dans les RHE exposés à l'Eug et à l'IsoEug en présence de DEPMPO.....	110
Figure 72 : Schématisation de l'incorporation de la HRP dans les RHE par voie systémique	111
Figure 73 : Coupes histologiques des RHE après 48 h et 72 h d'incubation avec de la HRP dans le milieu de culture et RHE contrôles.....	113
Figure 74 : Comparaison des spectres RPE-spin trapping en solution en présence HRP/H ₂ O ₂ (haut) et dans des RHE dopés à la HRP (bas) de l'Eug et de l'IsoEug.	114
Figure 75 : Schéma de l'approche expérimentale de l'étude RPE-spin trapping dans les RHE en présence des molécules cibles et sous illumination par le simulateur solaire	116
Figure 76 : Comparaison des spectres RPE-spin trapping obtenus dans les RHE en présence d'Eug, d'IsoEug et de Guaiacol exposés ou non au simulateur solaire	118
Figure 77 : Schéma illustrant l'approche expérimentale RPE-spin scavenging dans les RHE.....	119
Figure 78 : Suivi temporel de l'intensité RPE relative (I/I_0) du CxP au sein de RHE en présence d'Eug et d'IsoEug	120
Figure 79 : Formation potentielle d'adduits entre les radicaux carbonés issus de l'Eug et de l'IsoEug avec la cystéine telle que prédite par DFT.....	121
Figure 80 : Procédure générale de préparation des échantillons pour les études de réactivité de l'Eug et de l'IsoEug avec des acides aminés.....	123
Figure 81 : Structure et poids moléculaires des acides aminés utilisés pour les études de réactivité	123
Figure 82 : Comparaison des spectres obtenus par spectrométrie de masse (ESI- μ TOF) des essais de l'IsoEug ou du (¹³ C-MeO)-IsoEug en solution avec de la Ac-Cys-Me et le système initiateur HRP/H ₂ O ₂ montrant le déplacement d'une valeur de 1 du m/z en fonction de l'espèce isotopique utilisée	125
Figure 83 : Schéma réactionnel illustrant la génération photo-induite de l'état triplet du biradicalaire BP** (transition n- π^*)	135
Figure 84 : Diagramme de Jablonski de la BP menant à la formation du biradical BP**	136
Figure 85 : Symptômes (ici une dermatite vésiculo-bulleuse) pouvant résulter de la PADC à une crème contenant du KP	137
Figure 86 : Photo-dégradation du KP menant à la formation de radicaux potentiellement capables de dimériser en rouge	138
Figure 87 : Produits issus de la photo-excitation du KP dans de l'éthanol et proposition d'un schéma réactionnel impliquant des intermédiaires radicalaires.....	139
Figure 88 : Composés possédant des similitudes structurales avec le KP reconnus (droite) ou non (gauche) pour leur aptitude à induire une PADC croisée.....	140
Figure 89 : Schéma proposé de rétro-aldolisation de l'OCT menant à la formation de BP.....	141
Figure 90 : Description schématique illustrant les modes opératoires pour la préparation de l'échantillon en solution irradié (gauche) ou pour le RHE irradié (droite)	141
Figure 91 : Simulation globale (spectre rouge, caractéristique d'un spin-adduit issu du piégeage d'un radical ROS de type HO [•] : $g = 2,0058$; $a_H = 13,1$ G ; $a_N = 14,0$ G et $a_P = 47,1$ G) du spectre de RPE expérimental dans un RHE obtenu pour la BP (2,2 $\mu\text{mol.cm}^{-2}$) en présence de DEPMPO (20 $\mu\text{mol.cm}^{-2}$) après 5 min d'irradiation	143
Figure 92 : Simulation globale (spectre rouge) et déconvolution (spectres bleu et vert) du spectre de RPE expérimental obtenu en solution avec le KP (10 mM) en présence de DEPMPO (50 mM) après photo-exposition (5 min).....	144
Figure 93 : Simulation globale (spectre rouge) et déconvolution (spectre bleu et vert) du spectre de RPE expérimental dans un RHE obtenu pour le KP (1,6 $\mu\text{mol.cm}^{-2}$) en présence de DEPMPO (20 $\mu\text{mol.cm}^{-2}$) après 5 min d'irradiation	145
Figure 94 : Photo-réaction proposé par Karlsson et al. entre des résidus de type tryptophane (bleu) et de type lysine (rouge) soumis aux UV en présence de KP ¹²	146

<i>Figure 95 : Spectres de RPE-spin trapping de l'OCT (10 mM) en solution avec du DEPMPO (50 mM) à différents temps d'irradiation.....</i>	<i>147</i>
<i>Figure 96 : Simulation globale (spectre rouge) et déconvolution (vert et bleu) du spectre RPE expérimental obtenu pour les RHE en présence d'OCT (10 mM) et exposé 20 min au spectre d'émission solaire en présence de DEPMPO (50 mM)</i>	<i>148</i>
<i>Figure 97 : Comparaison des spectres expérimentaux RPE-spin trapping de l'OCT en solution ou dans un RHE en présence de DEPMPO.....</i>	<i>149</i>

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Fonctionnement des réactions radicalaires.....</i>	<i>3</i>
<i>Tableau 2 : Principales classes de phénols et de polyphénols.....</i>	<i>12</i>
<i>Tableau 3 : Différence d'enthalpie libre ΔG entre le radical le plus stable en référence (0 kcal.mol⁻¹) et le second radical pour chaque molécule.....</i>	<i>40</i>
<i>Tableau 4 : Densité de spin sur les radicaux PhO* de chaque molécule.....</i>	<i>41</i>
<i>Tableau 5 : Différentes voies expérimentales testées pour former 11 à partir de 10.....</i>	<i>52</i>
<i>Tableau 6 : Résultats des tests de viabilité cellulaire des RHE traités avec de la HRP pendant 48 à 72 h comparés à un RHE non-traité.....</i>	<i>112</i>
<i>Tableau 7 : Moyenne des résultats (triplicata) des mesures de TEER des RHE traités avec de la HRP pendant 48 à 72 h comparé à un RHE non-traité comme référence.....</i>	<i>112</i>
<i>Tableau 8 : Enthalpie libre (ΔG en kcal.mol⁻¹) de la réaction de recombinaison radicalaire entre le radical thiyle de la cystéine et différentes positions radicalaires carbonées de l'Eug et de l'IsoEug induites par délocalisation du radical PhO* préalablement formé.....</i>	<i>122</i>
<i>Tableau 9 : Rapports m/z observés pouvant correspondre à la formation d'une liaison entre l'acide aminé étudié et l'Eug ou l'IsoEug.....</i>	<i>124</i>
<i>Tableau 10 : Rapports m/z observés pouvant correspondre à la formation d'une liaison entre l'acide aminé étudié et l'Eug ou l'IsoEug, tous deux substitués au 13C sur la fonction méthoxy.....</i>	<i>125</i>

Sommaire

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. AVANT-PROPOS : L'eugénol et l'isoeugénol, des antioxydants et des allergènes	1
2. Stress oxydant et systèmes antioxydants	2
2.1. Radicaux libres et stress oxydant	2
2.2. Systèmes antioxydants	4
2.2.1. Les antioxydants endogènes : agents cytoprotecteurs biologiques	5
<i>Les superoxyde dismutases</i>	5
<i>Les catalases</i>	5
<i>Le glutathion et ses enzymes</i>	6
2.2.2. Les agents antioxydants exogènes	8
<i>Oligoéléments</i>	8
<i>Vitamines</i>	9
<i>Les phénols et les polyphénols</i>	11
2.2.3. Mesure du pouvoir antioxydant	16
3. L'allergie de contact (ADC)	18
3.1. La peau	19
3.2. Le mécanisme de l'allergie de contact	21
3.2.1. Formation d'un complexe antigénique et théorie de l'haptène	22
3.2.2. La phase de sensibilisation	22
3.2.3. Phase d'élicitation ou de révélation	23
3.3. Chimie et classification des allergènes	24
3.3.1. Liaisons menant à l'hapténisation	24
<i>Liaisons de coordination</i>	24
<i>Liaisons covalentes</i>	25
3.3.2. Haptènes en puissance : les « pro- » et « pré-haptènes »	26
<i>Pro-haptènes</i>	27
<i>Pré-haptènes</i>	28
3.4. Identification et évaluation du potentiel allergisant	30
4. Projet : DERMATOX	33
4.1. Composés cibles	34
4.2. Méthodologie employée pour l'étude d'intermédiaires radicalaires	36
4.3. Élargissement méthodologique à d'autres systèmes irradiés	37

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE ISOTOPIQUE DE L'EUGENOL ET DE L'ISOEUGENOL

1. Études préliminaires : calculs théoriques sur l'évolution radicalaire de l'eugénol et de l'isoeugénol	39
---	-----------

2. Les voies de synthèse développées	43
2.1. Synthèse (¹³ C-MeO)-Eug et du (¹³ C-MeO)-IsoEug : la substitution sur les fonctions méthoxy	44
2.2. Synthèse du β-(¹³ C)-IsoEug : la substitution sur la chaîne allylique	45
2.3. Synthèse du 2,6-(¹³ C)-Eug et du 2,6-(¹³ C)-IsoEug : la substitution au sein du cycle aromatique	46
2.4. Autres positions cibles	53
3. Bilan vis-à-vis des synthèses substituées au ¹³C	55
Experimental part: Chapter 1	57

CHAPITRE 2 : ÉTUDES DES INTERMÉDIAIRES RADICALAIRES ET REACTIVITÉ DE L'EUGENOL ET DE L'ISOEUGENOL SOUMIS A DIFFÉRENTS SYSTÈMES OXYDANTS

1. Les fondamentaux	88
1.1. La Résonance Paramagnétique Électronique (RPE) ^{106,107}	88
1.1.1. L'effet Zeeman	88
1.1.2. Les interactions hyperfines	90
1.2. Le <i>spin trapping</i>	91
1.3. Le <i>spin scavenging</i>	94
2. Identification des espèces radicalaires issues des composés cibles par <i>spin trapping</i>	96
2.1. Étude de RPE- <i>spin trapping</i> en solution	96
2.1.1. La méthodologie expérimentale	97
<i>Les initiations radicalaires</i>	97
<i>Préparation des échantillons</i>	100
2.1.2. Résultats et discussion	100
2.2. Étude de RPE couplée au <i>spin trapping</i> dans des RHE	107
2.2.1. Les RHE : des matrices de cultures cellulaires mimant la peau	107
2.2.2. Étude de RPE- <i>spin trapping</i>	108
<i>Méthodologie expérimentale</i>	108
<i>Résultats et discussion</i>	109
2.2.3. Étude de RPE- <i>spin trapping</i> dans les RHE dopés	110
<i>Méthodologie expérimentale pour le dopage métabolique des RHE avec de la HRP</i>	110
<i>Résultats et discussion</i>	114
2.2.4. Étude de RPE- <i>spin trapping</i> dans les RHE sous irradiation	116
<i>Méthodologie expérimentale pour l'exposition solaire des RHE</i>	116
<i>Résultats et discussion</i>	117
2.3. Étude de RPE- <i>spin scavenging</i> dans des RHE	118
2.3.1. Méthodologie expérimentale	119
2.3.2. Résultats et discussion	119

3. Réactivité de l'Eug et de l'IsoEug vis-à-vis d'acides aminés	120
3.1. Calculs théoriques de réactivité radicalaire avec un acide aminé	121
3.2. Étude de la réactivité radicalaire en solution	122
3.2.1. Méthodologie expérimentale	122
3.2.2. Résultats et discussion	124
4. Bilan	126
Experimental part: Chapter 2	129

CHAPITRE 3 : ÉTUDE RADICALAIRE DE LA PHOTO-ALLERGIE DE CONTACT

1. La photo-allergie de contact	134
1.1. Les photo-allergènes étudiés : les dérivés de benzophénone	134
1.1.1. La benzophénone (BP) et ses propriétés photochimiques	135
1.1.2. Le kétoprofène (KP), un anti-inflammatoire non-stéroïdien	136
1.1.3. L'octocrylène (OCT) et l'oxybenzone (OBZ), les filtres solaires	140
1.2. L'objectif : étude des systèmes photo-exposés	141
2. Résultats et discussion	142
2.1. Étude de la BP par RPE- <i>spin trapping</i>	142
2.1.1. En solution	142
2.1.2. Dans des RHE	142
2.2. Étude du KP par RPE- <i>spin trapping</i>	143
2.2.1. En solution	143
2.2.2. Dans des RHE	145
2.3. Étude de l'OBZ et de l'OCT par RPE- <i>spin trapping</i>	146
2.3.1. En solution	146
2.3.2. Dans des RHE	148
3. Bilan	149
Experimental part: Chapter 3	151

CONCLUSION GÉNÉRALE

Contexte	154
Synthèse et conclusions	155
Perspectives	158

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Sommaire de partie :

1. AVANT-PROPOS : L'eugénol et l'isoeugénol, des antioxydants et des allergènes	1
2. Stress oxydant et systèmes antioxydants	2
2.1. Radicaux libres et stress oxydant	2
2.2. Systèmes antioxydants	4
2.2.1. Les antioxydants endogènes : agents cytoprotecteurs biologiques	5
<i>Les superoxyde dismutases</i>	5
<i>Les catalases</i>	5
<i>Le glutathion et ses enzymes</i>	6
2.2.2. Les agents antioxydants exogènes	8
<i>Oligoéléments</i>	8
<i>Vitamines</i>	9
<i>Les phénols et les polyphénols</i>	11
2.2.3. Mesure du pouvoir antioxydant	16
3. L'allergie de contact (ADC)	18
3.1. La peau	19
3.2. Le mécanisme de l'allergie de contact	21
3.2.1. Formation d'un complexe antigénique et théorie de l'haptène	22
3.2.2. La phase de sensibilisation	22
3.2.3. Phase d'élicitation ou de révélation	23
3.3. Chimie et classification des allergènes	24
3.3.1. Liaisons menant à l'hapténisation	24
<i>Liaisons de coordination</i>	24
<i>Liaisons covalentes</i>	25
3.3.2. Haptènes en puissance : les « pro- » et « pré-haptènes »	26
<i>Pro-haptènes</i>	27
<i>Pré-haptènes</i>	28
3.4. Identification et évaluation du potentiel allergisant	30
4. Projet : DERMATOX	33
4.1. Composés cibles	34
4.2. Méthodologie employée pour l'étude d'intermédiaires radicalaires	36
4.3. Élargissement méthodologique à d'autres systèmes irradiés	37

1. AVANT-PROPOS : L'eugénole et l'isoeugénole, des antioxydants et des allergènes

L'eugénole et l'isoeugénole sont deux alcoxyphénols de la famille des phénylpropanoïdes biosynthétisés au sein de certaines plantes à partir de phénylalanine (Figure 1).¹⁻³ De ce fait, ces composés se trouvent naturellement présents dans les huiles essentielles de nombreuses plantes capables de les biosynthétiser. C'est dans les huiles essentielles de clou de girofle, de canneliers ou d'ylang-ylang qu'il est possible de les identifier majoritairement dans des concentrations significatives. Ce sont les principaux agents odorants et gustatifs de ces huiles et ils sont utilisés dans de nombreux secteurs industriels en tant que fragrances (e.g., cosmétique, aromathérapie, parfumerie...).⁴⁻⁸

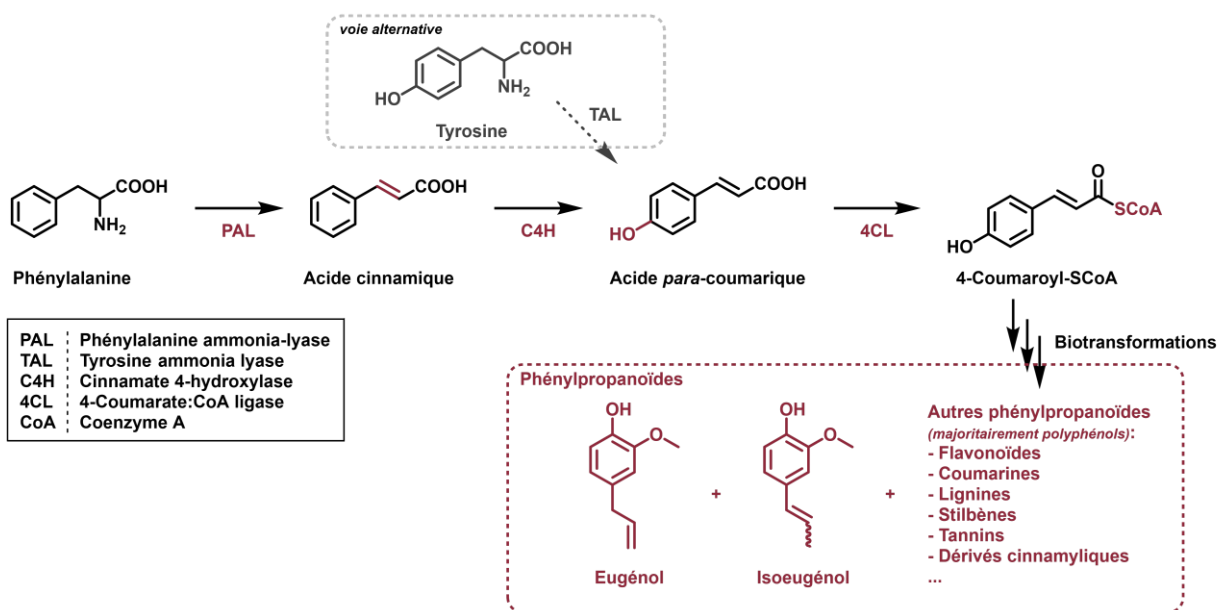


Figure 1 : Schéma de biosynthèse des phénylpropanoïdes (notamment de l'eugénole et de l'isoeugénole) à partir de phénylalanine ou dans certains cas de tyrosine.¹⁻³

Ces substances sont également utilisées dans de nombreux autres secteurs pour d'autres propriétés intrinsèques. L'eugénole est notamment connue dans le domaine dentaire, qui en a fait une véritable « légende », étant le nom d'une plateforme nationale de référence utilisée par les dentistes.⁹ L'eugénole était déjà utilisé depuis 1875 par les chirurgiens-dentistes comme pansement dentaire à l'eugénate, en mélangeant l'eugénole à de la poudre de zinc.¹⁰ Puis, l'usage de l'eugénate s'est diversifié à d'autres applications bucco-dentaires et au-delà, l'eugénole étant aussi utilisée dans l'élaboration de médicaments ou des conservateurs. Ces applications sont principalement dues aux propriétés antioxydantes et cytoprotectrices ainsi qu'aux effets antiseptique et analgésique de l'eugénole.¹¹ *A contrario*, l'isoeugénole est moins mis sur le devant de la scène, bien qu'il se retrouve malgré tout utilisé comme son analogue dans certains produits en tant que conservateur alimentaire naturel ou dans la formulation de

médicaments.¹² Sa popularité amoindrie résulte de sa toxicité supérieure à celle de l'eugénol. En effet, malgré toutes les vertus intéressantes que possèdent ces composés ils sont toutefois aussi connus pour avoir des propriétés prooxydantes et cytotoxiques apparentes.^{13,14} L'eugénol et l'isoeugénol sont notamment identifiés par les dermatologues en tant que responsables d'allergie de contact (ADC). Ainsi, les différents secteurs industriels impliqués, et notamment le cosmétique, sont aujourd'hui contraints d'indiquer leur présence sur leurs produits manufacturés. Ce sont également des constituants du Fragrance Mix I en association avec d'autres molécules, outil de diagnostic d'une ADC aux fragrances.¹⁵

Les comportements anti- et prooxydants de l'eugénol et de l'isoeugénol résultent de leurs structures moléculaires. Ce sont des composés contenant un noyau aromatique de type phénol sur lequel sont greffés : (i) en position *ortho*- un groupement méthoxy et (ii) en position *para*- un groupement qui est soit allylique dans le cas de l'eugénol et soit propénylique dans le cas de l'isoeugénol (Figure 1). L'eugénol et l'isoeugénol sont, en conséquence, deux isomères de position définis par le placement de la double liaison du substituant en position *para*-. Les différents dérivés d'oxydation connus mais aussi les intermédiaires radicalaires possiblement formés suite à l'évolution de l'eugénol et de l'isoeugénol au sein de la peau jouent très probablement un rôle clé dans leurs comportements anti- et prooxydants.¹³ Cependant, bien que de nombreuses hypothèses quant au devenir de ces molécules ont pu être formulées dans la littérature, leur réactivité dans des matrices cellulaires humaines complexes telle que la peau n'est pas élucidée à ce jour. Afin d'allier la compréhension de la réactivité antioxydante en établissant des frontières menant à l'action cytotoxique de ces molécules, l'objectif de ce travail a été d'investiguer la formation potentielle d'intermédiaires radicalaires réactifs dans la peau et de comprendre leurs mécanismes d'action.

2. Stress oxydant et systèmes antioxydants

La peau ne suffisant pas à filtrer le passage de toutes les sources de stress oxydant, les êtres-vivants se doivent de développer des systèmes de défense. En effet, l'action du stress oxydant est à l'origine de nombreuses pathologies humaines ou du vieillissement. Ainsi, des capacités de défense antioxydantes sont nécessaires pour protéger l'organisme. Celles-ci peuvent être endogènes (*i.e.*, les mécanismes de détoxifications et les systèmes antioxydants métaboliques) ou encore exogènes (*e.g.*, polyphénols, vitamines, oligoéléments...).

2.1. Radicaux libres et stress oxydant

Les radicaux sont définis comme des structures atomiques, ioniques ou moléculaires possédant un ou plusieurs électrons non-appariés sur les couches électroniques de valence externes. Ces espèces étant peu stables, elles ont souvent des temps de demi-vie courts. Ainsi, l'électron non-apparié est particulièrement réactif cherchant à compléter son orbitale

moléculaire. Un radical libre est donc une espèce la plupart du temps caractérisée par une instabilité. Lorsque ce radical n'est pas délocalisable ou stabilisé par son environnement direct, il est capable d'enclencher des réactions radicalaires en chaîne sur des espèces stables proches.^{16,17} On distingue trois grandes étapes pour de telles réactions : l'initiation, la propagation puis la terminaison (Tableau 1).¹⁶

Tableau 1 : Fonctionnement des réactions radicalaires

Etape de réaction	Equations de réaction	Mécanismes chimiques
• L'initiation ou amorçage : <i>Création de radicaux</i>	$AA \longrightarrow A^{\bullet} + A^{\bullet}$	<i>Clivage homolytique</i>
	$AA \xrightarrow{\pm e^{-}} A^{\pm} + A^{\bullet}$	<i>Transfert électronique (Single electron transfer, SET)</i>
• La propagation : <i>Prolifération des radicaux</i>	$A^{\bullet} + M \longrightarrow AM^{\bullet}$	<i>Addition radicalaire (AR)</i>
	$A^{\bullet} + M \longrightarrow A^{\pm} + M^{\bullet}$	<i>Transfert électronique, SET</i>
	$AA + M^{\bullet} \longrightarrow A^{\pm} + A^{\bullet} + M$	<i>Transfert électronique, SET</i>
	$M^{\bullet} + M \longrightarrow MM^{\bullet}$	<i>Polymérisation via AR</i>
	$AM^{\bullet} + M \longrightarrow AMM^{\bullet}$	<i>Polymérisation via AR</i>
	$AA + M^{\bullet} \longrightarrow AM + A^{\bullet}$	<i>Substitution radicalaire</i>
	$2 M - AH^{\bullet} \rightarrow M = A + M - H_2$	<i>Dismutation radicalaire</i>
• La terminaison : <i>Recombinaison radicalaire</i>	$A^{\bullet} + A^{\bullet} \longrightarrow AA$	<i>Transfert électronique 1 + 1</i>
	$A^{\bullet} + M^{\bullet} \longrightarrow AM$	<i>Transfert électronique 1 + 1</i>
	$M^{\bullet} + M^{\bullet} \longrightarrow MM$	<i>Transfert électronique 1 + 1</i>

(A = atome ou groupe d'atomes, M = molécule)

Parmi les espèces radicalaires les plus importantes on distingue principalement les espèces réactives dérivées de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species, ROS*) mais aussi celles dérivées de l'azote (*Reactive Nitrogen Species, RNS*). Ces espèces sont essentiellement des oxydants provoquant en conséquence de nombreux dégâts physiologiques aux biomolécules à l'origine de multitude de pathologies. Cependant, certaines d'entre elles sont nécessaires au développement de l'organisme et à son homéostasie lorsqu'elles sont présentes en concentration appropriée (e.g., comme agent de signal intramoléculaire) (Figure 2).¹⁸⁻²⁰

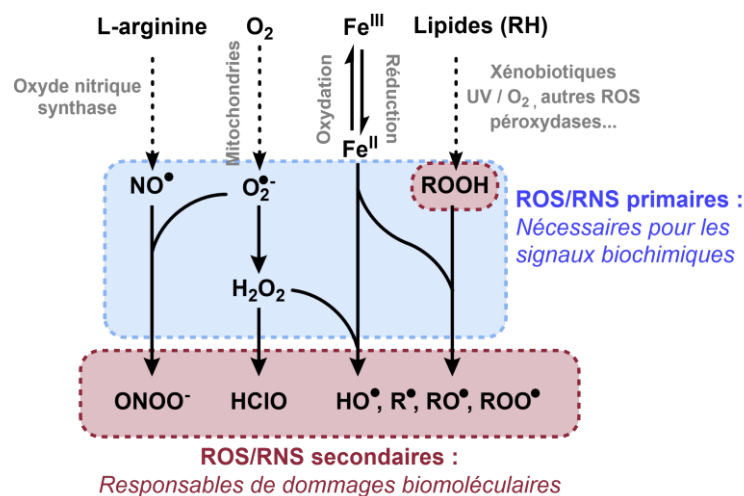


Figure 2 : Schéma de production des différentes espèces radicalaires réactives dérivées de l'oxygène et de l'azote (ROS et RNS)¹⁶

Suite à la découverte des radicaux libres aux alentours de 1955, le professeur Denham Harman et ses collaborateurs avaient formulé l'hypothèse que l'accumulation des dommages moléculaires et cellulaires causés par les ROS était responsable du vieillissement.²¹ Le stress oxydant avait alors été déjà défini comme résultant de toute perturbation modifiant l'équilibre entre la présence/génération de ces espèces réactives endogènes ou exogènes et la faculté de l'organisme à neutraliser ou réparer les dommages oxydants délétères qui en découlent. En effet, lorsque ce n'est pas régulé correctement l'excès de ROS ou d'autres radicaux libres favorise l'apparition de nombreuses pathologies (allergies, inflammations, cancers, maladies cardiovasculaires et dégénératives...) ainsi que le vieillissement prématuré des cellules et de l'organisme.¹⁸ L'apoptose, ou mort programmée des cellules, est en effet la principale conséquence du stress oxydant et de l'action des ROS et des RNS d'origine extra- ou intracellulaire (Figure 3).¹⁷

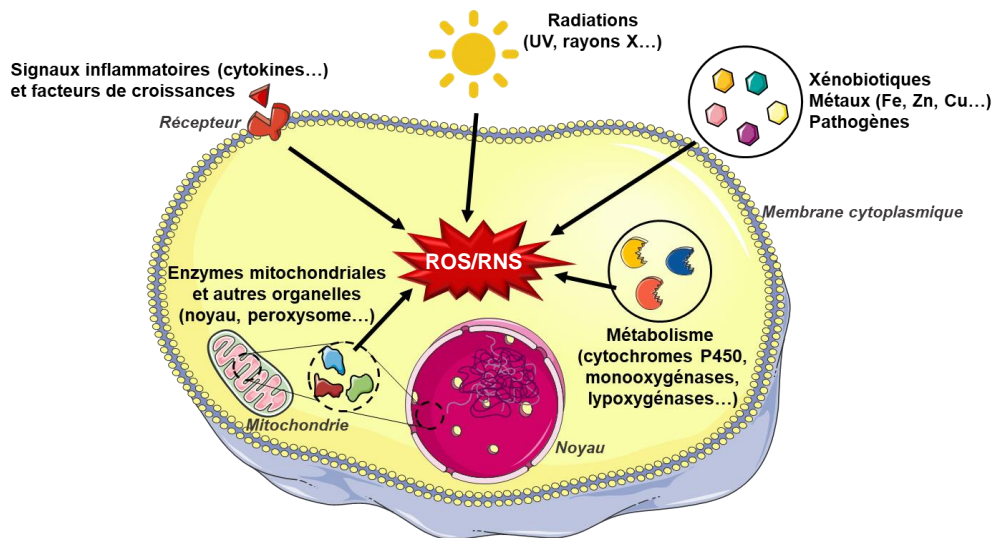


Figure 3 : Origines extra- ou intracellulaires de ROS et RNS au sein d'une cellule

2.2. Systèmes antioxydants

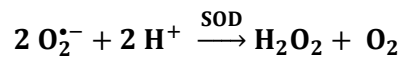
Les radicaux libres, et principalement les ROS, sont à la base de nombreuses fonctions physiologiques primordiales (e.g., respiration cellulaire) pour le bon fonctionnement, la signalisation et la régulation cellulaire. La production de ROS participant au maintien de l'homéostasie cellulaire, elle se doit d'être contrôlée afin d'éviter des surproductions qui mènent aux pathologies.¹⁹ Comme défini par Halliwell et Gutteridge autour des années 1990, les antioxydants sont des substances qui, lorsqu'elles sont présentes à de faibles concentrations par rapport à celles d'un substrat oxydable, retardent ou empêchent de manière significative l'oxydation de ce substrat.²² Ainsi, l'organisme possède divers systèmes antioxydants qui peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation ou leur origine. En effet, ils peuvent être endogènes (principalement enzymatiques et protéiques), mais également exogènes (alimentation, application cutanée...).

2.2.1. Les antioxydants endogènes : agents cytoprotecteurs biologiques

Afin de pouvoir assurer l'équilibre homéostatique cellulaire en présence de radicaux libres réactifs nécessaires à l'organisme, le vivant utilise différents systèmes notamment enzymatiques pour réguler ces radicaux ou bien les neutraliser en cas d'excès. Les principaux systèmes enzymatiques répertoriés sont : les superoxyde dismutases (SOD), les catalases (CAT) et les enzymes à glutathion (*i.e.*, les glutathion peroxydases (GPX), les glutathion réductases (GR) et les glutathion S-transférases (GST)). Ces systèmes enzymatiques fonctionnent en symbiose afin de lutter contre le stress oxydant, notamment en régulant la présence de radicaux et d'autres espèces réactives telles des ROS.²³

Les superoxyde dismutases

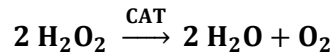
Les SOD sont des métalloenzymes permettant à l'organisme de réguler le taux intracellulaire de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). L' $O_2^{\cdot-}$ qui peut subir une dismutation par action des SOD pour générer du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) :^{23,24}



Ces métalloprotéines peuvent exister sous diverses formes, en fonction du métal présent au sein même du site actif de l'enzyme ou encore en fonction de leur localisation cellulaire. Il existe trois types de SOD chez l'Homme. Il y a deux SOD dimériques de type Cu^{II}/Zn^{II} -SOD utilisant ainsi le cuivre et le zinc comme cofacteurs. Le fonctionnement est le même pour chacun des deux isoformes de la Cu^{II}/Zn^{II} -SOD, le cuivre servant à la réaction de dismutation, tandis que le zinc maintient la structure protéique de ces enzymes. La principale différence entre les deux Cu^{II}/Zn^{II} -SOD est la localisation. L'une est une enzyme cytosolique présente dans le cytoplasme, le noyau et l'espace intermembranaire des mitochondries, alors que l'autre est une enzyme extracellulaire. La troisième SOD est tétramérique de type Mn^{III} -SOD utilisant le manganèse comme cofacteur. Dans le cas des bactéries, cette dernière peut être dimérique. La Mn^{III} -SOD est présente au sein des mitochondries permettant de contrôler l' $O_2^{\cdot-}$ qui y est généré. Il a pu être observé lors d'un déficit ou d'une carence en Mn^{III} -SOD qu'une augmentation de la production de $O_2^{\cdot-}$ entraîne l'inhibition des complexes (I) et (II) de la chaîne respiratoire des mitochondries. Enfin, dans le cas des organismes procaryotes un quatrième isoforme de SOD existe, une Fe^{II} -SOD utilisant le fer comme cofacteur.²⁴

Les catalases

Les CAT sont des enzymes ayant pour mission de réguler les concentrations en H_2O_2 . Elles sont localisées au sein des peroxysomes étant donné que l' H_2O_2 y est produit par les flavines, la glucose oxydase, l'urate oxydase ou encore la D-aminoacide-oxydase. Pour ce faire, les CAT possèdent un groupe hème au sein du site actif de leur structure dimérique capable de catalyser la dismutation du H_2O_2 en H_2O et en O_2 :^{23,25,26}



Cependant, ce sont préférentiellement des hauts niveaux de H_2O_2 intracellulaire qui entraînent l'activation des CAT, tandis que les plus faibles seront traités par les GPX.

Le glutathion et ses enzymes

Le glutathion (GSH) est un pseudo-tripeptide composé de trois acides aminés (Figure 4).^{27,28} En raison du résidu cystéine, le GSH est facilement oxydé de manière non-enzymatique en disulfure de GSH (GSSG), par exemple par des radicaux libres et des ROS.

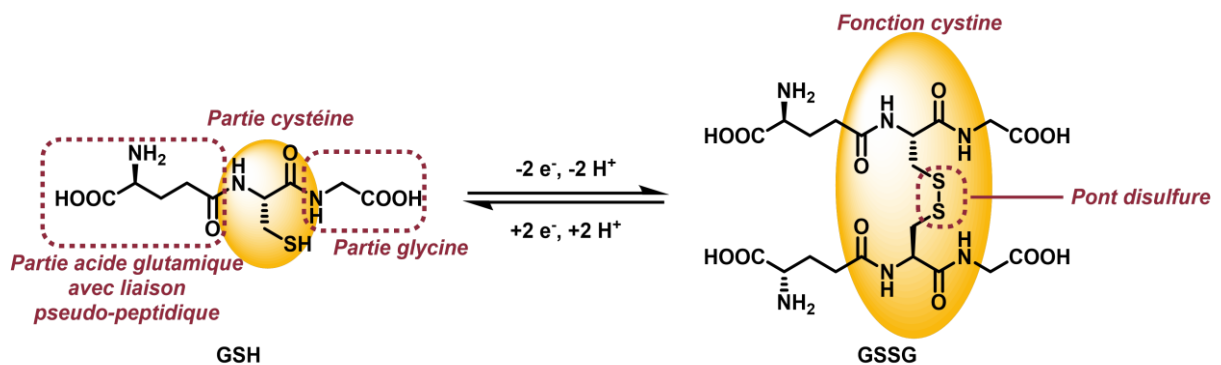


Figure 4 : Schéma illustrant la structure du GSH et son équilibre rédox formant le dimère GSSG relié par un pont disulfure

Le GSH est l'agent antioxydant endogène le plus largement impliqué lors des mécanismes de détoxification de l'organisme de par (i) ses propriétés rédox permettant de réduire les ROS, (ii) sa capacité à être régénéré et (iii) son efficacité à piéger d'autres radicaux libres ou à réagir avec des xénobiotiques afin de pouvoir facilement les excréter. Cette dernière fonction est notamment assurée *via* l'action de la GST.^{23,28,29} Dans un premier temps, la GST a un rôle indirect sur la détoxification en assurant le transport intermembranaire de son cofacteur GSH qui va être actif. La GST permet ainsi la réaction du GSH avec les xénobiotiques organiques de par la formation d'une liaison covalente qu'ils soient électrophiles ou radicalaires. Dans les mécanismes radicalaires impliquant les cystéines et les groupements thiols en général, la formation de radicaux thiyles permet d'effectuer une réaction de recombinaison radicalaire.²⁹ Si le xénobiotique est un métal, la GST assure aussi la formation d'une liaison de coordination stable entre le GSH et le métal. Par après, l'adduit GS-xénobiotique est susceptible d'être éliminé *via* des transformations menant à un adduit hydrosoluble dérivé de l'acide mercapturique capable de partir notamment dans les urines (Figure 5).^{30,31}

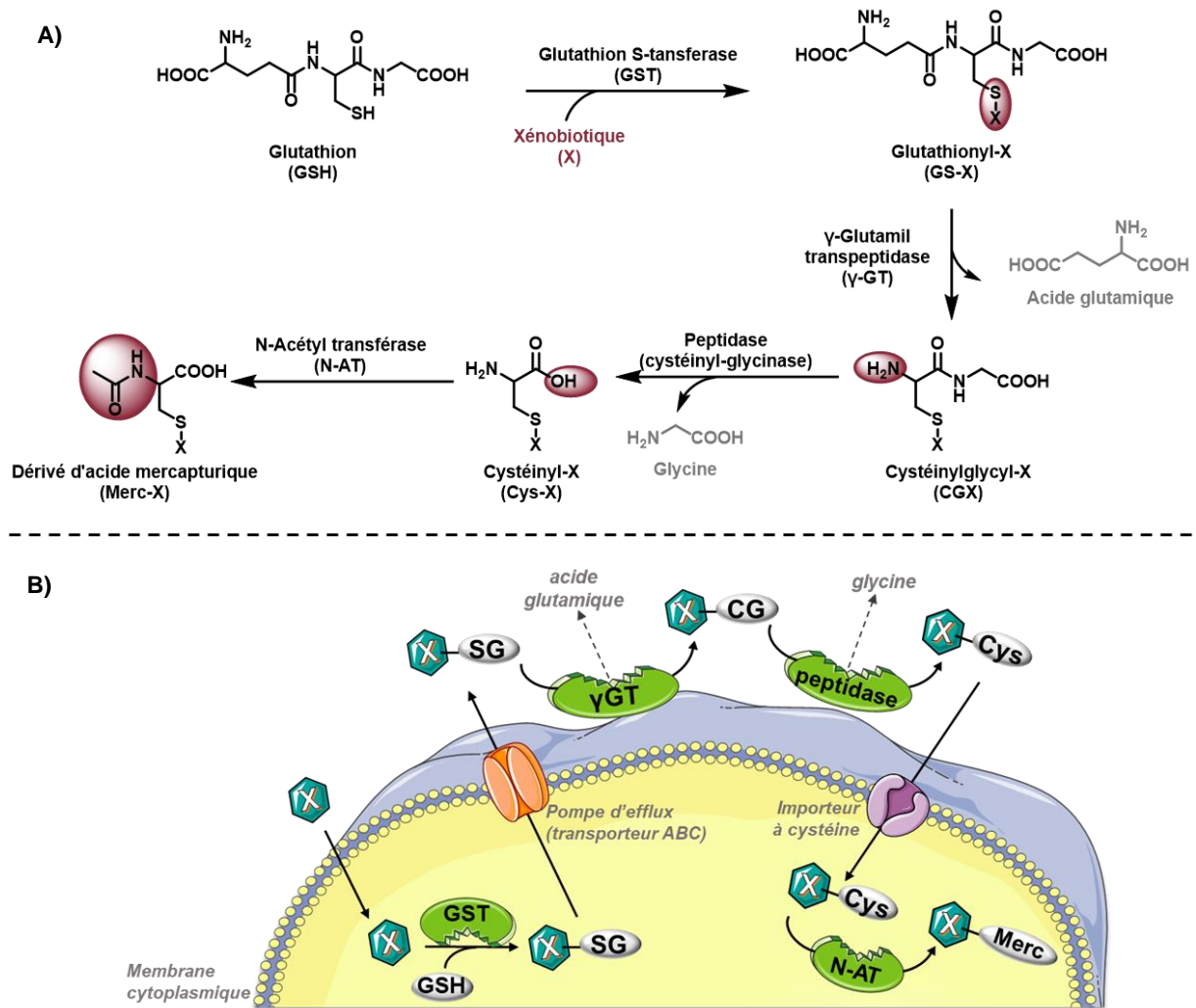


Figure 5 : Illustration du fonctionnement des mécanismes de détoxification, (A) chimique et (B) biologique, d'un xénobiotique par le GSH

La GPX, découverte en 1957 par Mills, a une fonction redondante avec celle des CAT.³² En effet, la GPX sert également à neutraliser le H_2O_2 présent dans l'organisme. Utilisant le GSH comme cofacteur, ce dernier va se retrouver oxydé en GSSG afin de réduire le H_2O_2 en H_2O . Cette enzyme, bien qu'elle agisse avec une cinétique plus lente que les CAT, se révèle avoir une plus grande affinité avec les substrats oxygénés sous forme de H_2O_2 mais aussi sous forme d'hydroperoxyde organique (ROOH) qui se réduit alors en alcool (ROH). Pour effectuer cette réduction enzymatique, la GPX est une enzyme composée de quatre unités n'utilisant pas que le GSH mais aussi du sélénium au sein du site actif et provenant des sélénocystéines présentes dans chacune des unités de l'enzyme (Figure 6).^{23,33}

D'autres défenses antioxydantes existent aussi au sein de l'organisme. En effet, d'autres enzymes et protéines comme les métallothionéines peuvent également réduire et neutraliser, ou encore, permettre l'excrétion et le phagocytage de substances prooxydantes. Cependant, il a été montré avec les GR et les G6PD que certains de ces systèmes antioxydants peuvent

aussi avoir des actions plus indirectes, en assurant par exemple le transport, le stockage et la régénération du matériel antioxydant de la transferrine ou de la ferritine.³⁴

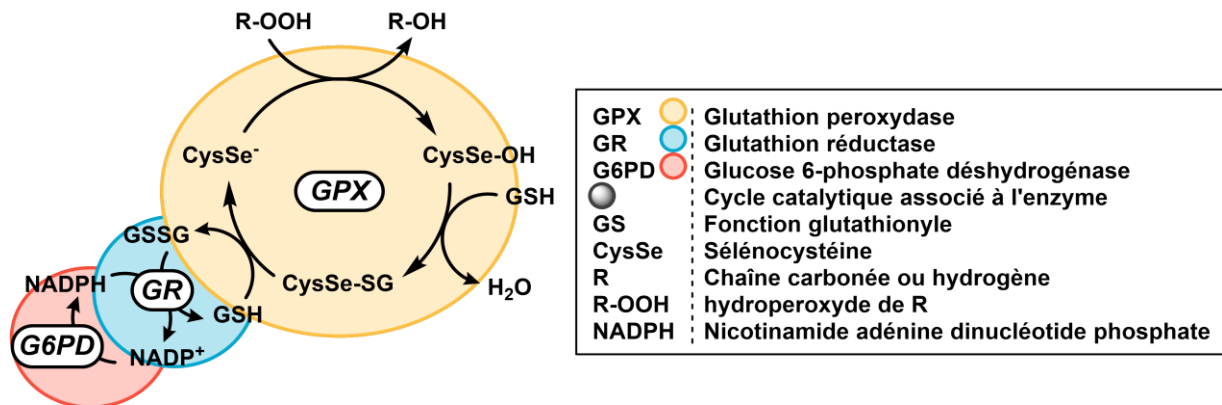


Figure 6 : Mécanismes catalytiques concertés des enzymes GPX, GR et G6PD permettant la régénération du GSH après son action antioxydante vis-à-vis des peroxydes. L'ATP représentant la source d'énergie essentielle au métabolisme pour réaliser, entre autres, les réactions biochimiques thermodynamiquement défavorables, la régénération du GSH représente en conséquence un coût moins cher en énergie.

2.2.2. Les agents antioxydants exogènes

Bien que l'organisme possède un système de défense lui permettant de lutter contre le stress oxydant, celui-ci n'est pas toujours suffisant. Les antioxydants non-enzymatiques et non-protéiques peuvent dans certains cas être biosynthétisés par le métabolisme, mais dans la plupart des cas ils sont apportés par voie exogène afin d'aider le vivant à lutter contre les effets prooxydants. C'est dans l'alimentation majoritairement que le corps trouve les nutriments antioxydants nécessaires. Il est possible de trouver ces substances dans d'autres organismes telles que les plantes afin de pouvoir en récolter les bienfaits et bénéfiques. Ces antioxydants ont aussi l'avantage de pouvoir régulièrement être utilisés par exemple pour préserver de nombreux produits de consommation de la vie de tous les jours (e.g., conservateurs alimentaires de type E 3xx³⁵ ou conservateurs cosmétiques) en plus des potentielles propriétés curatives qui sont souvent utilisées dans des médicaments et pommades. Ces additifs peuvent se regrouper en plusieurs catégories.

Oligoéléments

Les oligoéléments se trouvent sous forme de sels inorganiques soit de sels minéraux et sont nécessaires à la vie d'un organisme. Ils doivent être apportés *via* l'alimentation afin d'en éviter la carence. Étant essentiels à l'organisme mais de manière peu abondante (en quantité inférieure à 1 ppm, soit 1 mg de sel pour 1 kg de masse corporelle) il est toutefois nécessaire d'en éviter l'excès. Ils sont impliqués de manière importante dans l'homéostasie énergétique de l'organisme. Ils sont, en effet, souvent utilisés dans les réactions enzymatiques du métabolisme en qualité de cofacteur d'enzymes antioxydantes. Il est possible de citer ceux

contenant le cuivre, le manganèse, le zinc, le fer ou encore le sélénium comme il a été montré dans le cas des métalloenzymes citées précédemment.³⁶

Les oligoéléments sont donc principalement des métaux ou des métalloïdes. Ils présentent des propriétés rédox essentielles dans certaines réactions métaboliques de transfert d'électrons pour la neutralisation de composés oxydants ou l'inhibition d'effets prooxydants. De fait, les oligoéléments sont souvent impliqués dans les systèmes enzymatiques une fois internalisés par l'organisme. Ces sels minéraux n'étant que rarement sous forme d'ions-libres dans l'organisme, ils se retrouvent liés à des protéines soumises à l'adoption d'une structure quaternaire compatible, formant les complexes des métalloprotéines.³⁶

Vitamines

Les vitamines sont des substances organiques ne pouvant pas être biosynthétisées en quantités suffisantes par l'organisme bien que nécessaires. Elles sont classées en deux groupes principalement : les vitamines liposolubles qui se stockent dans les graisses, et les vitamines hydrosolubles non-stockables et traitées par les reins afin d'être éliminées par voie urinaire. Les vitamines ont des fonctions diverses (*e.g.*, coenzyme) et pour certaines ce sont des agents antioxydants exogènes incontournables comme les vitamines A, B, C et E (Figure 7).^{37,38}

Les vitamines A ou les provitamines A (précurseurs des vitamines A) ont été identifiées comme jouant un rôle utile notamment contre le vieillissement de la peau dès 1984 chez des souris photo-exposées.³⁹ Parmi les précurseurs des vitamines A, les plus connus sont les caroténoïdes et notamment le β -carotène. Subdivisés en deux groupes, les carotènes (totalement lipophiles) et les xanthophylles (porteurs de substituants oxygénés), les caroténoïdes sont présents dans un grand nombre de fruits et de légumes, et agissent comme pigment apportant une couleur de jaune à rouge. Ces propriétés pigmentaires sont notamment dues à leurs structures polyéniques possédant un système conjugué contenant entre sept et quinze liaisons- π . Outre les propriétés pigmentaires, les caroténoïdes se révèlent efficaces vis-à-vis de la neutralisation des ROS principalement aussi dû à la présence de ces nombreuses doubles liaisons conjuguées. Ils agissent au travers de trois mécanismes : (i) l'abstraction d'un hydrogène, (ii) le transfert électronique (*i.e.*, SET, *cf.* Tableau 1), ou encore (iii) le greffage de l'espèce oxydante sur la structure (*i.e.*, AR, *cf.* Tableau 1) (Figure 7).^{38,40}

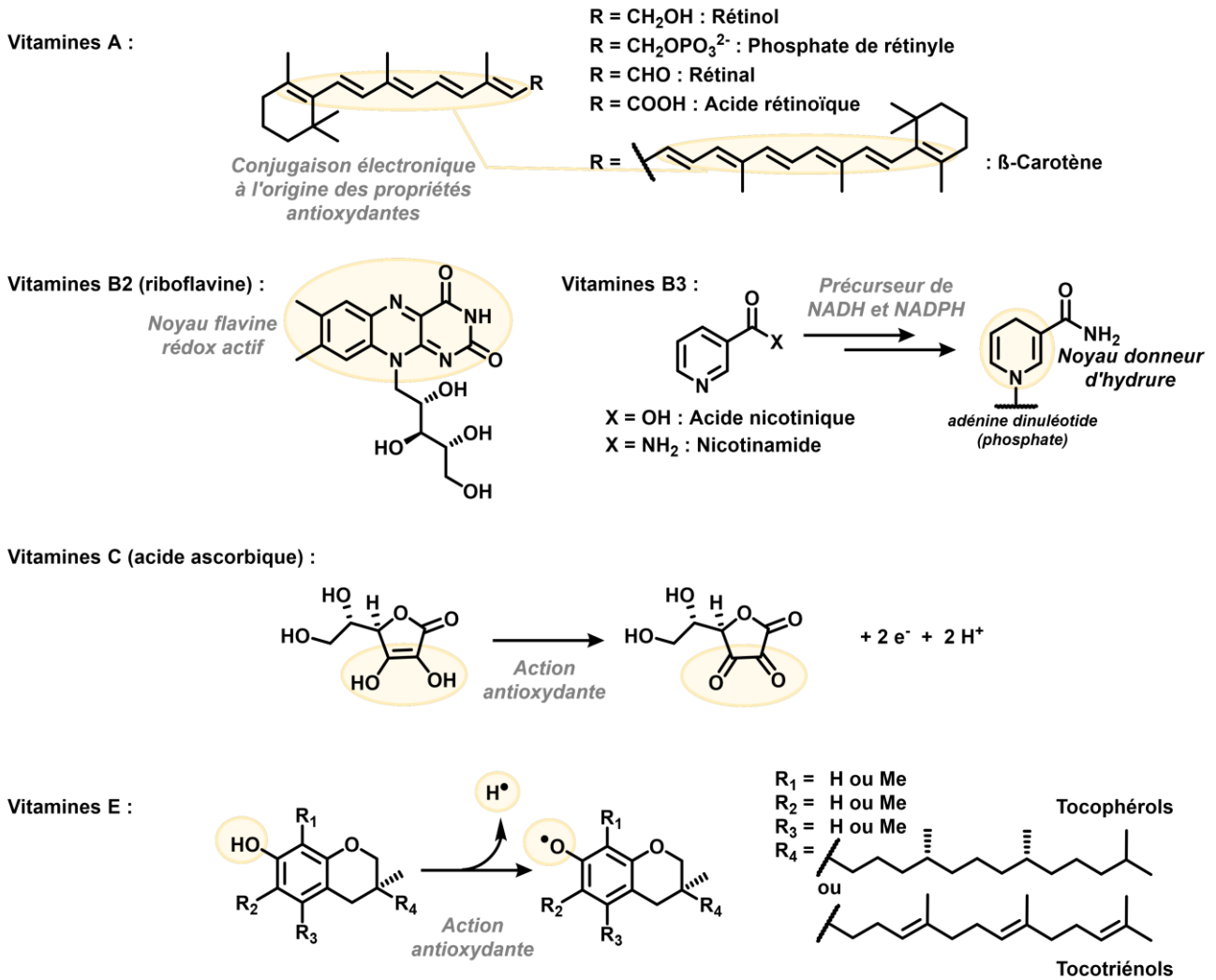


Figure 7 : Les différentes vitamines antioxydantes et la source de leur pouvoir antioxydant (encerclée en jaune)

Les vitamines B sont principalement impliquées dans la production d'énergie. Elles servent également au renouvellement cellulaire, au maintien de la peau (élasticité, hydratation, solidité...) et au bon fonctionnement du système immunitaire. Parmi les différentes vitamines B qui existent, les vitamines B2 (riboflavine) et B3 (acide nicotinique et nicotinamide) présentent un intérêt antioxydant particulier. Ce sont des précurseurs de la flavine adénine dinucléotide (FAD), de la nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et du NADPH (Figure 7) qui sont impliqués dans de nombreuses oxydoréductases (couples FAD/FADH₂ et NAD(P)⁺/NAD(P)H).

La vitamine C, ou acide L-ascorbique, est un antioxydant de la classe des vitamines hydrosolubles. En effet, composé d'une fonction ène-diol au sein de sa structure cyclique de type γ-butyrolactone, ainsi que d'une chaîne 1,2-dihydroxyéthyle en position α, l'acide ascorbique présente suffisamment de groupements polaires capables de former des liaisons

hydrogènes pour lui permettre de se déplacer dans le sang et d'être diffusé dans les tissus de manière variable (Figure 7). Il se retrouve ainsi présent dans le cytosol, le fluide extracellulaire, les muscles ou encore le foie après son apport *via* l'alimentation, notamment de fruits et de légumes. Cet apport est nécessaire chez l'Homme ne pouvant pas le synthétiser (*i.e.*, absence de la gluconolactone oxydase), contrairement à la plupart des plantes et autres animaux. Or, l'acide ascorbique est un antioxydant efficace, capable de directement réagir et piéger les ROS tels que le $O_2^{\cdot-}$, le radical hydroxyle (HO^{\cdot}), l'oxygène singulet (1O_2) ou de réduire le H_2O_2 . Par ailleurs, la vitamine C présente également un effet antioxydant indirect étant capable de régénérer d'autres antioxydants après leur utilisation. C'est le cas par exemple des tocophérols et des tocotriénols (vitamine E).^{38,41}


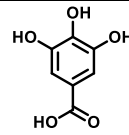
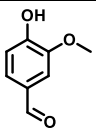
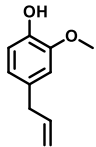
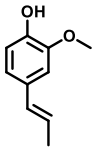
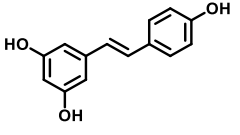
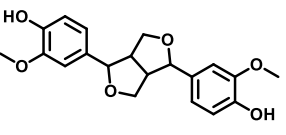
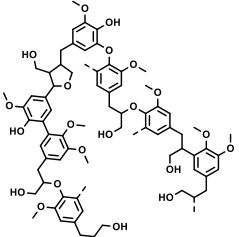
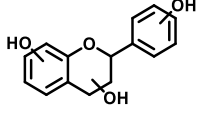
Les vitamines E correspondent à un ensemble de huit molécules organiques liposolubles. Parmi elles il y a les tocophérols, dont le plus connu est l' α -tocophérol étant le plus actif biologiquement, et il y a les tocotriénols qui sont plus rares. Les vitamines E sont stockées dans les tissus adipeux et se retrouvent sur les membranes cellulaires ou dans celles des organites cellulaires (dans les membranes externes des mitochondries et du réticule endoplasmique). Elles sont composées d'une chaîne aliphatique (pouvant posséder trois insaturations dans le cas des tocotriénols) reliée à un squelette chromane contenant une fonction hydroxy sur le noyau aromatique et pouvant comporter des substituants méthyles en fonction du composé (Figure 7). Ce sont donc des dérivés chromane et donc de phénol *per se*. Ainsi, de par cette partie phénolique les vitamines E présentent une bonne activité antioxydante. Étant liposolubles, elles sont principalement impliquées dans la réduction des hydroperoxydes lipidiques résultant de leur peroxydation. Le tocophérol présente un fort pouvoir antioxydant étant capable de neutraliser divers radicaux libres tels que les radicaux peroxydes, hydroxyles ou encore alkyles par la libération de l'hydrogène phénolique, ainsi que par la stabilité du radical phénoxy (PhO^{\cdot}) formé. Comme énoncé précédemment, les tocophérols peuvent ensuite être régénérés par la vitamine C à la surface des membranes cellulaires, et ils peuvent aussi être régénérés par le GSH pour générer du GSSG.^{38,42,43}

Les phénols et les polyphénols

Les groupements phénol ($PhOH$) présentent un rôle antioxydant comme montré ci-dessus dans le cas des vitamines E. L'une des plus grandes familles d'antioxydants non-enzymatiques et non-protéiques est celle des polyphénols. Les polyphénols se trouvent en très grande partie au sein du règne végétal où ce sont des métabolites secondaires, majoritairement des phénylpropanoïdes comme l'eugénol et l'isoeugénol.¹ Ces composés forment un ensemble vaste et varié de molécules comportant au moins un groupe phénolique au sein de leur structure moléculaire. Ils sont classés en deux grandes catégories, les flavonoïdes et les non-flavonoïdes, eux-mêmes subdivisés en différents familles de composés

en fonction de leur géométrie moléculaire. Ayant un squelette (flavonoïdes ou non) qui peut varier de par le degré de polymérisation, des substitutions, cyclisations produites et des fonctions chimiques présentes en plus du noyau phénolique (Tableau 2).^{44,45}

Tableau 2 : Principales classes de phénols et de polyphénols

Squelette	Classe	Exemples de structures
C_6	Phénols simples	C_6 :  Catéchol C_6-C_1 :  Acide gallique  Vanilline
C_6-C_n	Phénols alkylés ou substitués	C_6-C_3 :  Eugénol  Isoeugénol
$C_6-C_2-C_6$	Stilbènes	 <i>trans-Resvératrol</i>
$(C_6-C_3)_n$	Lignines (Polymères de C_6-C_3) $n = 2$: Lignane	 Pinorésinol (lignane)  Fragment possible de Lignine
$C_6-C_3-C_6$	Flavonoïdes	 Squelette Flavonoïde Noyau Flavane
$(C_{15})_n$	Tanins (Polymères de diverses sous-unités)	<i>Gallotanins (acides galliques autour du glucose)</i> <i>Ellagitanins (dimères d'acide gallique autour du glucose)</i> <i>Tanins condensés (oligomères de flavanols)</i> <i>Tanins complexes (mélange gallo-/ellagitanin et catéchine)</i>

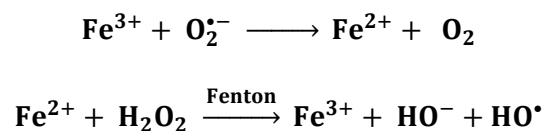
Les flavonoïdes ($C_6-C_3-C_6$) sont les plus répandus au sein même des plantes. Ils sont composés de deux cycles aromatiques reliés par trois atomes de carbone. Dans de nombreux cas les trois atomes de carbone forment un cycle pyrane avec un des deux groupements phényles auquel ils sont liés et un atome d'oxygène sur sa position en *ortho* formant une fonction flavane (2-phénylchromane), bien qu'il existe des exceptions (*i.e.*, les aurones, les chalcones et les dihydrochalcones). Les principaux flavonoïdes naturels possèdent tous un fragment phénolique par la présence d'au moins une fonction hydroxyle sur le cœur

aromatique du noyau flavane (cf. Tableau 2, Flavonoïdes). Ceux-ci sont répartis en six catégories : les flavanols, les flavanones, les flavonols, les flavones, les isoflavones et les anthocyanes.⁴⁵⁻⁴⁷

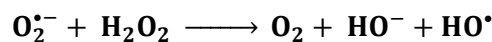
Les non-flavonoïdes naturels comptent principalement comme brique de base le motif phénolique PhOH simple ou substitué sous forme d'acide benzoïque tels l'acide *para*-hydroxybenzoïque, l'acide vanillique ou encore des acides hydroxycinnamiques. La biosynthèse des phénylpropanoïdes montre que l'acide *para*-coumarique est également un intermédiaire clé à la formation d'autres composés (cf. Figure 1).¹ Puis, suite à diverses actions enzymatiques et métaboliques ces briques de base peuvent polymériser, être plus ou moins substituées et avoir la fonction acide réduite afin de mener à la formation d'autres polyphénols. C'est ici, dans cette classe de molécules, que se situent l'eugénol et l'isoeugénol de structure C₆-C₃ et qui présentent également un pouvoir antioxydant.^{44,45}

Le pouvoir antioxydant des polyphénols, qu'ils soient flavonoïdes ou non-flavonoïdes, se manifeste sous plusieurs formes. Les polyphénols sont capables (i) de complexer, voir chélater, les ions métalliques qui peuvent présenter des propriétés rédox prooxydantes (e.g., *ortho*-alkoxyphénols, flavonoïdes...), (ii) d'inhiber certaines enzymes susceptibles de former notamment des ROS (inhibition de la xanthine oxydase par l'eugénol), ou de manière plus intéressante et directe (iii) de réduire directement les radicaux libres.⁴⁵

Il a été montré que la présence d'ions métalliques en milieu biologique peut avoir un effet oxydant et cytotoxique. Dans le cas du fer notamment, des réactions telle que la réaction de Fenton au sein du système réactionnel de Haber-Weiss peut s'opérer :⁴⁸



Produit net du système de Haber-Weiss :



D'autres métaux et notamment le système Cu²⁺/Cu⁺, peuvent également induire la réaction de type Fenton. Ceci entraîne la conversion du H₂O₂ (considéré comme faiblement toxique dû aux différents mécanismes de détoxification) en radical HO[•] qui présente des effets délétères forts en comparaison. La complexation de ces métaux de transition par effet chélatant des polyphénols permet ainsi de bloquer la réaction de Fenton contribuant directement à leur caractère antioxydant.⁴⁹

Le second mécanisme d'action antioxydant des polyphénols se produit au travers de l'inhibition d'enzymes oxydantes. Par exemple, la xanthine oxydase (XO) qui catalyse la

production du radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$ *via* la consommation d'hypoxanthine a été identifiée comme pouvant être inhibée par les polyphénols. La récente revue de Liu *et al.* illustre les avancées sur la compréhension de la structure des polyphénols qui permettent l'inhibition de la XO.⁵⁰ Cette inhibition compétitive a été montrée comme étant notamment le résultat de la formation de liaisons hydrogènes au sein du site actif de la XO due aux fonctions phénoliques ou méthoxy des polyphénols et les divers acides aminés des protéines. Dans certains cas l'inhibition s'est avérée irréversible, conséquence probable de la formation de liaisons covalentes au sein du site actif, bien que des zones d'ombres subsistent quant au mécanisme impliqué.⁵⁰

Enfin, le groupement hydroxyle des phénols (PhOH) peut être converti en radical phénoxy (PhO \cdot) suite à la libération d'un hydrogène provoquant son oxydation. C'est principalement par le don de cet hydrogène radicalaire que les polyphénols peuvent neutraliser les radicaux libres selon le mécanisme proposé par Sherwin en 1976 (Figure 8).⁵¹ Cette réaction d'oxydo-réduction est possible grâce à la stabilité du PhO \cdot due à la délocalisation possible de l'électron non-apparié au sein du cœur aromatique formant ainsi des intermédiaires radicalaires carbonés. Dans le cas où des substituants sont conjugués au groupement aromatique, cette délocalisation peut s'étendre formant davantage de radicaux carbonés. C'est par exemple le cas de l'isoeugénol. Par ailleurs, une réaction radicalaire de terminaison est susceptible de faire dimériser les intermédiaires radicalaires oxygénés ou carbonés dérivés des radicaux PhO \cdot . Ceci a été notamment montré dans les travaux de Bortolomeazzi *et al.* qui ont décrit la formation de dimères de l'eugénol et de l'isoeugénol à partir des différents radicaux carbonés formés (Figure 8).⁵²

Les composés alkoxyphénoliques comme l'eugénol et l'isoeugénol ont également la possibilité d'évoluer au travers d'autres mécanismes pouvant expliquer leurs propriétés. Ceux-ci peuvent avoir lieu par (i) voie enzymatique (*e.g.*, déméthylase), (ii) β -scission libérant un radical méthyle ou encore (iii) la libération d'un hydrogène sur une chaîne aliphatique.⁵³ En effet, la littérature propose, dans le cas de l'eugénol et de l'isoeugénol, la production d'une forme d'oxydation finale de type *ortho*-quinone par oxydation enzymatique ou β -scission (Figure 9a et 9b), mais aussi la formation d'une *para*-méthylène quinone dans le cas d'une nouvelle action antioxydante *via* abstraction d'un hydrogène de la chaîne allylique (Figure 9c). Il a été montré que cette forme de méthylène quinone peut se former majoritairement dans le cas de l'eugénol où la conjugaison de deux doubles liaisons- π du substituant en position *para*- du cycle aromatique renforcerait sa stabilité. En revanche, la formation de la méthylène quinone ne semble pas être favorable dans le cas de l'isoeugénol qui a déjà une conjugaison de son substituant en *para*- avec le noyau phénolique.^{13,53-55}

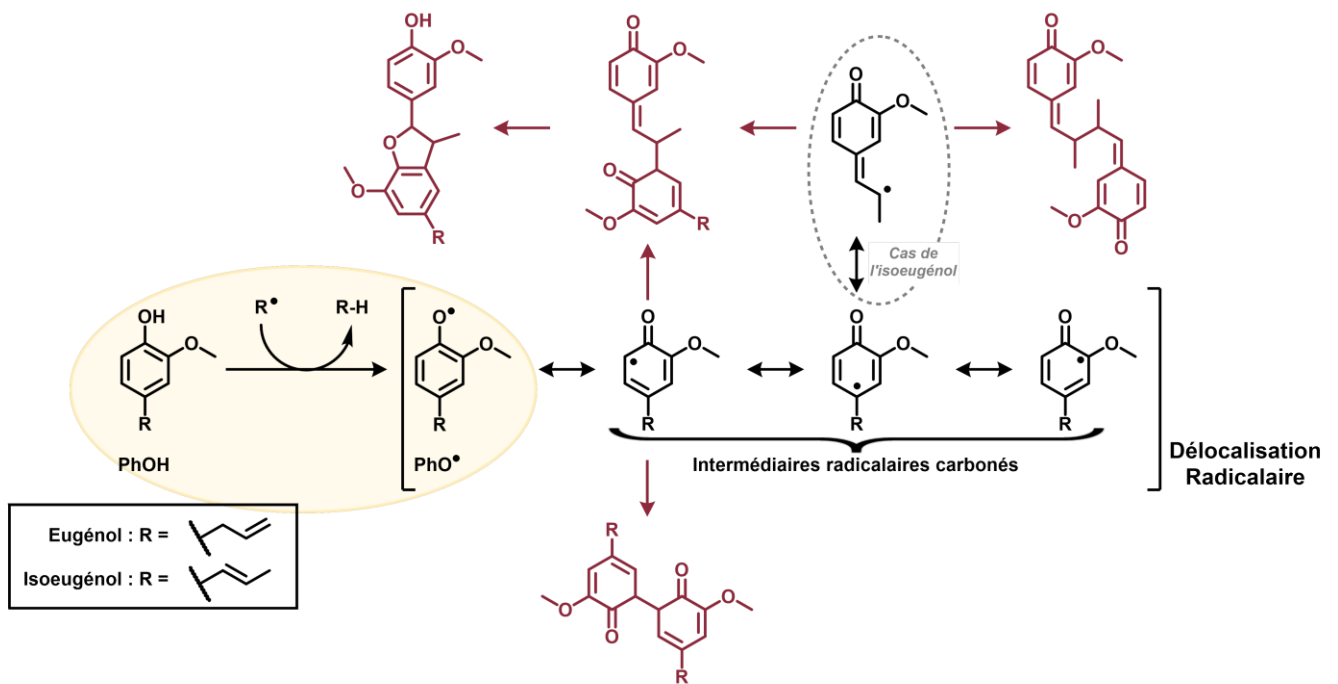


Figure 8 : Mécanisme de neutralisation des radicaux libres R^\bullet (entouré en jaune) par les polyphénols tel que l'eugéno! et l'isoeugéno! et évolution du radical PhO^\bullet (produits de dimérisation des intermédiaires carbonés en rouge)

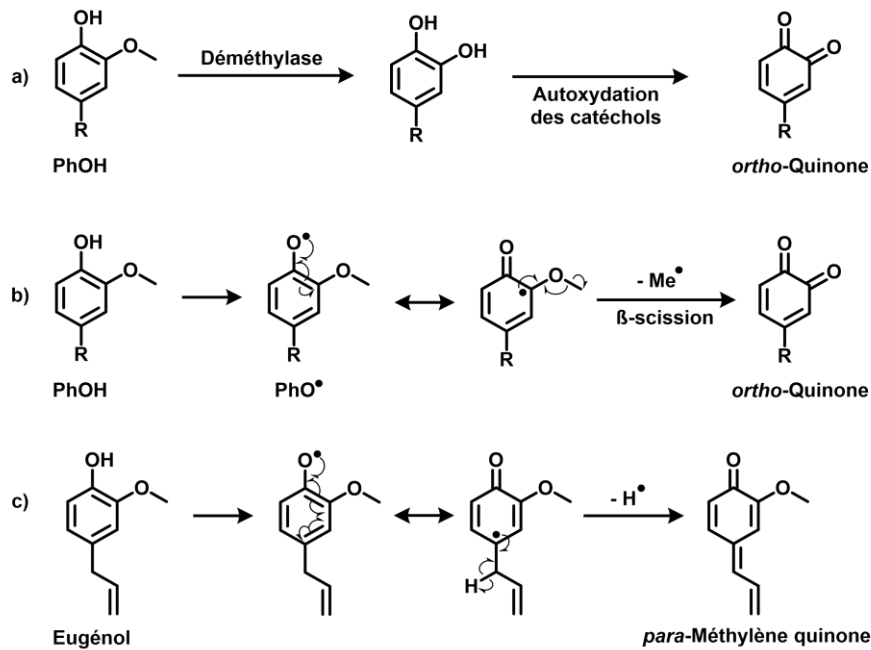


Figure 9 : Mécanismes d'oxydation des ortho-alkoxyphénols menant à (a) une *ortho*-quinone suite à l'action d'une déméthylase pour former un cœur catéchol qui peut s'autoxyder ou à (b) une *ortho*-quinone formée par β -scission radicalaire ou encore à (c) une *para*-méthylène quinone dans le cas de l'eugéno!

2.2.3. Mesure du pouvoir antioxydant

Une espèce antioxydante est identifiable à sa capacité à inhiber partiellement ou totalement un système prooxydant ou l'oxydation directe d'un substrat. Il peut s'agir d'un système enzymatique à inhiber, d'une oxydation métallique, d'une catalyse oxydante organique ou même d'une neutralisation de radicaux libres. La compréhension du potentiel antioxydant d'une espèce implique une étude mécanistique du système étudié. Cette étude peut s'articuler autour d'analyses du potentiel rédox par voltampérométrie cyclique, de calculs quantiques de densité électronique par des calculs de *Density Functional Theory* (DFT), de cristallographie d'enzymes en présence ou non d'antioxydant, ou encore d'autres analyses utilisant diverses spectroscopies combinées à, par exemple, des substitutions isotopiques. La compréhension mécanistique de la capacité antioxydante d'une molécule permet une première appréciation des conditions favorisant l'effet antioxydant et celles conduisant à de probables effets cytotoxiques. Enfin, l'évaluation spécifique du pouvoir antioxydant d'une espèce est soumise principalement à d'autres tests de référence tels l'inhibition du système enzymatique XO, le piégeage de radicaux 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyles (DPPH[•]) ou d'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS[•]), l'*Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC) ou encore le *Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter* (TRAP).

La XO catalysant l'oxydation de l'hypoxanthine puis de la xanthine pour former de l'acide urique *via* l'utilisation d'oxygène qui formera de l'O₂^{•-}, l'évaluation du pouvoir inhibant d'un substrat peut se faire par le dosage de la quantité d'acide urique produit par une mesure d'absorption UV (λ_{\max} d'absorbance de l'acide urique : 290 nm).⁵⁶ Ce test présente aussi l'avantage de pouvoir estimer le pouvoir de piégeage vis-à-vis du radical O₂^{•-} formé. En effet, il a été montré que le radical O₂^{•-} peut réagir avec de l'acide sulfanilique, de la *N*-(1-naphtyle)-éthylènediamine et de l'acide acétique. Cette réaction générant un produit de coloration rosée (λ_{\max} d'absorbance : 550 nm), il est possible de doser le radical O₂^{•-} qui n'a pas été consommé par l'action antioxydante de l'espèce testée.⁵⁷

De la même manière, la mesure du pouvoir antioxydant d'une espèce est communément effectuée au travers de l'évaluation de sa capacité à piéger ou à désactiver d'autres espèces radicalaires de référence par un test de *Free-Radical Scavenging* (FRS). Ainsi, le piégeage du radical DPPH[•] ou du radical ABTS[•] par un radical H[•] issu d'une espèce antioxydante qui mène à leur neutralisation induit un changement de couleur de ces espèces. Le DPPH[•] de couleur violette (λ_{\max} d'absorbance : 517 nm) devient incolore lorsqu'il est réduit permettant ainsi son dosage spectrophotométrique.⁵⁸ Sur le même principe, la mesure du FRS de l'ABTS[•], de couleur bleue lorsqu'il est sous la forme de radical cationique (λ_{\max} d'absorbance : 734 nm), va perdre en couleur durant sa réduction (Figure 10).⁵⁹

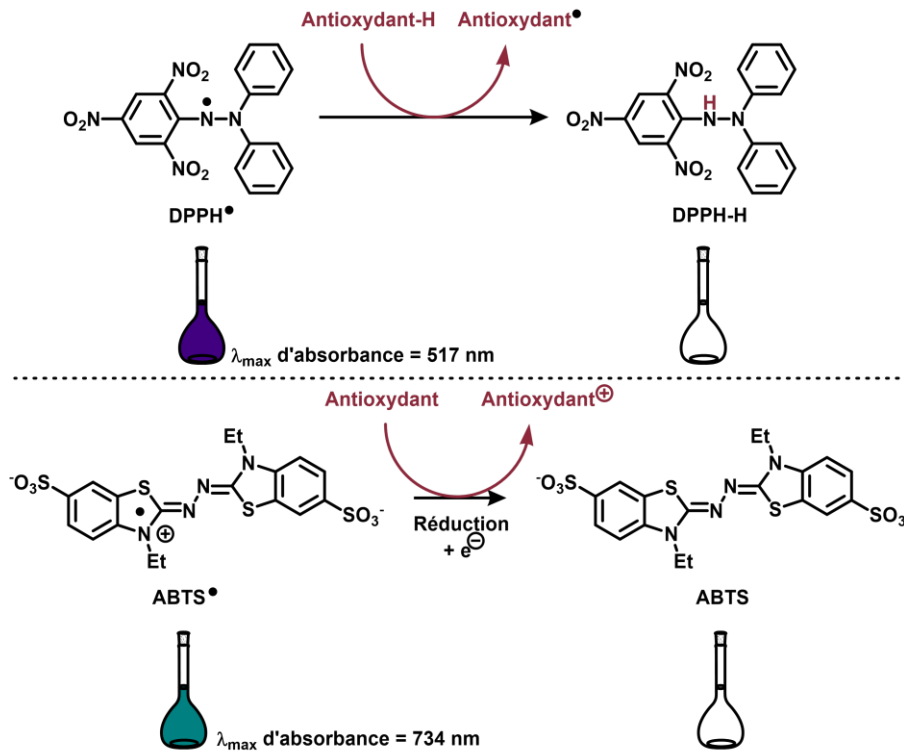


Figure 10 : Mesure du pouvoir antioxydant par *Free Radical Scavenging* (FRS) du DPPH• ou de l'ABTS•

Le TRAP est un test établi en 1985 par Wayner visant à mesurer la quantité de dioxygène consommé lors d'une peroxydation lipidique.⁶⁰ Pour ce faire, le dichlorohydrate de 2,2'-azobis-2-aminidinopropane (AAPH) réagit naturellement avec deux molécules d'O₂ afin de thermiquement (37 °C) se dégrader en deux radicaux 2-peroxyde de 2-aminidinopropane (AAPOO•). Cette consommation en O₂ était mesurée historiquement à l'aide d'une électrode thermostatée à oxygène. Cependant, au vu de la stabilité discutable de l'électrode sur la durée, la méthode a évolué vers une mesure indirecte consistant à observer l'augmentation en chimioluminescence lorsque du luminol est en contact avec des radicaux peroxydes.⁶¹ Le couple AAPH/AAPOO• se retrouve également impliqué dans l'ORAC, un autre test similaire de mesure du pouvoir antioxydant. Cependant, contrairement à la version améliorée du TRAP, l'ORAC se base sur l'observation de la diminution de la fluorescence d'une sonde (fluorescéine ou son analogue dichloré) lorsque celle-ci est en contact avec du AAPOO•.⁶² Dans l'ORAC, un composé antioxydant induira une perte de fluorescence due à la neutralisation du radical peroxyde (Figure 11).

D'autres essais ont été développés se basant toujours sur les propriétés rédox des espèces (de test ou antioxydantes) visibles par spectroscopie, que ce soit au travers de la réduction d'ions métalliques (e.g., le *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP)⁶³, *CUPric Reducing Antioxidant Capability* (CUPRAC)⁶⁴...), ou par des composés organiques et enzymes menant à l'inhibition et à la neutralisation des radicaux libres. Toutes ces différentes

mesures du pouvoir antioxydant permettent d'adapter ensuite les quantités optimales et/ou la nature des antioxydants utilisés, en corrélation avec leur fonction (médicaments, conservateurs alimentaires ou cosmétiques, anodes sacrificielles...) tout en évitant/limitant les effets secondaires. Finalement, en paraphrasant Paracelse « tout est poison et rien n'est sans poison ; la dose seule fait que quelque chose n'est pas un poison », il est nécessaire de comprendre les effets potentiellement indésirables et souvent délétères (prooxydant, cytotoxique ...) induits par l'action d'un composé antioxydant pour en optimiser son utilisation.

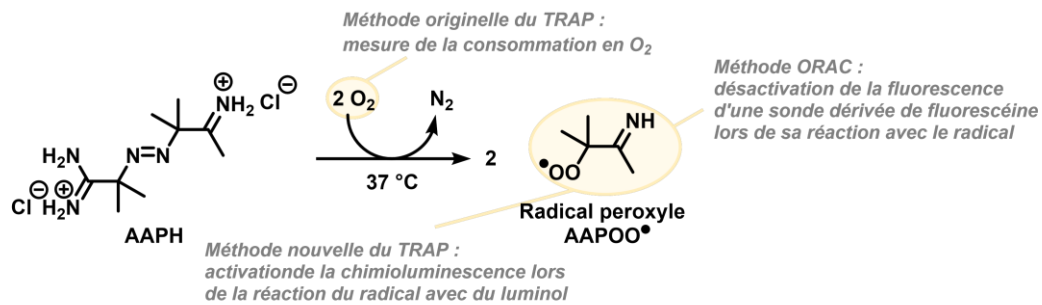


Figure 11 : Réaction de décomposition thermique de l'AAPH pour former le radical peroxy AAPOO• impliqué dans les mesures du pouvoir antioxydant TRAP et ORAC

3. L'allergie de contact (ADC)

Aujourd'hui près d'une personne sur cinq est allergique à au moins un allergène cutané. De ce fait, l'ADC est considérée comme l'expression d'immunotoxicité la plus fréquente chez l'Homme.^{65,66} En raison de la mise sur le marché croissante de composés chimiques dans les produits de consommation, ces proportions ont tendance à croître. Aujourd'hui, il existe plus de 3500 substances classifiées comme sensibilisantes que l'on retrouve dans d'innombrables produits manufacturés industriels ou usuels, tels les cosmétiques, les textiles, les produits ménagers, etc...⁶⁷ L'ADC est, en conséquence, un problème majeur de santé publique impactant de façon significative la qualité de vie des travailleurs ou des usagers atteints.

Seuls des traitements symptomatiques existent afin de soulager les symptômes cliniques de l'ADC. La prévention en évitant la substance en question reste le seul moyen aujourd'hui de contrer définitivement les symptômes cliniques. Ceci s'illustre notamment dans les directives et les législations Européennes obligeant l'industrie à procéder à l'évaluation circonstanciée des risques liés aux produits chimiques afin de protéger la santé humaine et l'environnement. Ainsi, l'Union Européenne a établi des législations fortes telles que le 7^{ème} Amendement à la Réglementation des produits cosmétiques, rendant obligatoire l'étiquetage de 26 substances odorantes sur les produits de consommation.⁶⁸

Gell et Coombs, furent les premiers à classer en 1963 l'ACD comme une réaction d'hypersensibilité de type retardée ou de type IV, une réaction immunitaire à médiation cellulaire reliée aux lymphocytes T.⁶⁹ *A contrario*, les autres réactions d'hypersensibilité décrites sont des réactions immunitaires à médiation humorale impliquant directement les lymphocytes B et les anticorps qu'ils produisent. L'ADC est une pathologie qui fait suite à une exposition répétée à un xénobiotique allergisant. La manifestation des symptômes cliniques apparaît entre 24 h et 72 h après une réexposition à l'allergène suite à en avoir été sensibilisé. S'ensuivent, d'un point de vue clinique, différents symptômes cutanés comme des rougeurs, des gonflements, des fortes démangeaisons ou encore de l'eczéma (Figure 12).^{69,70}



Figure 12 : Exemples de symptômes qui font suite à une dermatite de contact allergique induite par des produits cosmétiques (González-Muñoz *et al.*)⁷⁰

La chimie joue un rôle primordial dans la compréhension des mécanismes menant à l'ADC. En effet, la chimie moléculaire et supramoléculaire se retrouve impliquée tout au long du processus qui mène aux symptômes cliniques suite à un contact répété de l'allergène sur la peau.

3.1. La peau

De par sa masse et sa surface (*i.e.*, 4 à 5 kg pour 1,5 à 2 m²) la peau est l'organe le plus important (le plus lourd et le plus étendu) chez l'Homme.⁷¹ *Per se*, elle constitue la première barrière entre le corps humain et son environnement. Cet organe présente des propriétés permettant d'assurer la protection des tissus et des organes des agressions venant de l'extérieur (*e.g.*, rayons UV, pénétration de corps étrangers ou xénobiotiques, chocs, régulation de la température corporelle, *etc.*). Par ailleurs, bien qu'assurant la séparation physique entre l'intérieur et l'extérieur du corps, la peau n'est pas totalement hermétique : elle est perméable, élastique et en constant renouvellement. De nombreux facteurs influencent la perméabilité de la peau vis-à-vis des molécules xénobiotiques (*e.g.*, taille et masse molaire (MW) de la molécule, polarité, degré d'ionisation, possibilité de former des liaisons hydrogène, lipophilie logP (partition octanol/eau)).^{72,73} La « règle des 5 de Lipinski » est un algorithme développé afin d'estimer la propension d'une molécule à franchir les barrières biologiques. Elle repose sur quatre conditions : MW < 500 Da, logP < 5, donneur de liaisons hydrogène < 5 et nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène < 10 (2 x 5).⁷⁴ Il s'agit d'une règle générale vis-à-vis de

tous types de barrière et elle peut se préciser en fonction de sa nature. Ainsi, afin d'accroître la diffusion par voie cutanée et donc le passage au travers de la couche la plus externe de la peau, le *stratum corneum* ou couche cornée, il est estimé que le xénobiotique se peut d'avoir un poids moléculaire supérieur ($MW < 1000 \text{ Da}$)⁷⁵ et une lipophilie adaptée permettant une solubilité dans l'eau suffisante sans pour autant empêcher la diffusion de ladite substance au travers des couches lipidiques ($\log P$ dans la gamme 1-3 idéalement mais pouvant s'étendre à -1,4-4).⁷⁶ Outre les xénobiotiques, la peau n'est pas non plus capable de filtrer de la même manière tout le spectre du rayonnement (Figure 13).⁷⁷

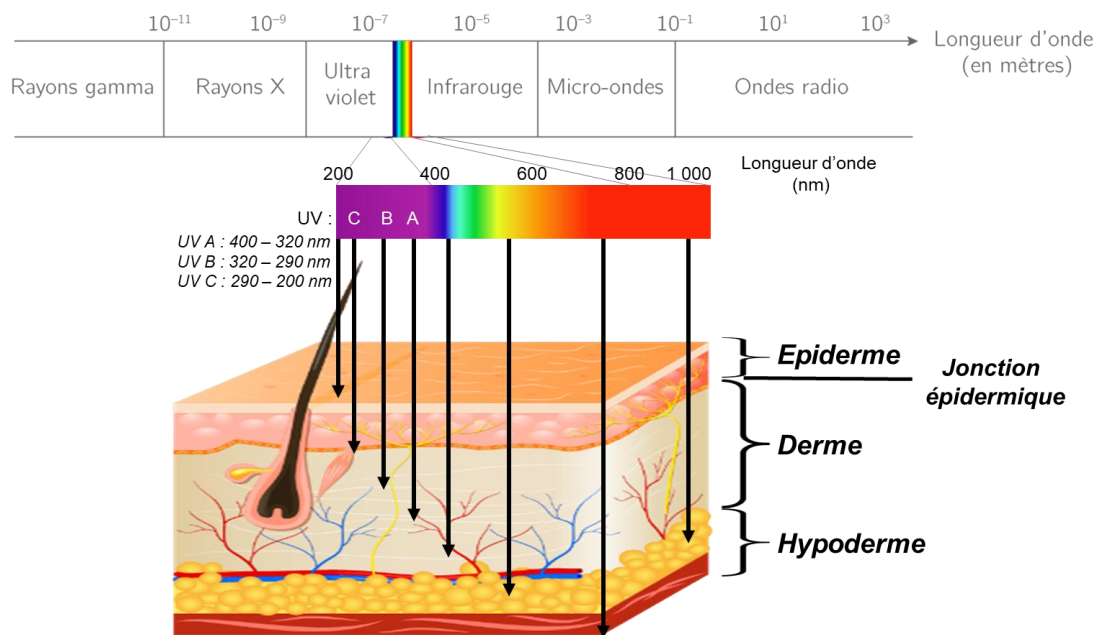


Figure 13 : Coupe histologique schématique de la peau et pénétration des rayonnements allant de l'UV au proche infrarouge (IR)

La peau laissant, malgré tout, entrer des xénobiotiques ainsi que des rayonnements, elle se doit d'avoir également un système de protection pour préserver l'intégrité structurelle du corps humain. Ainsi, la peau agit aussi comme un organe immunitaire *per se* où chaque partie est compartimentée et a son rôle. La peau est composée de trois couches principales : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure 13). Celles-ci font varier l'épaisseur de la peau entre 1,5 et 4 mm selon les régions du corps.⁷¹

L'épiderme est la couche superficielle la plus externe constituée principalement de kératinocytes (*i.e.*, environ 80% des cellules de cette couche). Ceux-ci sont produits dans la couche basale, strate la plus interne de l'épiderme localisée à la jonction épidermique puis se différencient dans les couches supérieures, s'aplatissent, meurent et s'agrègent pour former le *stratum corneum* sous forme d'empilement de cellules mortes liées par des filaments protéiques de filaggrine. Ces cellules mortes sont ensuite éliminées par desquamation et assurent le renouvellement continu de l'épiderme.⁷⁸ Outre les kératinocytes, l'épiderme est

également composé de cellules assurant la pigmentation (*i.e.*, les mélanocytes) en produisant de la mélanine, la perception sensorielle via des mécanorécepteurs (*i.e.*, les cellules de Merkel) et l'immunité grâce à la présence de cellules dendritiques (*e.g.*, les cellules de Langerhans) qui ont un rôle primordial quant aux réactions du système immunitaire.^{71,78}

Le derme, d'une épaisseur environ vingt fois plus grande que celle de l'épiderme, correspond à la couche intermédiaire de la peau. Il est constitué de fibroblastes riches en fibres de collagène, d'élastine et de réticuline conférant à la peau son élasticité et sa force. Le derme est également composé de cellules sanguines, d'artérioles et de veinules assurant la nutrition de l'épiderme.⁷¹

L'hypoderme est la couche la plus profonde de la peau et est constituée de manière similaire au derme mais enrichi de cellules adipeuses d'épaisseur variable selon les individus. Ce sont ces tissus graisseux qui permettent la protection vis-à-vis des variations de températures et des chocs.⁷¹

3.2. Le mécanisme de l'allergie de contact

L'ADC est une réaction d'immunotoxicité, et est donc le résultat d'une réaction immunitaire qui se déroule en deux phases distinctes : une phase dite de sensibilisation qui est asymptomatique et une phase d'élicitation, aussi appelé de révélation, symptomatique (Figure 14 adapté de Vileno *et al.*).^{79,80} Après pénétration de l'allergène dans l'épiderme, ces deux phases nécessitent une étape clé de nature chimique, appelée hapténisation, permettant la formation d'un complexe antigénique ou immunogène (*i.e.*, complexe haptène-protéine).

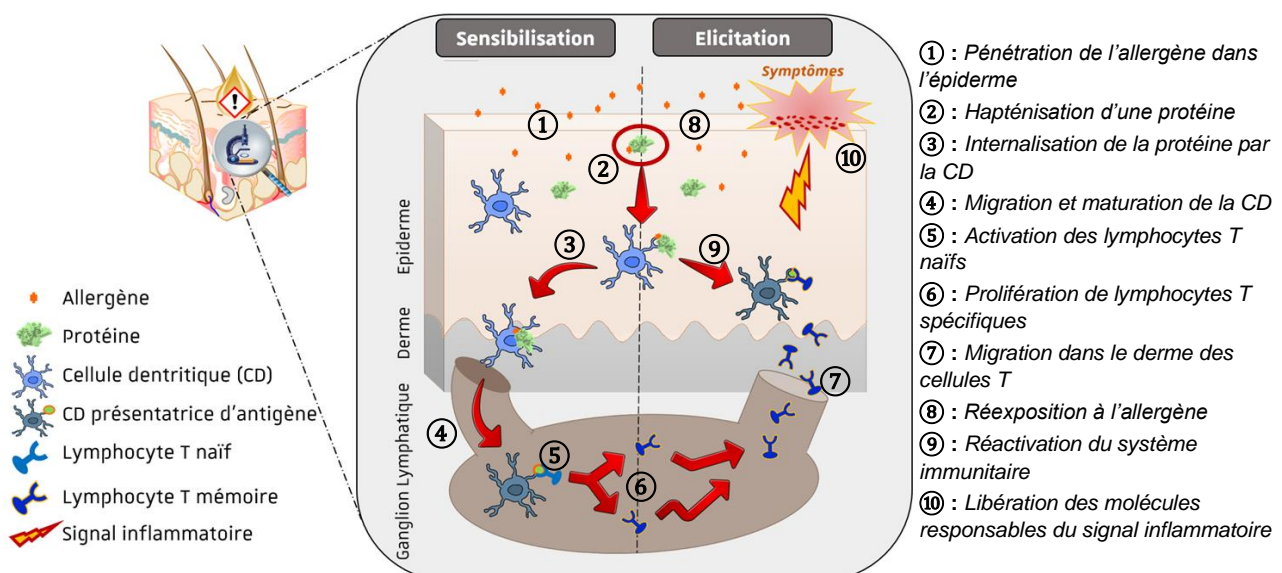


Figure 14 : Mécanisme menant à l'ADC adapté de Vileno *et al.*⁸⁰

3.2.1. Formation d'un complexe antigénique et théorie de l'haptène

L'allergène de contact ou haptène, comme désigné dans les années 1930 par Landsteiner et Jacobs,⁸¹ est un xénobiotique de faible poids moléculaire (*i.e.*, <1000 Da)⁸² et de lipophilie suffisante (*i.e.*, logP 1-3)⁷⁶ lui permettant de franchir la couche cornée et de pénétrer dans l'épiderme (Figure 14①). Néanmoins, l'haptène *per se* n'est pas capable seul d'activer le système immunitaire et de conduire à l'ADC. Il nécessite une étape préalable d'hapténisation des protéines cutanées (Figure 14②). Cette étape correspond à la formation d'une liaison stable entre l'haptène et une protéine endogène. De cette liaison résulte une modification de la structure initiale de la protéine formant ce qui est appelé un complexe antigénique, qui ne sera pas reconnu par l'organisme comme faisant partie du soi et initiera ainsi le processus menant à l'immunotoxicité.⁷⁹

Ce processus débute par la reconnaissance de l'entité antigénique immunogène par des cellules dendritiques (*e.g.*, les cellules de Langerhans) présentes dans la peau. Le mécanisme de l'ADC se différencie alors en deux phases.

3.2.2. La phase de sensibilisation

C'est après un premier contact de la peau avec l'allergène que cette phase est initiée aboutissant à la sensibilisation de l'individu. Aucun symptôme clinique n'est observable, mais c'est au cours de la sensibilisation que le processus biologique est activé par la création de ce qu'on appelle une « mémoire immunologique ». Le temps nécessaire est compris entre trois et quinze jours.⁸³

Après la formation du complexe antigénique celui-ci est reconnu par des cellules dendritiques (Figure 14③, 2 à 5% de la population cellulaire épidermique) très largement impliquées dans les réactions immunitaires. Ce sont elles qui remplissent principalement la fonction de cellules présentatrices d'antigène car ce sont les seules cellules de l'épiderme possédant des récepteurs membranaires spécifiques du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II).⁸⁴

De cette manière, les protéines hapténisées sont le plus souvent internalisées par des endosomes dans les cellules présentatrices d'antigènes (Figure 14③). Dans certains autres cas, l'allergène seul franchit la membrane de la cellule et hapténise une protéine du cytosol, ou encore, se fixe directement au CMH II. Ensuite, le complexe antigénique qui se trouve à l'intérieur de la cellule dendritique est « digéré » par des endopeptidases. Les cellules initient alors un processus de maturation et de migration vers les ganglions lymphatiques proximaux où elles exprimeront les fragments peptidiques hapténisés. (Figure 14④). Plus précisément, les peptides portant les modifications chimiques produites par l'haptène, aussi appelés

épitopes, vont se combiner au CMH II pour former un nouveau complexe, le réceptosome (Figure 15).⁸⁵

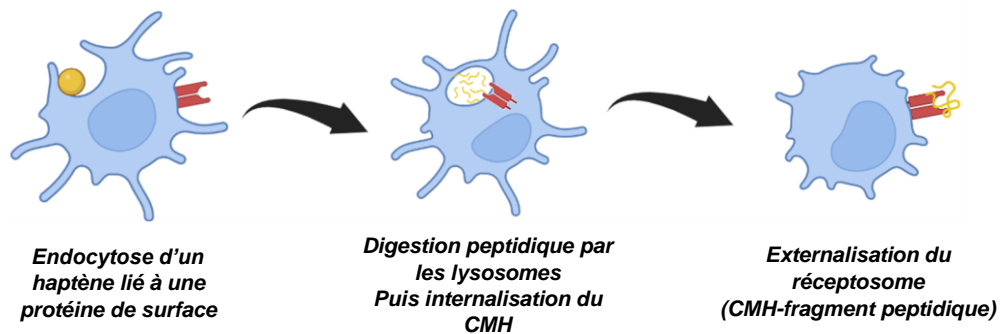


Figure 15 : Apprêtement de l'haptène après son internalisation par les cellules dendritiques menant à la formation du réceptosome

Le réceptosome sera externalisé à la surface de la cellule lui faisant perdre sa capacité à interagir avec un autre complexe antigénique, mais lui offrant la possibilité d'être reconnu par les récepteurs des lymphocytes T naïfs et de les stimuler (Figure 14⑤). Les cellules T naïves se différencient ensuite par expansion clonale et prolifèrent formant ainsi des nouveaux lymphocytes T mémoires et effecteurs spécifiques de l'antigène (Figure 14⑥) qui vont migrer dans le derme via les canaux lymphatiques efférents (Figure 14⑦). À ce stade, l'individu est considéré comme étant sensibilisé *ad vitam æternam* au composé allergène en question.⁷⁹

3.2.3. Phase d'élicitation ou de révélation

Lorsque l'individu sensibilisé se réexpose à l'espèce allergisante, il développera ensuite les symptômes associés à l'ADC (*i.e.*, rougeurs, eczémas, gonflements...). Les premiers symptômes cliniques de l'ADC n'apparaissent qu'après 12 h suivant le second contact avec l'allergène pour durer entre 24 et 72 h. Cette étape de révélation débute de manière similaire à la phase de sensibilisation. Après une réexposition de la peau à l'allergène, celui-ci franchit de nouveau la couche cornée et pénètre au sein de l'épiderme (Figure 14⑧). Le composé effectue alors une hapténisation réactivant le système immunitaire par reconnaissance du complexe antigénique par une cellule dendritique, à l'instar de la sensibilisation. Suivant le même schéma, le complexe immunogène est à nouveau « digéré » par une cellule dendritique qui le présentera directement aux lymphocytes T spécifiques produits lors de la phase de sensibilisation et présents dans la peau (Figure 14⑨). C'est suite à cette interaction avec les cellules T spécifiques que le système immunitaire est activé sur le site d'application de l'allergène engendrant la production de cytokines et autres agents pro-inflammatoires (aboutissant notamment à l'activation de kératinocytes qui prolifèrent et libèrent d'autres cytokines inflammatoires) dont l'afflux important crée une vasodilatation et provoque les symptômes cliniques (Figure 14⑩).⁷⁹

3.3. Chimie et classification des allergènes

Comme décrit dans la section précédente, une étape clé pour déclencher une sensibilisation cutanée et l'ADC qui s'ensuit est chimique : l'hapténisation. Celle-ci repose sur la formation d'une liaison fixant l'haptène à la protéine. La chimie joue donc un rôle des plus importants dans l'ADC. La formation de cette liaison et la nature de l'interaction dépend des groupements réactifs au sein de l'allergène. De fait, la formation du complexe immunogène réside dans des interactions dites de coordination (complexation) ou dans la formation de liaisons covalentes stables entre l'haptène et la protéine.⁷⁵

3.3.1. Liaisons menant à l'hapténisation

En chimie, c'est l'énergie d'une liaison qui caractérise l'interaction entre les différentes parties. Ainsi, la stabilité d'une liaison est régie par son niveau d'énergie (Figure 16). Il est donc possible de retrouver des interactions faibles (e.g., interactions de Van de Waals, liaisons hydrogènes...) qui sont réversibles, ainsi que des liaisons plus fortes et plus stables telles que les liaisons de coordination et les liaisons covalentes.⁷⁵

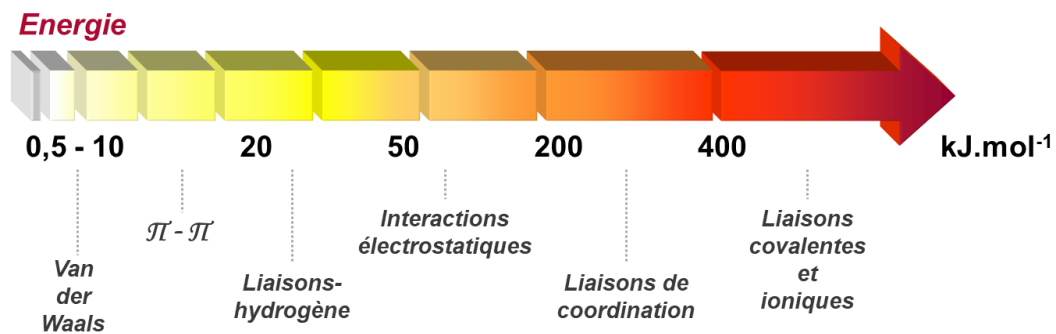


Figure 16 : Classement des liaisons chimiques en fonction des niveaux d'énergie⁷⁵

Liaisons de coordination

Les liaisons de coordination sont impliquées dans le cas de l'allergie aux métaux (e.g., nickel, chrome, cobalt...). Celles-ci se forment principalement sur les chaînes latérales des acides aminés riches en électrons. Autrement dit, ce sont notamment les hétéroatomes tels que l'azote, l'oxygène ou même le soufre présents sur les chaînes latérales de ces acides aminés qui sont impliqués (e.g., lysine, tyrosine, cystéine...). De ce métal ainsi complexé résulte un complexe de coordination suffisamment stable pour être reconnu par le système immunitaire comme un adduit immunogène capable de l'activer. Ces assemblages peuvent avoir une géométrie variable et se caractérisent par leur nombre de « ligands » dépendant de la nature du métal et de son degré d'oxydation (Figure 17).^{75,83}

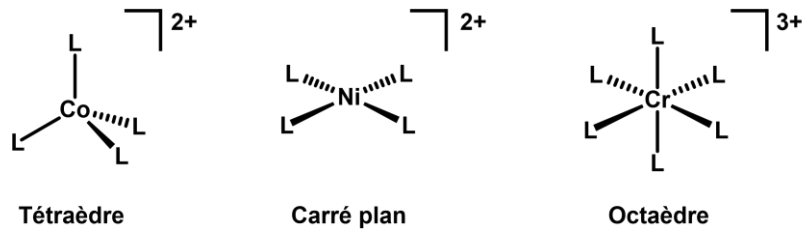


Figure 17 : Exemples de complexes de coordination formés entre un métal (Co^{II} , Ni^{II} , Cr^{III}) et des ligands L

Ces métaux se trouvent en général sous forme de sel. Le nickel par exemple, qui est encore à ce jour l'allergène de contact possédant la plus grande prévalence de personnes sensibilisées, se trouve sous forme de sels de nickel (II) dans de nombreux bijoux de l'époque par exemple. Ainsi, un arrêté du 18 juillet 2000 interdit la mise sur le marché en Europe de produits d'exposition prolongée contenant du nickel (e.g., boucles d'oreilles, bracelets, boutons rivets...).⁸⁶ Le chrome, quant à lui, est présent sous forme saline (i.e., sels trivalents (III) et hexavalents (VI)) dans les aciers inoxydables, le ciment ou encore le cuir utilisé en maroquinerie ou dans l'industrie de la chaussure. Or, sous sa forme métallique, le chrome (0) n'est pas sensibilisant, tandis que sous forme de sel il le devient.⁸³

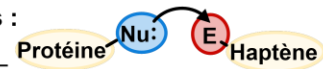
Liaisons covalentes

Les liaisons covalentes sont plus fortes et plus stables que les liaisons de coordination avec une énergie aux alentours des $400 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. La formation de ces liaisons est, en conséquence, difficilement réversible. Ce sont elles qui sont impliquées dans le cas de l'ADC aux espèces organiques. Le complexe immunogène résulte ici de la formation d'une liaison covalente entre l'haptène et une protéine cutanée. Le mécanisme communément accepté est de type nucléophile-électrophile, autrement dit « à transfert de 2 électrons ». Les haptènes organiques sont la plupart du temps des molécules présentant un centre électrophile qui réagit avec les chaînes latérales nucléophiles de certains acides aminés qui constituent les protéines de la peau. La littérature a montré en effet qu'il existe de nombreuses fonctions chimiques électrophiles des haptènes susceptibles de réagir avec les protéines par des mécanismes bien définis tels que la substitution nucléophile ou l'addition nucléophile pouvant s'ensuivre d'une élimination (Figure 18).⁸³

Cependant, certains allergènes (non électrophiles) ne s'inscrivent pas dans ce modèle de réactivité. Pour ces derniers, un autre mécanisme est mis en avant qui résulte de la mise en commun d'un électron de chacun des deux partenaires impliqués lors de l'hapténisation. Ce mécanisme à « 1+1 électron » est par essence de type radicalaire.^{80,83} Aujourd'hui, les mécanismes radicalaires sont en conséquence également considérés comme pouvant intervenir dans la formation d'un complexe haptène-protéine. En effet, il existe des allergènes qui ne présentent pas forcément de site électrophile, mais qui sont pour autant capables

d'altérer des protéines cutanées par le biais d'un mécanisme à 1+1 électron. C'est le cas notamment des hydroperoxydes allyliques dérivés de l'autoxydation de terpènes naturels (Figure 18).⁸⁰

Mécanisme nucléophile-électrophile ou à transfert de 2 électrons :
(*Substitution nucléophile, Addition nucléophile, Addition-élimination*)



Nu: Acide aminé nucléophile (lysine, cystéine, histidine, tyrosine...)

E Centre électrophile

Flèche mécanistique suite à l'attaque nucléophile

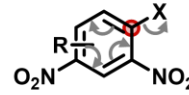
R = alkyle
X = Cl, Br, I



Halogénure d'alkyle



Halogénure d'acyle

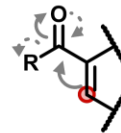


Halogénure d'aryle



Carbonyle / Carboxyle :

aldéhyde : R' = H
cétone : R' = alkyle
ester : R' = O-alkyle
amide : R' = NH-(alkyle)
N-(alkyle)₂



Composés α,β -insaturés :

aldéhyde : R' = H
cétone : R' = alkyle
ester : R' = O-alkyle
amide : R' = NH-(alkyle)
N-(alkyle)₂



Epoxyde

Mécanisme radicalaire ou à transfert de 1+1 électron :

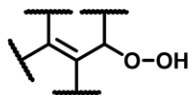
(*Addition radicalaire, recombinaison radicalaire...*)



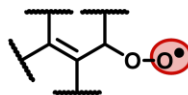
R• Acide aminé à activité radicalaire (cystéine, tyrosine, tryptophane...)

R• Radical

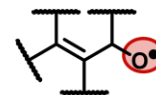
R = alkyle



Hydroperoxyde allylique



Radical peroxy



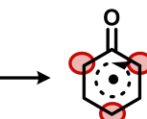
Radical alkoxy



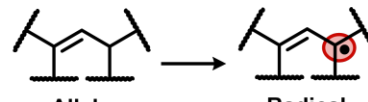
Radical carboné



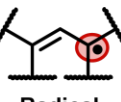
Radical phénoxy



Radicaux carbonés dérivés du phénoxy



Allyle



Radical allyle

Figure 18 : Classification et exemples des types d'haptènes organiques en fonction de leur réactivité menant à la formation d'un complexe antigénique

3.3.2. Haptènes en puissance : les « pro- » et « pré-haptènes »

Certaines molécules sont inoffensives *per se* et nécessitent d'une étape d'activation supplémentaire pour devenir allergisantes et donc capables de réagir avec les protéines cutanées. Autrement dit, ces molécules sont en réalité des haptènes en puissance, dont

Lepoittevin initie en 2006 une distinction entre deux classes: les pro-haptènes et les pré-haptènes.⁸⁷

Pro-haptènes

Les pro- sont des molécules qui deviennent aptes à altérer une protéine cutanée pour former le complexe antigénique suite à une étape de transformation métabolique. Cette étape de métabolisation permet de générer à partir du pro-haptène des fonctions chimiques électrophiles, ou encore, des intermédiaires radicalaires réactifs.

La peau est un organe complexe qui, afin d'assurer la protection envers les substances xénobiotiques lipophiles capables de franchir la couche cornée, possède un système enzymatique particulièrement développé afin d'en assurer la détoxification. Deux types d'enzymes sont connus pour être impliqués : les enzymes de phase I, ainsi que les enzymes de phase II. Parmi les enzymes de phase I, les monooxygénases à cytochromes P-450, les alcools- et aldéhydes- déshydrogénases ou encore les peroxydases pourraient être citées, entre autres. Ces enzymes sont responsables de l'oxydation des xénobiotiques assurant leur fonctionnalisation et permettant par la suite leur élimination par le système de détoxification.

Parmi les enzymes de phase II, les sulfotransférases, les *N*-acétyltransférases ou encore les glutathion-S-transférases décrites précédemment dans les mécanismes antioxydants de détoxification pourraient être citées. Ces enzymes permettent de transformer les xénobiotiques en composés hydrosolubles par conjugaison. Ils peuvent ensuite être éliminés par voie rénale (majoritairement par excrétion dans les urines ou la bile).^{30,31}

Un exemple de pro-haptène connu est l'alcool cinnamique. Une fois à l'intérieur de la peau, il peut subir de manière successive deux oxydations par des transformations métaboliques induites par des enzymes de phase I : l'alcool déshydrogénase (ADH) et l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH). L'alcool cinnamique, qui était de lui-même non-allergisant, est ainsi métabolisé dans un premier temps en aldéhyde cinnamique, qui lui est allergisant, et, cette dernière molécule est également susceptible d'être oxydée pour produire l'acide cinnamique également allergisant (Figure 19).⁸⁸

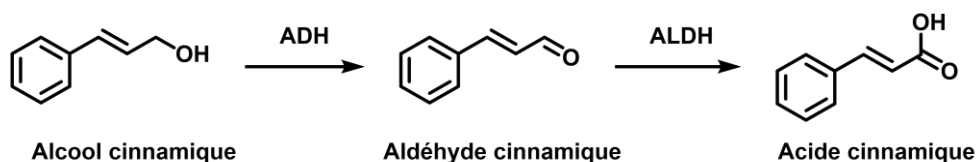


Figure 19 : L'alcool cinnamique, un exemple de pro-haptène susceptible d'être oxydé en substances allergènes par des actions enzymatiques (ADH et ALDH) formant des fonctions électrophiles réactives à l'origine des propriétés allergisantes (aldéhyde α,β -insaturé et acide carboxylique)

Pré-haptènes

Les pré-haptènes sont également des molécules non réactives vis-à-vis des protéines qui nécessitent une transformation pour générer l'espèce réactive et ainsi le complexe antigénique. Le pré-haptène se différencie du pro-haptène de par l'origine de la transformation nécessaire pour accéder au stade d'haptène. Ce sont des transformations physico-chimiques sans recourir à la métabolisation et à un système enzymatique spécifique qui permettent à un pré-haptène de devenir l'espèce sensibilisante.⁸⁷ De ce fait, les réactions qui peuvent se produire sont la plupart du temps des oxydations à l'air (*i.e.*, autoxydation) ou les transformations photo-actives.⁷⁵

De nombreux terpènes naturels se trouvent dans cette catégorie. Ce sont des composés qui ne sont pas allergisants, mais qui possèdent une fonction allylique oxydable (*e.g.*, le Δ^3 -carène, le R-(+)-limonène, l'acide abiétique, le linalool, ...). L'autoxydation de ces composés est une réaction radicalaire en chaîne résultant de l'abstraction de l'hydrogène en position allylique sur laquelle une addition d'oxygène mène à la formation d'hydroperoxydes (ROOHs), produits d'oxydation primaire. Il a été montré au travers de multiples études multicentriques en Europe que ces ROOHs sont des sensibilisants forts.⁸⁹

Les ROOHs issus de l'exposition à l'air des terpènes présentent au sein de leur structure la fonction hydroperoxyde caractérisée par la présence d'une liaison O-O d'énergie de dissociation faible (environ $175 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). La rupture donc facile de cette liaison produit des radicaux alcoyles ($\text{RO}\cdot$) et éventuellement peroxydes ($\text{ROO}\cdot$) qui sont peu stables eux-mêmes. Cette instabilité reliée à la présence de doubles liaisons dans la structure moléculaire provoque des réarrangements radicalaires (*e.g.*, cyclisation intramoléculaire, abstraction d'hydrogène allylique, β -scission, ...) afin d'atteindre un état plus stable au travers la formation d'un radical centré sur un atome de carbone ou radical carboné ($\text{R}\cdot$). Par après, les radicaux ainsi formés peuvent poursuivre les réactions en chaîne de type radicalaire pour former l'adduit haptène-protéine qui mènera à la sensibilisation cutanée. À titre d'exemple, le R-(+)-limonène, provenant notamment des huiles essentielles de citron, s'autoxyde pour donner dans le mélange d'oxydation deux hydroperoxydes de limonène (Lim-1-OOH et Lim-2-OOH) qui suite à leur décomposition radicalaire sont susceptibles de faire intervenir différents $\text{R}\cdot$ capables de réagir avec les protéines de la peau (Figure 20).^{80,90}

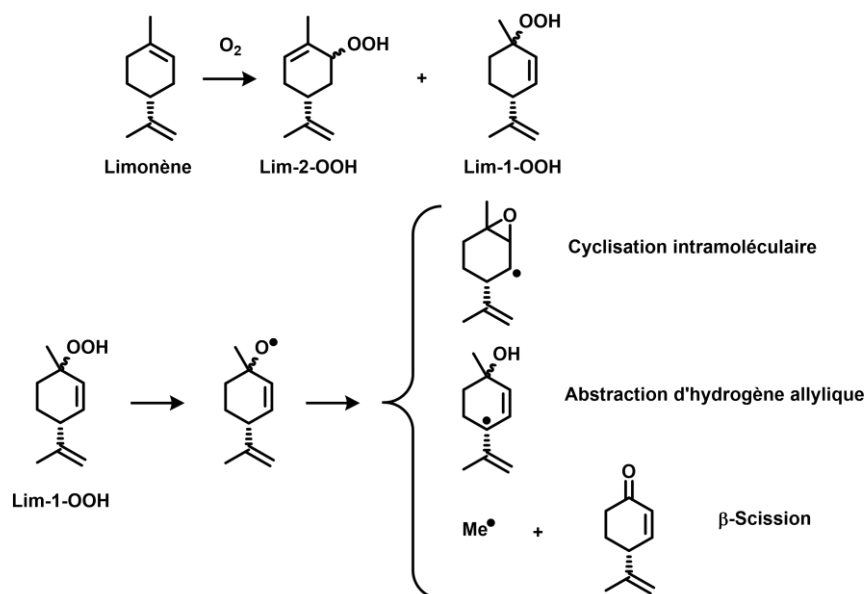


Figure 20 : Autoxydation du limonène et produits d'oxydation primaire Lim-1-OOH et Lim-2-OOH. À titre d'exemple, radicaux carbonés potentiellement formés par dégradation radicalaire du Lim-1-OOH.

La *para*-phénylènediamine (PPD), est un autre exemple. Il s'agit d'un des ingrédients le plus utilisés dans la composition de colorants capillaires engendrant des réactions allergiques sévères. Permettant d'obtenir une couleur noire, la PPD a été aussi identifiée comme responsable de dermatites issues de tatouages éphémères au henné. Ainsi, depuis 2005, ce composé est interdit par la législation Européenne dans les cosmétiques en contact avec la peau. En revanche, la PPD est toujours utilisée dans les colorants capillaires prêts à l'emploi sans droit de dépasser une concentration de 10%. La PPD présente dans les colorants capillaires est utilisée avec un oxydant, le H₂O₂. Or, lorsqu'il est mentionné d'allergie à la PPD, celle-ci est souvent associée à ses formes d'oxydation (Figure 21). Une étude récente a montré que suite à son oxydation, la PPD est susceptible de réagir avec des protéines dans un modèle d'épiderme humain reconstitué (RHE).⁹¹ En effet, des adduits entre la forme benzoquinone diimine (BQDI) et des résidus cystéines ont été identifiés au sein des RHE par résonance magnétique nucléaire (RMN) à angle magique de spin. Par ailleurs, des tests en solution ont pu montrer que cette BQDI, une fois générée est capable de donner lieu à la base de Bandrowski (BB) par trimérisation. Cet oligomère est identifié comme un sensibilisant au niveau extrême lors de tests de sensibilisation sur le modèle murin du local lymph node assay (LLNA).



Figure 21 : Formation de formes sensibilisantes de la PPD après oxydation et dimérisation

3.4. Identification et évaluation du potentiel allergisant

Un travail primordial dans une optique de prévention de l'exposition aux allergènes est l'identification et l'évaluation du potentiel allergisant des composés chimiques. Le diagnostic des patients sensibilisés s'effectue la plupart du temps à l'aide des tests épicutanés, aussi appelés « *patch tests* », développés courant des années 60. Ces tests consistent en l'application topique, sur le dos ou sur l'avant-bras, d'une quantité définie de substance connue pour être allergisante dans un véhicule (pétrolatum, éthanol ...) à l'aide d'une chambre occlusive. Une première lecture se réalise à 48 h, puis 72 h voire même 96 h.⁹² De cette façon un niveau de sensibilisation est évalué en fonction des symptômes, en différenciant les faiblement positifs (+, érythèmes, infiltrations, papules), les fortement positifs (++, érythème plus fort, papules plus intenses et vésicules) et les extrêmement positifs (+++, érythèmes intenses, œdème, vésicules coalescentes ou bulles) par rapport aux réactions d'irritation (IR, absence d'œdème, aspect fripé, papules, pustules, hypopion, vésicules, pétéchies voire même nécrose).⁹³

L'augmentation de la prévalence et du nombre de patients souffrant d'une ADC fait, qu'à ce jour, l'évaluation du potentiel sensibilisant des molécules avant leur mise sur le marché est d'une importance capitale et est devenue une obligation pour l'industrie. En effet, l'un des meilleurs moyens de prévenir la sensibilisation à un allergène consiste à pouvoir prédire sa capacité à induire une réaction d'allergie cutanée, d'autant plus qu'aucun traitement n'existe pour guérir de cette pathologie. Il est primordial de contrôler la présence et la quantité « acceptable » de ces substances sensibilisantes au sein des produits de consommation.

C'est dans cette optique que les directives et les législations Européennes exigent des industriels d'évaluer les risques encourus par la présence des produits chimiques dans leurs consommables. En décembre 2006 la réglementation *Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals* (REACH) a été adoptée par le Parlement Européen et le Conseil de l'Union Européenne pour une mise en application à compter du juin 2007. REACH a pour but de permettre la collecte d'informations toxicologiques sur plus de 20000 composés.⁹⁴ De plus, en 2013 il a été décrété dans le 7^{ème} Amendement à la réglementation Européenne sur les produits cosmétiques l'interdiction des tests sur des animaux permettant l'évaluation de la toxicité des ingrédients dans les produits cosmétiques. De ce fait, de nombreuses méthodes alternatives à l'expérimentation animale ont vu le jour afin d'évaluer le potentiel allergisant des composés chimiques et ont été approuvées par le Centre Européen de Validation des Méthodes Alternatives (ECVAM) en accord avec l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE). Aussi, cette réglementation établit les normes concernant la composition et l'étiquetage des produits cosmétiques.⁶⁸

La sensibilisation cutanée à un allergène se produit au travers d'étapes physiologiques distinctes sur lesquelles reposent les différentes méthodes d'évaluation. Ces dernières se doivent d'être à la fois qualitatives mais aussi quantitatives, dans le but de détecter les espèces responsables d'une réaction allergique dans un premier temps, puis de pouvoir les classer par rapport à leur pouvoir sensibilisant. Les paramètres clé quant à l'évaluation du potentiel des allergènes ont pu être définis *via* une mise en commun des connaissances sur les mécanismes chimiques et biologiques impliqués lors de la sensibilisation cutanée. Ces paramètres ont été répertoriés afin de guider et perfectionner les stratégies et méthodes employées pour la détection et l'étude du potentiel de sensibilisation. L'*Adverse Outcome Pathway* (AOP) défini pour la sensibilisation cutanée offre un aperçu de cet ensemble commun de critères dont les informations ont été réunies pour chaque méthode en collaboration avec leurs développeurs (Figure 22).⁹⁵

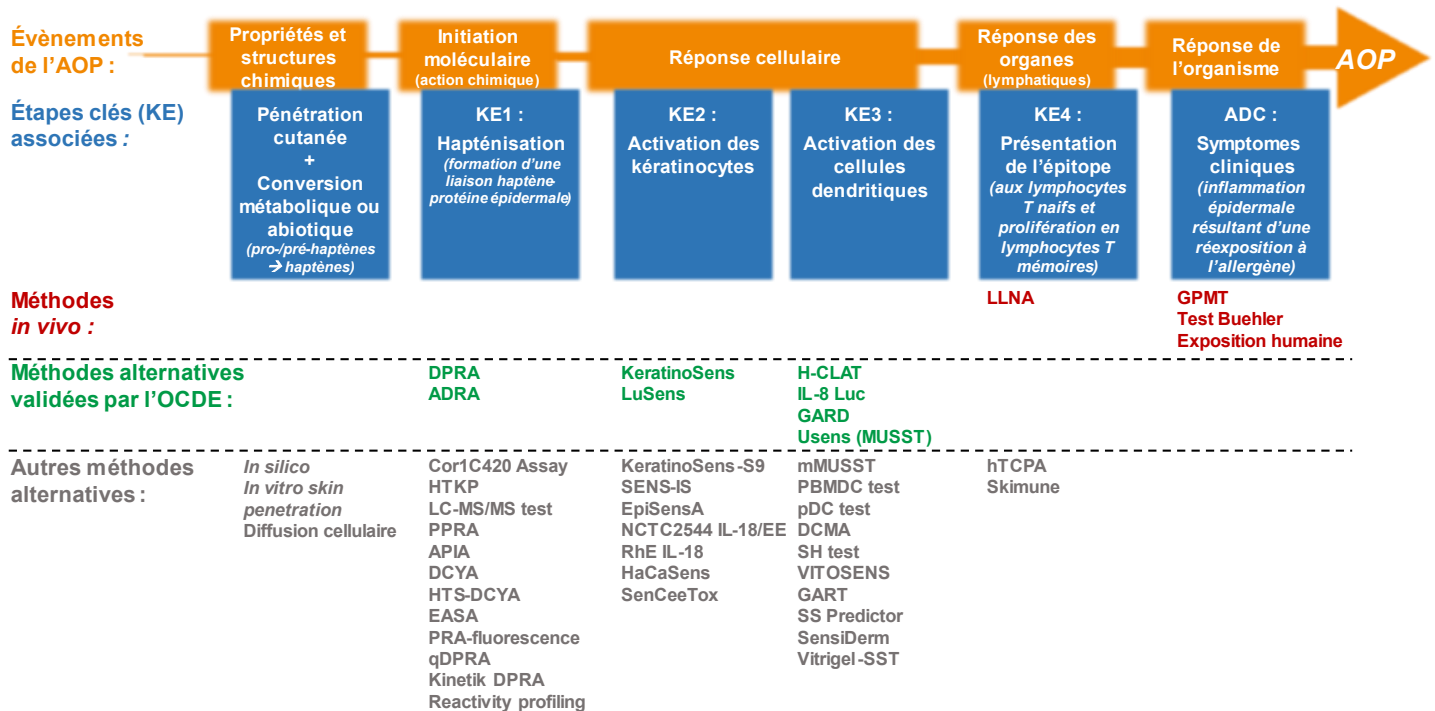


Figure 22 : Étapes clé de la sensibilisation cutanée définies par l'AOP et méthodes d'évaluation du pouvoir sensibilisant associées

Historiquement, le LLNA a été très largement utilisé pour l'évaluation de la phase de sensibilisation cutanée à un composé. Bien qu'aujourd'hui son utilisation soit interdite dans le domaine du cosmétique par le 7^{ème} Amendement mentionné précédemment, la base de données que le LLNA a permis d'élaborer reste encore très largement utilisée. Mis au point par Kimber et Basketter dans les années 90, il consiste à effectuer une étude *in vivo* basée sur un modèle murin.⁹⁶ Le LLNA se centre sur la détection de la prolifération lymphocytaire au sein des ganglions drainant le site d'application de la substance testée sur des souris. Une fois par jour et pendant trois jours, la molécule à tester est appliquée par voie topique sur le

dos de l'oreille d'une souris. Puis le sixième jour un radioisotope (*i.e.*, la thymidine tritiée) est injecté à l'animal par voie intraveineuse. Enfin, après 5 h la souris est euthanasiée afin de prélever les ganglions lymphatiques proximaux de l'oreille et mesurer la prolifération des lymphocytes *via* le taux de radioactivité observé par β -scintillation (Figure 23).^{97,98}

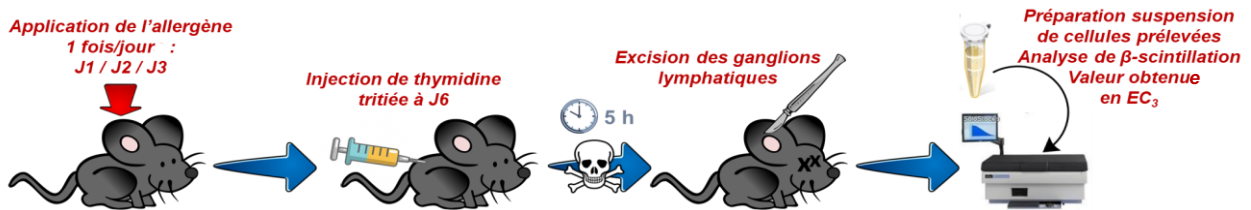


Figure 23 : Schéma du protocole expérimental du LLNA.

EC_3 est la concentration (%) du composé chimique testé nécessaire pour induire une prolifération des lymphocytes T trois fois supérieure au contrôle. ($EC_3 < 0,1\%$: sensibilisant extrême ; $0,1\% \leq EC_3 < 1\%$: sensibilisant fort ; $1\% \leq EC_3 < 10\%$: sensibilisant modéré ; $10\% \leq EC_3 < 100\%$: sensibilisant faible)

Du fait de cette interdiction, des méthodes alternatives ont été élaborées ciblant les étapes clés établies par l'AOP (Figure 22). Ainsi, des tests *in vitro*, *in silico* ou *in chemico* ont vu le jour.⁹⁵

Les techniques *in vitro* se basent principalement sur l'utilisation de cellules dendritiques ou encore de kératinocytes et reposent sur l'étude de l'activation de ces cellules, permettant ainsi l'identification la quantification du potentiel de sensibilisation d'une substance allergène. Ceci a donné lieu aux essais *Human Cell Line Activation Test* (h-CLAT) et *Myeloid U-937 Skin Sensitization Test* (MUSST), ou encore au test KeratinoSens®. Le h-CLAT et le MUSST mesurent l'expression de protéines qui sont à la surface des cellules dendritiques (*i.e.*, CD54 et CD86) via l'utilisation de modèles de ces cellules (*e.g.*, THP-1, cellules myéloïdes humaines de type U937). En utilisant la lignée cellulaire humaine HaCaT mutée, KeratinoSens® mesure la libération de luciférase associée à un gène clé de la sensibilisation. D'autres technologies prometteuses qui se basent sur l'utilisation de peaux et d'épidermes humains reconstitués sont en développement encore de nos jours. Ces modèles 3D de la peau sont exposés à des substances qui peuvent être sensibilisantes afin de mesurer différentes activités qui peuvent avoir lieu *in situ*. Ce sont ce type de modèles qui ont été utilisés lors de ce travail de thèse.

Les méthodes *in silico*, en vogue depuis quelques années, consistent en la modélisation informatique du potentiel allergisant de substances cibles. Ces méthodes tentent d'établir une corrélation entre l'activité d'une molécule et sa structure moléculaire. Autrement dit, c'est au travers des propriétés physico-chimiques des allergènes qu'il va être tenté d'établir un schéma allergisant et de prédire le potentiel sensibilisant. Ces techniques s'articulent autour de trois axes :⁹⁹⁻¹⁰¹

- Les bases de données qui regroupent les différents cas d'allergie qui ont été recensés (e.g., CosIng, SkinSensDB, RIFM, TOXNET-HSDB, NTP-ICE, ECHA-CHEM, EURL-ECVAM-DB-ALM...) ¹⁰⁰
- Les différents logiciels informatiques dits « experts » qui s'appuient sur des paramètres de modélisation permettant la mise en évidence de la présence de fragments ou motifs moléculaires qui sont supposés être réactifs vis-à-vis des protéines et calculant la capacité que va avoir la molécule à pénétrer au sein d'un épiderme (e.g., DEREK). ^{99,101,102}
- La *Quantitative Structure Activity Relationships* (QSAR) qui au travers de calculs quantitatifs permet de mettre en relation la structure chimique d'un composé et son activité biologique.

L'OCDE recommande fortement l'utilisation de ces méthodes sous forme de boîte à outils prédisant le potentiel de sensibilisation des composés chimiques. Cependant, bien que les méthodes *in silico* présentent de nombreux atouts ils ne peuvent pallier aux tests *in vivo*.

Les méthodes *in chemico* se basent sur la réactivité d'un haptène vis-à-vis des protéines cutanées. En effet, cette étape clé indique qu'il est possible de mettre en corrélation cette réactivité avec le potentiel de sensibilisation des produits chimiques. Le *Direct Peptide Reactivity Assay* (DPRA) a notamment été mis au point en 2004 par l'équipe de Gerberick collaborant avec l'équipe de Lepoittevin et a été validé par l'OCDE en 2015. Le principe de base est l'incubation de la molécule d'intérêt avec des peptides synthétiques contenant une lysine ou une cystéine à température ambiante 24 h. La déplétion des peptides est alors mesurée par HPLC couplé à une détection UV. La diminution en quantité des peptides indique théoriquement leur réactivité vis-à-vis d'un allergène. ¹⁰³ Ne permettant cependant pas de mettre en évidence le potentiel de sensibilisation des pro- et des pré-haptènes, les équipes de Gerberick et de Lepoittevin ont adapté le DPRA pour ajouter une étape d'activation de la molécule testée donnant lieu au *Peroxidase Peptide Reactivity Assay* (PPRA). ¹⁰⁴ Ce dernier ajoute une étape d'oxydation de la molécule d'essai au travers d'un système enzymatique en utilisant la *horseradish peroxidase* (HRP) combinée à du H₂O₂. Les résultats obtenus par le PPRA permettent d'apporter des informations complémentaires au DPRA concernant la réactivité des potentiels allergènes sur les résidus cystéine et lysine des protéines.

4. Projet : DERMATOX

Comme décrit précédemment, une distinction est en général établie entre les effets cytotoxiques et les capacités antioxydantes-cytoprotectrices des composés chimiques. Néanmoins, pour certaines molécules cette frontière n'est pas toujours aussi claire. En effet, certains composés possèdent des propriétés qui mènent à l'un ou l'autre de ces effets

antagonistes. Des zones d'ombre subsistent encore aujourd'hui quant à la compréhension de ces mécanismes.

Notre projet de recherche DERMATOX a tenté de comprendre comment la réactivité antioxydante de certaines molécules, comme l'eugénol et l'isoeugénol, peut mener à une action cytotoxique. DERMATOX porte concrètement sur l'étude de la formation potentielle d'intermédiaires radicalaires réactifs, afin d'en comprendre leurs mécanismes d'action dans la peau. Pour ce faire, le travail de recherche s'est articulé autour des axes suivants, correspondant chacun à un chapitre du manuscrit de thèse : (i) synthèse des composés cibles contenant une substitution isotopique au ^{13}C sur des positions clé, (ii) utilisation de la résonance paramagnétique électronique (RPE) combinée à des sondes de spin (*i.e.*, piégeage de spin et décroissance de spin) sur des modèles d'épidermes humains reconstitués (RHE) afin d'évaluer ce qui pourrait se passer *in vivo* dans des conditions proches d'une exposition réelle, (iii) utilisation de techniques alternatives permettant d'apporter des informations complémentaires pour valoriser l'enrichissement isotopique (*e.g.*, études de réactivité sur des acides aminés) et (iv) validation de l'utilisation d'un système d'irradiation des RHE par étude préliminaire sur des composés photo-sensibilisants.

4.1. Composés cibles

Comme décrit précédemment, parmi la globalité des composés antioxydants certaines molécules sont capables de neutraliser les radicaux libres. C'est le cas des polyphénols et notamment celui de l'eugénol et de l'isoeugénol. Bien que structurellement très proches, ces composés ne présentent pas les mêmes activités. Les travaux de Marteau *et al.* affichent des valeurs de constante de vitesse k pour le FRS du radical DPPH dans l'heptane différentes pour chacune des deux molécules (eugénol : $k = 3,35 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et isoeugénol : $k = 30,1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Aussi, ils ont montré que ces valeurs de k varient en fonction du solvant utilisé.¹⁰⁵ D'autre part, Loveless *et al.* ont classé l'eugénol comme un sensibilisant cutané faible (valeur EC_3 du LLNA de 13%), tandis que l'isoeugénol est classifié comme un sensibilisant modéré (valeur EC_3 du LLNA de 1,3%).¹⁴ Il est donc nécessaire pour chacun de ces deux composés de sonder les deux aspects : antioxydant *versus* prooxydant.

En réalité, lors de leur action antioxydante ces molécules peuvent être elles-mêmes oxydées. Cette oxydation peut donner des intermédiaires réactifs et se poursuivre jusqu'à aboutir à la formation finale de composés de type *ortho*-quinone et *para*-méthylène quinone connus pour avoir des comportements cytotoxiques. Pendant de nombreuses années, l'implication de ces produits d'oxydation ultimes montrant de nombreux centres électrophiles a été suspectée de mener à l'ADC induite par l'eugénol et par l'isoeugénol, sans avoir été vraiment démontrée (Figure 24).¹³

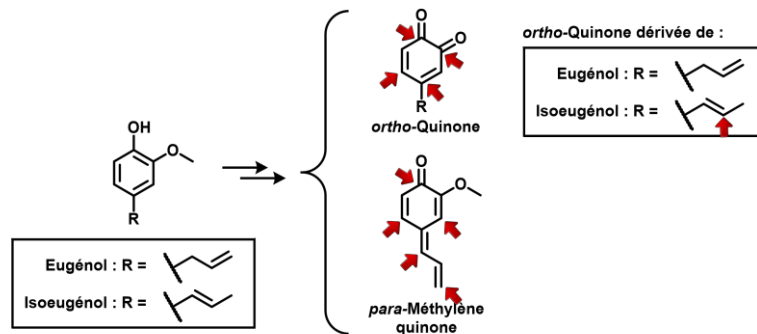


Figure 24 : Dérivés de type *ortho*-quinone et *para*-méthylène quinone issus de l'eugénol et de l'isoeugénol. Les flèches rouges montrent les centres électrophiles potentiellement réactifs

Il a été montré que de nombreux intermédiaires radicalaires se forment lors de l'oxydation et obtention de ces structures de type quinone à partir de l'eugénol et de l'isoeugénol. Depuis que les mécanismes radicalaires sont considérés de plus en plus dans les processus métaboliques (e.g., activation de radicaux thiyles²⁹) et aussi dans le cas de certaines molécules allergisantes (e.g., hydroperoxydes allyliques⁸⁰), l'implication probable des intermédiaires radicalaires issus de l'eugénol et de l'isoeugénol pourrait être aussi suspectée dans la peau (Figure 25).

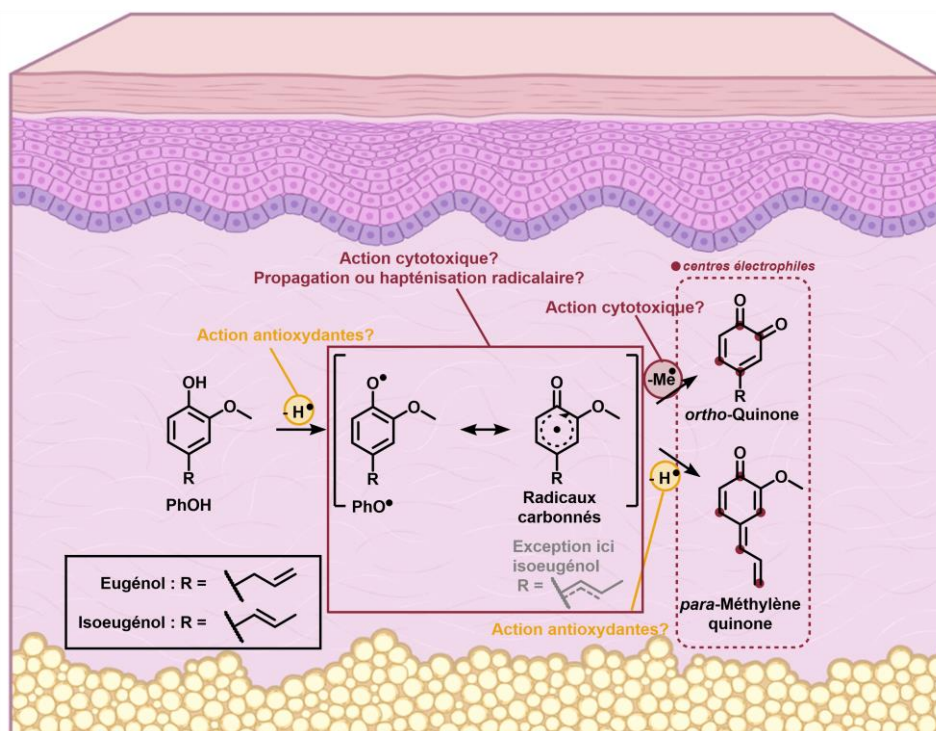


Figure 25 : Hypothèse sur les potentielles actions antioxydantes (jaune) et cytotoxiques (rouge) au sein d'un épiderme dérivées des intermédiaires résultant de l'oxydation de l'eugénol et de l'isoeugénol

4.2. Méthodologie employée pour l'étude d'intermédiaires radicalaires

La RPE est aujourd'hui l'outil de choix pour l'identification et l'analyse des espèces qui possèdent des électrons non-appariés (*i.e.*, paramagnétiques). Elle a été utilisée dans de nombreux domaines biologiques permettant de comprendre des mécanismes physiologiques de par la possibilité de caractériser, d'identifier et de localiser les espèces radicalaires dans les tissus biologiques, telles que les ROS et les RNS.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ Dû à la forte réactivité de la majorité des radicaux libres, ces espèces ont des durées de vie souvent courtes (de l'ordre de la nanoseconde) et sont, en conséquence, de détection difficile. Ceci pousse la communauté scientifique à utiliser des techniques d'analyse indirectes. Depuis quelques années, le laboratoire étudie en collaboration avec le laboratoire POMAM les espèces radicalaires réactives issues de sensibilisants cutanés en utilisant le piégeage de spin ou *Spin Trapping*. La combinaison RPE-*Spin Trapping* a permis d'identifier les espèces radicalaires transitoires ($RO\cdot$ / $ROO\cdot$ / $R\cdot$) à courte durée de vie issues d'hydroperoxydes allyliques allergisants.^{80,109} En effet, l'utilisation d'un *Spin Trap* (ST), diamagnétique à l'origine, permet de convertir une espèce radicalaire à temps de vie court en un nouvel adduit de spin paramagnétique avec une durée de vie plus longue permettant son analyse. Dans la plupart des cas les ST sont des dérivés de type nitrone et sont choisis en fonction de leur toxicité, pénétration, et possibilité qu'ont ces espèces à faciliter l'interprétation du signal de RPE du spin adduit formé en fonction des constantes de couplage hyperfin (*hfccs*). Aussi, les informations apportées par RPE-*Spin Trapping* peuvent être complétées par l'utilisation d'une autre méthodologie indirecte, le *Spin Scavenging*. Cette dernière utilise une sonde paramagnétique à l'origine, le *Spin Scavenger* (SC) dont la décroissance du signal est observée, soit la décroissance de spin. Cette décroissance résulte dans la plupart des cas par l'action des ROS dans les systèmes *in vivo*.¹¹⁰ Nous avons, en conséquence, utilisé ces techniques de RPE afin de mettre en évidence les espèces radicalaires issues de l'eugénol et de l'isoeugénol dans la peau.

Dans le cadre de l'étude des mécanismes réactionnels impliqués dans l'allergie cutanée, plusieurs approches ont été développées au laboratoire de Dermatochimie utilisant la substitution isotopique au ¹³C de certaines positions stratégiques au sein de composés cibles. Ces méthodes permettent d'apporter des informations tant mécanistiques que sur le comportement des composés en fonction des conditions expérimentales. Une de ces approches, largement utilisée dans ce projet DERMATOX, est basée sur l'utilisation du RPE-*spin trapping* exploitant l'introduction d'un ¹³C (spin nucléaire ½) et le couplage hyperfin spécifique qui en découle.¹¹¹ Dans ce projet, elle a été appliquée pour l'étude des positions radicalaires cibles potentielles sélectionnées en amont pour l'eugénol et l'isoeugénol par DFT et en accord avec la littérature (Figure 26).

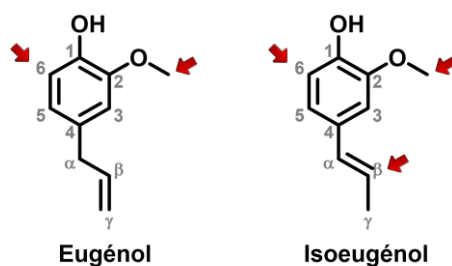


Figure 26 : Positions cibles (flèches rouges) pour une substitution isotopique au ^{13}C sur l'eugénol et l'isoeugénol. Les chiffres gris représentent la numérotation des positions qui sera appliquée dans ce manuscrit.

La première étape clé menant à une sensibilisation cutanée étant la création du complexe antigénique par la formation d'une liaison covalente entre un haptène et une protéine, nous avons cherché à vérifier si ces intermédiaires radicalaires pourraient réagir avec des acides aminés. Certains acides aminés sont en effet capables de réagir au travers de réactions radicalaires comme la cystéine, *via* le radical thiyle, ou le tryptophane et la tyrosine dû à la forte stabilisation des radicaux sur ces systèmes aromatiques. Ainsi, la possible formation d'adduits entre l'eugénol ou l'isoeugénol et différents acides aminés en solution a été étudiée par spectrométrie de masse en tirant avantage de la substitution isotopique au ^{13}C .

4.3. Élargissement méthodologique à d'autres systèmes irradiés

Les études décrites ci-dessus ont mis en évidence la formation de radicaux suite à une photo-activation de l'eugénol et de l'isoeugénol incubés dans des RHE. Nous avons donc étendue cette méthodologie à l'étude de la photo-allergie de contact (PADC).

De nombreuses personnes souffrent de PADC à certains composés. Ces patients ne souffrant de symptômes cliniques que lorsqu'ils sont exposés à la lumière solaire après avoir été en contact avec un photo-allergène illustrent le fait que, dans certains cas, une activation par la lumière est nécessaire pour que la substance sensibilisante devienne réactive vis-à-vis des protéines cutanées et du système immunitaire.¹¹² Le kétoprofène et l'octocrylène sont des composés dérivés de la benzophénone connue pour être photo-active en générant un biradical sur la fonction carbonyle (Figure 27).^{113,114} Ils sont utilisés dans la vie courante comme pommade anti-inflammatoire non-stéroïdienne et comme filtre solaire, respectivement. Aussi, ces deux molécules sont connues pour être des photo-sensibilisants pouvant produire une allergie dite « croisée ».^{115,116} Cela laisse penser qu'une réactivité similaire résulte de ces trois molécules au noyau de type benzophénone photo-activable. Le kétoprofène est suspecté également de générer un radical suite à une décarboxylation sur sa chaîne non aromatique, celui-ci stabilisé par la délocalisation possible de l'électron dans le système aromatique conjugué.¹¹⁷ L'octocrylène, en revanche, est suspecté dans de nombreux cas se dégrader

dans un premier temps en benzophénone par une coupure oxydante selon un mécanisme de rétro-aldolisation sur sa fonction alcène (Figure 27).^{114,118}

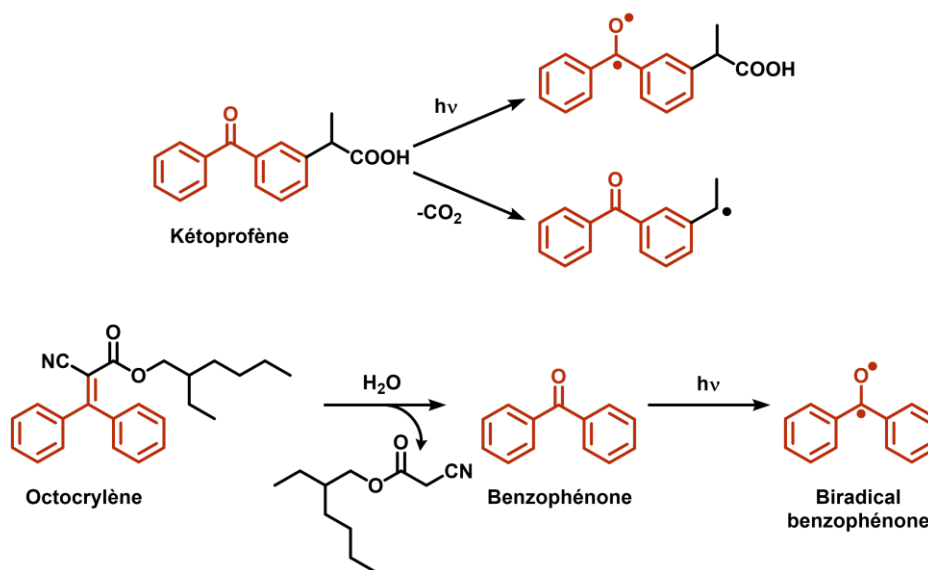


Figure 27 : Radicaux potentiels obtenus à partir du kétoprofène et de l'octocrylène. En rouge est représenté le noyau benzophénone.

Le premier chapitre de ce manuscrit décrit en détail les voies de synthèse développées pour l'introduction d'une substitution au ^{13}C dans des positions cibles de l'eugénol et de l'isoeugénol. Le deuxième chapitre décrit les études d'intermédiaires radicalaires par RPE conduites avec les composés substitués ou non en solution et dans des RHE. Ce même second chapitre s'intéresse par la suite à la réactivité vis-à-vis des acides aminés en solution dans le contexte de production d'intermédiaires radicalaires identifiés en solution. Enfin, le dernier chapitre présente les études préliminaires de RPE sur la formation d'espèces radicalaires dans des RHE traités avec des photo-allergènes et irradiés avec un simulateur solaire.

CHAPITRE 1

Synthèse isotopique de l'eugénol et de l'isoeugénol

--

Substitution au ^{13}C de positions spécifiques

Sommaire de partie :

1. Études préliminaires : calculs théoriques sur l'évolution radicalaire de l'eugénol et de l'isoeugénol	39
2. Les voies de synthèse développées	43
2.1. Synthèse (^{13}C -MeO)-Eug et du (^{13}C -MeO)-IsoEug : la substitution sur les fonctions méthoxy	44
2.2. Synthèse du β -(^{13}C)-IsoEug : la substitution sur la chaîne allylique	45
2.3. Synthèse du 2,6-(^{13}C)-Eug et du 2,6-(^{13}C)-IsoEug : la substitution au sein du cycle aromatique	46
2.4. Autres positions cibles	53
3. Bilan vis-à-vis des synthèses substituées au ^{13}C	55
Experimental part: Chapter 1	57

1. Études préliminaires : calculs théoriques sur l'évolution radicalaire de l'eugénol et de l'isoeugénol

Ce premier chapitre se focalise sur la synthèse de l'eugénol et de l'isoeugénol, appelés dès à présent **Eug** et **IsoEug** respectivement, contenant une substitution au ¹³C sur des positions potentiellement réactives. Ces synthèses ayant pour but de mettre en évidence les intermédiaires radicalaires carbonés issus directement de la structure moléculaire de ces deux composés, ce chapitre commence par une étude théorique et calculatoire de l'évolution radicalaire potentielle des molécules. Ces calculs en combinaison avec des données de la littérature, ont permis de choisir les positions sur lesquelles l'introduction d'une substitution isotopique au ¹³C était d'un intérêt tout particulier.

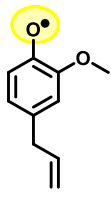
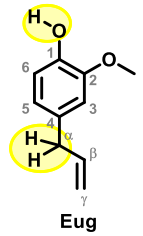
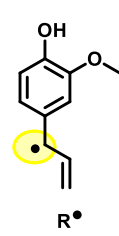
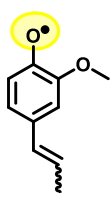
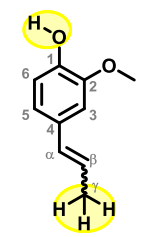
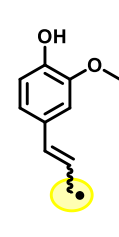
Comme il a été exposé précédemment, l'**Eug** et l'**IsoEug**, possédant un cœur phénolique, sont susceptibles d'avoir une activité radicalaire. Ce sujet de thèse se centrant sur l'étude des intermédiaires radicalaires potentiellement réactifs induits par les xénobiotiques en contact avec la peau, une étude théorique au préalable sur l'évolution ou la dégradation de l'**Eug** et de l'**IsoEug** était nécessaire afin de comprendre les processus radicalaires qui en résultent. Nous intéressant principalement à l'activité radicalaire directe que peuvent avoir ces molécules suite à leur oxydation, des calculs de *Density Functional Theory* (DFT)^a ont été effectués en collaboration avec le Dr. Gourlaouen du Laboratoire de Chimie Quantique (UMR 7177 Institut de Chimie, Université de Strasbourg, France).

Les calculs de DFT ont mis en évidence que l'**Eug** possède deux sites possibles pour la formation d'un radical stable. Le premier, connu pour les systèmes phénoliques, se situe sur la fonction phénol produisant un radical PhO[•]. Le second se situe sur le méthylène α-C du groupement allylique en *para*- pour générer un radical carboné R[•] (Tableau 3). De la même manière, les calculs de DFT ont montré que l'**IsoEug** est enclin favorablement à la formation d'un radical oxygéné de type PhO[•] et à la formation d'un radical carboné de type R[•], ce dernier se localisant cette fois-ci sur le carbone terminal γ-C de la chaîne propénylique (Tableau 3). Dans le cas de l'**Eug**, les calculs ont mis en exergue que la formation du radical R[•] est plus favorable de 2,7 kcal.com⁻¹ que le radical PhO[•] dû à la délocalisation plus importante du système-π conjugué. *A contrario*, dans le cas de l'**IsoEug**, la formation du radical PhO[•] est

^a Toutes les études calculatoires ont été effectuées avec le pack GAUSSIAN 09 (Gaussian, 2009 ; version D.01) au niveau DFT (fonctionnelle ωB97XD). Tous les atomes sont décrits par la base 6-31+G** (Ditchfield *et al.*, 1971, DOI : 10.1063/1.16774902). Le solvant (eau) est pris en compte au travers d'un modèle continuum polarisé (PCM, Cossi *et al.*, 1996, DOI : 10.1016/0009-2614(96)00349-1). Les énergies qui résultent de ces calculs sont données en enthalpies libres (ΔG en kcal.mol⁻¹).

plus stable que celle du radical R[•] pour n'importe lequel de ses deux diastéréoisomère *Z* et *E* (Tableau 3).

Tableau 3 : Différence d'enthalpie libre ΔG entre le radical le plus stable en référence (0 kcal.mol⁻¹) et le second radical pour chaque molécule

Sites possibles de formation radicalaire permettant l'obtention des radicaux PhO [•] et R [•] à partir de l'Eug et de l'IsoEug		
		
		
$\Delta G(\text{PhO}^\bullet)$ en kcal.mol ⁻¹	Molécule	$\Delta G(\text{R}^\bullet)$ en kcal.mol ⁻¹
2,7	Eug	0
0	(Z)-IsoEug	4,4
0	(E)-IsoEug	4,0

Cette première information apportée par les calculs de DFT suggère, en conséquence, une différence de comportement radicalaire pour l'**Eug** et l'**IsoEug**. Pour l'**Eug** un radical carboné devrait se former en priorité suite à une activation radicalaire contrairement au traditionnel radical PhO[•] connu de la littérature pour ces familles de composés phénoliques. Ceci laisse supposer le possible départ d'un atome d'hydrogène suite à la formation du radical PhO[•] comme le propose la littérature, menant à la formation d'une méthylène quinone.^{13,55} Aussi, l'évolution proposée souvent pour les composés *ortho*-alkoxyphénols suite à la formation du radical PhO[•] s'ensuit par la perte de l'alkyle alkoxylique menant à la formation du composé d'oxydation final de type *ortho*-quinone.^{13,53} Des calculs de DFT ont donc été effectués pour chaque composé en considérant le départ du radical méthyle [•]CH₃ ou de l'hydrogène H[•] en α -C pour l'**Eug** et en γ -C pour l'**IsoEug** (Figure 28).

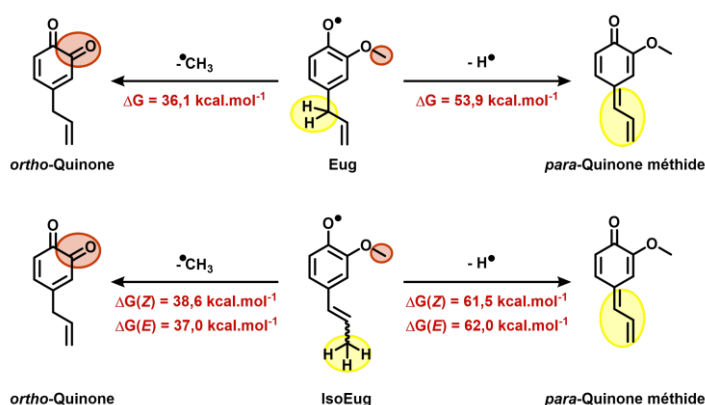


Figure 28 : Bilan des calculs de DFT en considérant la perte des groupements méthyle ou d'hydrogène à partir du radical phénoxy PhO[•] de chaque molécule en kcal.mol⁻¹

Ces décompositions sont cependant énergétiquement très défavorables d'elles-mêmes. En conséquence, des calculs de DFT portés sur la possible dimérisation de ces composés ont été effectués pour évaluer si ces calculs sont en accord avec ce que propose la littérature concernant les dimérisations de l'**Eug** et de l'**IsoEug** à partir du radical PhO[•]. Ainsi, dans un premier temps la carte de la densité de spin a été établie pour chaque molécule suite à la formation du radical PhO[•] et les valeurs de la densité de spin ont été relevées (Tableau 4).

Tableau 4 : Densité de spin sur les radicaux PhO[•] de chaque molécule

Carte de la densité électronique			
Numérotation			
Position dans la structure moléculaire	Eug	(Z)-IsoEug	(E)-IsoEug
PhO	0,33	0,30	0,29
MeO	0,07	0,06	0,06
1-C	-0,01	-0,02	-0,01
2-C	0,32	0,29	0,29
3-C	-0,20	-0,21	-0,22
4-C	0,34	0,40	0,36
5-C	-0,09	-0,12	-0,11
6-C	0,23	0,24	0,22
α-C	-0,02	-0,15	-0,16
β-C	0,02	0,21	0,28
γ-C	0,06	-0,02	-0,03

Ces valeurs montrent que la densité de spin est principalement localisée dans le noyau phénolique (positions *ortho*- et *para*-) dans le cas de l'**Eug** et de l'**IsoEug**, bien que pour cette

dernière molécule la densité électronique se localise également sur la chaîne allylique (*i.e.*, carbone β -C). Ces valeurs sont en accord avec ce que propose la littérature quant à la dimérisation radicalaire de ces molécules au travers de l'oxygène phénoxy (PhO), du carbone en *ortho*- (*i.e.*, 6-C) et dans le cas de l'**IsoEug** de la position β -C.⁵² En revanche, ces calculs exposent également que la plus grande densité de spin se localise sur le carbone quaternaire en *para*- (*i.e.*, 4-C). Ainsi, dans un second temps des calculs ont été réalisés sur des réactions de couplage entre les différents radicaux potentiels. L'attaque du radical PhO[•] sur les positions PhO, 4-C et 6-C a été testée. Pour l'**IsoEug** la position β -C a aussi été testée et pour l'**Eug** c'est une dimérisation par attaque sur l'alcène terminal en γ -C qui a été calculée (Figure 29).

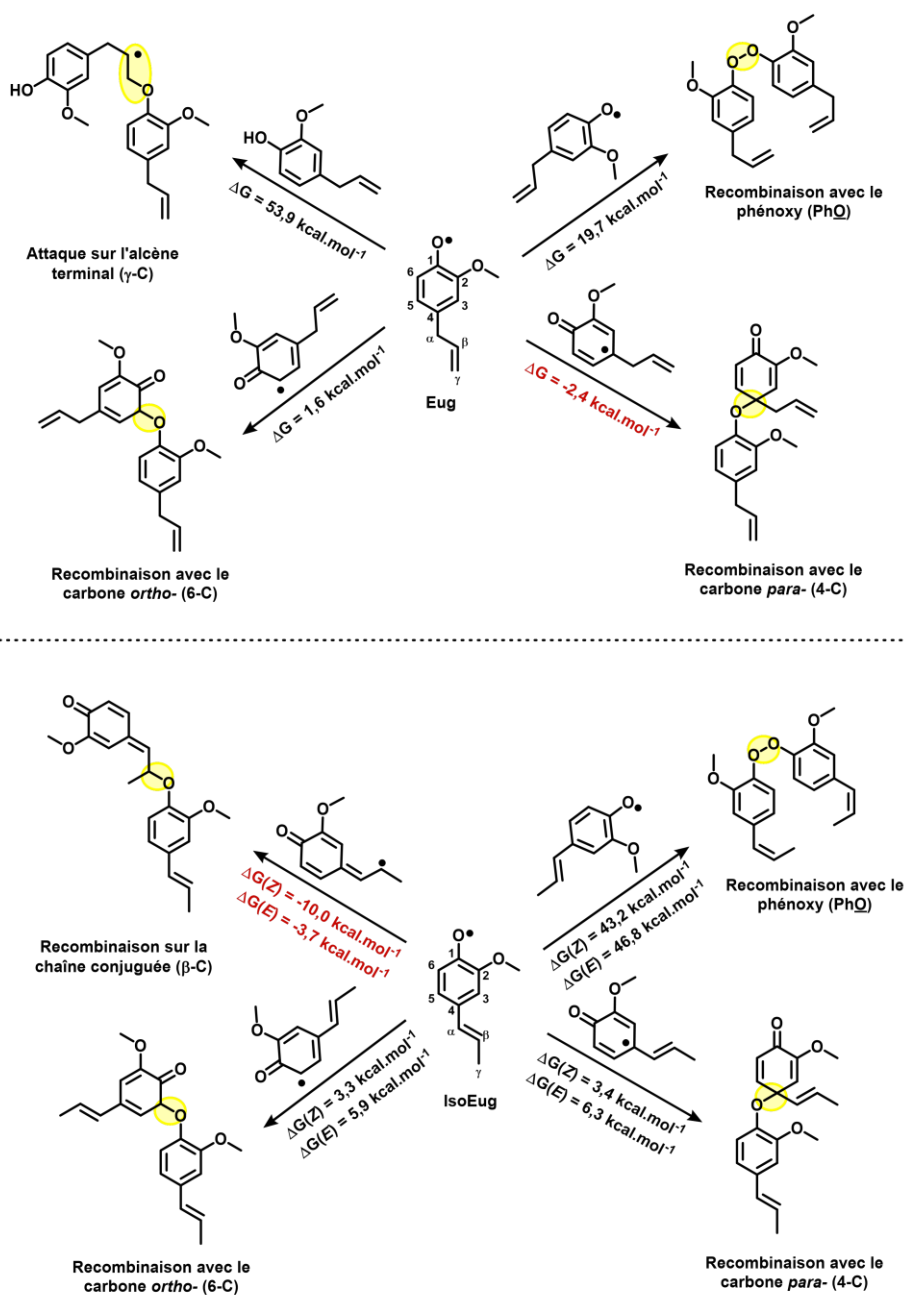


Figure 29 : Énergie de dimérisation des radicaux PhO[•] par recombinaison radicalaire pour chaque molécule avec en rouge l'enthalpie de dimérisation préférentielle

Les calculs proposent une dimérisation sur le carbone en *para*- 4-C pour l'**Eug** cependant, peut-être dû au caractère quaternaire de ce carbone, il semblerait qu'il ne soit pas le plus susceptible de réagir par rapport à ce que propose la littérature.⁵² Cet atome de carbone ne sera donc pas une cible pour la suite de l'investigation. D'un autre côté, dans le cas du carbone *ortho*- 6-C une énergie faible de dimérisation avec le radical PhO^\bullet a été obtenue. Par contre, la littérature propose une dimérisation sur ce même carbone. C'est pour cela que le carbone en *ortho*- 6-C reste une cible de choix pour la suite de l'étude. Bien que la Figure 28 montre la probabilité faible de libération du radical $^\bullet\text{CH}_3$, la littérature expose clairement la possibilité que l'**Eug** et l'**IsoEug** ont de générer une *ortho*-quinone. Le groupement méthyle de la fonction méthoxy demeure donc aussi une cible d'étude de ce manuscrit. Enfin, la Figure 29 montre que les calculs de DFT sont en accord avec la littérature vis-à-vis de la possible réactivité radicalaire de l'atome de carbone conjugué β -C de la chaîne propénylique de l'**IsoEug**, aussi position cible.

Pour résumer, les positions carbonées cibles pour nos études portent sur les intermédiaires radicalaires issus de l'**Eug** qui sont sur le carbone de la fonction méthoxy et le carbone en *ortho*- du cycle aromatique 6-C. Pour l'**IsoEug**, ces mêmes positions restent aussi des cibles avec également le carbone β -C de la chaîne propénylique. Ainsi, afin d'étudier la réactivité radicalaire de ces positions carbonées, nous avons décidé de synthétiser les composés contenant une substitution au ^{13}C sur ces dites positions (Figure 30).



Figure 30 : Positions sélectionnées en vue d'une substitution isotopique au ^{13}C , symbolisées par des étoiles jaunes pour les positions principales et rouges pour les positions que nous avons considéré comme secondaires

2. Les voies de synthèse développées

Au fil de ce chapitre, les voies de synthèse effectuées et leur développement pour substituer au ^{13}C spécifiquement les positions ciblées des molécules d'intérêt sont présentées. Avant de procéder aux synthèses utilisant des composés de départ contenant les ^{13}C au sein de leur structure, ceux-ci étant particulièrement onéreux, les stratégies de synthèse ont été mises au point et optimisées avec les analogues de départ commerciaux sans substitution isotopique spécifique préalable. L'élaboration de ces stratégies se base donc d'abord sur l'élaboration d'une stratégie à partir de la bibliothèque de « ^{13}C -molécules » disponibles, suivie d'une optimisation avec des composés commerciaux sans substitution spécifique.

2.1. Synthèse (^{13}C -MeO)-Eug et du (^{13}C -MeO)-IsoEug : la substitution sur les fonctions méthoxyles

La première substitution isotopique que nous avons entreprise consiste en l'introduction d'un atome de ^{13}C sur la position méthoxy (MeO) de l'**Eug** et de l'**IsoEug**. Cette position carbonée présente sur une fonction chimique de type éther sur un noyau aromatique est la plus triviale à substituer en reprenant la synthèse proposée par les travaux de Rice *et al.*¹¹⁹ Cette voie de synthèse utilise de l'**Eug** commercial afin d'obtenir le (^{13}C -MeO)-**Eug** (Figure 31).

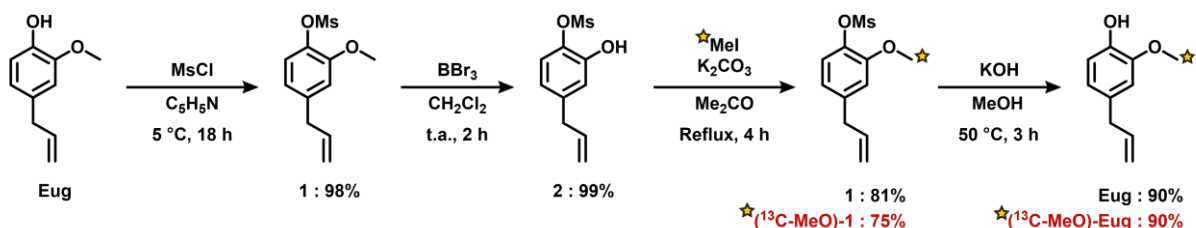


Figure 31 : Schéma de synthèse effectuée afin d'obtenir le (^{13}C -MeO)-**Eug** à partir d'**Eug**

Elle débute par la synthèse de l'**Eug** protégé avec un groupement mésylate greffé sur la fonction phénolique à l'aide de chlorure de mésyle dans de la pyridine pour obtenir le composé **1**. L'étape clé qui a permis par la suite l'insertion du ^{13}C au sein de la molécule a été la déméthylation du groupement méthoxy. Cette dernière s'est effectuée en complétant la synthèse de Rice *et al.* par l'ajout d'un lavage au pentane avec réextraction du composé **2** avec de l'acétonitrile afin d'obtenir le composé déméthylé pur avec un rendement quantitatif. En effet, en suivant simplement le protocole proposé par de Rice *et al.* le composé obtenu n'est pas pur et nécessite une optimisation. Se dégradant sur silice, il n'est pas possible de le purifier par colonne chromatographique. Cependant, une simple extraction acétonitrile/pentane suffit à purifier le composé **2**. L'insertion du ^{13}C a ensuite pu être effectuée à l'aide de (^{13}C)-iodométhane au travers d'une méthylation classique dans l'acétone en utilisant du carbonate de potassium comme base. Ceci permet de réobtenir sans autre purification le composé **1** ou le (^{13}C -MeO)-**1** lorsque la synthèse est effectuée avec le composé isotopiquement substitué. Enfin, l'**Eug** et son analogue enrichis au ^{13}C , le (^{13}C -MeO)-**Eug**, ont été obtenus par déprotection de la fonction phénolique à l'aide d'hydroxyde de potassium dans du méthanol. Le (^{13}C -MeO)-**Eug** a pu être produit avec un rendement global de 65% en 4 étapes relativement rapides.

Deux stratégies ont été envisagées pour la synthèse du (^{13}C -MeO)-**IsoEug**. La première aurait pu être menée en commençant la synthèse à partir de l'**IsoEug** commercial, en effectuant de manière similaire à la synthèse décrite ci-dessus une protection de la fonction phénol, suivie de la déméthylation du groupement méthoxy, puis sa re-méthylation à l'aide du (^{13}C)-iodométhane pour enfin déprotéger la fonction phénol. Cependant, par soucis de

simplicité une deuxième option a été choisie. Elle consiste en l'isomérisation de l'**Eug** afin d'obtenir l'**IsoEug**. De nombreuses méthodes expérimentales existent afin d'effectuer cette isomérisation par catalyse métallique (e.g., catalyse au ruthénium¹²⁰) ou thermiquement à l'aide d'une base.¹²¹ La majorité de ces stratégies produit préférentiellement le diastéréoisomère *E*. Nous avons choisi de réaliser cette isomérisation par voie palladocatalysée à l'aide de chlorure de palladium dans du méthanol selon la synthèse proposée par Nielsen *et al.*, et permettant d'obtenir le ($^{13}\text{C-MeO}$)-**IsoEug** avec un rendement de 77% (Figure 32).^{122,123} Le rendement modeste de cette réaction s'explique par la conversion non totale du ($^{13}\text{C-MeO}$)-**Eug** qui est récupéré suite à la purification du ($^{13}\text{C-MeO}$)-**IsoEug** par colonne chromatographique.

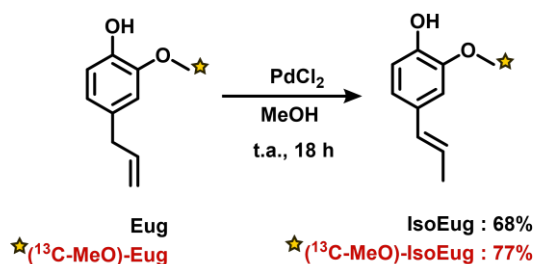


Figure 32 : Isomérisation du ($^{13}\text{C-MeO}$)-**Eug** pour obtenir le ($^{13}\text{C-MeO}$)-**IsoEug**

2.2. Synthèse du β -(^{13}C)-**IsoEug** : la substitution sur la chaîne allylique

La seconde substitution isotopique entreprise a été l'introduction du ^{13}C sur la chaîne propénylique de l'**IsoEug** sur la position β . Pour ce faire la stratégie a consisté à insérer ce carbone *via* une réaction de Wittig afin de former la double liaison contenant le ^{13}C à partir de l'aldéhyde présent sur la vanilline (Figure 33).

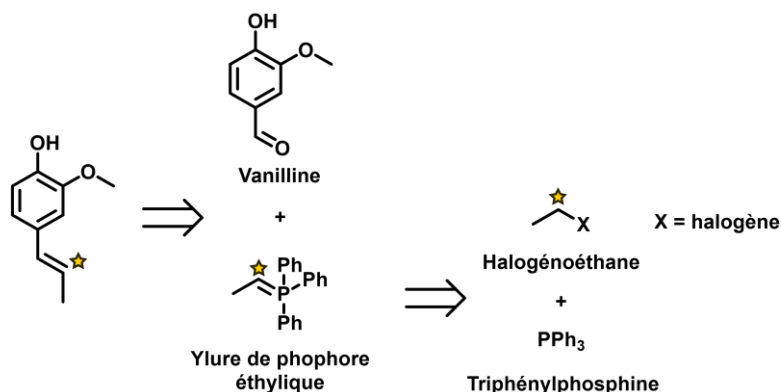


Figure 33 : Schéma de rétrosynthèse menant à l'obtention du β -(^{13}C)-**IsoEug** à partir de vanilline et d'halogénoéthane (les atomes de ^{13}C sont marqués d'une étoile)

Comme montré dans la rétrosynthèse envisagée (Figure 33), la première étape a été la préparation du sel éthylique de phosphonium (substitué au ^{13}C) permettant la génération ultérieure de l'ylure de phosphore nécessaire à la réaction de Wittig. Ce sel de phosphonium

3 et son analogue substitué au ^{13}C ont été obtenus par substitution nucléophile de la triphénylphosphine sur du iodoéthane ou du 1-(^{13}C)-iodoéthane. Par après, la fonction phénolique de la vanilline limitant la réaction de Wittig elle a été protégée à l'aide d'un groupement protecteur silylé de type *tert*-butyldiphénylesilyle en faisant réagir l'analogue chloré avec de l'imidazole sur la vanilline pour obtenir le composé **4**. Ce dernier a ensuite été capable de réagir au travers d'une réaction de Wittig avec l'ylure de phosphore généré par réaction acido-basique entre le composé **3** ou (^{13}C)-**3** et le *tert*-butylate de potassium, pour obtenir l'**IsoEug** protégé **5** et (^{13}C)-**5**. Enfin, le β -(^{13}C)-**IsoEug** a été obtenu par déprotection du groupement silylé à l'aide de fluorure de tétra-*n*-butylammonium avec un rendement de 27% estimé à partir du 1-(^{13}C)-iodoéthane (Figure 34).

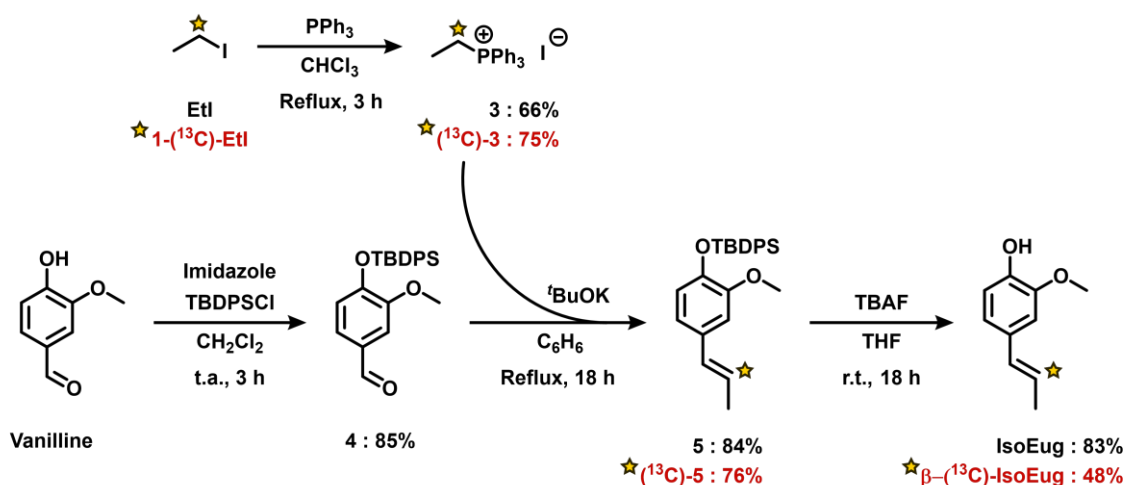


Figure 34 : Schéma de synthèse du β -(^{13}C)-**IsoEug**

2.3. Synthèse du 2,6-(^{13}C)-**Eug** et du 2,6-(^{13}C)-**IsoEug** : la substitution au sein du cycle aromatique

L'insertion ciblée d'un atome de ^{13}C au sein même du noyau aromatique d'une molécule est l'une des synthèses les plus difficiles. En effet, la « moléculothèque » de composé possédant un noyau phénylique substitué au ^{13}C dans des positions structurales précises est limitée et onéreuse, d'autant plus lorsque cette position ne porte pas de substituant ou n'est pas impliquée électroniquement avec un substituant (souvent en position *meta*-). En fonction des composés disponibles pour insérer le ^{13}C dans les positions *ortho*- de l'**Eug** et de l'**IsoEug**, une analyse rétrosynthétique a été développée (Figure 35). Tout d'abord, il a été montré précédemment que l'**IsoEug** peut être synthétisé par isomérisation de l'**Eug**, celui-ci préalablement obtenu contenant un atome de ^{13}C . Cette dernière molécule peut être synthétisée en greffant la chaîne allylique directement en *para*- du noyau aromatique *ortho*-méthoxyphénol, aussi appelé guaiacol, contenant au préalable l'atome de ^{13}C au sein du cœur phénylique. Le guaiacol substitué au ^{13}C n'étant pas commercial, il est nécessaire de le synthétiser en y greffant sur une des deux positions *ortho*- du phénol la fonction méthoxyle. Cependant, le seul phénol substitué sélectivement au ^{13}C dans les positions *ortho*- disponible

commerciallement est le 2,6- (^{13}C) -disubstitué et symétrique. Ainsi, nous avons réalisé cette voie de synthèse en utilisant ce phénol disubstitué comme produit de départ, pour avoir l'**Eug** et l'**IsoEug** eux-mêmes disubstitués sur les positions en *ortho*-. Le fait que l'une de ces positions soit quaternaire (portant la fonction méthoxyle) et l'autre tertiaire (position cible) devrait pouvoir permettre de distinguer leur réactivité.

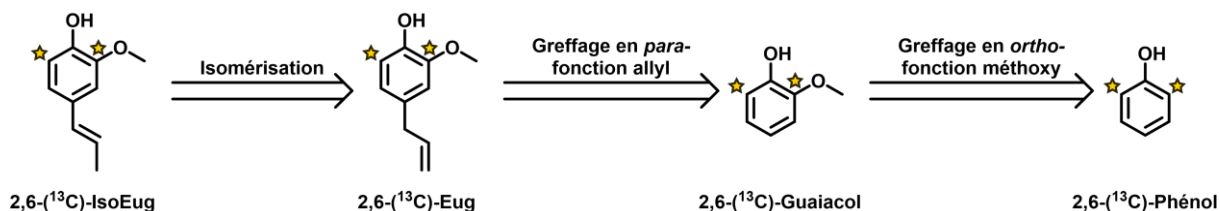


Figure 35 : Schéma de rétrosynthèse permettant la production d'**Eug** et d'**IsoEug** substitués aux atomes de ^{13}C dans les positions *ortho*-

Ji et Schäffer ont proposé une synthèse, elle-même inspirée des travaux de Loudon et Scott ainsi que de ceux de Kratzl et Vierhapper permettant l'obtention de catéchol substitué au ^{13}C ou au ^{14}C à partir de phénol déjà substitué.^{124–126} Étant donné que le guaiacol correspond à une molécule de catéchol méthylé sur l'une des fonctions hydroxyle, cette synthèse proposée par Ji *et al.* a été adaptée afin d'obtenir le guaiacol à partir de phénol (Figure 36).

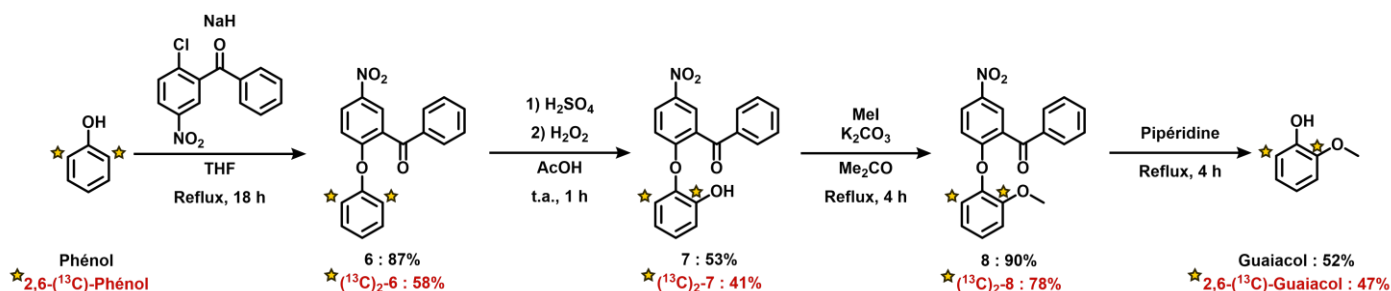


Figure 36 : Schéma de synthèse pour produire du guaiacol à partir de phénol

Celle-ci débute par une réaction de substitution nucléophile aromatique par action du phénolate, produit *in situ* à l'aide d'hydrure de sodium, sur de la 2-chloro-5-nitrobenzophénone afin d'obtenir la 5-nitro-2-phénoxy-benzophénone **6**. Cette unité de type benzophénone greffée sur le phénol agit comme groupement *ortho*-directeur pour l'hydroxylation du motif phénolique. Cette direction se produit grâce à la formation d'un intermédiaire de type sel de phénylxanthylum par dissolution du composé **6** dans l'acide sulfurique concentré en libérant de l'eau (Figure 37). Lorsque ce sel est en présence d'eau un dérivé de xanthidrol se forme. Loudon *et al.* ont montré que le cœur catéchol du composé **7** greffé au dérivé de type benzophénone peut être ensuite obtenu par oxydation du xanthidrol. Cette oxydation peut aussi se faire directement par ajout de peroxyde d'hydrogène dans la solution initiale de **6** dans l'acide sulfurique et l'acide acétique glacial au travers d'un chemin réactionnel passant

par chaque intermédiaire énoncé précédemment afin de produire ainsi le composé **7** (Figure 37).¹²⁷

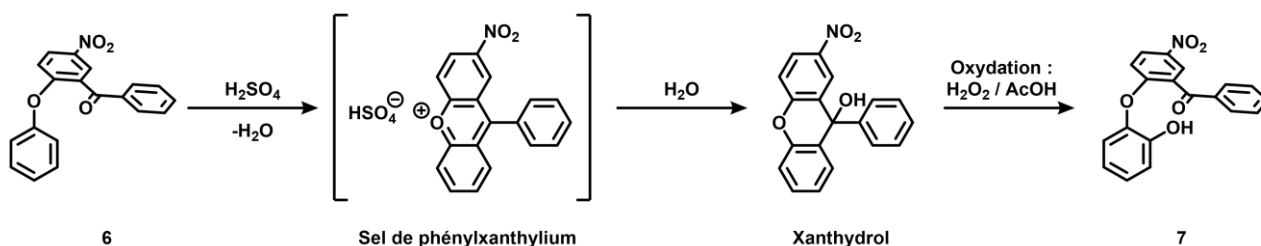


Figure 37 : Schéma de la réaction permettant l'oxydation du composé **6** pour l'obtention de **7**

Enfin, pour obtenir le guaiacol, brique centrale de l'**Eug** et de l'**IsoEug**, une méthylation de la fonction hydroxyle du composé **7** à l'aide d'iodométhane a permis l'obtention du composé **8**. Cette méthylation s'effectue avant le clivage du dérivé benzophénone afin de différencier les deux fonctions phénoliques permettant d'avoir une substitution au ^{13}C sur les deux carbones en *ortho*-, 2-C et 6-C (et non sur celui en *ortho*- portant le méthoxy, 2-C, et celui en *para*-, 4-C). Pour finir, c'est ce clivage de la nitro-benzophénone à l'aide de pipéridine qui a permis l'obtention du guaiacol (Figure 36). Néanmoins, lorsque cette synthèse du guaiacol a été menée avec les réactifs contenant les ^{13}C , nous avons remarqué par ^{13}C -RMN que ce que nous avons obtenu est un mélange de deux isotopomères inséparable, le 2,6- (^{13}C) -guaiacol ainsi que le 1,3- (^{13}C) -guaiacol (Figure 38). En effet, un phénomène d'isomérisation semble se produire dès l'étape de méthylation, donnant également $(^{13}\text{C})_2$ -**8** sous forme de mélange de deux isotopomères. Nous pensons qu'en milieu basique (*i.e.*, avec le carbonate de potassium dans l'acétone à reflux) le substituant de type benzophénone peut migrer d'une fonction hydroxyle à l'autre du noyau catéchol par $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ intramoléculaire (Figure 39). Il est à noter que lorsque les composés ne possèdent pas de substitution isotopique particulière, ce phénomène n'était pas identifiable car en migrant d'une fonction hydroxyle à l'autre, le même composé est supposé être obtenu.

Dans un second temps, à partir du guaiacol nous nous sommes intéressés au greffage de la chaîne allylique en position *para*- afin de produire de l'**Eug**. La première étape permettant cette allylation du guaiacol a consisté à substituer avec un halogène la position *para*- de telle sorte que la liaison C-C entre le cycle aromatique et la chaîne allylique puisse être formée (Figure 40). En effet, halogéner cette position avec un brome, un chlore ou un iode, la rend susceptible de faire des couplages métallo-catalysés, effectuer des substitutions nucléophiles sur aromatique ou encore de générer un organolithien nucléophile.

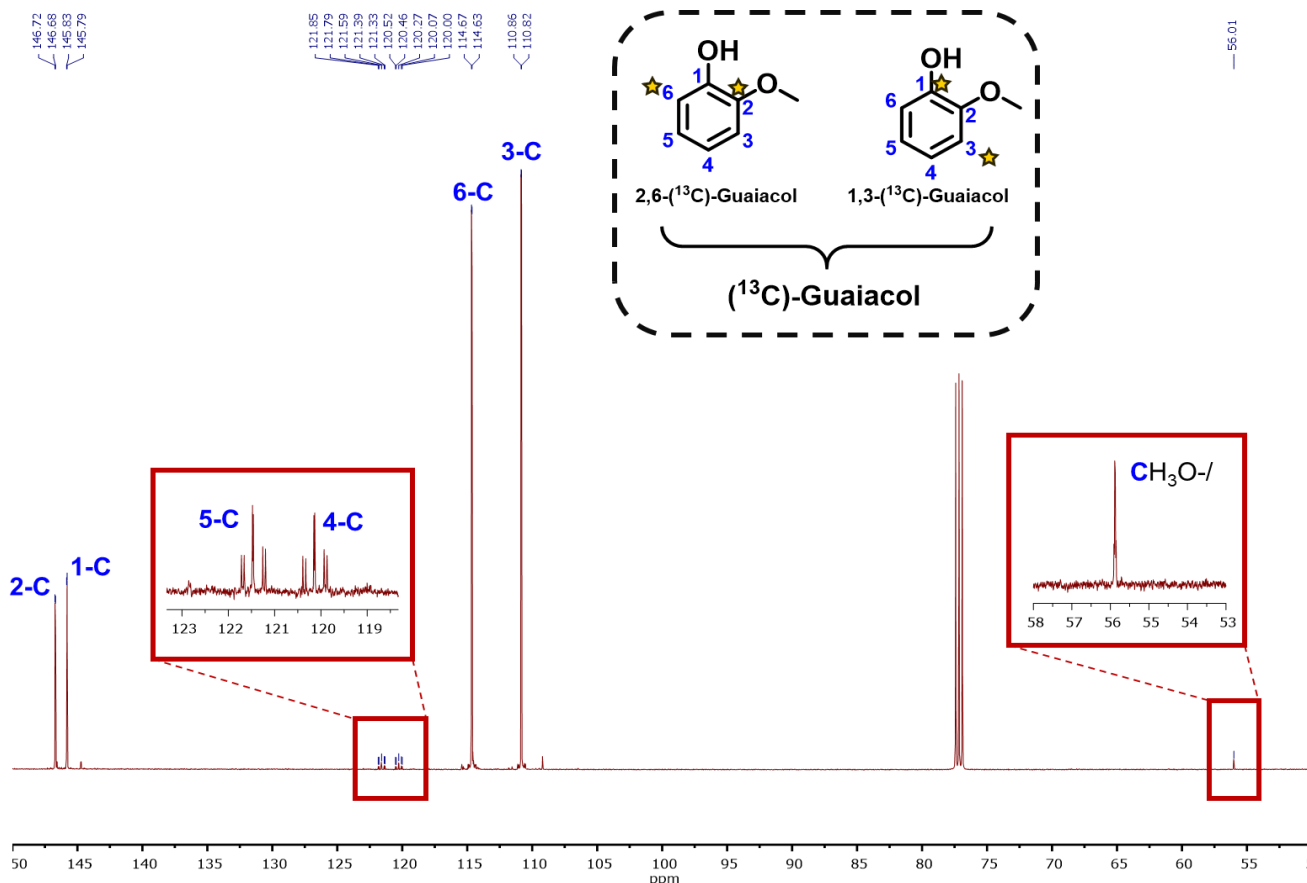


Figure 38 : Spectre ^{13}C -RMN (125 MHz) montrant l'obtention d'un mélange d'isotopomères de (^{13}C) -Guaiacol (cf. Partie Expérimentale)

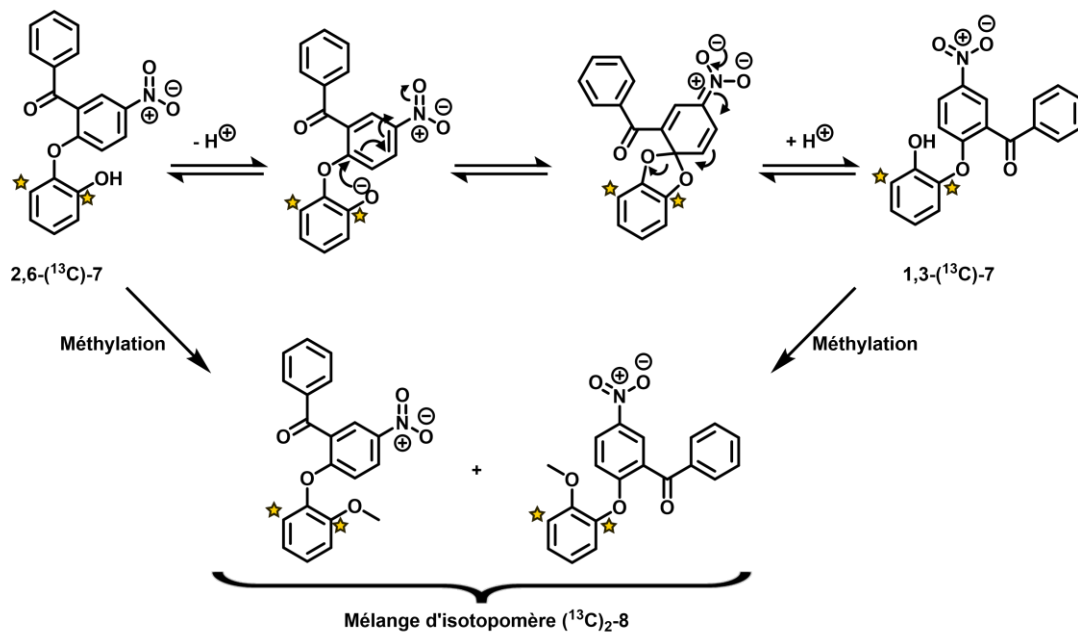


Figure 39 : Proposition de mécanisme d'isomérisation de $(^{13}\text{C})_2-7$ menant au mélange de deux isotopomères $(^{13}\text{C})_2-8$ après méthylation

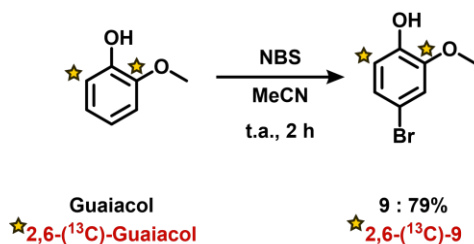


Figure 40 : Synthèse de **9** par bromation en *para*- du guaiacol

Afin d'éviter les réactions secondaires avec la fonction phénol, le composé **9** a ensuite été protégé. Lors des tests d'optimisation de la synthèse, les groupements protecteurs utilisés ont été sous forme d'éther silylé (-OTBDPS) ou sous forme d'éther de méthoxyméthyle (-OMOM) car les autres groupements protecteurs des fonctions hydroxyles possèdent des contraintes qui empêchaient leur utilisation. En effet, la déprotection douce d'un groupement éther de benzyle ou d'allyle se fait par hydrogénation catalytique qui réduirait aussi l'alcène de la fonction allyle une fois greffée, le groupement éther de *tert*-butyle nécessite des conditions dures en chauffant une solution fortement acide pour sa déprotection, les groupements de type ester (e.g., acétyle, pyvaloyle, benzoyle) sont fragiles et pourraient interagir au final dans des conditions expérimentales qui sont utilisées dans la suite de la synthèse (i.e., organolithien, Grignard). La protection des composés sous forme -OTBDPS et -OMOM présentant des rendements de même grandeur, c'est la protection sous forme d'-OTBDPS qui a été retenue. Ainsi, le composé **10** a été obtenu à l'aide de chlorure de *tert*-butyl(chloro)diphénylsilane en présence d'imidazole (Figure 41). En effet, ce groupement protecteur a l'avantage de pouvoir facilement être déprotégé de façon sélective à l'aide de fluorure de tétra-*n*-butylammonium, contrairement au -OMOM qui bien que nécessitant des conditions de déprotection plus douces que ses groupements congénères éthers nécessite toujours des conditions dures pouvant dégrader le produit par la suite en chauffant un milieu acide.

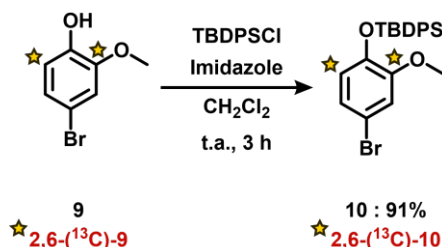


Figure 41 : Protection de la fonction phénolique sous forme d'éther silylé pour former le composé **10**

Lors du développement de la stratégie de synthèse permettant d'accéder à l'**Eug** et à l'**IsoEug**, l'insertion du groupement allylique reste encore l'étape limitante de la synthèse. Différentes voies expérimentales ont été testées pour former le composé **11**. Cependant, peu d'entre elles se sont avérées être fructueuses (Tableau 5). La réaction permettant la formation du composé **11** avec le meilleur rendement a été pour l'instant celle passant par la formation d'un Grignard à partir du composé bromé **10** qui a permis ensuite de faire une substitution nucléophile sur du bromure d'allyle, offrant le composé **11** avec le faible rendement de 14% (Figure 42).

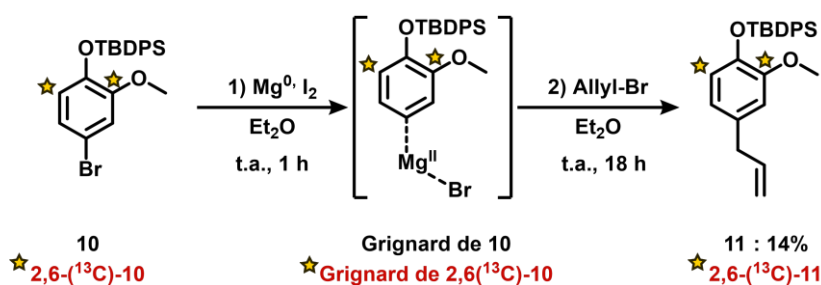


Figure 42 : Formation d'un réactif de Grignard à partir de **10** pour obtenir l'**Eug** silylé **11**

Une déprotection du composé **11** à l'aide du fluorure de tétra-*n*-butylammonium a ensuite permis de former l'**Eug**, capable d'être isomérisé comme décrit précédemment pour former l'**IsoEug** (Figure 43).

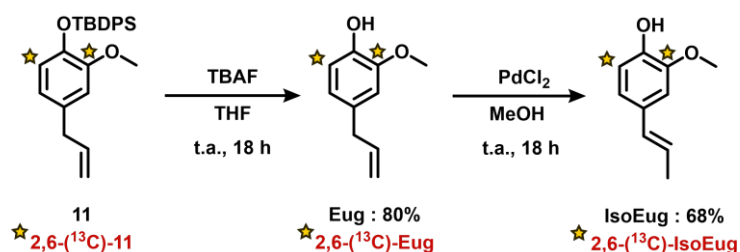


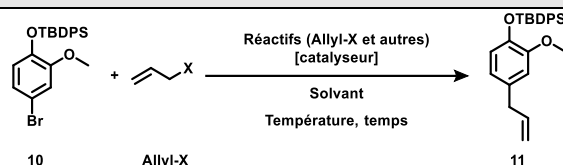
Figure 43 : Déprotection de l'éther silylé menant à l'obtention de l'**Eug** et de l'**IsoEug** par isomérisation

Bien que cette synthèse substituée au ¹³C de l'**Eug** et de l'**IsoEug** soit totalement développée, l'étape clé permettant l'insertion de la chaîne allylique en position *para*- du cœur aromatique de type guaiacol reste limitante (Figure 42). Ainsi, la synthèse substituée n'a pas été menée à terme pour l'obtention de l'**Eug** et de l'**IsoEug** tous deux substitués au ¹³C sur les positions *ortho*-.

Seul le motif commun de type guaiacol substitué au ¹³C en *ortho*-, le **2,6-(¹³C)-guaiacol** a été obtenu et sera utilisé comme référence structurale dans les prochaines parties sous la forme de mélange avec son isotopomère **1,3-(¹³C)-guaiacol**.

Tableau 5 : Différentes voies expérimentales testées pour former 11 à partir de 10

Schéma réactionnel global des tests de greffage du groupement allylique sur le composé 10



Réactifs	Catalyseur	Solvant	Température	Temps	Rendement
Allyl-Mg-Br	-	THF	t.a. puis reflux	18 h	-
Allyl-Mg-Br	-	Et ₂ O	t.a. puis reflux	18 h	-
Allyl-Mg-Br	Pd(PPh ₃) ₄	THF	t.a. puis reflux	18 h	-
Allyl-Mg-Br	PdCl ₂	THF	t.a. puis reflux	18 h	-
Allyl-Mg-Br	NiCl ₂ (dppe)	THF	t.a. puis reflux	18 h	Traces
Allyl-Mg-Br	NiCl ₂ (dppe)	THF	t.a. puis reflux	18 h	Traces*
Allyl-Mg-Br	PdCl ₂	THF	t.a. puis reflux	18 h	-*
1) ⁿ BuLi 2) Allyl-Br	-	THF	1) -78 °C 2) t.a.	1) 1 h 2) 18 h	7%
1) ⁿ BuLi 2) Allyl-Br	KI	THF	1) -78 °C 2) t.a.	1) 1 h 2) 18 h	Traces
1) ⁿ BuLi 2) Allyl-Br	-	THF	1) -78 °C 2) Reflux	1) 1 h 2) 18 h	Traces
1) ⁿ BuLi 2) Allyl-Br	-	Et ₂ O	1) -78 °C 2) t.a.	1) 1 h 2) 18 h	-
1) ⁿ BuLi 2) Allyl-OTs	-	THF	1) -78 °C 2) t.a.	1) 1 h 2) 18 h	-
1) ⁿ BuLi 2) Allyl-Br	-	THF	1) -78 °C 2) t.a.	1) 1 h 2) 18 h	Traces*
1) ⁿ BuLi 2) Allyl-Br	KI	THF	1) -78 °C 2) t.a.	1) 1 h 2) 18 h	Traces*
1) Mg ⁰ 2) Allyl-Br	1) I ₂ 2) -	THF	t.a.	1) 1 h 2) 18 h	8%
1) Mg ⁰ 2) Allyl-Br	1) I ₂ 2) -	THF	reflux	1) 1 h 2) 18 h	7%
1) Mg ⁰ 2) Allyl-Br	1) I ₂ 2) -	Et ₂ O	t.a.	1) 1 h 2) 18 h	14%
1) Mg ⁰ 2) Allyl-Br	1) I ₂ 2) -	Et ₂ O	reflux	1) 1 h 2) 18 h	12%
1) Mg ⁰ 2) Allyl-Br	1) I ₂ 2) KI	Et ₂ O	t.a.	1) 1 h 2) 18 h	Traces
1) Mg ⁰ 2) Allyl-Br	1) I ₂ 2) -	Et ₂ O	t.a.	1) 1 h 2) 18 h	13%*
1) Mg ⁰ 2) Allyl-Br	1) I ₂ 2) -	THF	t.a.	1) 1 h 2) 18 h	9%*
1) Mg ⁰ 2) Allyl-Br	1) I ₂ 2) Pd(PPh ₃) ₄	Et ₂ O	t.a.	1) 1 h 2) 18 h	Traces
1) Mg ⁰ 2) Allyl-Br	1) I ₂ 2) PdCl ₂	Et ₂ O	t.a.	1) 1 h 2) 18 h	-
1) Mg ⁰ 2) Allyl-Br	1) I ₂ 2) NiCl ₂ (dppe)	Et ₂ O	t.a.	1) 1 h 2) 18 h	-
1) Mg ⁰ 2) Allyl-Br	1) I ₂ 2) Pd(PPh ₃) ₄	Et ₂ O	t.a.	1) 1 h 2) 18 h	-

* Changement de groupement protecteur -OMOM à la place de -OTBDPS

2.4. Autres positions cibles

Bien que la synthèse substituée au ^{13}C a principalement été focalisée sur les atomes de carbone à l'origine de la dimérisation radicalaire de l'**Eug** et de l'**IsoEug** d'après des travaux antérieurs et de la littérature en accord avec les calculs théoriques de DFT, ces calculs ont exposé que certaines autres positions peuvent demeurer intéressantes à étudier. Parmi celles-ci il y a la position 4-C en *para*- de l'**Eug** et de l'**IsoEug** ainsi que la position α -C de la chaîne allylique de l'**Eug**. Pour chacune de ces deux positions une stratégie rétrosynthétique commune a été élaborée (Figure 44). L'**Eug**, capable d'être isomérisé en **IsoEug**, peut être obtenu à partir d'un ester d'acide vanillique, lui-même obtenu par la synthèse du noyau phénolique à partir d'un précurseur pyranone réagissant avec un « pronucléophile » qui permettra d'introduire la substitution isotopique. En effet, les pyran-4-ones peuvent servir comme précurseurs des phénols où le carbonyle du pyranone devient l'hydroxyle phénolique comme l'ont montré les travaux de Beyer *et al.* pour la synthèse de phénols isotopiquement substitués en position *para*- à partir de diéthyle malonate, contenant au préalable ladite substitution isotopique, comme pronucléophile.¹²⁸

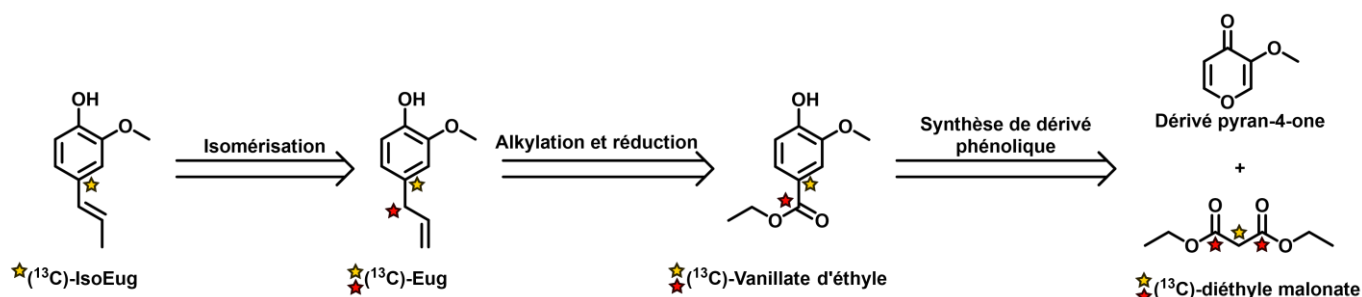


Figure 44 : Schéma de rétrosynthèse permettant l'obtention de l'**Eug** et de l'**IsoEug** substitués au ^{13}C dans la position 4-C en *para*- (étoile jaune) et l'obtention de l'**Eug** substitué au ^{13}C dans la position α -C (étoile rouge)

La première grande étape clé de cette stratégie de synthèse est l'introduction du ^{13}C au sein de la position *para*- du composé phénolique ou sur la chaîne ester portée sur cette même position à partir de diéthyle malonate commercial isotopiquement substitué sur le carbone méthylénique (Figure 44 étoiles jaunes) ou sur les carbones carboxyliques (Figure 44 étoiles rouges). Le diéthyle malonate joue ainsi le rôle de pronucléophile pour ouvrir le dérivé de pyran-4-one **12**, préalablement synthétisé par méthylation de l'acide pyroméconique. Cette conversion de l'hétérocycle en dérivé phénolique s'est effectuée en s'inspirant des travaux de Marshall *et al.* qui ont optimisé aux micro-ondes (μW) la synthèse proposée par Beyer *et al.*^{128,129} Ainsi l'ouverture du pyran-4-one **12** s'est effectuée en milieu basique à l'aide de *tert*-butanolate de potassium permettant l'addition nucléophile du diéthyle malonate sur l'insaturation en α,β du groupement carbonyle du pyranone. S'en est suivie une cyclisation pour former un intermédiaire 4-diester cyclohex-2,5-dièn-1-one par élimination d'eau. Puis,

c'est une décarboxylation en milieu acide qui permet de réaromatiser la molécule afin d'obtenir la vanillate d'éthyle (Figure 45).

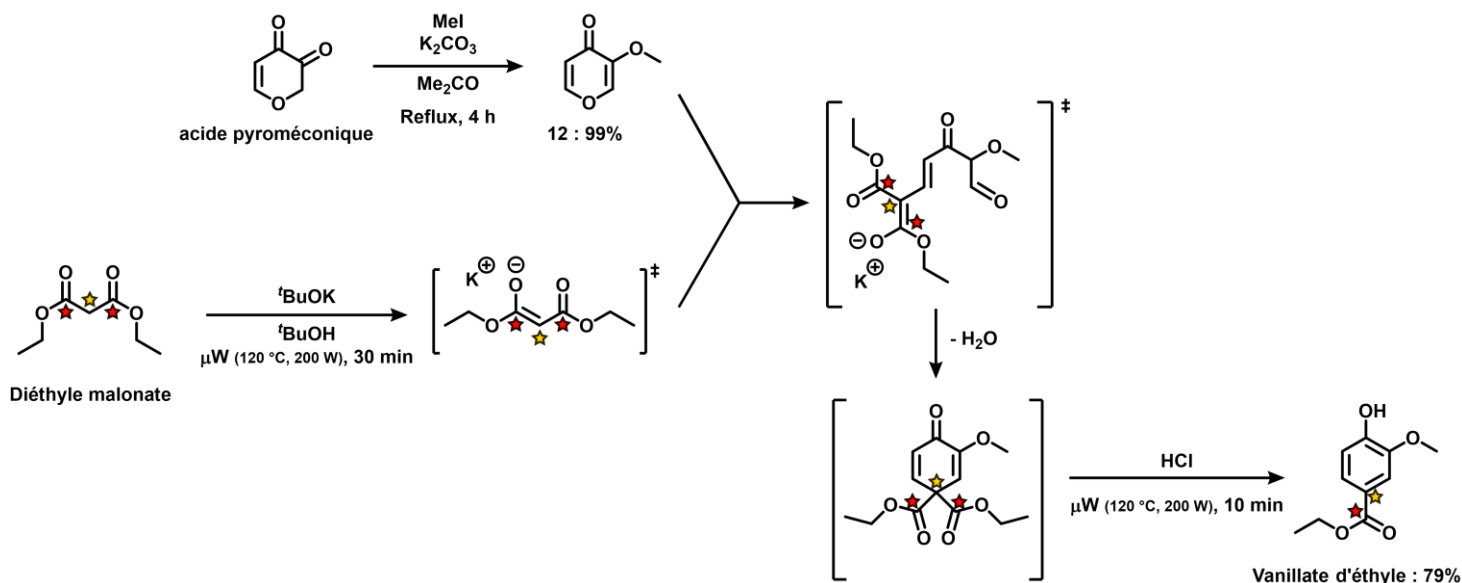


Figure 45 : Schéma réactionnel de production de vanillate d'éthyle pouvant être obtenu substitué au ¹³C à partir de diéthyle malonate et d'acide pyroméconique

La fonction phénolique du vanillate d'éthyle a été protégée sous forme d'éther silylé à l'aide de chlorure de *tert*-butyldiphénylsilane en solution en présence d'imidazole afin d'obtenir le composé **13**. La fonction ester du composé **13** a ensuite pu être réduite sous la forme d'un alcool primaire par l'action d'aluminohydrure de lithium pour obtenir le composé **14** dont la fonction alcool ainsi générée a aussi pu être substituée en dérivé bromé pour être activée (Figure 46).

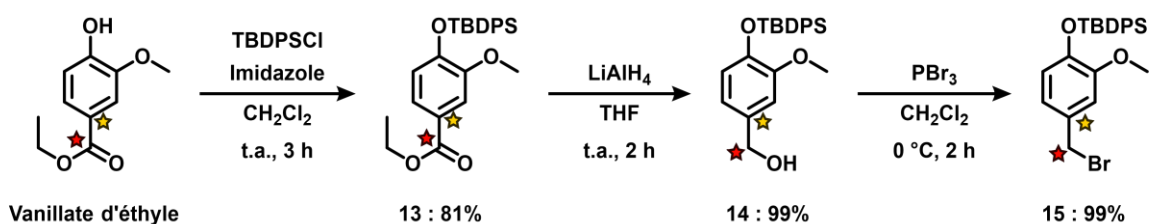


Figure 46 : Protection du vanillate d'éthyle sous forme de d'éther silylé suivie de la réduction de la fonction ester et de la substitution de l'alcool obtenu pour obtenir le dérivé bromé **15**

Enfin, après avoir généré le centre électrophile sur le carbone portant le brome du composé **15**, la fonction alcène du composé **16** a pu être obtenue à l'aide d'un réactif de Grignard du bromure de vinylmagnésium nécessaire à l'obtention de **16**. Ce dernier correspond à l'**Eug** de la fonction phénolique sous forme d'éther silylé. Ainsi, un clivage de ce groupement protecteur à l'aide de fluorure de tétra-*n*-butylammonium permet l'obtention de l'**Eug** isomérisable pour obtenir l'**IsoEug** (Figure 47).

Bien que la stratégie de synthèse permettant d'obtenir le α -(^{13}C)-**Eug** ainsi que les 4-(^{13}C)-**Eug** et 4-(^{13}C)-**IsoEug** a été développée à partir de dérivés substitués du diéthyle malonate commerciales, ces synthèses substituées n'ont pas pu être menées à terme à l'issu de cette thèse, seule les séries non-substituées ont été effectuées pour le développement de la voie de synthèse.

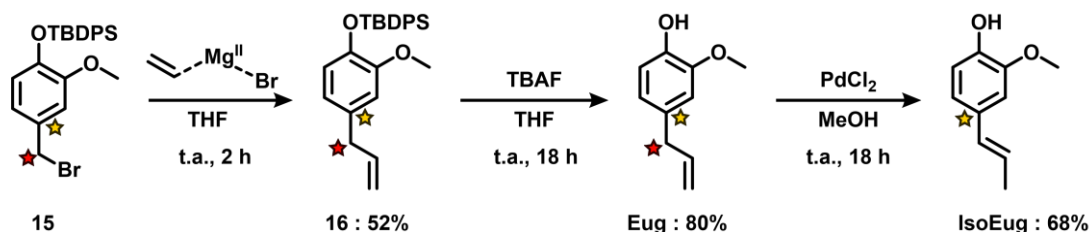


Figure 47 : Schéma de synthèse menant à l'obtention de l'**Eug** et de l'**IsoEug** à partir de **15**

3. Bilan vis-à-vis des synthèses substituées au ^{13}C

Ce premier chapitre présente les stratégies de synthèse développées permettant l'obtention de l'**Eug** et de l'**IsoEug** contenant des substitutions isotopiques au ^{13}C .

La littérature proposant une déméthylation permettant l'obtention, par oxydation, d'un dérivé de type *ortho*-quinone, l'**Eug** et l'**IsoEug** ont été synthétisés avec la fonction méthoxy contenant cet enrichissement isotopique permettant ainsi l'étude du comportement du groupement méthyle par la suite. Cette synthèse a été développée à partir d'**Eug** par déméthylation de la fonction méthoxy, puis re-méthylation de celle-ci avec du (^{13}C)-iodométhane permettant l'introduction du ^{13}C .

L'**IsoEug**, étant supposé pouvoir générer un intermédiaire radicalaire réactif en position β de sa chaîne allylique conjuguée au noyau aromatique, a également été obtenu contenant une substitution isotopique au ^{13}C sur cette position (β -C) au travers d'une réaction de Wittig comme étape clé permettant l'introduction de cet isotope. La réaction de Wittig a pu être réalisée à partir de vanilline et de 1-(^{13}C)-iodoéthane convertie au préalable en yluire de phosphore.

Le carbone en position *ortho*-, 6-C, de l'**Eug** et de l'**IsoEug** étant connu de la littérature comme l'une des cibles préférentielles de dimérisation radicalaire nous avons cherché également à le substituer au ^{13}C . L'introduction de l'isotope dans cette position étant complexe, une stratégie de synthèse permettant l'apport du ^{13}C sur les positions *ortho*- a été développée à partir de 2,6-(^{13}C)-phénol. Cependant, cette stratégie de synthèse propose une étape encore très limitante n'ayant pas permis l'aboutissement de la synthèse du 2,6-(^{13}C)-**Eug** et du 2,6-(^{13}C)-**IsoEug**. De fait, seul le motif de base de type guaiacol a été synthétisé contenant des

^{13}C sur les positions *ortho*- pour les études qui ont suivi. Néanmoins, celui-ci s'est isomérisé lors de sa synthèse (étape de méthylation) donnant donc le 2,6-(^{13}C)-guaiacol en mélange avec son isotopomère 1,3-(^{13}C)-guaiacol.

Après nos études théoriques et bibliographiques, bien que moins suspectées, d'autres positions potentielles d'apparition d'intermédiaires radicalaires réactifs ont également été identifiées sur la position *para*-, 4-C, des noyaux phénoliques de l'**Eug** et de l'**IsoEug** et sur le méthylène, α -C, de la chaîne allylique de l'**Eug**. Ainsi, une stratégie de synthèse commune à chacune de ces positions a été développée en faisant varier la position de substitution isotopique du diéthyle malonate utilisé comme produit de départ pour former le cœur phénolique en réagissant avec un dérivé de pyranone.

Experimental part: Chapter 1

Materials and methods

Reagents and solvents

All reactions requiring anhydrous conditions, air and/or moisture sensitive, were carried out in flame-dried glassware and under an inert atmosphere of argon.

All fully enriched ¹³C-isotopic compounds were purchased from EurisoTop[®]. All other solvents and reactants were purchased from Sigma-Aldrich[®], TCI Chemicals[®], Thermo Fischer Scientific[®], Alfa Aesar[®], Carlo Erba[®] or FluoroChem[®], depending on availability.

When necessary, solvents and liquid amine reagents were anhydrous and pure from suppliers, or distilled according to the literature.^a Old batches of hygroscopic solid compounds (e.g., *N*-bromosuccinimide (NBS)) were also purified by recrystallization according to the literature.^a The other reagents and solvents were used as received.

Organolithium reagents were purchased in solution and were titrated each time before use with the method described by Suffert or with diphenylacetic acid.^b

Follow-up of the reactions

Reactions were followed by thin layer chromatography (TLC) performed on aluminum sheets or glass plated coated with silica gel (Merck[®] 60 F₂₅₄). After elution, the TLC plates were visualized with UV light ($\lambda = 254$ and 365 nm). When necessary, they were revealed using different TLC dips/stains depending on the reaction products and impurities, either an exposure to iodine pellets in a jar or by immersion in a solution of cerium phosphomolybdic acid (PMA/Ce) or potassium permanganate (KMnO₄)

Purification of products

Column chromatography purifications were carried out using silica gel (Merck[®] 40-63 μ m). Preparative thin layer chromatography (PLC) was performed on glass plated coated with silica gel (Merck[®] 60 F₂₅₄, 0.5 mm or 2 mm).

Filtrations through Celite to remove metallic salts were performed on a pad of Celite[™] 545 on sintered funnel with a suction vial.

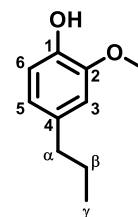
^a W. L. F. Armarego, Purification of laboratory chemicals, Butterworth-Heinemann is an imprint of Elsevier, Amsterdam, 8th edition., 2017.

^b J. Suffert, Simple direct titration of organolithium reagents using *N*-pivaloyl-*o*-toluidine and/or *N*-pivaloyl-*o*-benzylaniline, J. Org. Chem., 1989, 54, 509–510.

Characterization of products

Proton (^1H) and carbon (^{13}C) nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on Bruker[®] Advance spectrometers at 300 MHz, 400 MHz or 500 MHz for ^1H and at 100 MHz or 125 MHz for ^{13}C . NMR chemical shifts (δ) are reported in parts per million (ppm) and are indirectly referenced to tetramethylsilane (TMS) *via* the residual solvent signal resulting from NMR samples performed in CDCl_3 (CDCl_3 : $\delta(^1\text{H}) = 7.26$ ppm and $\delta(^{13}\text{C}) = 77.2$ ppm) except mention otherwise.

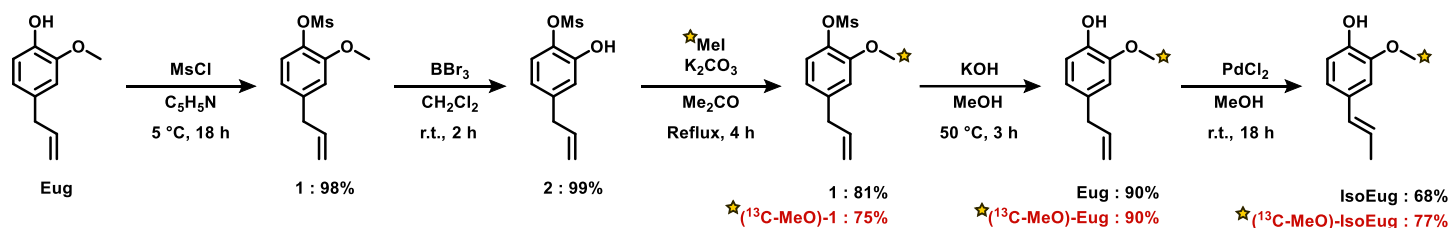
The NMR descriptions are given with the following numeration of carbon atoms, based on the *para*-substitute-catechol core:



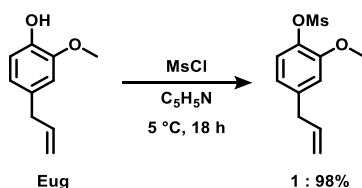
The other non-classical numeration of carbon atoms of synthesized molecules are given on the reaction scheme.

Multiplicities are indicated as s (singlet), br s (broad singlet), d (doublet), br d (broad doublet), t (triplet), q (quadruplet), dd (doublet of doublet), td (triplet of doublet), tt (triplet of triplet), dq (doublet of quadruplet), ddd (doublet of doublet of doublet), dtd (doublet of triplet of doublet), dd (doublet of doublet of quadruplet) and m (multiplet). Coupling constants (J) are given in Hertz (Hz). Signal attributions were determined on the basis of unambiguous chemical shifts or coupling patterns using databases, tables, charts and simulations. Two-dimensional (2D) NMR spectroscopies were performed when necessary to complete spectral assignment: correlation spectroscopy (COSY) based on ^1H , heteronuclear single quantum correlation (HSQC) and heteronuclear multiple bond correlation (HMBS) based on ^1H - ^{13}C correlation.

Synthesis procedures

 Synthesis of (¹³C-MeO)-eugenol and (¹³C-MeO)-isoeugenol: (¹³C-MeO)-Eug and (¹³C-MeO)-IsoEug


4-Allyl-2-methoxyphenyl methanesulfonate: 1



Methanesulfonyl chloride (1.2 mL, 15 mmol, 1.5 eq) was added dropwise to a solution of eugenol (1.64 g, 10 mmol, 1 eq) in dry pyridine (10 mL) stirred at 5 °C under an argon atmosphere. The reaction was complete after 18 h stirring at 5 °C. It was then quenched with 60 mL of water. The aqueous mixture was extracted with diethyl ether (3 x 80 mL). The combined organic layers were washed with hydrochloric acid (1 M, 20 mL), water (50 mL) and brine (20 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure (below 30 °C) to give the pure product.

Yield and aspect: 98% (2.37 g, 9.8 mmol), colorless oil partially crystallized at room temperature

Formula: C₁₁H₁₄O₄S

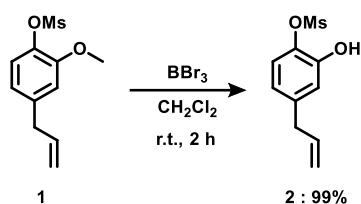
Molar mass: 242.29 g.mol⁻¹

CAS: 91971-63-0

TLC: R_f = 0.54 (Pentane/Et₂O 8:2)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.17 (s, 3 H, SCH₃), 3.38 (d, 2 H, ³J = 6.6 Hz, α-CH₂), 3.88 (s, 3 H, OCH₃), 5.10 (br s, 1 H, γ-CH₂), 5.13 (br d, 1 H, ³J = 4.3 Hz, γ-CH₂), 5.94 (m, 1 H, β-CH), 6.80 (m, 2 H, 3-CH + 5-CH), 7.22 (d, 1 H, ³J = 6.9 Hz, 6-CH)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 38.2 (SCH₃), 40.1 (α-CH₂), 56.0 (OCH₃), 113.1 (3-C), 116.6 (γ-CH₂), 121.1 (5-C), 124.3 (6-C), 136.6 (β-C), 136.6 (4-C), 140.7 (1-C), 151.2 (2-C)

4-Allyl-2-hydroxyphenyl methanesulfonate: 2

To a solution of **1** (726.9 mg, 3 mmol, 1 eq) in dichloromethane (30 mL) at -78 °C under an argon atmosphere, a solution of boron tribromide in dichloromethane (1 M, 4.5 mL, 4.5 mmol, 1.5 eq) was slowly added. The resulting reaction mixture was then allowed to reach room temperature and was stirred for 2 h. The reaction was then quenched with an aqueous solution of sodium hydrogenocarbonate (5%, 80 mL) and extracted with diethyl ether (2 x 100 mL). The combined organic layers were washed with water (2 x 80 mL) and brine (80 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give a crude brown viscous oil. The crude was dissolved in acetonitrile (30 mL) and washed with pentane (3 x 20 mL). The acetonitrile layer was then concentrated under reduced pressure to give the pure product.

Yield and aspect: 99% (680 mg, 2.98 mmol), colorless oil

Formula: C₁₀H₁₂O₄S

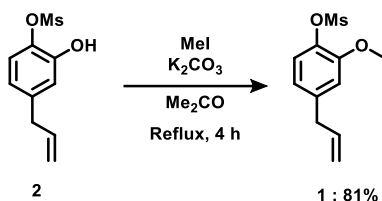
Molar mass: 228.26 g.mol⁻¹

CAS: 115234-25-8

TLC: R_f = 0.46 (Pentane/Et₂O 8:2)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.18 (s, 3 H, SCH₃), 3.32 (d, 2 H, ³J = 7.0 Hz, α-CH₂), 5.10 (br s, 1 H, γ-CH₂), 5.12 (br d, 1H, ³J = 4.3 Hz, γ-CH₂), 5.93 (m, 1 H, β-CH), 6.88 (m, 2 H, 3-CH + 5-CH), 7.06 (d, 1 H, ³J = 6.9 Hz, 6-CH)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 38.3 (SCH₃), 40.4 (α-CH₂), 112.9 (3-C), 116.5 (γ-CH₂), 120.7 (5-C), 124.8 (6-C), 136.7 (β-C), 137.1 (4-C), 141.9 (1-C), 147.0 (2-C)

4-Allyl-2-methoxyphenyl methanesulfonate: 1

To a solution of **2** (457 mg, 2 mmol, 1 eq) and potassium carbonate (553 mg, 4 mmol, 2 eq) in acetone (10 mL) at room temperature, methyl iodide was added (250 μL, 4 mmol, 2 eq).

The resulting reaction mixture was stirred at reflux for 4 h. Acetone was then evaporated under reduced pressure. The resulting oil was dissolved in dichloromethane (20 mL) and water (20 mL). The aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 x 30 mL). The combined organic layers were washed with brine (15 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give the pure product.

Yield and aspect: 81% (393 mg, 1.62 mmol), colorless oil partially crystallized at room temperature

Formula: C₁₁H₁₄O₄S

Molar mass: 242.29 g.mol⁻¹

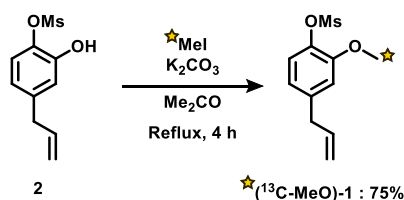
CAS: 91971-63-0

TLC: R_f = 0.54 (Pentane/Et₂O 8:2)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.17 (s, 3 H, SCH₃), 3.38 (d, 2 H, ³J = 6.6 Hz, α-CH₂), 3.88 (s, 3 H, OCH₃), 5.10 (br s, 1 H, γ-CH₂), 5.13 (br d, 1H, ³J = 4.3 Hz, γ-CH₂), 5.94 (m, 1 H, β-CH), 6.80 (m, 2 H, 3-CH + 5-CH), 7.22 (d, 1 H, ³J = 6.9 Hz, 6-CH)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 38.2 (SCH₃), 40.1 (α-CH₂), 56.0 (OCH₃), 113.1 (3-C), 116.6 (γ-CH₂), 121.1 (5-C), 124.3 (6-C), 136.6 (β-C), 136.6 (4-C), 140.7 (1-C), 151.2 (2-C)

4-Allyl-2-(¹³C)-methoxyphenyl methanesulfonate: (¹³C-MeO)-1



To a solution of **2** (680 mg, 2.98 mmol, 1 eq) and potassium carbonate (824 mg, 5.96 mmol, 2 eq) in acetone (15 mL) at room temperature, (¹³C)-methyl iodide was added (374 μL, 5.96 mmol, 2 eq). The resulting mixture was stirred at reflux temperature for 4 hours. Acetone was then evaporated under reduced pressure. The resulting oil was dissolved in dichloromethane (30 mL) and water (30 mL). The aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 x 40 mL). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give the pure product.

Yield and aspect: 75% (547 mg, 2.25 mmol), colorless oil partially crystallized at room temperature

Formula: ¹³CC₁₀H₁₄O₄S

Molar mass: 243.06 g.mol⁻¹

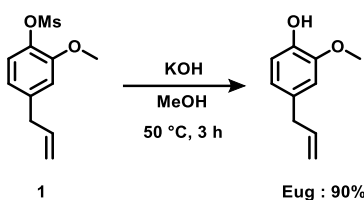
CAS (¹³C non-substituted): 91971-63-0

TLC: R_f = 0.54 (Pentane/Et₂O 8:2)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.17 (s, 3 H, SCH₃), 3.38 (d, 2 H, ³J = 6.6 Hz, α-CH₂), 3.88 (d, 3 H, ¹J_{H-¹³C} = 145.6 Hz, O¹³CH₃), 5.10 (br s, 1 H, γ-CH₂), 5.13 (br d, 1 H, ³J = 4.3 Hz, γ-CH₂), 5.94 (m, 1 H, β-CH), 6.80 (m, 2 H, 3-CH + 5-CH), 7.22 (d, 1 H, ³J = 6.9 Hz, 6-CH)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 38.2 (SCH₃), 40.1 (α-CH₂), 56.0 (O¹³CH₃), 113.1 (3-C), 116.6 (γ-CH₂), 121.1 (5-C), 124.3 (6-C), 136.6 (β-C), 136.6 (4-C), 140.7 (1-C), 151.2 (2-C)

4-Allyl-2-methoxyphenol, Eugenol: Eug



A saturated solution of potassium hydroxide (11.7 M, 4.9 mL, 57.3 mmol, 35 eq) was added to **1** (393 mg, 1.62 mmol, 1 eq) dissolved in methanol (16 mL). The resulting mixture was heated at 50 °C for 3 h, then methanol was removed under reduced pressure. The obtained crude aqueous solution was diluted with hydrochloric acid (3 M) until pH around 6. This aqueous mixture was extracted with diethyl ether (3 x 30 mL). The combined organic layers were washed with brine (15 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give the pure product.

Yield and aspect: 90% (240 mg, 1.46 mmol), yellowish oil

Formula: C₁₀H₁₂O₂

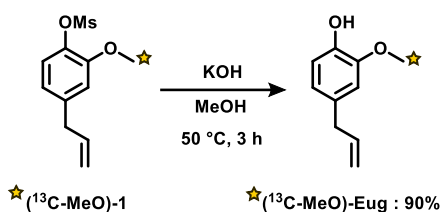
Molar mass: 164.2 g.mol⁻¹

CAS: 97-53-0

TLC: R_f = 0.27 (Pentane/EtOAc 9:1)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.33 (d, 2 H, ³J = 6.7 Hz, α-CH₂), 3.88 (s, 3 H, OCH₃), 5.02-5.12 (m, 2 H, γ-CH₂), 5.51 (s, 1 H, OH), 5.91-6.02 (m, 1 H, β-CH), 6.66-6.71 (m, 2 H, 3-CH + 5-CH), 6.83-6.86 (m, 1 H, 6-CH)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 39.9 (α-C), 55.9 (OCH₃), 111.1 (γ-C), 114.2 (3-C), 115.6 (6-C), 121.2 (5-C), 131.9 (4-C), 137.9 (β-C), 143.9 (1-C), 146.4 (2-C)

4-Allyl-2-(^{13}C)-methoxyphenol, (^{13}C -MeO)-Eugenol: (^{13}C -MeO)-Eug


A saturated solution of potassium hydroxide (11.7 M, 6.7 mL, 78.4 mmol, 35 eq) was added to ($^{13}\text{C}\text{-MeO})\text{-1}$ (547 mg, 2.25 mmol, 1 eq) dissolved in methanol (22 mL). Resulting mixture was heated at 50 °C for 3 h, then methanol was removed under reduced pressure. The crude aqueous mixture was diluted with hydrochloric acid (3 M) until a pH around 6. This aqueous solution was extracted with diethyl ether (3 x 30 mL). The combined organic layers were washed with brine (15 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give the pure product.

Yield and aspect: 90% (335 mg, 2.03 mmol), yellowish oil partially solid

Formula: $^{13}\text{C}\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_2$

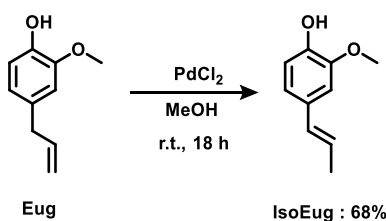
Molar mass: 165.09 g.mol $^{-1}$

CAS (^{13}C non-substituted): 97-53-0

TLC: $R_f = 0.27$ (Pentane/EtOAc 9:1)

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3.33 (d, 2 H, $^3J = 6.7$ Hz, $\alpha\text{-CH}_2$), 3.88 (d, 3 H, $^1J_{\text{H-}^{13}\text{C}} = 144.2$ Hz, O^{13}CH_3), 5.02-5.12 (m, 2 H, $\gamma\text{-CH}_2$), 5.51 (s, 1 H, OH), 5.91-6.02 (m, 1 H, $\beta\text{-CH}$), 6.66-6.71 (m, 2 H, 3-CH + 5-CH), 6.83-6.86 (m, 1 H, 6-CH)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 39.9 ($\alpha\text{-C}$), 55.9 (O^{13}CH_3), 111.1 ($\gamma\text{-C}$), 114.2 (3-C), 115.6 (6-C), 121.2 (5-C), 131.9 (4-C), 137.9 ($\beta\text{-C}$), 143.9 (1-C), 146.4 (2-C)

2-Methoxy-4-(prop-1-en-1-yl)phenol, Isoeugenol: IsoEug


To a solution of **Eug** (164.2 mg, 1 mmol, 1 eq) in methanol (5 mL), palladium^{II} chloride (8.9 mg, 0.05 mmol, 0.05 eq) was added under an argon atmosphere at room temperature. The resulting mixture was stirred for 18 hours, then was filtered through Celite. The filtrate was

concentrated under reduced pressure. The obtained crude product was purified by column chromatography on silica gel (Pentane/Et₂O 85:15) to give the pure product.

Formula: C₁₀H₁₂O₂

Molar mass: 164.2 g.mol⁻¹

Yield and aspect: 68% (111.7 mg, 0.68 mmol), yellowish oil

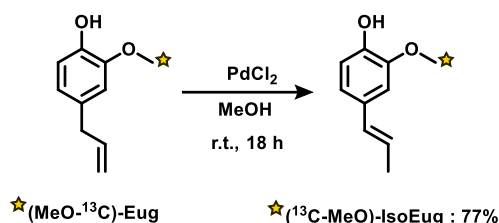
CAS: 97-54-1

TLC: R_f = 0.36 (Pentane/Et₂O 8:2)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.88 (dd, 3 H, ³J = 7.1 Hz, ⁴J = 1.8 Hz, γ-CH₃), 3.92 (s, 3 H, OCH₃), 6.04-6.11 (m, 1 H, β-CH), 6.29-6.35 (m, 1 H, α-CH), 6.82-6.87 (m, 3 H, H_{aromatic})

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 18.5 (γ-CH₃), 55.9 (OCH₃), 107.9 (3-C), 114.4 (6-C), 119.4 (5-C), 123.6 (β-C) 130.8 (α-C), 130.8 (4-C) , 144.8 (1-C), 146.7 (2-C)

2-(¹³C)-Methoxy-4-(prop-1-en-1-yl)phenol, (¹³C-MeO)-Isoeugenol: (¹³C-MeO)-IsoEug



To a solution of (¹³C-MeO)-Eug (165 mg, 1 mmol, 1 eq) in methanol (5 mL), palladium^{II} chloride (8.9 mg, 0.05 mmol, 0.05 eq) under an argon atmosphere at room temperature. The resulting mixture was stirred for 18 h, then was filtered through Celite. The filtrate was concentrated under reduced pressure. The obtained crude product was purified by column chromatography on silica gel (Pentane/Et₂O 85:15) to give the pure product.

Yield and aspect: 77% (127.4 mg, 0.77 mmol), yellowish oil

Formula: ¹³CC₉H₁₂O₂

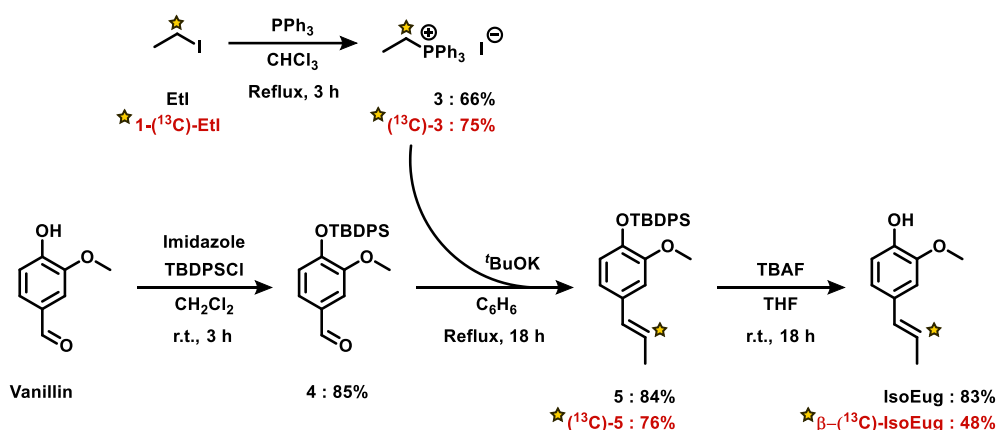
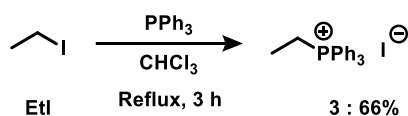
Molar mass: 165.09 g.mol⁻¹

CAS (¹³C non-substituted): 97-54-1

TLC: R_f = 0.36 (Pentane/Et₂O 8:2)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.88 (dd, 3 H, ³J = 7.1 Hz, ⁴J = 1.8 Hz, γ-CH₃), 3.92 (d, 3 H, ¹J_{H-¹³C} = 145.0 Hz, O¹³CH₃), 6.04-6.11 (m, 1 H, β-CH), 6.29-6.35 (m, 1 H, α-CH), 6.82-6.87 (m, 3 H, H_{aromatic})

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 18.5 (γ-CH₃), 55.9 (O¹³CH₃), 107.9 (3-C), 114.4 (6-C), 119.4 (5-C), 123.6 (β-C) 130.8 (α-C), 130.8 (4-C) , 144.8 (1-C), 146.7 (2-C)

Synthesis of β -(^{13}C)-Isoeugenol: β -(^{13}C)-IsoEug

 Ethyltriphenylphosphonium iodide: **3**


Iodoethane (1 g, 6.40 mmol, 1.1 eq) and triphenylphosphine (1.52 g, 5.79 mmol, 1 eq) were dissolved in chloroform (6 mL). The resulting mixture was refluxed for 3 h and after this time it was allowed to reach room temperature. The solvent was evaporated under reduced pressure and the obtained crude of the reaction was then put in suspension in tetrahydrofuran. The white solid formed in solution was filtered under vacuum on a sintered funnel to give the pure product as the filter residue.

Yield and aspect: 66% (based on Etl, 1.76 g, 4.21 mmol), white crystal solid

Formula: $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{IP}$

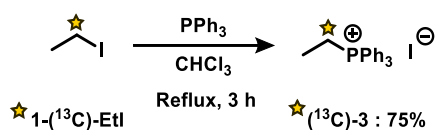
Molar mass: $418.26 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

CAS: 4736-60-1

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.39 (td, 3 H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.4 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-P}} = 4.3 \text{ Hz}$, CH_3), 3.79 (dq, 2 H, $^2J_{\text{H-P}} = 12.8 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H-H}} = 7.4 \text{ Hz}$, CH_2), 7.66-7.86 (m, 15 H, 3 x Ph)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.0 (d, $^2J_{\text{P-C}} = 5.3 \text{ Hz}$, CH_3), 17.3 (d, $^1J_{\text{P-C}} = 51.6 \text{ Hz}$, CH_2), 118.1 (d, $^1J_{\text{P-C}} = 85.9 \text{ Hz}$, 3 x Ph_{gem}P), 130.6 (d, $^2J_{\text{P-C}} = 12.5 \text{ Hz}$, 6 x Ph_{ortho}P), 133.7 (d, $^3J_{\text{P-C}} = 9.9 \text{ Hz}$, 6 x Ph_{meta}P), 135.1 (d, $^4J_{\text{P-C}} = 3.0 \text{ Hz}$, 3 x Ph_{para}P)

^{31}P NMR (121 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 26.23

1- (^{13}C) -Ethyltriphenylphosphonium iodide: (^{13}C) -3


1- (^{13}C) -Iodoethane (1 g, 6.37 mmol, 1.1 eq) and triphenylphosphine (1.52 g, 5.79 mmol, 1 eq) were dissolved in chloroform (6 mL). The resulting mixture was refluxed for 3 h and after this time it was allowed to reach room temperature. The solvent was evaporated under reduced pressure and the obtained crude of the reaction was put in suspension in tetrahydrofuran. The white solid formed in solution was filtered under vacuum on a sintered funnel to give the pure product as the filter residue.

Yield and aspect: 75% (based on 1- (^{13}C) -Etl, 2.00 g, 4.76 mmol), white crystal solid

Formula: $^{13}\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{IP}$

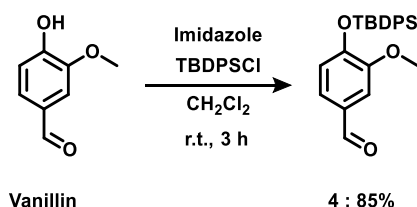
Molar mass: 419.04 g.mol $^{-1}$

CAS: 89376-54-5

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.39 (dtd, 3 H, $^2J_{\text{H-}^{13}\text{C}} = 20.0$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 7.4$ Hz, $^3J_{\text{H-P}} = 4.3$ Hz, CH_3), 3.79 (ddq, 2 H, $^1J_{\text{H-}^{13}\text{C}} = 133.8$ Hz, $^2J_{\text{H-P}} = 12.8$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 7.4$ Hz, CH_2), 7.66-7.86 (m, 15 H, 3 x Ph)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.0 (dd, $^1J_{\text{C-}^{13}\text{C}} = 32.6$ Hz, $^2J_{\text{P-C}} = 5.3$ Hz, CH_3), 17.3 (d, $^1J_{\text{P-C}} = 51.6$ Hz, $^{13}\text{CH}_2$), 118.1 (dd, $^1J_{\text{P-C}} = 85.9$ Hz, $^2J_{\text{C-}^{13}\text{C}} = 1.4$ Hz, 3 x Ph_{gemP}), 130.6 (d, $^2J_{\text{P-C}} = 12.5$ Hz, 6 x $\text{Ph}_{\text{orthoP}}$), 133.7 (d, $^3J_{\text{P-C}} = 9.9$ Hz, 6 x Ph_{metaP}), 135.1 (d, $^4J_{\text{P-C}} = 3.0$ Hz, 3 x Ph_{paraP})

^{31}P NMR (121 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 26.23 (d, $^2J_{^{13}\text{C-P}} = 52.08$ Hz)

4-((*tert*-Butyldiphenylsilyl)oxy)-3-methoxybenzaldehyde: 4


To a stirred solution of vanillin (1.52 g, 10 mmol, 1 eq) in dichloromethane (50 mL), imidazole (1.50 g, 25 mmol, 2.5 eq) and *tert*-butyldiphenylsilyl chloride (2.9 mL, 11 mmol, 1.1 eq) were successively added under an argon steam at 0 °C. The resulting mixture was stirred at room temperature for 3 h, then was quenched with water (40 mL). The organic layer was separated and the aqueous one was extracted with diethyl ether (3 x 60 mL). The combined

organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give the crude product, which was purified by column chromatography on silica gel (Pentane/Et₂O 9:1) to give the pure product.

Yield and aspect: 85% (3.320 g, 8.5 mmol), colorless oil

Formula: C₂₄H₂₆O₃Si

Molar mass: 390.55 g.mol⁻¹

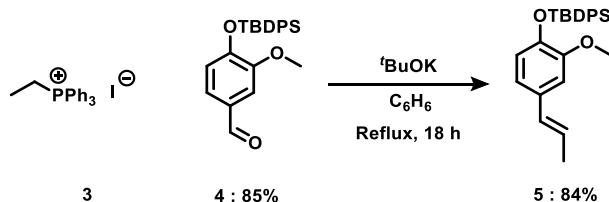
CAS: 69405-03-4

TLC: R_f = 0.85 (Pentane/Et₂O 9:1)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.11 (s, 9 H, (CH₃)₃CSi), 3.63 (s, 3 H, OCH₃), 6.80 (d, 1 H, ³J = 8.5 Hz, 6-CH), 7.18 (dd, 1 H, ³J = 8.5 Hz, ⁴J = 2.8 Hz, 5-CH), 7.31 (d, 1 H, ⁴J = 2.8 Hz, 3-CH), 7.32-7.43 (m, 6 H, Ph_{ortho/para}Si), 7.69-7.73 (m, 4 H, Ph_{meta}Si), 9.84 (s, 1 H, CHO)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 20.1 ((CH₃)₃CSi), 26.8 ((CH₃)₃CSi), 53.7 (OCH₃), 111.5 (3-C), 119.5 (6-C), 126.3 (5-C), 127.4 (4 C, Ph_{meta}Si), 129.6 (2 C, Ph_{para}Si), 131.2 (4-C), 132.9 (2 C, Ph_{gem}Si), 135.4 (4 C, Ph_{ortho}Si), 144.7 (2-C), 150.8 (1-C), 191.3 (CHO)

***tert*-Butyl(2-methoxy-4-(prop-1-en-1-yl)phenoxy)diphenylsilane: 5**



To a stirred solution of **3** (375 mg, 0.90 mmol, 1.05 eq) in anhydrous benzene (10 mL), potassium *tert*-butoxyde (105 mg, 0.95 mmol, 1.1 eq) was added under an argon steam and refluxed for 1.5 h. Then, mixture was cooled down to 0 °C and **4** (313 mg, 0.85 mmol, 1 eq) in solution with a little amount of anhydrous benzene was slowly added. The resulting mixture was refluxed for 18 h before being allowed to reach room temperature. The reaction was quenched with a saturated aqueous solution of ammonium chloride (20 mL) and extracted with diethyl ether (3 x 30 mL). The combined organic layers were washed with brine (10 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (Pentane/Et₂O 95:5) to give the pure product.

Yield and aspect: 84% (289.4 mg, 0.72 mmol), colorless oil

Formula: C₂₄H₃₀O₂Si

Molar mass: 402.61 g.mol⁻¹

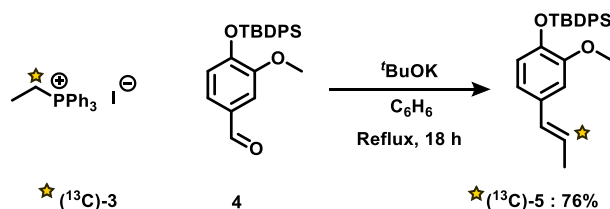
CAS: 2289651-73-4

TLC: R_f = 0.68 (Pentane/Et₂O 97:03)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.11 (s, 9 H, (CH₃)₃CSi), 1.89 (dd, 3 H, ³J = 6.9 Hz, ⁴J = 2.0 Hz, γ-CH₃) 3.67 (s, 3 H, OCH₃), 5.59- 5.69 (m, 1 H, β-CH), 6.23-6.28 (m, 1 H, α-CH), 6.62-6.71 (m, 3 H, 3-CH + 5-CH + 6-CH), 7.33-7.47 (m, 6 H, Ph_{ortho/para}Si), 7.71-7.76 (m, 4 H, Ph_{meta}Si)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 14.6 (γ-CH₃), 19.4 ((CH₃)₃CSi), 26.7 ((CH₃)₃CSi), 55.7 (OCH₃), 111.8 (3-C), 118.9 (6-C), 120.3 (5-C), 124.1 (4 C, Ph_{meta}Si), 125.7 (β-¹³CH), 127.9 (2 C, Ph_{para}Si), 129.6 (d, α-C), 130.1 (4-C), 134.9 (2 C, Ph_{gem}Si), 135.3 (4 C, Ph_{ortho}Si), 144.8 (1-C), 146.6 (2-C)

tert-Butyl(2-methoxy-4-(2-(¹³C)-prop-1-en-1-yl)phenoxy)diphenylsilane: (¹³C)-5



To a stirred solution of (¹³C)-3 (441 mg, 1.05 mmol, 1.05 eq) in anhydrous benzene (10 mL), potassium *tert*-butoxyde (124 mg, 1.1 mmol, 1.1 eq) was added under an argon steam and refluxed for 1.5 h. Then, mixture was cool down to 0 °C and 4 (390 mg, 1 mmol, 1 eq) in solution with a little amount of anhydrous benzene was slowly added. The resulting mixture was refluxed for 18 hours before being allowed to reach room temperature. The reaction was then quenched with a saturated aqueous solution of ammonium chloride (20 mL) and extracted with diethyl ether (3 x 40 mL). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (Pentane/Et₂O 95:5) to give the pure product.

Yield and aspect: 76% (308 mg, 0.76 mmol), colorless oil

Formula: ¹³CC₂₃H₃₀O₂Si

Molar mass: 403.60 g.mol⁻¹

CAS (¹³C non-substituted): 2289651-73-4

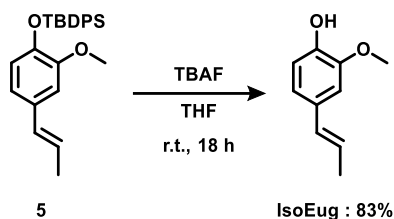
TLC: R_f = 0.68 (Pentane/Et₂O 97:03)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.11 (s, 9 H, (CH₃)₃CSi), 1.89 (dd, 3 H, ³J = 6.9 Hz, ⁴J = 2.0 Hz, γ-CH₃) 3.67 (s, 3 H, OCH₃), 5.44- 5.84 (m, 1 H, β-¹³CH), 6.21-6.31 (m, 1 H, α-CH),

6.62-6.71 (m, 3 H, 3-CH + 5-CH + 6-CH), 7.33-7.47 (m, 6 H, Ph_{ortho/para}Si), 7.71-7.76 (m, 4 H, Ph_{meta}Si)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 14.6 (γ-CH₃, ¹J_{C-¹³C} = 43.1 Hz), 19.4 ((CH₃)₃CSi), 26.7 ((CH₃)₃CSi), 55.7 (OCH₃), 111.8 (3-C), 118.9 (6-C), 120.3 (5-C), 124.1 (4 C, Ph_{meta}Si), 125.7 (β-¹³CH), 127.9 (2 C, Ph_{para}Si), 129.6 (d, ¹J_{C-¹³C} = 71.3 Hz, α-C), 130.1 (4-C), 134.9 (2 C, Ph_{gem}Si), 135.3 (4 C, Ph_{ortho}Si), 144.8 (1-C), 146.6 (2-C)

2-Methoxy-4-(prop-1'-en-1'-yl)phenol, Isoeugenol: IsoEug



To a solution of **5** (289.4 mg, 0.72 mmol, 1 eq) in anhydrous tetrahydrofuran (6 mL) under an argon atmosphere, a solution of tetra-*n*-butylammonium fluoride (1 M in tetrahydrofuran, 1.45 mL, 1.45 mmol, 2 eq.) was added at room temperature. The resulting mixture was stirred for 18 h and was quenched after this time with a saturated aqueous solution of ammonium chloride (10 mL). The reaction mixture was extracted with diethyl ether (30 mL) and ethyl acetate (3 x 30 mL). The combined organic layers were washed with brine (10 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (Pentane/EtOAc 9:1) to give the pure product.

Yield and aspect: 83% (98.5 mg, 0.6 mmol), colorless to yellowish solid partially oil

Formula: C₁₀H₁₂O₂

Molar mass: 164.2 g.mol⁻¹

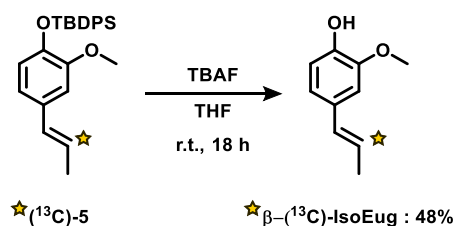
CAS: 97-54-1

TLC: R_f = 0.36 (Pentane/Et₂O 8:2)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.88 (dd, 3 H, ³J = 7.1 Hz, ⁴J = 1.8 Hz, γ-CH₃), 3.92 (s, 3 H, OCH₃), 6.04-6.11 (m, 1 H, β-CH), 6.29-6.35 (m, 1 H, α-CH), 6.82-6.87 (m, 3 H, H_{aromatic})

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 18.5 (γ-CH₃), 55.9 (OCH₃), 107.9 (3-C), 114.4 (6-C), 119.4 (5-C), 123.6 (β-C), 130.8 (α-C), 130.8 (4-C), 144.8 (1-C), 146.7 (2-C)

2-Methoxy-4-(β -(^{13}C)-prop-1'-en-1'-yl)phenol, β -(^{13}C)-Isoeugenol: β -(^{13}C)-IsoEug



To a solution of (^{13}C)-**5** (302.7 mg, 0.75 mmol, 1 eq) in anhydrous tetrahydrofuran (6 mL) under an argon atmosphere, a solution of tetra-*n*-butylammonium fluoride (1 M in tetrahydrofuran, 1.5 mL, 1.5 mmol, 2 eq.) was added at room temperature. The resulting mixture was stirred for 18 h and was quenched after this time with a saturated aqueous solution of ammonium chloride (10 mL). The reaction mixture was extracted with diethyl ether (30 mL) and ethyl acetate (3 x 30 mL). The combined organic layers were washed with brine (10 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (Pentane/EtOAc 9:1) to give the pure product.

Yield and aspect: 48% (59.5 mg, 0.36 mmol), colorless to yellowish solid partially oil

Formula: $^{13}\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_2$

Molar mass: 165.09 g.mol⁻¹

CAS (^{13}C non-substituted): 2289651-73-4

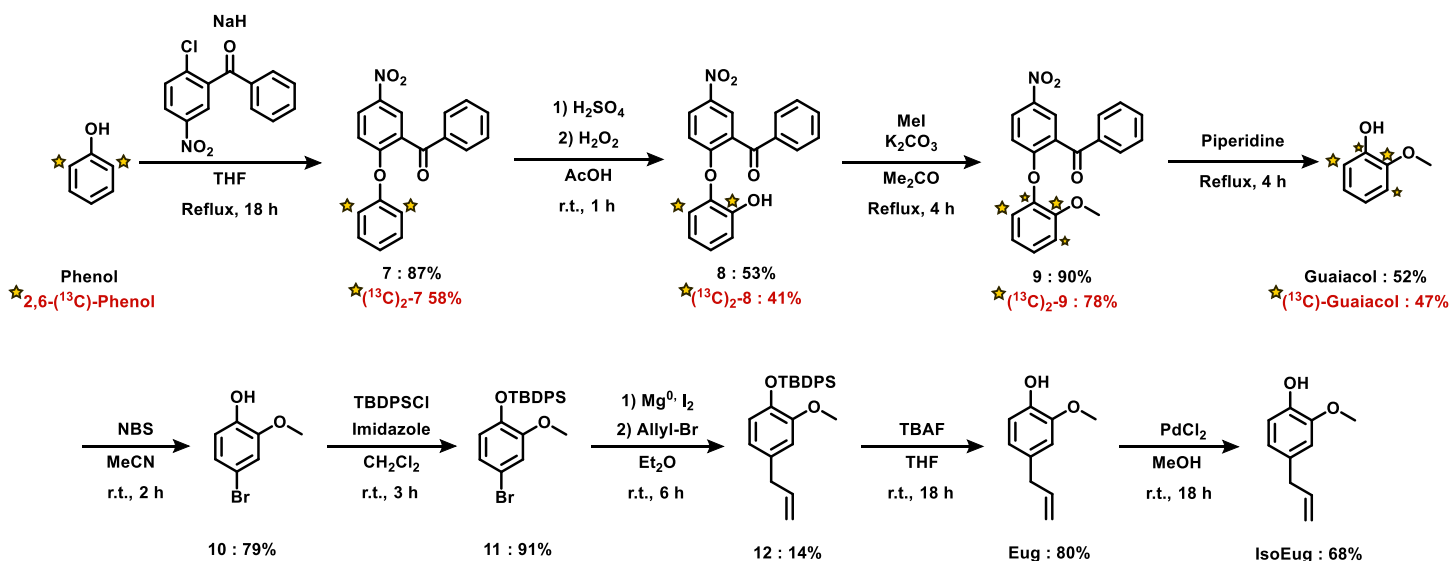
TLC: $R_f = 0.36$ (Pentane/Et₂O 8:2)

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.88 (ddd, 3 H, $^2J_{\text{H-}^{13}\text{C}} = 22.0$ Hz, $^3J = 7.1$ Hz, $^4J = 1.8$ Hz, $\gamma\text{-CH}_3$), 3.92 (s, 3 H, OCH_3), 5.89-6.26^a (m, 1 H, $\beta\text{-}^{13}\text{CH}$), 6.29-6.35^b (m, 1 H, $\alpha\text{-CH}$), 6.80-6.87 (m, 3 H, $\text{H}_{\text{aromatic}}$)

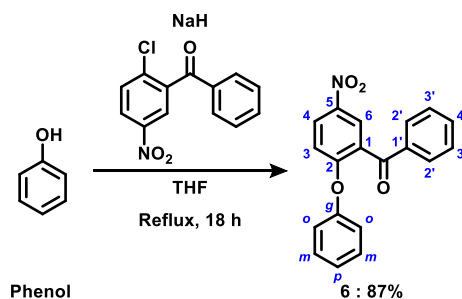
^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 18.5 (d, $^1J_{\text{C-}^{13}\text{C}} = 44.0$ Hz, $\gamma\text{-CH}_3$), 55.9 (OCH_3), 107.9 (d, $^3J_{\text{C-}^{13}\text{C}} = 4.8$ Hz, **3-C**), 114.4 (**6-C**), 119.4 (d, $^3J_{\text{C-}^{13}\text{C}} = 5.2$ Hz, **5-C**), 123.6 (**$\beta\text{-}^{13}\text{C}$**), 130.8 (d, $^1J_{\text{C-}^{13}\text{C}} = 72.8$ Hz, **$\alpha\text{-C}$**), 130.8 (**4-C**), 144.8 (**1-C**), 146.7 (**2-C**)

^a Even if it's described as a multiplet, it's still possible to observe the $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ coupling constant of a value of $^1J_{\text{H-}^{13}\text{C}} = 149.0$ Hz

^b Even if it's described as a multiplet, it's still possible to observe the $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ coupling constant of a value of $^2J_{\text{H-}^{13}\text{C}} = 15.7$ Hz

Strategy for the synthesis of 2,6-(^{13}C)-Eugenol and 2,6-(^{13}C)-Eugenol through the 2,6-(^{13}C)-Guaiacol production


(5-Nitro-2-phenoxyphenyl)(phenyl)methanone: 6



Sodium hydride (60% in mineral oil (560 mg, 14 mmol, 1.4 eq) was dissolved in dry tetrahydrofuran (15 mL) under an argon atmosphere after being washed with petroleum ether to remove grease. A solution of phenol (941 mg, 10 mmol, 1 eq) in dry tetrahydrofuran (10 mL) was then added dropwise at 0 °C. The resulting mixture allowed to warm up to room temperature and was stirred for 15 min until the end of gas release. Then 2-chloro-5-nitrobenzophenone (2.89 g, 11 mmol, 1.1 eq) in solution in dry tetrahydrofuran (10 mL) was slowly added and the reaction mixture was refluxed for 18 h. The reaction was stopped after this time with an aqueous solution of sodium hydroxide (1 M, 20 mL). The product was extracted with dichloromethane (4 x 40 mL). The combined organic layers were washed with water (2 x 20 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give the pure product.

Yield and aspect: 87% (2.778 g, 8.7 mmol), yellowish oil

Formula: $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{NO}_4$

Molar mass: $319.32 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

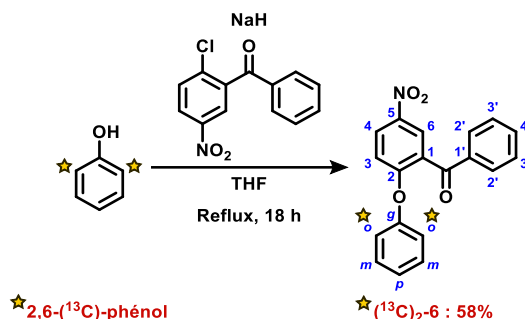
CAS: 408337-45-1

TLC: R_f = 0.5 (Pentane/EtOAc 8:2)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.92 (d, 1 H, ³J = 9.2 Hz, 3-CH), 6.95-7.03 (m, 2 H, o-CH), 7.19-7.24 (m, 1 H, p-CH), 7.32-7.41 (m, 2 H, 3'-CH), 7.49 (m, 2 H, m-CH), 7.58-7.66 (m, 1 H, 4'-CH), 7.85-7.91 (m, 2 H, 2'-CH), 8.27 (dd, 1 H, ³J = 9.2 Hz, ⁴J = 2.8 Hz, 4-CH), 8.40 (d, 1 H, ⁴J = 2.8 Hz, 6-CH)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 116.6 (p-C), 120.5 (2 C, o-C), 125.8 (6-C), 126.1 (1-C), 127.4 (4-C), 128.8 (2 C, m-C), 129.9 (2 C, 3'-C), 130.5 (2 C, 2'-C), 130.5 (4'-C), 134.1 (3-C), 136.7 (1'-C), 142.5 (5-C), 154.4 (g-C), 160.8 (2-C), 193.4 (C=O)

(5-Nitro-2-(2,6-(¹³C)-phenoxy)phenyl)(phenyl)methanone: (¹³C)₂-6



Sodium hydride (60% in mineral oil (88 mg, 2.2 mmol, 1.4 eq) was dissolved in dry tetrahydrofuran (5 mL) under an argon atmosphere after being washed with petroleum ether to remove grease. A solution of phenol (150 mg, 1.56 mmol, 1 eq) in dry tetrahydrofuran (2 mL) was then added dropwise at 0 °C. The resulting mixture allowed to warm up to room temperature and was stirred for 15 min until the end of gas release. Then 2-chloro-5-nitrobenzophenone (449 mg, 1.7 mmol, 1.1 eq) in solution in dry tetrahydrofuran (2 mL) was slowly added and the reaction mixture was refluxed for 18 h. The reaction was stopped after this time with an aqueous solution of sodium hydroxide (1 M, 5 mL). The product was extracted with dichloromethane (4 x 20 mL). The combined organic layers were washed with water (2 x 10 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give the pure product.

Yield and aspect: 58% (306 mg, 0.9 mmol), yellowish oil

Formula: ¹³C₂C₁₇H₁₃NO₄

Molar mass: 321.30 g.mol⁻¹

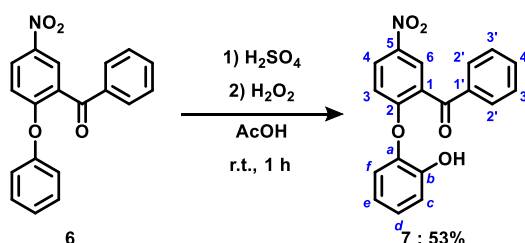
CAS (¹³C non-substituted): 408337-45-1

TLC: R_f = 0.5 (Pentane/EtOAc 8:2)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.92 (d, 1 H, ³J = 9.2 Hz, 3-CH), 6.80-7.18^a (m, 2 H, o-CH), 7.19-7.24 (m, 1 H, p-CH), 7.32-7.41 (m, 2 H, 3'-CH), 7.33-7.52^b (m, 2 H, m-CH), 7.58-7.66 (m, 1 H, 4'-CH), 7.85-7.91 (m, 2 H, 2'-CH), 8.27 (dd, 1 H, ³J = 9.2 Hz, ⁴J = 2.8 Hz, 4-CH), 8.40 (d, 1 H, ⁴J = 2.8 Hz, 6-CH)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 116.6 (bs, p-C), 120.5 (2 C, o-C), 125.8 (6-C), 126.1 (1-C), 127.4 (4-C), 128.8 (d, 2 C, ¹J_{C-¹³C} = 142.4 Hz, m-C), 129.9 (2 C, 3'-C), 130.5 (2 C, 2'-C), 130.5 (4'-C), 134.1 (3-C), 136.7 (1'-C), 142.5 (5-C), 154.4 (t, ¹J_{C-¹³C} = 74.24 Hz, g-C), 160.8 (2-C), 193.4 (C=O)

(2-(2-Hydroxyphenoxy)-5-nitrophenyl)(phenyl)methanone: 7



After **6** (1.628 g, 5 mmol, 1 eq) was totally dissolved in sulfuric acid (6 mL), the solution was diluted with glacial acetic acid (20 mL). The resulting mixture was vigorously stirred for 15 min and hydrogen peroxide (50%, 3.1 mL, 55 mmol, 11 eq) was added dropwise at room temperature. The reaction was stirred for 1 h at room temperature then poured onto ice (750 g) to give a precipitate filtered under vacuum and washed thoroughly with cold water. The filter residue was totally dissolved in ethyl acetate and the aqueous filtered solution was extracted with ethyl acetate (2 x 200 mL). The combined organic solutions were washed with brine (100 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give the pure product.

Yield and aspect: 87% (2.778 g, 8.7 mmol), yellowish oil

Formula: C₁₉H₁₃NO₅

Molar mass: 335.32 g.mol⁻¹

CAS: 408337-55-3

TLC: R_f = 0.29 (Pentane/EtOAc 8:2)

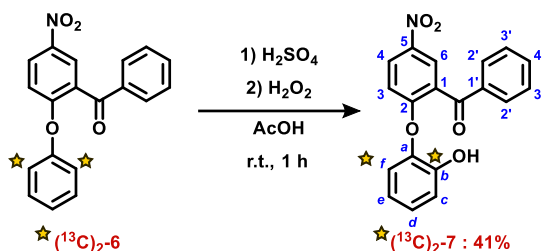
^a Even if it's described as a multiplet, it's still possible to observe the ¹H-¹³C coupling constant of a value of ¹J_{H-¹³C} = 159.0 Hz

^b Even if it's described as a multiplet, it's still possible to observe the ¹H-¹³C coupling constant of a value of ²J_{H-¹³C} = 67.1 Hz

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.93 (tt, 1 H, ³J = 7.7 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 4'-CH), 7.15 (dd, 1 H, ³J = 8.5 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, f-CH), 7.16-7.21 (m, 3 H, c-CH + d-CH + e-CH), 7.55-7.61 (m, 3 H, -CH + 3'-CH), 7.70-7.76 (m, 1 H, OH), 7.97 (dd, 2 H, ³J = 8.4 Hz, ⁴J = 1.4 Hz, 2'-CH), 8.30 (dd, 1 H, ³J = 9.1 Hz, ⁴J = 2.8 Hz, 4-CH), 8.34 (d, 1 H, ⁴J = 2.8 Hz, 6-CH)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 117.3 (d-C), 118.4 (c-C), 120.4 (f-C), 122.5 (e-C), 126.1 (1-C), 127.7 (3-C), 128.0 (4-C), 129.2 (4'-C), 129.2 (2 C, 3'-C), 130.7 (2 C, 2'-C), 134.9 (3-C), 141.8 (1'-C), 142.4 (5-C), 149.0 (b-C), 155.8 (a-C), 160.3 (2-C), 191.2 (C=O)

(2-(2-Hydroxy-2,6-(¹³C)-phenoxy)-5-nitrophenyl)(phenyl)methanone: (¹³C)₂-7



After (¹³C)₂-6 (306 mg, 0.9 mmol, 1 eq) was totally dissolved in sulfuric acid (1 mL), the solution was diluted with glacial acetic acid (5 mL). The resulting mixture was vigorously stirred for 15 min and hydrogen peroxide (50%, 0.6 mL, 9.9 mmol, 11 eq) was added dropwise at room temperature. The reaction was stirred for 1 h at room temperature then poured onto ice (150 g) to give a precipitate filtered under vacuum and washed thoroughly with cold water. The filter residue was totally dissolved in ethyl acetate and the aqueous filtered solution was extracted with ethyl acetate (2 x 50 mL). The combined organic solutions were washed with brine (20 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give the pure product.

Yield and aspect: 41% (125.4 mg, 0.37 mmol), yellowish oil

Formula: ¹³C₂C₁₇H₁₃NO₅

Molar mass: 337.30 g.mol⁻¹

CAS (¹³C non-substituted): 408337-55-3

TLC: R_f = 0.29 (Pentane/EtOAc 8:2)

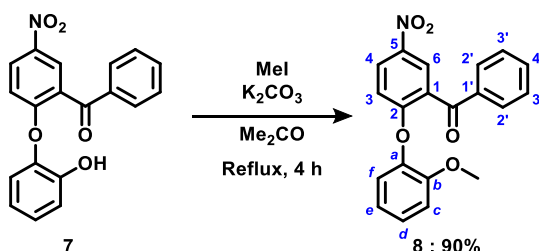
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.93 (tt, 1 H, ³J = 7.7 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 4'-CH), 7.15^a (m, 1 H, ¹J_{H-¹³C} = 159.1 Hz, f-CH), 7.01-7.27 (m, 3 H, c-CH + d-CH + e-CH), 7.55-7.61 (m, 3 H, -CH

^a Even if it's described as a multiplet, it's still possible to read the ¹H-¹³C coupling constant of a value of ¹J_{H-¹³C} = 159.1 Hz

+ 3'-CH), 7.70-7.76 (m, 1 H, OH), 7.97 (dd, 2 H, ³J = 8.4 Hz, ⁴J = 1.4 Hz, 2'-CH), 8.30 (dd, 1 H, ³J = 9.1 Hz, ⁴J = 2.8 Hz, 4-CH), 8.34 (d, 1 H, ⁴J = 2.8 Hz, 6-CH)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 117.3 (d-C), 118.4 (dd, ¹J_{C-¹³C} = 69.1 Hz, ³J_{C-¹³C} = 4.9 Hz, c-C), 120.4 (dd, ¹J_{C-¹³C} = 56.1 Hz, ³J_{C-¹³C} = 6.2 Hz, e-C), 122.5 (d, ²J_{C-¹³C} = 5.8 Hz, f-C), 126.1 (1-C), 127.7 (3-C), 128.0 (4-C), 129.2 (4'-C), 129.2 (2 C, 3'-C), 130.7 (2 C, 2'-C), 134.9 (3-C), 141.8 (1'-C), 142.4 (5-C), 149.0 (d, ²J_{C-¹³C} = 5.8 Hz, b-C), 155.8 (a-C), 160.3 (2-C), 191.2 (C=O)

(2-(2-Methoxyphenoxy)-5-nitrophenyl)(phenyl)methanone: 8



To a solution of **7** (680 mg, 1.8 mmol, 1 eq) and potassium carbonate (746 mg, 5.4 mmol, 3 eq) in acetone (20 mL) at room temperature, methyl iodide was added (336 μL, 5.4 mmol, 3 eq). The resulting mixture was stirred at reflux temperature for 4 h. The solvent was evaporated under reduced pressure. The resulting oil was dissolved in dichloromethane (30 mL) and water (30 mL). The aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 x 40 mL). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give the pure product.

Yield and aspect: 90% (566 mg, 1.62 mmol), yellowish oil

Formula: C₂₀H₁₅NO₅

Molar mass: 349.34 g.mL⁻¹

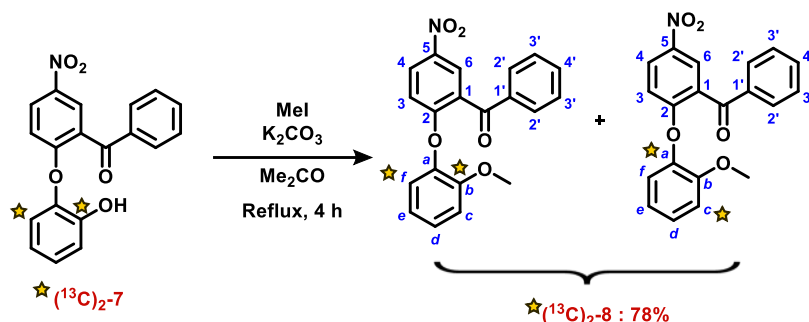
CAS: 53379-81-0

TLC: R_f = 0.39 (Pentane/EtOAc 8:2)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.71 (s, 3 H, OCH₃), 6.71 (d, 1 H, ³J = 9.2 Hz, 3-CH), 6.78-7.22 (m, 4 H, c-CH + e-CH + d-CH + f-CH +), 7.48 (m, 2 H, 3'-CH), 7.58-7.63 (m, 1 H, 4'-CH), 7.95 (dd, ³J = 7.0 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, 2 H, 2'-CH), 8.21 (dd, 1 H, ³J = 9.2 Hz, ⁴J = 2.8 Hz, 4-CH), 8.37 (d, 1 H, ⁴J = 2.8 Hz, 6-CH)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 55.8 (OCH₃), 106.1 (3-C), 113.1 (c-C), 114.8 (4-C), 121.4 (d-C), 122.8 (f-C), 126.0 (5-C), 127.3 (e-C), 128.6 (2 C, 3'-C), 129.3 (2 C, 1-C + 6-C), 130.3 (2 C, 2'-C), 134.0 (4'-C), 136.7 (a-C), 137.6 (1'-C), 141.8 (a-C), 151.3 (b-C), 160.8 (2-C), 193.6 (C=O)

(2-(2-Methoxy-2,6- ^{13}C -phenoxy)-5-nitrophenyl)(phenyl)methanone and (2-(2-Methoxy-1,3- ^{13}C -phenoxy)-5-nitrophenyl)(phenyl)methanone: (^{13}C)₂-8



To a solution of (^{13}C)₂-7 (125.4 mg, 0.37 mmol, 1 eq) and potassium carbonate (152 mg, 1.1 mmol, 3 eq) in acetone (5 mL) at room temperature, methyl iodide was added (69 μL , 1.1 mmol, 3 eq). The resulting mixture was stirred at reflux temperature for 4 h. The solvent was evaporated under reduced pressure. The resulting oil was dissolved in dichloromethane (30 mL) and water (30 mL). The aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 x 40 mL). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give the pure product.

Yield and aspect: 78% (100.7 mg, 0.29 mmol), yellowish oil

Formula: $^{13}\text{C}_2\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{NO}_5$

Molar mass: 351.33 g.mol⁻¹

CAS (^{13}C non-substituted): 53379-81-0

TLC: R_f = 0.39 (Pentane/EtOAc 8:2)

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3.71 (s, 3 H, OCH_3), 6.71 (d, 1 H, $^3\text{J} = 9.2$ Hz, 3-CH), 6.78-7.22 (m, 4 H, c-CH + e-CH + d-CH + f-CH +), 7.48 (m, 2 H, 3'-CH), 7.58-7.63 (m, 1 H, 4'-CH), 7.95 (dd, $^3\text{J} = 7.0$ Hz, $^4\text{J} = 1.9$ Hz, 2 H, 2'-CH), 8.21 (dd, 1 H, $^3\text{J} = 9.2$ Hz, $^4\text{J} = 2.8$ Hz, 4-CH), 8.37 (d, 1 H, $^4\text{J} = 2.8$ Hz, 6-CH)

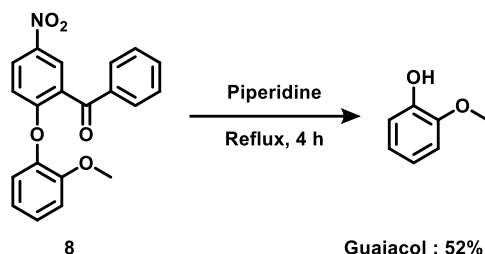
^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 55.8 (OCH_3), 106.1 (3-C), 113.1 (d, $^2\text{J}_{\text{C}-^{13}\text{C}} = 5.4$ Hz, c-C), 114.8 (4-C), 121.4^a (d + t, d-C), 122.8 (d, $^2\text{J}_{\text{C}-^{13}\text{C}} = 6.5$ Hz, f-C), 126.0 (5-C), 127.3^b (d + bs, e-C), 128.6 (2 C, 3'-C), 129.3 (2 C, 1-C + 6-C), 130.3 (2 C, 2'-C), 134.0 (4'-C), 136.7 (a-C),

^a For this ^{13}C -NMR spectrum, the signal corresponding to the carbon "d-C" from the mixture of isotopomers (^{13}C)₂-8 shows a doublet (d, $^1\text{J}_{\text{C}-^{13}\text{C}} = 57.1$ Hz) corresponding to the isotopomer with ^{13}C in positions **a** and **c**, and a pseudo-triplet (t, $^2\text{J}_{\text{C}-^{13}\text{C}} = 2.0$ Hz) corresponding to the isotopomer with ^{13}C in positions **b** and **f**.

^b For this ^{13}C -NMR spectrum, the signal corresponding to the carbon "e-C" from the mixture of isotopomers (^{13}C)₂-8 shows a doublet (d, $^1\text{J}_{\text{C}-^{13}\text{C}} = 58.3$ Hz) corresponding to the isotopomer with ^{13}C in positions **b** and **f**, and a broad singlet (bs) corresponding to the isotopomer with ^{13}C in positions **a** and **c**.

137.6 (1'-C), 141.8 (d, ²J_{C-¹³C} = 5.4 Hz, a-C), 151.3 (d, ²J_{C-¹³C} = 6.5 Hz, b-C), 160.8 (2-C), 193.6 (C=O)

2-Methoxyphenol, Guaiacol



Compound **8** (630 mg, 1.8 mmol, 1 eq) was dissolved in freshly distilled piperidine (9 mL) under an argon atmosphere and the solution was refluxed for 4 h. The resulting mixture was allowed to reach room temperature and was diluted in dichloromethane (30 mL) then was cooled at 0 °C to add hydrochloric acid (2 M, 120 mL) dropwise. The aqueous layer was extracted with a mixture of dichloromethane/ethyl acetate (5 x 30:30 mL). The combined organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (Pentane/Et₂O 85:15) to give the pure product.

Yield and aspect: 52% (116.7 mg, 0.94 mmol), brown-yellowish oil

Formula: C₇H₈O₂

Molar mass: 124.14 g.mol⁻¹

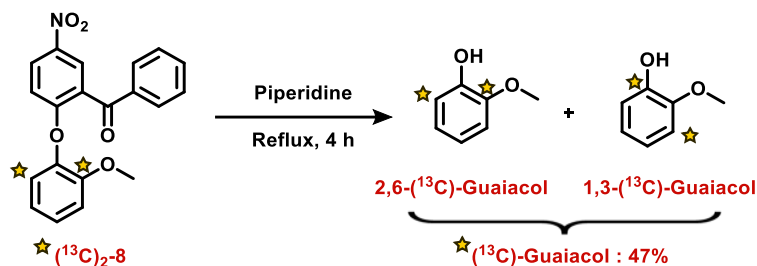
CAS : 90-05-1

TLC: R_f = 0.45 (Pentane/EtOAc 9:1) / 0.67 (Pentane/Et₂O 8:2)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.89 (s, 3 H, OCH₃), 5.60 (bs, 1 H, OH), 6.84-6.89 (m, 3 H, 3-CH + 4-CH + 5-CH), 6.94-6.91 (m, 1 H, 6-CH)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 56.0 (OCH₃), 11.8 (3-C), 114.6 (6-C), 120.1 (4-C), 121.6 (5-C), 145.8 (1-C), 146.7 (2-C)

2,6-(^{13}C)-2-Methoxyphenol and 1,3-(^{13}C)-2-Methoxyphenol, 2,6-(^{13}C)-Guaiacol and 1,3-(^{13}C)-Guaiacol: (^{13}C)-Guaiacol



Compound **8** (100.7 mg, 0.29 mmol, 1 eq) was dissolved in freshly distilled piperidine (2 mL) under an argon atmosphere and the solution was refluxed for 4 h. The resulting mixture was allowed to reach room temperature and was diluted in dichloromethane (8 mL) then was cooled at 0 °C to add hydrochloric acid (2 M, 40 mL) dropwise. The aqueous layer was extracted with a mixture of dichloromethane/ethyl acetate (5 x 30:30 mL). The combined organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (Pentane/Et₂O 85:15) to give the pure product.

Yield and aspect: 47% (17 mg, 0.13 mmol), brown-yellowish oil

Formula: $^{13}\text{C}_2\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$

Molar mass: 126.12 g.mol⁻¹

CAS (^{13}C non-substituted): 90-05-1

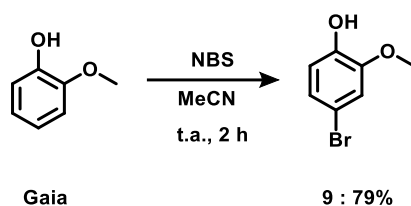
TLC: R_f = 0.45 (Pentane/EtOAc 9:1) / 0.67 (Pentane/Et₂O 8:2)

^1H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.89 (s, 3 H, OCH₃), 5.60 (br s, 1 H, OH), 6.84-6.89 (m, 3 H, **3-CH** + **4-CH** + **5-CH**), 6.94-6.91 (m, 1 H, **6-CH**)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 56.0 (OCH₃), 110.8 (d, $^2\text{J}_{\text{C}-^{13}\text{C}} = 4.8$ Hz, **3-C**), 114.6 (d, $^2\text{J}_{\text{C}-^{13}\text{C}} = 5.8$ Hz, **6-C**), 120.1^a (s + dd, **4-C**), 121.6^b (s + dd, **5-C**), 145.8 ($^2\text{J}_{\text{C}-^{13}\text{C}} = 4.8$ Hz, **1-C**), 146.7 ($^2\text{J}_{\text{C}-^{13}\text{C}} = 5.8$ Hz, **2-C**)

^a For this ^{13}C -NMR spectrum, the signal corresponding to the carbon "**4-C**" from the mixture of isotopomers (^{13}C)-Guaiacol shows a doublet of doublet (d, $^1\text{J}_{\text{C}-^{13}\text{C}} = 58.1$ Hz, $^3\text{J}_{\text{C}-^{13}\text{C}} = 7.2$ Hz) corresponding to the isotopomer with ^{13}C in positions **1-C** and **3-C**, and a broad singlet (br s) corresponding to the isotopomer with ^{13}C in positions **2-C** and **6-C**.

^b For this ^{13}C -NMR spectrum, the signal corresponding to the carbon "**5-C**" from the mixture of isotopomers (^{13}C)-Guaiacol shows a doublet of doublet (dd, $^1\text{J}_{\text{C}-^{13}\text{C}} = 57.4$ Hz, $^3\text{J}_{\text{C}-^{13}\text{C}} = 7.2$ Hz) corresponding to the isotopomer with ^{13}C in positions **2-C** and **6-C** and a broad singlet (br s) corresponding to the isotopomer with ^{13}C in positions **1-C** and **3-C**.

4-Bromo-2-methoxyphenol: 9

To a solution of **guaiacol** (1.241 g, 10 mmol, 1 eq) at 0 °C in anhydrous acetonitrile (100 mL), *N*-bromosuccinimide was added under an argon steam. After stirring for 1.5 h at 0 °C, the mixture was allowed to slowly reach room temperature in 30 min and the reaction was quenched with a saturated aqueous solution of sodium thiosulfate (100 mL). The organic layers were collected and the aqueous one was extracted with ethyl acetate (3 x 120 mL). The combined organic layers were washed with brine (100 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (Pentane/EtOAc 9:1) to give the pure product.

Yield and aspect: 79% (1.604 g, 7.9 mmol), yellowish brownish oil

Formula: C₇H₇BrO₂

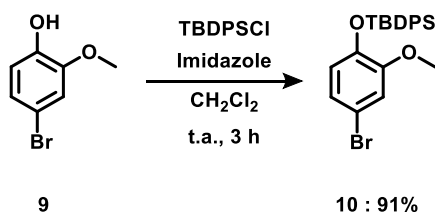
Molar mass: 203.04 g.mol⁻¹

CAS: 7368-78-7

TLC: R_f = 0.32 (Pentane/EtOAc 9:1)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.81 (s, 3 H, OCH₃), 5.65 (bs, 1 H, OH), 6.80 (d, 1 H, ³J = 8.3 Hz, 6-CH), 6.94-6.98 (m, 1 H, 5-CH), 6.99 (d, 1 H, ⁴J = 2.1 Hz, 3-CH)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 56.2 (OCH₃), 111.6 (3-C), 114.2 (4-C), 115.8 (6-C), 124.2 (5-C), 144.9 (1-C), 147.3 (2-C)

(4-Bromo-2-methoxyphenoxy)(tert-butyl)diphenylsilane: 10

To a stirred solution of **9** (912.6 mg, 4.5 mmol, 1 eq) in dichloromethane (10 mL), imidazole (811 mg, 13.5 mmol, 3 eq) and *tert*-butyldiphenylsilyl chloride (1.75 mL, 6.75 mmol, 1.5 eq) were successively added under an argon atmosphere at 0 °C. The resulting mixture was stirred at room temperature for 3 h, then was quenched with water (10 mL). The organic layer was

separated and the aqueous one was extracted with diethyl ether (3 x 15 mL). The combined organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give the crude product which was purified by column chromatography on silica gel (Pentane/Et₂O 95:05) to give the pure product.

Yield and aspect: 91% (1.810 g, 4.1 mmol), yellowish oil

Formula: C₂₃H₂₅BrO₅Si

Molar mass: 441.43 g.mol⁻¹

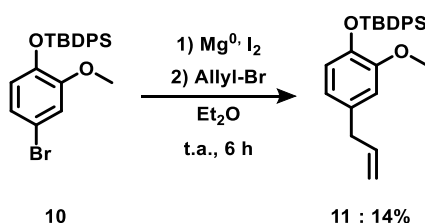
CAS: 431879-38-8

TLC: R_f = 0.88 (Pentane/Et₂O 95:05)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.15 (s, 9 H, (CH₃)₃CSi), 3.55 (s, 3 H, OCH₃), 6.55 (d, 1 H, ³J = 8.5 Hz, **6-CH**), 6.74 (dd, 1 H, ³J = 8.5 Hz, ⁴J = 2.4 Hz, **5-CH**), 6.85 (d, 1 H, ⁴J = 2.1 Hz, **3-CH**), 7.30-7.45 (m, 6 H, **Ph_{ortho/para}Si**), 7.67-7.69 (m, 4 H, **Ph_{meta}Si**)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 19.9 ((CH₃)₃CSi), 26.8 ((CH₃)₃CSi), 55.6 (OCH₃), 113.3 (**4-C**), 115.6 (**3-C**), 121.3 (**6-C**), 123.5 (**5-C**), 127.7 (4 C, **Ph_{meta}Si**), 129.7 (2 C, **Ph_{para}Si**), 133.3 (2 C, **Ph_{gem}Si**), 135.5 (4 C, **Ph_{ortho}Si**), 144.5 (**1-C**), 151.3 (**2-C**)

(4-Allyl-2-methoxyphenoxy)(tert-butyl)diphenylsilane: 11



To an anhydrous solution of magnesium (30 mg, 1.2 mmol, 1.2 eq) and a small amount of iodine in diethyl ether (10 mL) under an argon atmosphere, **10** (441 mg, 1 mmol, 1 eq) was slowly added (heating the solution to reflux). The resulting mixture was stirred for 1 h, then allyl bromide (105 μL, 1.2 mmol, 1.2 eq) was slowly added at 0 °C. Then, the reaction mixture was allowed to reach room temperature and stirred for 5 h before being stopped by adding slowly water (10 mL). The aqueous layer was extracted with diethyl ether (3 x 20 mL) and combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (Pentane/Et₂O 95:05) to give the pure product.

Yield and aspect: 14% (56 mg, 0.14 mmol), yellowish oil

Formula: C₂₆H₃₀O₂Si

Molar mass: 402.2 g.mol⁻¹

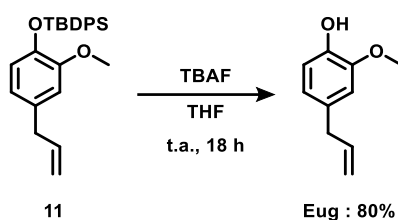
CAS: 142876-79-7

TLC: R_f = 0.71 (Pentane/Et₂O 97:03)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.13 (s, 9 H, (CH₃)₃CSi), 3.25 (d, 2 H, ³J = 6.2 Hz, α-CH₂), 3.55 (s, 3 H, OCH₃), 4.96-5.03 (m, 2 H, γ-CH₂), 5.84- 5.98 (m, 1 H, β-CH), 6.45 (dd, 1 H, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 2.1 Hz, 5-CH), 6.59 (d, 1 H, ⁴J = 2.1 Hz, 3-CH), 6.63 (d, 1 H, ³J = 8.0 Hz, 6-CH), 7.30-7.45 (m, 6 H, Ph_{ortho/para}Si), 7.70-7.74 (m, 4 H, Ph_{meta}Si)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 19.9 ((CH₃)₃CSi), 26.9 ((CH₃)₃CSi), 55.5 (OCH₃), 113.1 (3-C), 115.4 (α-CH₂), 116.1 (γ-CH₂), 119.9 (6-C), 120.3 (5-C), 127.5 (4 C, Ph_{meta}Si), 129.6 (2 C, Ph_{para}Si), 133.1 (4-C), 133.8 (2 C, Ph_{gem}Si), 135.4 (4 C, Ph_{ortho}Si), 138.1 (1-C), 138.1 (β-CH), 150.1 (2-C)

4-Allyl-2-methoxyphenol, Eugenol: Eug



To a solution of **11** (289.4 mg, 0.72 mmol, 1 eq) in anhydrous tetrahydrofuran (6 mL) under an argon atmosphere, a solution of tetra-*n*-butylammonium fluoride (1 M in tetrahydrofuran, 1.45 mL, 1.45 mmol, 2 eq) was added at room temperature. The resulting mixture was stirred for 18 h and was quenched with a saturated aqueous solution of ammonium chloride (10 mL). The reaction mixture was extracted with diethyl ether (30 mL) and ethyl acetate (3 x 30 mL). The combined organic layers were washed with brine (10 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. Crude product was purified by column chromatography on silica gel (Pentane/EtOAc 9:1) to give the pure product.

Yield and aspect: 80% (94.6 mg, 0.58 mmol), yellowish oil

Formula: C₁₀H₁₂O₂

MW: 164.2 g.mol⁻¹

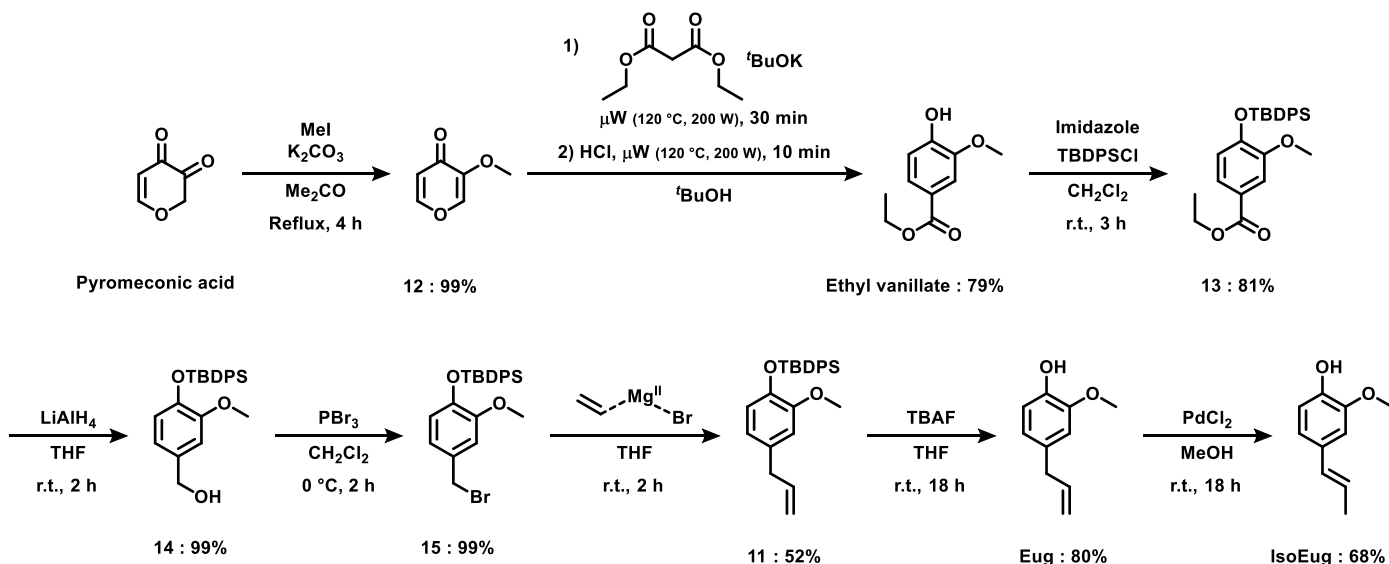
CAS: 97-53-0

TLC: R_f = 0.27 (Pentane/EtOAc 9:1)

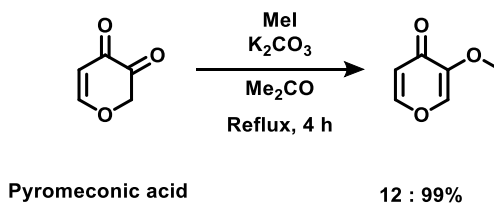
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.33 (d, 2 H, ³J = 6.7 Hz, α-CH₂), 3.88 (s, 3 H, OCH₃), 5.02-5.12 (m, 2 H, γ-CH₂), 5.51 (s, 1 H, OH), 5.91-6.02 (m, 1 H, β-CH), 6.66-6.71 (m, 2 H, 3-CH + 5-CH), 6.83-6.86 (m, 1 H, 6-CH)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 39.9 (α-C), 55.9 (OCH₃), 111.1 (γ-C), 114.2 (3-C), 115.6 (6-C), 121.2 (5-C), 131.9 (4-C), 137.9 (β-C), 143.9 (1-C), 146.4 (2-C)

Strategy for the synthesis of 2,6-(¹³C)-Eugenol and 2,6-(¹³C)-Eugenol through the 2,6-(¹³C)-Guaiacol production



3-Methoxy-4H-pyran-4-one: 12



To a solution of pyromeconic acid (1.121 g, 10 mmol, 1 eq) and potassium carbonate (4.146 g, 30 mmol, 3 eq) in acetone (60 mL) at room temperature, methyl iodide was added (1.9 mL, 30 mmol, 3 eq). The resulting mixture was stirred at reflux temperature for 4 h. Acetone was evaporated under reduced pressure. The resulting oil was dissolved in dichloromethane (100 mL) and water (100 mL). The aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 x 100 mL). The combined organic layers were washed with brine (50 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give the pure product.

Yield and aspect: 99% (1.249 g, 9.9 mmol), colorless oil

Formula: C₆H₆O₃

Molar mass: 126.11 g.mol⁻¹

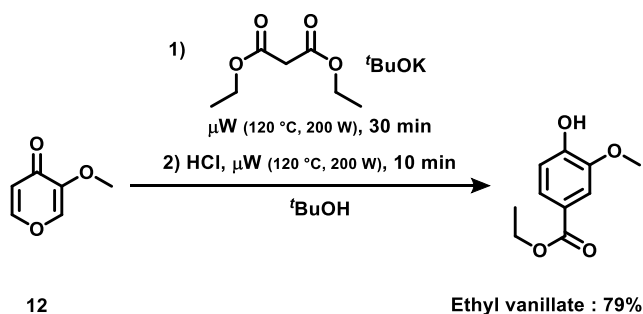
CAS: 1193-64-2

TLC: R_f = 0.6 (Pentane/Et₂O 8:2)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.78 (s, 3 H, OCH₃), 6.43 (d, 1 H, ³J = 5.6 Hz, 6-CH), 7.58 (s, 1 H, 3-CH), 7.72 (d, 1 H, ³J = 5.6 Hz, 5-CH)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 56.5 (OCH₃), 116.2 (3-C), 136.3 (6-C), 149.7 (2-C), 154.6 (5-C), 173.7 (1-C)

Ethyl 4-hydroxy-3-methoxybenzoate: Ethyl vanillate



A microwave vial was charged under an argon atmosphere with **12** (126 mg, 1 mmol, 1 eq), dry potassium *tert*-butoxide (124 mg, 1.1 mmol, 1.1 eq) in *tert*-butanol (3 mL) and diethyl malonate (176 mg, 1.1 mmol, 1.1 eq). The resulting mixture was irradiated with microwaves at 120 °C and held for 30 min, then an aqueous solution of hydrochloric acid (1 M, 3 mL, 3 mmol, 3 eq.) was added and the solution was re-irradiated with microwaves at 120 °C held for 10 min. The *tert*-butanol was then removed under reduced pressure and the aqueous mixture was diluted with water (5 mL) and extracted with diethyl ether (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with water (2 x 10 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (Pentane/Et₂O 8:2) to give the pure product.

Yield and aspect: 79% (155 mg, 0.79 mmol), viscous solid

Formula: C₁₀H₁₂O₄

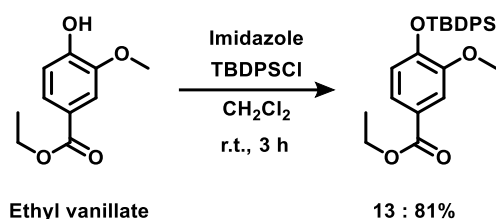
Molar mass: 196.20 g.mol⁻¹

CAS: 617-05-0

TLC: R_f = 0.49 (Pentane/Et₂O 9:1)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.38 (t, 3 H, ³J = 7.4 Hz, CH₃CH₂O), 3.93 (s, 3 H, CH₃O), 4.35 (q, 2 H, ³J = 7.4 Hz, CH₃CH₂O), 6.94 (d, 1 H, ⁴J = 2.2 Hz, 3-CH), 7.55 (d, 1 H, ³J = 8.1 Hz, 6-CH), 7.63 (dd, 1 H, ³J = 8.1 Hz, ⁴J = 2.2 Hz, 5-CH)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 14.4 (CH₃CH₂O), 56.0 (OCH₃), 60.8 (CH₃CH₂O), 111.9 (3-C), 114.3 (6-C), 122.6 (4-C), 124.2 (5-C), 146.4 (2-C), 150.2 (1-C), 166.6 (CO₂Et)

Ethyl 4-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)-3-methoxybenzoate: 13


To a stirred solution of ethyl vanillate (1.522 g, 10 mmol, 1 eq) in dichloromethane (20 mL), imidazole (1.802 g, 30 mmol, 3 eq) and *tert*-butyldiphenylsilyl chloride (3.9 mL, 15 mmol, 1.5 eq) were successively added under an argon atmosphere at 0 °C. The resulting mixture was stirred at room temperature for 3 h, then was quenched with water (30 mL). The organic layer was separated and the aqueous one was extracted with diethyl ether (3 x 50 mL). The combined organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give the crude product. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (Pentane/Et₂O 98:02) to give the pure product.

Yield and aspect: 81% (3.520 g, 8.1 mmol), colorless oil

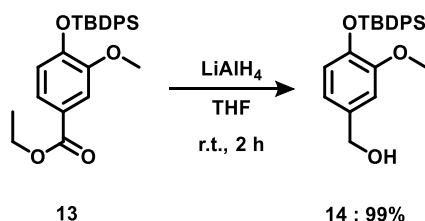
Formula: C₂₆H₃₀O₄Si

Molar mass: 434.61 g.mol⁻¹

TLC: R_f = 0.92 (Pentane/Et₂O 98:02)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.12 (s, 9 H, (CH₃)₃CSi), 1.34 (t, 3 H, ³J = 7.0 Hz, CH₃CH₂O), 3.61 (s, 3 H, CH₃O), 4.31 (q, 2 H, ³J = 7.0 Hz, CH₃CH₂O), 6.71 (d, 1 H, ³J = 8.2 Hz, 6-CH), 7.30-7.41 (m, 7 H, ArSi + 5-CH), 7.45 (d, 1 H, ⁴J = 1.9 Hz, 3-CH), 6.68-7.72 (m, 4 H, Ph_{meta}Si)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 14.3 ((CH₃)₃CSi), 19.8 (CH₃CH₂O), 26.4 ((CH₃)₃CSi), 55.3 (OCH₃), 65.8 (CH₃CH₂O), 112.9 (3-C), 119.6 (6-C), 123.0 (5-C), 123.8 (4-C), 129.7 (4 C, Ph_{meta}Si), 132.9 (2 C, Ph_{para}Si), 133.7 (2 C, Ph_{gem}Si), 135.1 (4 C, Ph_{ortho}Si), 149.2 (1-C), 150.2 (2-C), 166.4 (COOEt)

(4-((tert-Butyldiphenylsilyl)oxy)-3-methoxyphenyl)methanol: 14


To an anhydrous solution of lithium aluminum hydride (380 mg, 10 mmol, 1 eq) in tetrahydrofuran (15 mL) at 0 °C under an inert atmosphere, **13** (2.825 g, 6.6 mmol, 1 eq) in

solution in anhydrous tetrahydrofuran (15 mL) was slowly added. The resulting mixture was stirred for 2 h being allowed to reach room temperature. The reaction was quenched slowly at 0 °C with a saturated aqueous solution of ammonium chloride (30 mL), then an aqueous solution of sodium hydroxide (4 M, 20 mL) and a saturated solution of Rochelle's salt (50 mL) were added. The resulting mixture was stirred at room temperature for 3 h and the product was extracted with diethyl ether (2 x 150 mL) and ethyl acetate (150 mL). The combined organic layers were washed with brine (50 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated to give the pure product.

Yield and aspect: 99% (3.886 g, 9.9 mmol), colorless to yellowish oil

Formula: C₂₄H₂₈O₃Si

Molar mass: 392.57 g.mol⁻¹

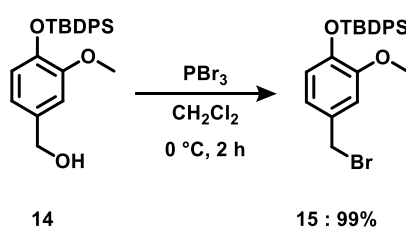
CAS: 1497396-45-8

TLC: R_f = R_f = 0.81 (Pentane/Et₂O 95:05)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.11 (s, 9 H, (CH₃)₃CSi), 3.59 (s, 3 H, CH₃O), 4.54 (s, 2 H, ArCH₂OH), 6.64 (dd, 1 H, ³J = 8.1 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, 5-CH), 6.67 (d, ³J = 8.1 Hz, 6-CH), 6.81 (d, 1 H, ⁴J = 1.9 Hz, 3-CH), 7.31-7.42 (m, 6 H, Ph_{ortho/para}Si), 7.68-7.73 (m, 4 H, Ph_{meta}Si)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 14.3 ((CH₃)₃CSi), 26.7 ((CH₃)₃CSi), 55.6 (OCH₃), 65.5 (ArCH₂OH), 111.5 (3-C), 119.4 (6-C), 120.0 (5-C), 127.6 (4 C, Ph_{meta}Si), 129.7 (2 C, Ph_{para}Si), 133.7 (2 C, Ph_{gem}Si), 134.3 (4-C), 135.7 (4 C, Ph_{ortho}Si), 144.7 (1-C), 150.7 (2-C)

(4-(Bromomethyl)-2-methoxyphenoxy)(tert-butyl)diphenylsilane: 15



To a solution of **14** (432 mg, 1.1 mmol, 1 eq) in dichloromethane (5 mL) at 0 °C under an argon atmosphere, phosphorus tribromide (105 μL, 1.1 mmol, 1 eq) was added. The resulting mixture was stirred at 0 °C for 2 h, then was quenched with a saturated aqueous solution of sodium bicarbonate (5 mL) added dropwise. The resulting mixture was extracted with dichloromethane (3 x 15 mL). The combined organic layers were washed with water (10 mL) and brine (5 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give the pure product.

Yield and aspect: 99% (496.5 mg, 1.09 mmol), yellowish oil

Formula: C₂₄H₂₇BrO₂Si

Molar mass: 455.47 g.mol⁻¹

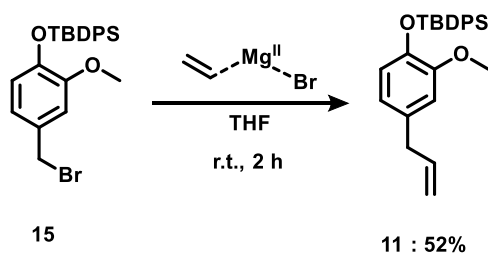
CAS: 2295698-38-1

TLC: R_f = 0.88 (Pentane/Et₂O 95:05)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.11 (s, 9 H, (CH₃)₃CSi), 3.57 (s, 3 H, CH₃O), 4.41 (s, 2 H, ArCH₂Br), 6.62 (d, ³J = 8.1 Hz, 6-CH), 6.67 (dd, 1 H, ³J = 8.1 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, 5-CH), 6.79 (d, 1 H, ⁴J = 1.9 Hz, 3-CH), 7.31-7.42 (m, 6 H, Ph_{ortho/para}Si), 7.68-7.73 (m, 4 H, Ph_{meta}Si)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 20.1 ((CH₃)₃CSi), 26.7 ((CH₃)₃CSi), 34.6 (ArCH₂Br), 55.6 (OCH₃), 113.2 (3-C), 120.2 (6-C), 121.6 (5-C), 127.6 (4 C, Ph_{meta}Si), 129.9 (2 C, Ph_{para}Si), 130.8 (4-C), 133.4 (2 C, Ph_{gem}Si), 135.7 (4 C, Ph_{ortho}Si), 145.5 (1-C), 150.7 (2-C)

(4-Allyl-2-methoxyphenoxy)(tert-butyl)diphenylsilane: 11



To an anhydrous solution of **15** (496.5 mg, 1.09 mmol, 1 eq) in tetrahydrofuran (5 mL) at 0 °C, vinylmagnesium bromide in tetrahydrofuran (1 M, 2.2 mL, 2.2 mmol, 2 eq) was slowly added. The resulting mixture was allowed to warm up at room temperature and was stirred for 18 h. The reaction was stopped with an aqueous solution of ammonium chloride (5 mL) and the product was extracted with diethyl ether (3 x 15 mL). The combined organic layers were washed with brine (10 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (Pentane/CH₂Cl₂ 9:1) to give the pure product.

Yield and aspect: 52% (229 mg, 0.57 mmol), yellowish oil

Formula: C₂₆H₃₀O₂Si

Molar mass: 402.61 g.mol⁻¹

CAS: 142876-79-7

TLC: R_f = 0.71 (Pentane/Et₂O 97:03)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.13 (s, 9 H, (CH₃)₃CSi), 3.25 (d, 2 H, ³J = 6.2 Hz, α-CH₂), 3.55 (s, 3 H, OCH₃), 4.96-5.03 (m, 2 H, γ-CH₂), 5.84- 5.98 (m, 1 H, β-CH), 6.45 (dd, 1 H,

³J = 8.0 Hz, ⁴J = 2.1 Hz, 5-CH), 6.59 (d, 1 H, ⁴J = 2.1 Hz, 3-CH), 6.63 (d, 1 H, ³J = 8.0 Hz, 6-CH), 7.30-7.45 (m, 6 H, **Ph_{ortho/para}Si**), 7.70-7.74 (m, 4 H, **Ph_{meta}Si**)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 19.9 ((CH₃)₃CSi), 26.9 ((CH₃)₃CSi), 55.5 (OCH₃), 113.1 (3-C), 115.4 (α-CH₂), 116.1 (γ-CH₂), 119.9 (6-C), 120.3 (5-C), 127.5 (4 C, **Ph_{meta}Si**), 129.6 (2 C, **Ph_{para}Si**), 133.1 (4-C), 133.8 (2 C, **Ph_{gem}Si**), 135.4 (4 C, **Ph_{ortho}Si**), 138.1 (1-C), 138.1 (β-CH), 150.1 (2-C)

CHAPITRE 2
Études des intermédiaires radicalaires
et réactivité de l'eugénol et de
l'isoeugénol soumis à différents
systèmes oxydants

--

D'une approche en solution aux
épidermes humains reconstitués
et réactivité vis-à-vis d'acides aminés

Sommaire de partie :

1. Les fondamentaux	88
1.1. La Résonance Paramagnétique Électronique (RPE) ^{106,107}	88
1.1.1. L'effet Zeeman	88
1.1.2. Les interactions hyperfines	90
1.2. Le <i>spin trapping</i>	91
1.3. Le <i>spin scavenging</i>	94
2. Identification des espèces radicalaires issues des composés cibles par <i>spin trapping</i>	96
2.1. Étude de RPE- <i>spin trapping</i> en solution	96
2.1.1. La méthodologie expérimentale	97
<i>Les initiations radicalaires</i>	97
<i>Préparation des échantillons</i>	100
2.1.2. Résultats et discussion	100
2.2. Étude de RPE couplée au <i>spin trapping</i> dans des RHE	107
2.2.1. Les RHE : des matrices de cultures cellulaires mimant la peau	107
2.2.2. Étude de RPE- <i>spin trapping</i>	108
<i>Méthodologie expérimentale</i>	108
<i>Résultats et discussion</i>	109
2.2.3. Étude de RPE- <i>spin trapping</i> dans les RHE dopés	110
<i>Méthodologie expérimentale pour le dopage métabolique des RHE avec de la HRP</i>	110
<i>Résultats et discussion</i>	114
2.2.4. Étude de RPE- <i>spin trapping</i> dans les RHE sous irradiation	116
<i>Méthodologie expérimentale pour l'exposition solaire des RHE</i>	116
<i>Résultats et discussion</i>	117
2.3. Étude de RPE- <i>spin scavenging</i> dans des RHE	118
2.3.1. Méthodologie expérimentale	119
2.3.2. Résultats et discussion	119
3. Réactivité de l'Eug et de l'IsoEug vis-à-vis d'acides aminés	120
3.1. Calculs théoriques de réactivité radicalaire avec un acide aminé	121
3.2. Étude de la réactivité radicalaire en solution	122
3.2.1. Méthodologie expérimentale	122
3.2.2. Résultats et discussion	124
4. Bilan	126
Experimental part: Chapter 2	129

1. Les fondamentaux

1.1. La Résonance Paramagnétique Électronique (RPE)^{106,107}

Le second chapitre de ce manuscrit de thèse se focalise sur la détection et l'analyse des différents intermédiaires radicalaires induits par l'**Eug** et l'**IsoEug** dans des matrices cutanées. Si l'action antioxydante de ces deux molécules implique la formation des espèces radicalaires, elles pourraient être réactives vis-à-vis des protéines de la peau formant un complexe antigénique, élément clé de la réponse immunitaire. Les espèces radicalaires possédant par définition au minimum un électron non-apparié, la résonance paramagnétique électronique (RPE) se pose ici en outil de choix pour leur caractérisation. *A contrario* de la résonance magnétique nucléaire (RMN) qui étudie le comportement d'un noyau soumis à un champ magnétique externe, la RPE se focalise sur les espèces paramagnétiques. Néanmoins, les deux spectroscopies résultent d'un même phénomène d'absorption d'énergie provenant d'une excitation électromagnétique induisant une transition d'énergie du spin des noyaux (pour la RMN) ou des électrons (pour la RPE) soumis à un champ magnétique externe.

La spectroscopie RPE peut être utilisée selon deux approches distinctes : en onde continue ou impulsionnelle. Dans ce travail, seule la spectroscopie RPE en onde continue ou *cw-RPE* (pour *continuous wave EPR*) est utilisée : l'échantillon est irradié continuellement par un rayonnement électromagnétique hyperfréquence.

1.1.1. L'effet Zeeman

La RMN comme la RPE reposent sur un principe fondamental : l'effet Zeeman. Celui-ci a été mis en évidence par le physicien néerlandais Pieter Zeeman récompensé pour cette découverte fondamentale par le prix Nobel de physique 1902.¹³⁰ Cet effet désigne la séparation des niveaux d'énergie définis d'un élément en plusieurs sous-niveaux sous l'action d'un champ magnétique. Dans le cas de la RPE, lorsque l'espèce paramagnétique est soumise à un champ magnétique externe (B_0), une levée de dégénérescence entre les états de spin électroniques est induite. En effet, les électrons possèdent individuellement un spin (*i.e.*, un moment angulaire propre) présent sans l'action d'une force externe. Chaque électron possède donc une charge, en mouvement conduisant à un champ magnétique intrinsèque dont résulte un moment magnétique sous forme de dipôle (Figure 48). Ce moment magnétique ($\vec{\mu}_S$) est défini selon l'équation 1 où γ_S correspond au rapport gyromagnétique de l'électron, h correspond à la constante de Planck (*i.e.*, $6,62607 \cdot 10^{-34} \text{ m}^2 \cdot \text{kg} \cdot \text{s}^{-1}$), β_e correspond au magnéton de Bohr (*i.e.*, $9,27401 \cdot 10^{-24} \text{ A} \cdot \text{m}^2$), \vec{S} correspond à l'opérateur du spin et g correspond au facteur de Landé (sans dimension) caractéristique à l'échantillon d'étude dépendant de sa structure électronique :

$$(Eq.1) \quad \vec{\mu}_S = \gamma_S \frac{h}{2\pi} \vec{S} = g\beta_e \vec{S}$$

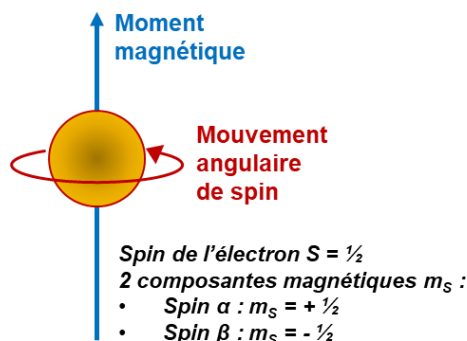


Figure 48 : L'électron libre et son moment magnétique résultant de son mouvement angulaire

Sous l'effet d'un champ magnétique externe B_0 , le moment magnétique de spin s'oriente de manière parallèle ou antiparallèle. Ceci permet la différenciation des niveaux d'énergies des deux moments de spin ($m_s = \pm 1/2$) dont les énergies des électrons sont définies selon le produit scalaire défini par l'équation 2 :

$$(Eq.2) \quad E = -\vec{\mu} \cdot \vec{B}_0$$

La levée de dégénérescence des deux états énergétiques se retrouve exprimée par l'Hamiltonien Zeeman, avec S_z la projection de l'opérateur de spin électronique sur l'axe z du champ B_0 , comme le montre l'équation 3 :

$$(Eq.3) \quad \vec{H}_{\text{Zeeman}} = -\vec{\mu} \cdot \vec{B}_0 = g\beta_e S_z$$

À ce stade, l'absorption d'une radiation électromagnétique de fréquence (ν) et d'énergie $h\nu$ perpendiculaire au champ B_0 induit la transition entre le niveau d'énergie $m_s = - 1/2$ vers le niveau $m_s = + 1/2$. Ceci n'est rendu possible que lorsque la différence entre ces deux niveaux d'énergie (ΔE) correspond à l'énergie $h\nu$ fournie par l'excitation micro-onde : c'est la condition de résonance (équation 4) qui s'écrit :

$$(Eq.4) \quad \Delta E = h\nu = E_+ - E_- = 1/2g\beta_e B_0 - (-1/2g\beta_e B_0) = g\beta_e B_0$$

$$\text{Avec :} \quad g = \frac{h \nu}{\beta_e B_0} \approx 0,714484 \frac{\nu(\text{MHz})}{B_0(\text{G})}$$

Le phénomène de RPE résulte donc conjointement de l'effet Zeeman et de la satisfaction de la condition de résonance. C'est une spectroscopie d'absorption qui détecte l'énergie absorbée lors de transitions électroniques. Comme dit précédemment, cette énergie se situe dans la gamme des micro-ondes (1-300 GHz). Par ailleurs, afin d'améliorer la sensibilité de détection, le champ magnétique B_0 est modulé (ca. 100 kHz) suivant un système de détection synchrone.¹⁰⁶ Cette approche a pour conséquence la détection non pas du spectre d'absorption mais de sa dérivée première (Figure 49).

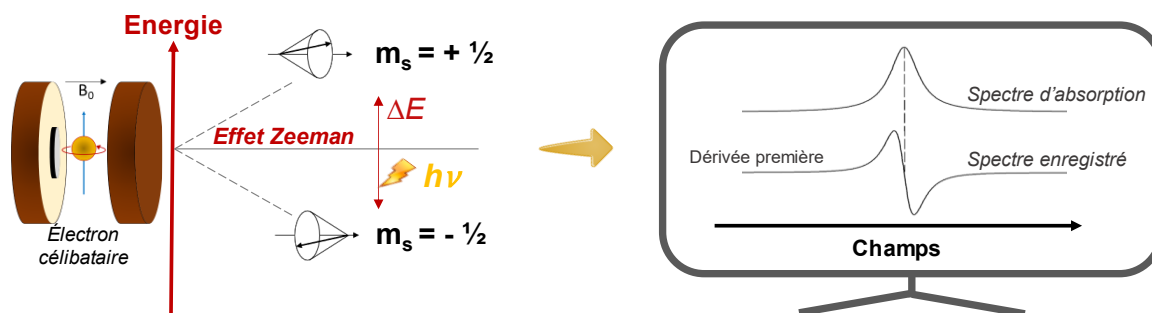


Figure 49 : Niveaux d'énergie et spectre RPE pour un système isotrope de spin $S = \frac{1}{2}$ lorsque la condition de résonance est vérifiée

1.1.2. Les interactions hyperfines

Outre la détection et la caractérisation proprement dite du ou des électrons non-appariés de l'échantillon étudié, la RPE permet l'étude de l'environnement proche de ces électrons qui jouent ici le rôle de sonde électronique. En effet, lorsque l'électron célibataire est à proximité d'un noyau de spin nucléaire I non nul, le champ magnétique induit par le noyau interagit avec le champ magnétique externe B_0 . Le champ magnétique perçu par le spin électronique s'en retrouve perturbé. Cette interaction entre le spin électronique (S) et le(s) spin(s) nucléaire(s) (I) est appelée interaction hyperfine. Dans un système isotrope, l'interaction hyperfine est définie par l'hamiltonien (équation 5) dépendant de sa constante de couplage hyperfine isotrope a_{iso} (*hfcc* pour *hyperfine coupling constant*, représentant cette énergie d'interaction) tel que :

$$(Eq.5) \quad \vec{H}_{\text{hyperfine}} = a_{\text{iso}} \cdot \vec{S} \cdot \vec{I}$$

L'interaction hyperfine dépend de différents facteurs tels que le rapport gyromagnétique ou la densité de spin électronique sur le noyau. Des différents paramètres de l'interaction hyperfine et de l'effet Zeeman *per se* résultent l'hamiltonien qui décrit le système de spin électronique et nucléaire suivant :

$$(Eq.6) \quad \vec{H}_{SI} = \vec{H}_{\text{Zeeman}} + \vec{H}_{\text{hyperfine}} = g\beta_e \vec{S} \cdot \vec{B}_0 + a_{\text{iso}} \vec{S} \cdot \vec{I}$$

Cette interaction hyperfine conduit à la subdivision de chaque niveau électronique m_s en $2nI+1$ sous niveaux de valeur m_I , où n correspond au nombre de noyaux équivalents possédant un spin nucléaire I non-nul. L'énergie de résonance $E(m_s, m_I)$ se définit alors au travers de l'équation 7 :

$$(Eq.7) \quad E(m_s, m_I) = g\beta_e B_0 m_s + m_s a_{\text{iso}} m_I$$

Les règles de sélection des transitions autorisées en RPE sont celles pour lesquelles $\Delta m_s = \pm 1$ et $\Delta m_l = 0$. De cette manière, $2nI+1$ transitions sont possibles dont l'espacement observé entre chaque raie correspond à la constante de couplage hyperfin. Le cas d'étude le plus simple serait celui du radical proton H^\bullet ($I = 1/2$) où l'électron non-apparié n'aurait qu'une seule interaction hyperfine avec le noyau de l'atome d'H. Dans ce cas, $2 \times 1/2 + 1 = 2$ transitions sont possibles, offrant donc deux raies dont l'*hfcc* correspond à a_H (Figure 50).

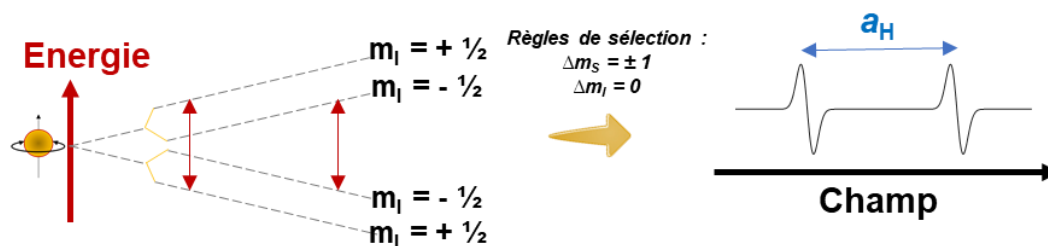


Figure 50 : Spectre de RPE du radical hydrogène H^\bullet résultant de l'interaction hyperfine avec un noyau 1H ($I = 1/2$)

Par conséquent, un spectre RPE comme son analyse peut rapidement se complexifier lorsque le spin électronique est à proximité de plusieurs noyaux non-équivalents possédant des spins nucléaires non-nuls. Dans ce cas le nombre de subdivisions des niveaux d'énergies, et par voie de conséquence le nombre de raies RPE pouvant être observées, se démultiplie (cf 1.2. Le *spin trapping*, Figure 51). Le spectre RPE n'en est que plus riche d'informations.

1.2. Le *spin trapping*

Le *spin trapping*, ou piégeage de spin, est une méthode « indirecte » classiquement utilisée en RPE pour l'analyse d'espèces radicalaires transitoires. Ces espèces réactives ayant souvent des temps de vie particulièrement courts (ns-ms) leur détection directe dans des conditions expérimentales classiques (température ambiante, solution aqueuse...) n'est pas possible. Cette méthodologie voit le jour à la fin des années 60 et est aujourd'hui incontournable dans l'étude d'intermédiaires radicalaires de courte durée de vie.¹³¹ Concrètement, le *spin trap* (ST) est une espèce diamagnétique capable de réagir avec l'espèce transitoire (R^\bullet) conduisant à une espèce paramagnétique persistante : l'adduit de spin ($^{\bullet}ST-R$). Ce dernier possédant un temps de vie plus long (de quelques minutes à plusieurs heures voire jours), sa détection par RPE en est grandement facilitée. De plus, la présence d'un voire plusieurs noyaux de spin nucléaire non-nuls sur le ST et les *hfccs* qui en découlent, dépendant du radical piégé, peuvent également permettre son identification (Figure 51).

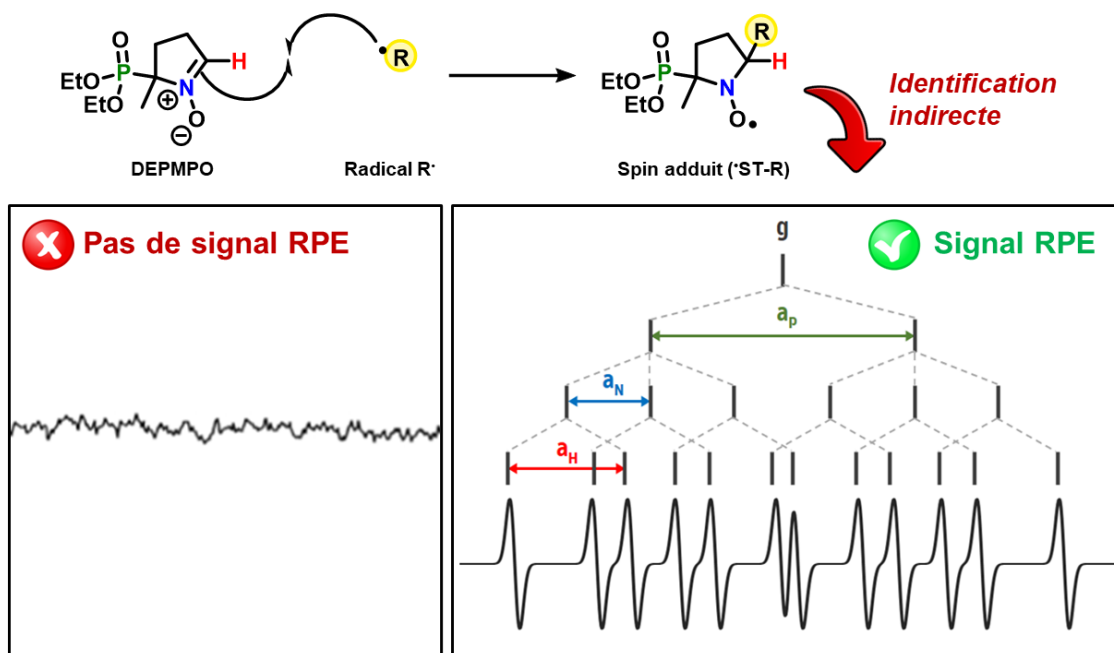


Figure 51 : Schéma descriptif illustrant une expérience de *spin trapping* par le **DEPMPPO** agissant comme ST et permettant la détection indirecte et l'identification du radical R^\bullet piégé par l'évaluation des *hfccs*

Majoritairement les ST sont des dérivés de type nitroso tel que le 2-méthyl-2-nitrosopropane (**MNP**) ou de type nitrone tels que la phényl-*N-tert*-butyl-nitronne (**PBN**), le 5,5-diméthyl-1-pyrroline-*N*-oxyde (**DMPO**), le 5-diéthoxyphosphoryl-5-méthyl-1-pyrroline-*N*-oxyde (**DEPMPPO**) ou encore le 5-diisopropoxyphosphoryl-5-méthyl-1-pyrroline-*N*-oxyde (**DIPMPPO**). Ces ST sont choisis en fonction de l'application visée, de leur compatibilité avec le milieu où est généré le radical d'intérêt (toxicité, solubilité, pénétration, ...) et de leur efficacité de piégeage. L'aptitude de l'adduit de spin à produire une signature RPE spécifique du radical piégé en fonction des *hfccs* est également déterminante dans le choix du ST (Figure 52).⁸⁰

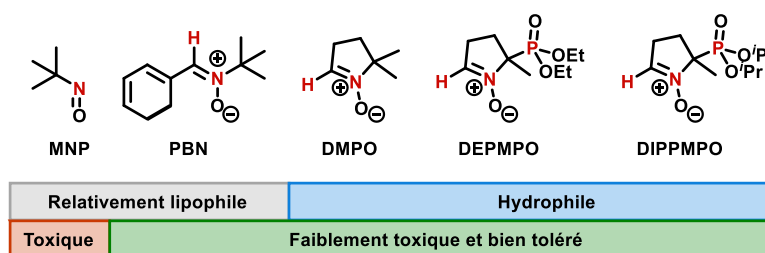


Figure 52 : ST classiques de type nitrone classés en fonction de leur toxicité et lipophilie. En rouge, les atomes avec un spin nucléaire non-nul à l'origine de *hfccs* de l'adduit de spin formé. Figure reprise de Vileno *et al.*⁸⁰

Ce sont ces *hfccs* qui permettent la caractérisation de la nature du radical piégé. Comme énoncé précédemment, l'électron non-apparié agit comme une sonde de son environnement avec des *hfccs* tributaires des noyaux voisins, de la géométrie/structure de l'adduit de spin et par voie de conséquence du radical piégé. Prenons pour exemple, le cas d'un radical centré

sur le carbone (^{12}C : $I = 0$) piégé par le **DEPMPO** (Figure 51). Outre son aspect radicalaire, l'adduit de spin possède trois noyaux de spin nucléaire non-nul (^1H : $I = \frac{1}{2}$; ^{14}N : $I = 1$; ^{31}P : $I = \frac{1}{2}$) proches de l'électron célibataire portée par la fonction aminoxyle du spin adduit. Le spectre RPE résultant peut avoir jusqu'à $[(2nI + 1) = (2 \times \frac{1}{2} + 1) \times (2 \times 1 + 1) \times (2 \times \frac{1}{2} + 1) = 12$ raies dont certaines peuvent se superposer et s'additionner en amplitude selon leur *hfccs* correspondantes (Figure 51).¹⁰⁶ De fait, ces constantes sont caractéristiques de l'espèce radicalaire piégée et permettent de distinguer les différentes espèces radicalaires piégées (oxygénées, carbonées...).

Le **DEPMPO** est le ST qui a été utilisé pour la suite de cette étude. Il est en particulier capable de distinguer les radicaux centrés sur l'oxygène ou le carbone du fait des *hfccs* spécifiques des adduits de spin formés. Par ailleurs, le **DEPMPO** est connu pour être capable de bien pénétrer à l'intérieur des systèmes biologiques tout en étant bien toléré par ces derniers.⁸⁰ Dans le cas où plusieurs systèmes radicalaires différents sont identifiés, il est nécessaire de faire une déconvolution de ces systèmes à partir du spectre expérimental obtenu afin d'identifier les différents adduits potentiels.

Dans le cas de nos études, si le radical piégé est un radical centré sur un atome de carbone substitué ^{13}C (avec $I_{^{13}\text{C}} = \frac{1}{2}$), une nouvelle *hfcc* induite par cet isotope entraîne « un dédoublement » du signal (Figure 53).^{80,107,111}

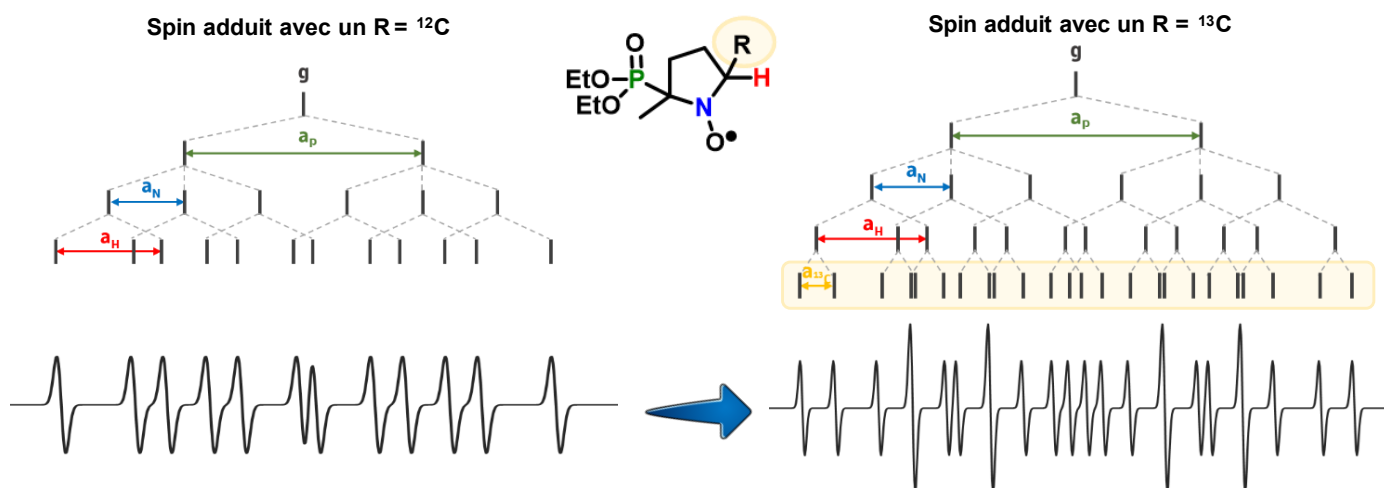


Figure 53 : Description schématique du dédoublement du signal RPE d'un adduit de spin du **DEPMPO** induit par la présence d'un radical carboné substitué au ^{13}C

Le *spin trapping* possède des avantages incontestables, il est primordial d'en connaître les limitations. D'une part, c'est une méthodologie « indirecte » et il faut garder à l'esprit que le spectre RPE observé est celui de l'adduit de spin et non celui du radical étudié. D'autre part, le ST ne permet pas la quantification des radicaux piégés. En effet, le temps de vie des adduits de spin comme l'efficacité des pièges sont très variables et dépendants des conditions

expérimentales. Dans certains rares cas il est néanmoins possible de quantifier relativement un adduit de spin par rapport à un autre.¹⁰⁷ Par ailleurs, certaines réactions secondaires non-radicalaires peuvent se produire induisant un artéfact *via* la formation d'un radical nitroxyde sans qu'il y ait pour autant piégeage radicalaire. On distingue ici notamment la ène-réaction avec un nitroso comme le **MNP**¹³², la réaction de Forrester-Hepburn¹³³ et le piégeage de spin inverse¹³⁴, ces deux derniers se produisant avec des nitrones (*e.g.*, **PBN**, **DMPO**, **DEPMPO**) (Figure 54).

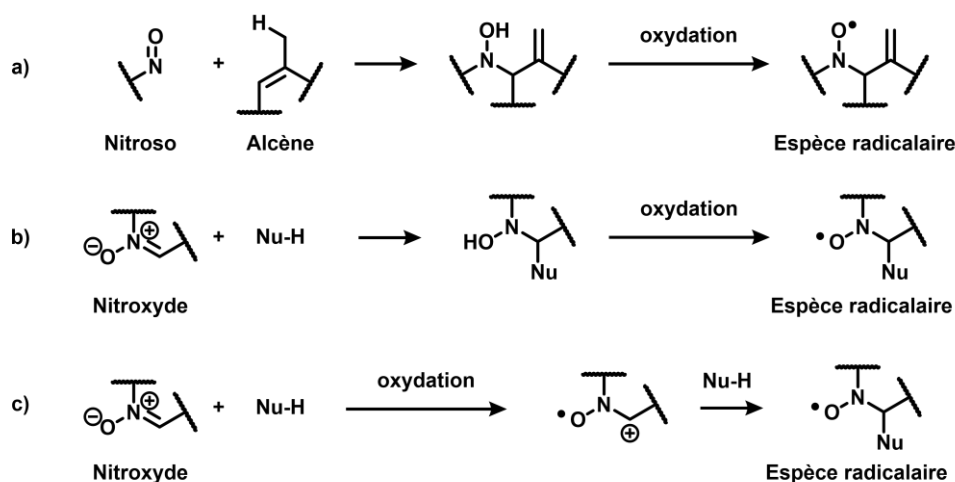


Figure 54 : Réactions secondaires permettant la formation de radicaux nitroxydes sans piégeage de spin : a) ène-réaction, b) réaction de Forrester-Hepburn et c) piégeage de spin inverse

Il en découle l'importance capitale d'effectuer toutes les expériences de contrôle et blancs pour s'assurer de l'origine des radicaux piégés sans (sur)interpréter de manière erronée les espèces ayant réagi avec le ST utilisé.

1.3. Le *spin scavenging*

Le *spin scavenging* est une méthode RPE permettant le suivi cinétique d'une génération radicalaire et notamment de ROS.^{107,110,135,136} Elle met en présence une molécule paramagnétique ou *spin scavenger* (SC) qui agirait ici comme une sorte de FRS (*free radical scavenger*, mesurant le pouvoir antioxydant des espèces, *cf.* Introduction Générale, partie 2.2.3., p.16).^{58,137} Si cette sonde est par nature visible en RPE (spectre spécifique) et relativement stable, elle réagit directement avec des radicaux de petite taille (*e.g.*, $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot^-$) conduisant à sa réduction et à la perte de son caractère paramagnétique.^{136,138} De fait, une étude de *spin scavenging* consiste à évaluer la cinétique de génération radicalaire en suivant la décroissance de l'intensité du signal RPE du SC en fonction du temps et/ou des conditions expérimentales (Figure 55). *A contrario* du FRS, le *spin scavenging* est en général utilisé pour évaluer le caractère cinétique de la production de ROS. Il est également important d'indiquer que cette technique expérimentale est souvent identifiée à tort comme étant du *spin trapping*.

Ces deux approches RPE sont différentes *per se* : si le piégeage de spin permet l'identification d'une espèce radicalaire en générant un adduit de spin paramagnétique et son spectre RPE correspondant, le *spin scavenging* vise à l'obtention de caractère essentiellement cinétique de la génération de ROS en suivant la disparition d'une sonde paramagnétique.^{107,110} On notera également que ces deux approches vont souvent de concert. En effet, un adduit de spin obtenu par *spin trapping* étant par essence une sonde paramagnétique (souvent moins protégée du point de vue stérique qu'un SC) elle est sensible aux réductions dues par exemple à la présence de ROS. De fait, le *spin scavenging* peut donc être un facteur limitant de la technique de spin trapping en réduisant parfois drastiquement le temps de vie et la détection des adduits générés.

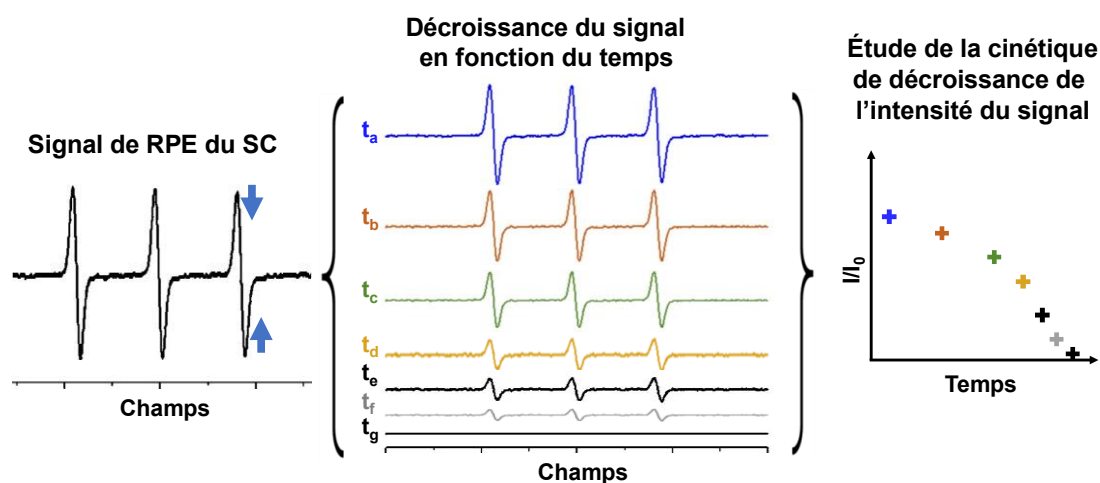


Figure 55 : Schéma de l'approche RPE dite de *spin scavenging* montrant la décroissance de l'intensité du signal RPE (I/I_0) associée à une sonde paramagnétique, le SC souvent de type nitroxyde. Cette décroissance enregistrée en fonction du temps ou de tout autre paramètre expérimental (température, pH, irradiation ...) est souvent induite par l'action de ROS

Visant à caractériser la génération de ROS induite par l'**Eug** et l'**IsoEug**, notre étude de *spin scavenging* s'inspire en particulier des travaux menés par Herrling *et al.* dans le cadre notamment d'imagerie RPE.¹¹⁰ Les SC utilisés ici sont le 3-carboxy-2,2,5,5-tétraméthylpyrrolidine-1-oxyle (**CxP**) et le 3-carbamoyl-2,2,5,5-tétraméthylpyrrolidine-1-oxyle (**CmP**) (Figure 56). Dans ces travaux ces SC sont utilisés pour mesurer la production de ROS générés dans la peau pendant son exposition aux UV : en termes de quantité et de répartition spatiale par imagerie. Le **CxP** et le **CmP** présentent l'avantage d'être assez stables dans la peau malgré son caractère réducteur et se retrouvent réduits majoritairement par les ROS.¹¹⁰ Aussi, le **CmP** du fait notamment de sa nature lipophile diffuse largement au sein de l'épiderme de façon extra et intra-cellulaire. Le **CxP** quant à lui étant déprotoné à pH physiologique (*i.e.*, pH \sim 7) sous forme ionique est trop polaire pour franchir les membranes cellulaires phospholipidiques. Dans l'absolu, cette approche permet de distinguer une génération radicalaire intra- ou extra-cellulaire en suivant la réduction de **CmP** et/ou **CxP**, respectivement.

Dans notre cas, il s'agit de d'évaluer la production d'intermédiaires radicalaires intra- et/ou extra-cellulaires par exposition de la peau à l'**Eug** et de l'**IsoEug**.

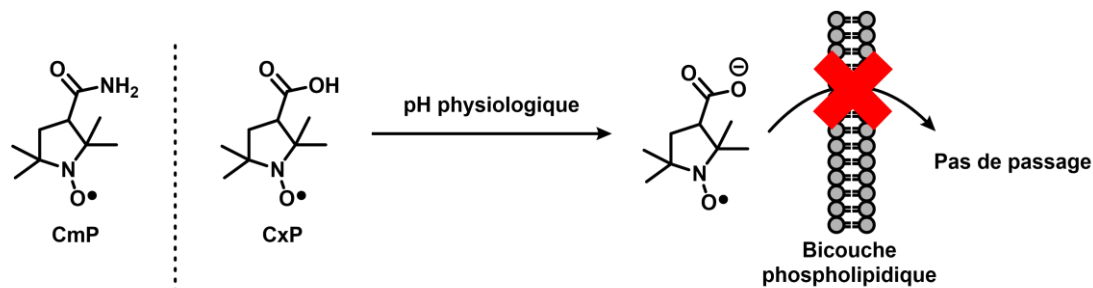


Figure 56 : Structure du **CmP** et du **CxP** qui ne peut franchir les barrières lipidiques à pH physiologique

2. Identification des espèces radicalaires issues des composés cibles par *spin trapping*

2.1. Étude de RPE-*spin trapping* en solution

Lors de cette étude le ST choisi a été le **DEPMPO**. Bien que commercial, ce composé a un coût particulièrement élevé et peut occasionnellement contenir des impuretés paramagnétiques. Les lignes de base correspondantes peuvent alors être soustraites après avoir réalisé les expériences de contrôle adéquates. Cependant, le moyen le plus simple de s'en dédouaner tout en limitant le coût est de synthétiser le **DEPMPO**. Pour ce faire, la méthode de synthèse en deux étapes décrite par Chalier *et al.* a été réalisée.^{139,140} Elle consiste, dans un premier temps, en l'addition de diéthylphosphite à température ambiante sur la 2-méthylpyrroline pour former le composé **16**. Puis, ce dernier est par la suite oxydé à l'aide d'acide *mé*ta-chloroperbenzoïque à -5 °C afin d'obtenir le **DEPMPO** avec un rendement global de 27% (Figure 57).

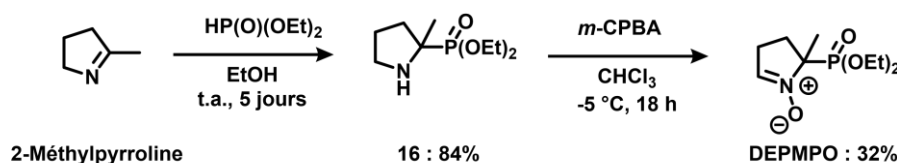


Figure 57 : Schéma de synthèse du **DEPMPO**

Une première approche a été effectuée en solution (matrice minimaliste) avant de pouvoir passer à un modèle d'avantage conforme à un environnement cutané (modèles 3D d'épidermes humains reconstitués, RHE) par nature plus complexe. Ceci visait à détecter et identifier la signature des potentiels adduits de spin formés par les intermédiaires radicalaires induits par les molécules cibles (**Eug** et **IsoEug**) et le ST (**DEPMPO**). Ceci dans le but de

constituer une référence des adduits dans un système relativement simple avant de passer à l'utilisation de RHE.

2.1.1. La méthodologie expérimentale

Ces expériences RPE en solution ont été réalisées dans une solution tampon d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES, 10 mM, pH 6,8). Les solutions d'études ont été préparées à partir de solutions mères de **DEPMPO** (concentration finale d'étude de 50 mM) dans le tampon HEPES et du substrat d'étude (**Eug**, **IsoEug** et analogues, concentration finale d'étude de 20 mM) dans un solvant organique. Différents solvants organiques compatibles avec les systèmes biologiques (acétone, acétonitrile, éthanol, diméthylsulfoxyde) ont été testés sans présenter de différences notables. Ainsi, par souci d'homogénéité avec les études ultérieures au sein des RHE, seuls les essais utilisant l'acétone sont présentés dans ce chapitre mais des expériences de contrôles ont été effectuées et se trouvent dans la partie expérimentale de ce chapitre.

Les initiations radicalaires

Afin de piéger les espèces radicalaires issues des composés phénoliques, une initiation radicalaire se doit d'être amorcée. Pour ce faire, deux systèmes ont été utilisés : (i) un système enzymatique utilisant la peroxydase de raifort (HRP) avec du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et (ii) un simple apport énergétique photo-induit.

La HRP est une peroxydase de la classe des enzymes oxydo-réductases. Les peroxydases sont des hémoprotéines qui possèdent un cation de fer coordonné au cœur d'une porphyrine liée à la protéine (Figure 58).¹⁴¹ C'est au cours des années 90 que le rôle des peroxydases a été élucidé pour les organismes vivants (animaux, microorganismes, plantes). Elles contribuent à la lignification et participent au recouvrement tissulaire des plantes, en plus de la régulation du taux de H_2O_2 au sein des organismes en le réduisant et en oxydant un autre substrat. La réduction par l'ion Fer (III) central est rendu possible par la fonction hémique au sein de la structure. Le centre métallique réagit dans un premier temps avec le H_2O_2 pour produire de l'eau en oxydant l'ion en Fer (IV). Puis, un substrat réducteur par la libération d'un hydrogène utilise ce caractère réducteur et libère une molécule d'eau en agissant à nouveau sur le substrat (Figure 59). Les antioxydants de structure phénolique tels que l'**Eug** et l'**IsoEug** (et éventuellement dans certains cas les sulfonates et amines) constituent un substrat cible connu de la HRP.¹⁴² Le bilan de cette réaction consiste en la formation de deux molécules d'eau et deux radicaux à partir d' H_2O_2 et de deux substrats antioxydants. Les radicaux ainsi formés correspondent aux substrats oxydés sous forme de radical phénoxy PhO^{\bullet} dans le cas des structures phénoliques comme l'**Eug** et l'**IsoEug** (Figure 59).^{142,143}

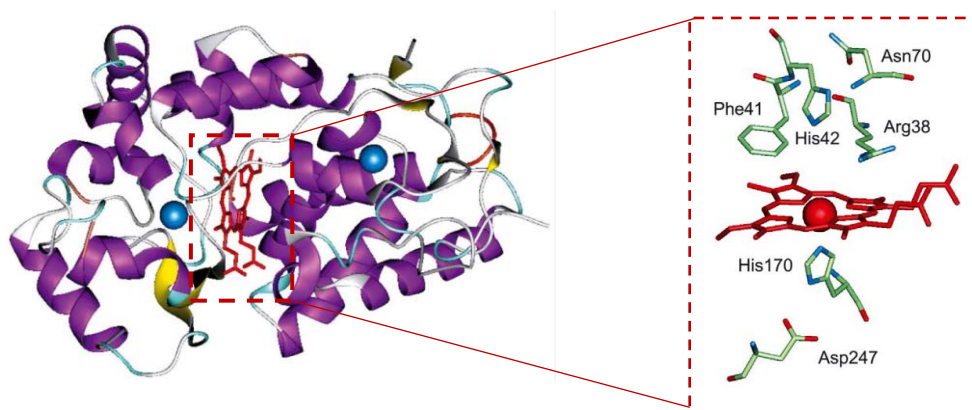
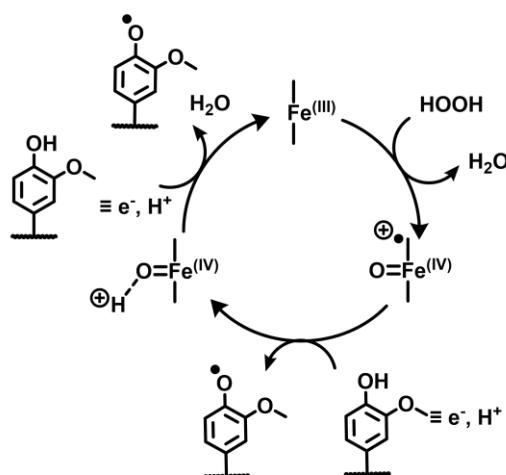


Figure 58 : Représentation 3D de la structure rayons X de la HRP (isoenzyme C) adaptée de Veitch *et al.*¹³ Les sphères bleues représentent des ions calcium maintenant la structure composée d'hélices- α et de feuillets- β représentés en violet. A droite : un zoom sur les acides aminés clés dans la région comportant l'hème (en rouge)

Cycle catalytique enzymatique :



Bilan de réaction :

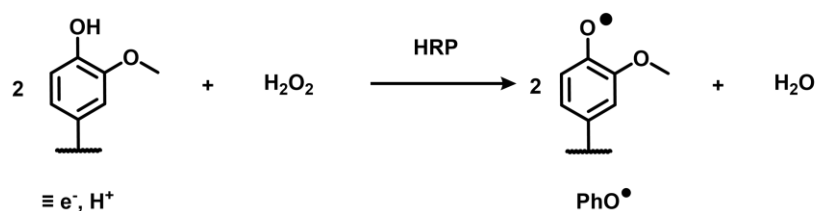


Figure 59 : Cycle catalytique enzymatique et bilan de la réaction de la HRP en présence d' H_2O_2 et de substrats antioxydants tels que l'**Eug** et l'**IsoEug**

Ainsi, le système HRP/ H_2O_2 a été utilisé dans notre étude comme initiateur radicalaire de l'**Eug** et de l'**IsoEug**. Il permet de mimer un environnement physiologique et biologique dans lequel le pouvoir antioxydant de ces composés cibles est mis en évidence par la génération d'un radical PhO^\bullet . Le *spin trapping* a permis d'identifier par la suite les espèces radicalaires issues de cette action antioxydante.

La lumière est une source d'énergie permettant de photoexciter des molécules afin de les rendre plus réactives, et dans certains cas elle facilite la photo-oxydation des composés excités. En effet, par absorption d'une longueur d'onde appropriée les dérivés phénoliques peuvent libérer un proton et un électron durant l'oxydation (Figure 60). Une exposition au soleil est notamment capable d'initier ces réactions de photo-oxydation.

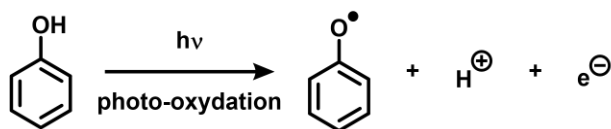


Figure 60 : Photo-oxydation d'un phénol

Expérimentalement, la source de photons que nous avons utilisée dans ce travail est un simulateur solaire Oriel Sol 3A simulant une exposition solaire naturelle ressentie sur la surface de la Terre (Figure 61).¹⁴⁴ La capacité d'un simulateur solaire à se rapprocher de la lumière naturelle du soleil est basée sur trois critères : (i) la correspondance spectrale, (ii) la non-uniformité spatiale de l'irradiance et (iii) l'instabilité temporelle.

Il existe trois standards acceptés comme correspondant aux irradiances solaires avec un simulateur solaire : AM 0, AM 1.5D et AM 1.5G. Tandis que le spectre AM 0 correspond à une exposition hors de l'atmosphère de la Terre, les deux spectres AM 1.5 correspondent à l'irradiance à la surface de la Terre, le D étant pour directement appliquée en un point, et G pour global. Le spectre AM 1.5G est donc celui s'approchant le plus communément d'une photo-exposition ressentie en prenant en compte à la fois la radiation directe, mais aussi diffuse frappant sur la surface de la Terre. (Figure 61).¹⁴⁴ Ceci permet de se rapprocher au maximum des conditions réelles d'exposition au soleil.

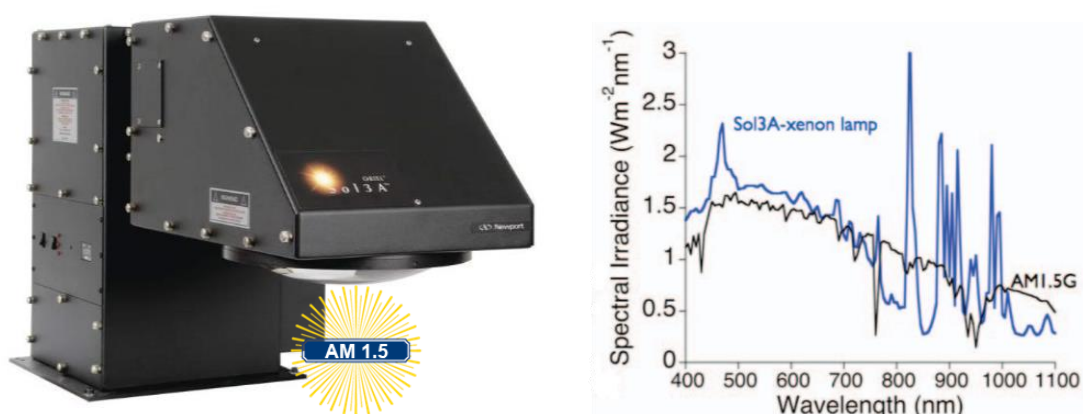


Figure 61 : Simulateur solaire Oriel Sol 3A lampe Xenon simulant le spectre solaire du soleil ressenti sur Terre (AM 1.5G) repris de Leary *et al.*¹⁴⁴

Préparation des échantillons

Dans la pratique, la préparation des échantillons est relativement simple. Le substrat d'étude et le ST sont mis en solution dans un tampon HEPES afin d'avoir des concentrations finales de 20 et 50 mM respectivement. Un excès de ST est engagé afin de pouvoir réagir rapidement avec les intermédiaires radicalaires. L'initiation radicalaire est, quant à elle, produite soit par le système HRP/H₂O₂ (5 U.mL⁻¹ / 32 mM), soit par photo-irradiation (simulateur solaire) pendant 5 à 10 min (Figure 62).

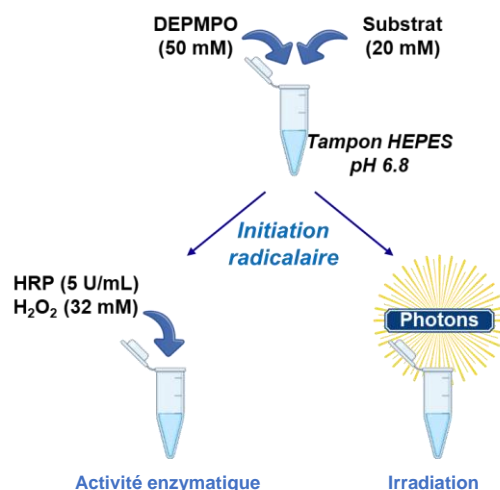


Figure 62 : Méthode expérimentale de préparation des échantillons en vue des tests en solution de RPE-*spin trapping*

Cette solution est ensuite mise dans un capillaire en verre scellé pour être placée dans la cavité du spectromètre de RPE et pour ensuite procéder à l'acquisition et à l'enregistrement des spectres RPE.

2.1.2. Résultats et discussion

L'**Eug** et l'**IsoEug** ont été testés dans un premier temps avec le système HRP/H₂O₂ en solution. Afin d'avoir de plus amples informations sur ces molécules, d'autres substrats similaires ont aussi été testés : (i) la molécule représentant le cœur commun à l'**Eug** et à l'**IsoEug**, le guaiacol et (ii) des analogues méthylés sur la fonction phénolique (*i.e.*, vétratrol, le méthyleugénol et le méthylisoeugénol) afin de souligner l'importance de cette fonction mise en évidence par la formation d'un intermédiaire radicalaire PhO[•] (Figure 63).

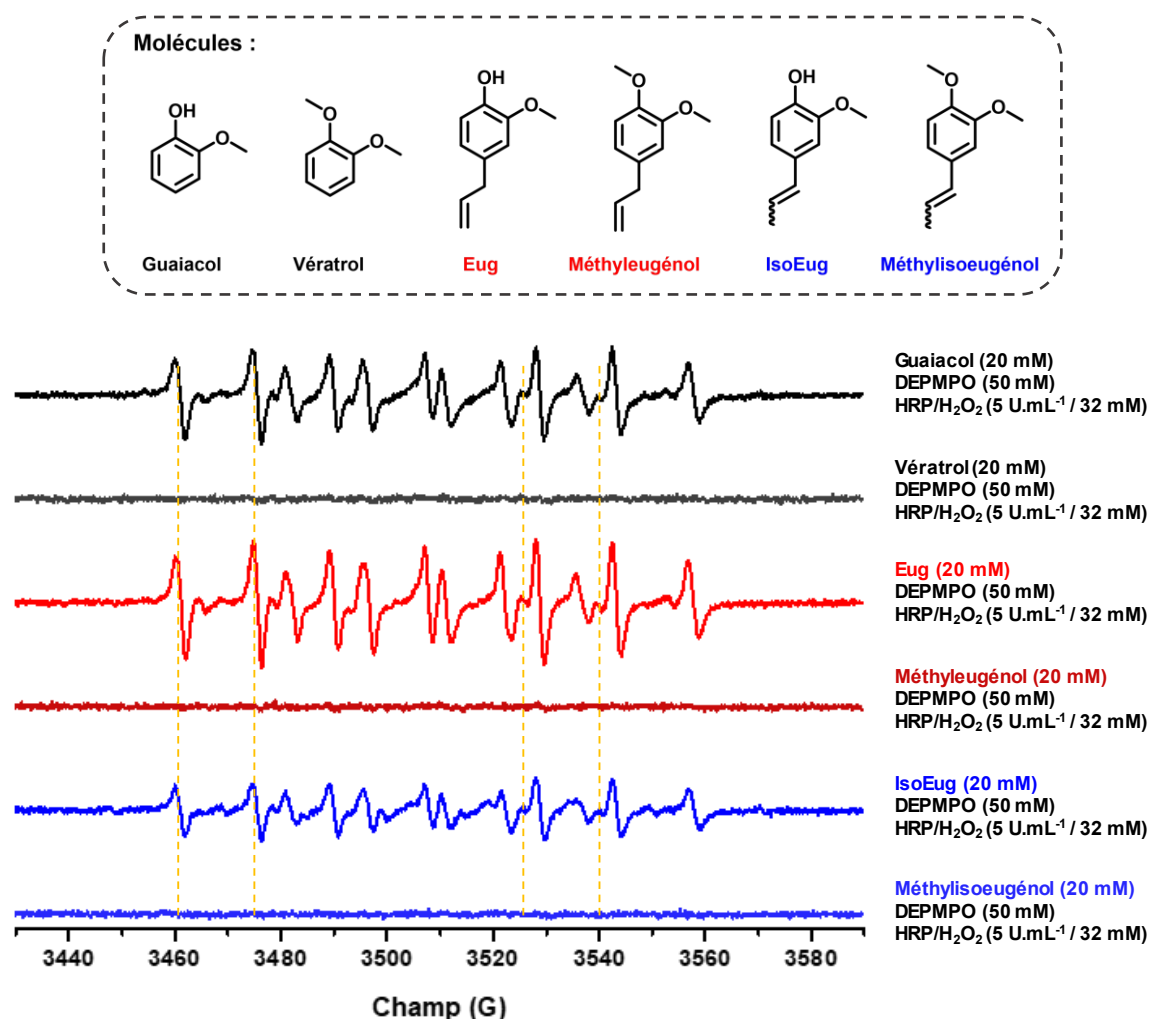


Figure 63 : Spectres RPE-*spin trapping* en solution du guaiacol, du vératrol, de l'**Eug**, du méthyleugénol, de l'**IsoEug** et du méthylisoeugénol suite à une initiation radicalaire par le système enzymatique HRP/H₂O₂

Ces premiers essais en solution initiés par le couple HRP/H₂O₂ mettent en évidence la formation d'intermédiaires radicalaires que génère le radical PhO[•]. Il est intéressant de noter que les spectres RPE sont très similaires pour l'**Eug**, l'**IsoEug** et le guaiacol. Après une identification et déconvolution manuelles, l'analyse de ces spectres a été affinée en utilisant des scripts faits sous un environnement MatLab[®] (Mathworks) en utilisant la boîte à outils EasySpin[®] développée par Stoll *et al.*^{80,145} Ceci a permis d'extraire le facteur *g* ainsi que les *hfccs* des adduits de spin formés (Figure 64).

Deux adduits de spin ont ainsi été identifiés au vu des *hfccs* mesurées et confrontées aux bases de données existantes, la littérature et les travaux antérieurs de piégeage de spin effectués au laboratoire.^{80,146} Le premier adduit de spin (Figure 64, spectre bleu avec *a_H* = 21,1 G, *a_N* = 14,5 G, *a_P* = 46,8 G) est typique d'un adduit formé par le piégeage d'un radical centré sur l'atome de carbone (R[•]).^{80,146,147} Cette génération de radical carboné peut s'expliquer par la délocalisation électronique du radical PhO[•]. Néanmoins, bien qu'un radical R[•] a été identifié,

il n'est pas possible à ce stade de déterminer où celui-ci est localisé sur le squelette carboné de l'**Eug**, de l'**IsoEug** ou du guaiacol. Ceci étant dit, les *hfccs* obtenues étant similaires pour chacune de ces molécules laissent supposer que l'intermédiaire radicalaire carboné piégé appartient au motif commun (guaiacol) de la structure de l'**Eug** et de l'**IsoEug**. Le second spin adduit observé (Figure 64, spectre vert avec $a_H = 10,9$ G, $a_N = 13,7$ G et $a_P = 50,2$ G) serait compatible avec le piégeage d'un radical de type peroxy (ROO^\bullet) probablement dû à une réaction secondaire de la HRP avec l' H_2O_2 .^{80,146-148}

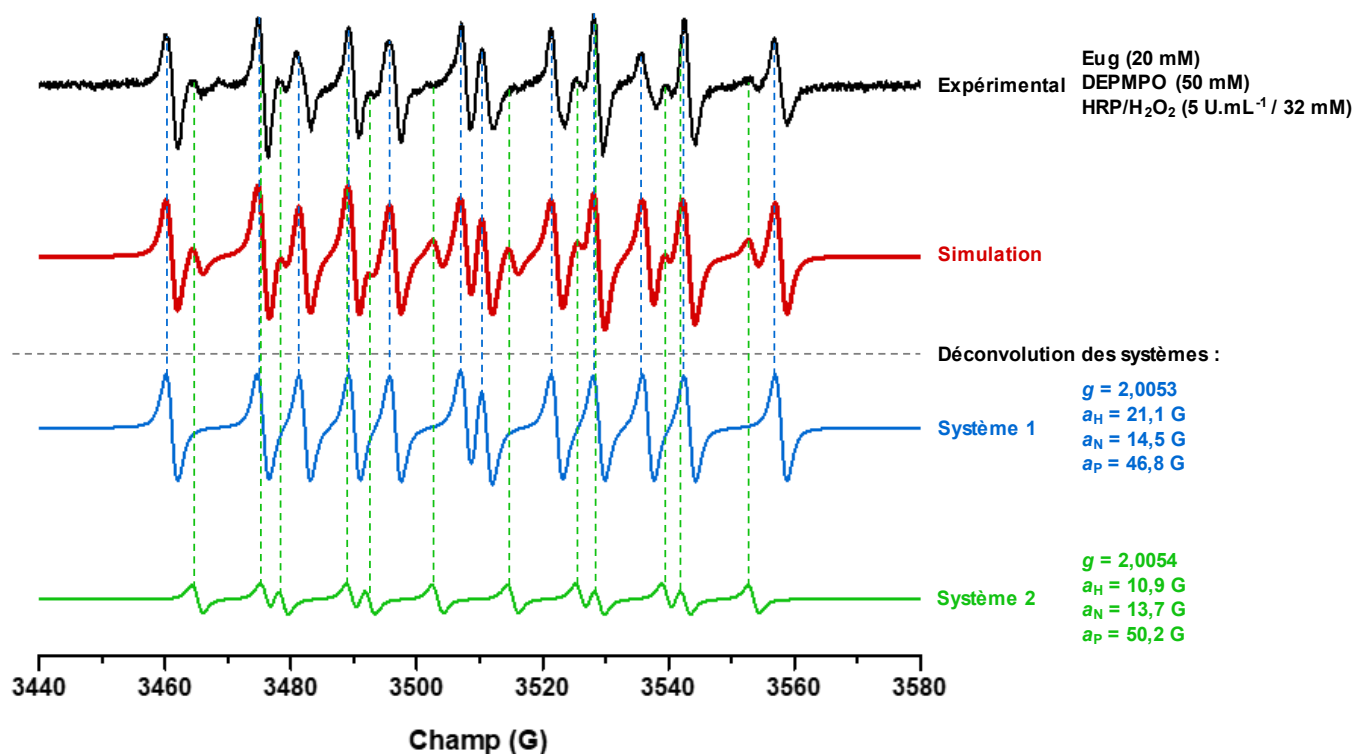


Figure 64 : Simulation et déconvolution des systèmes identifiés pour le spectre RPE obtenu en solution avec **Eug** via l'initiation HRP/H₂O₂. Un radical centré sur le carbone (spectre bleu) et un radical centré sur l'oxygène de type peroxy (spectre vert).

Dans un second temps, les composés ont été étudiés en solution sous illumination à l'aide du simulateur solaire. Ainsi les solutions tamponnées (HEPES, pH = 6.8) de molécules cibles (20 mM) en présence de ST (50 mM) ont été irradiées 5 minutes préalablement à l'acquisition des spectres RPE (Figure 65). Pour l'**Eug** et l'**IsoEug** les résultats montrent des adduits de spin similaires à ceux obtenus par voie enzymatique mais avec un rapport signal sur bruit (S/N) moindre. Pour les analogues méthylés vétratrol et méthylisoeugénol, aucun intermédiaire radicalaire photo-induit n'a été observé. Néanmoins et de manière surprenante, l'irradiation semble initier la photo-oxydation du méthyleugénol. Ceci peut potentiellement s'expliquer par les études DFT discutées précédemment (*cf.* Chapitre 1, partie 1., p.39). En effet, ces dernières présentaient l'**Eug** comme ayant deux sites d'oxydation : (i) la fonction phénoxy, mais également et de manière préférentielle (ii) le méthylène de la chaîne allylique. Ce dernier

pouvant donner lieu à un autre radical capable d'évoluer, par délocalisation électronique, en d'autres intermédiaires radicalaires carbonés qui ne sont pas les mêmes que ceux proposés après formation du PhO[•] (Figure 66).

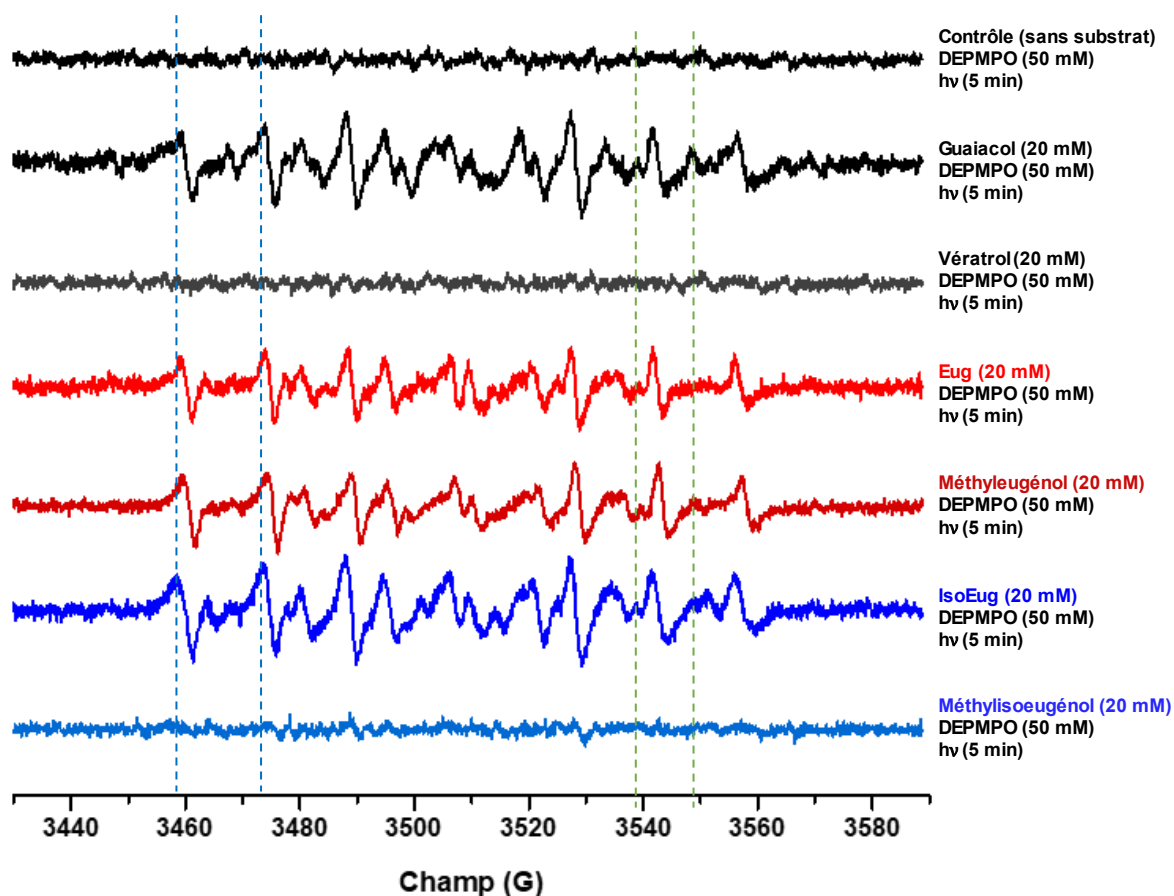


Figure 65 : Spectres de RPE obtenus par *spin trapping* en solution du guaiacol, du vératrol, de l'**Eug**, du méthyleugénol, de l'**IsoEug** et du méthylisoeugénol après une exposition lumineuse de 5 min.

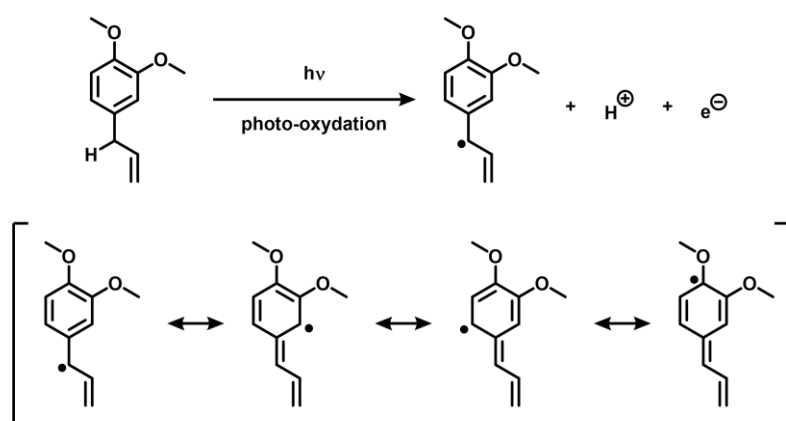


Figure 66 : Possible photo-oxidation du méthyleugénol et ses formes de résonances

Enfin les molécules synthétisées contenant une substitution au ¹³C (Chapitre 1) ont également été testées en solution afin d'élucider si les positions substituées sont impliquées

dans la formation d'espèces radicalaires carbonées identifiées. En effet, la présence potentielle d'un ^{13}C dans le voisinage de la sonde paramagnétique de l'adduit de spin entraînerait un dédoublement du signal RPE et permettrait la mise en évidence de la position radicalaire réactive. Les résultats ne montrent pas de nouvelle constante de couplage due à la présence d'un ^{13}C au sein du spin adduit, que l'initiation radicalaire soit faite par le système enzymatique (Figure 67) ou par irradiation (Figure 68). Ainsi, dans le cas des études en solution, ces positions ne semblent pas être celles impliquées dans ces réactions radicalaires.

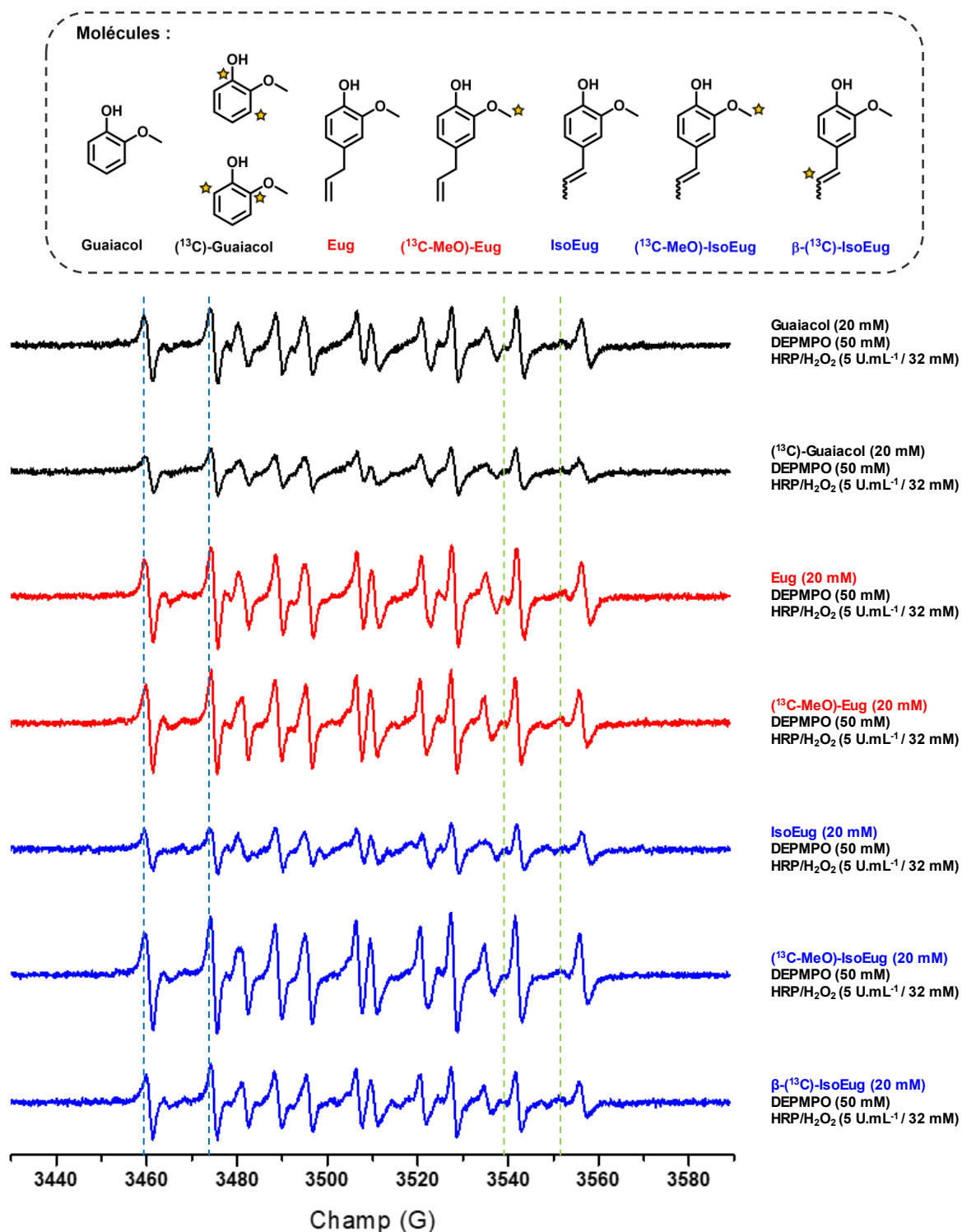


Figure 67 : Spectres de RPE combinés au *spin trapping* en solution du Guaiacol, de l'**Eug** et de l'**IsoEug** commerciaux comparés à leurs analogues substitués au ¹³C avec une initiation radicalaire *via* le système enzymatique HRP/H₂O₂. À noter que le (¹³C)-Guaiacol correspond au mélange 2,6-(¹³C)-Guaiacol et 1,3-(¹³C)-Guaiacol dont la synthèse est décrite Chapitre 1. Les étoiles jaunes des structures moléculaires représentent les ¹³C

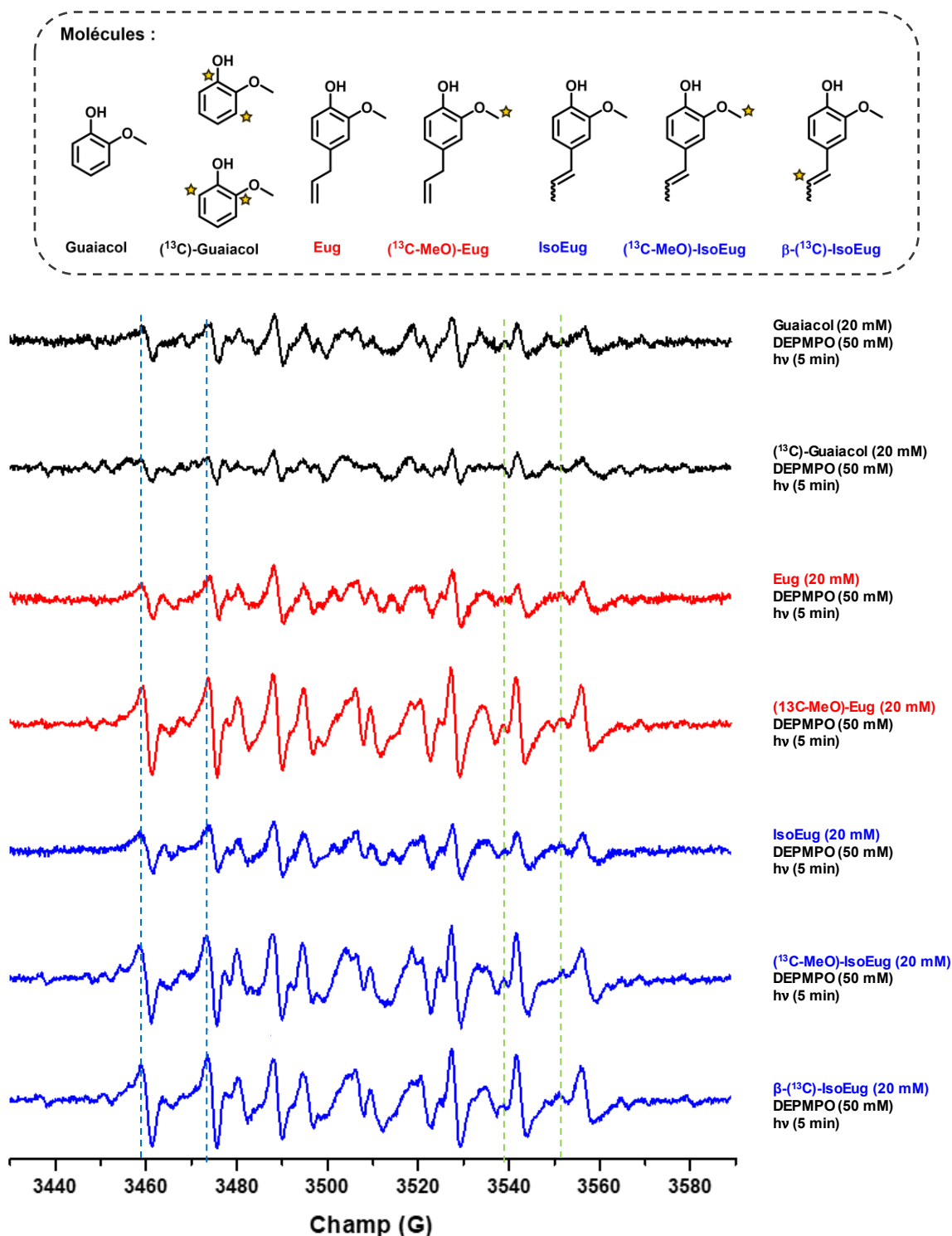


Figure 68 : Spectres de RPE combinés au *spin trapping* en solution du Guaiacol, de l'**Eug** et de l'**IsoEug** commerciaux comparés à leurs analogues substitués au ¹³C avec une initiation radicalaire via la photo-exposition des échantillons (5 min). À noter que le (¹³C)-Guaiacol correspond au mélange 2,6-(¹³C)-Guaiacol et 1,3-(¹³C)-Guaiacol dont la synthèse est décrite Chapitre 1. Les étoiles jaunes des structures moléculaires représentent les ¹³C

2.2. Étude de RPE couplée au spin trapping dans des RHE

Suite aux études en solution, les mêmes investigations ont été réalisées au sein de matrices 3D plus complexes : des épidermes humains reconstitués (RHE). L'intérêt de ces travaux est de mettre en évidence la formation d'intermédiaires radicalaires réactifs induits par l'exposition cutanée à un substrat sensibilisant (*i.e.*, **Eug** et **IsoEug**). L'utilisation des RHE est une méthode alternative aux tests sur les animaux permettant de mimer un scénario d'exposition réelle de la peau à ces substrats.^{80,109}

2.2.1. Les RHE : des matrices de cultures cellulaires mimant la peau

Ces études ont été effectuées sur les modèles 3D de RHE fournis par Cell Alternativ[®] (France). Les RHE utilisés « AlternaSkin[™] » sont reconstruits à partir d'une culture monocouche de kératinocytes et de fibroblastes (L929, SIRC), par utilisation d'un sérum d'origine végétale permettant la croissance de la matrice.¹⁴⁹ Les kératinocytes utilisés sont des kératinocytes épidermiques humains normaux (NHEK, cellules primaires de prépuces) cultivés sur une membrane en polycarbonate inerte de 0,6 cm² et à l'interface air-liquide permettant la différenciation des cellules et la reconstruction d'un épiderme. Leur construction est ainsi adaptée de la méthode de Poumay *et al.* publiée en 2004.¹⁵⁰ Le modèle ainsi obtenu présente la même structure et une composition physiologique au plus proche de l'épiderme humain offrant ainsi une coupe histologique comparable (Figure 69).

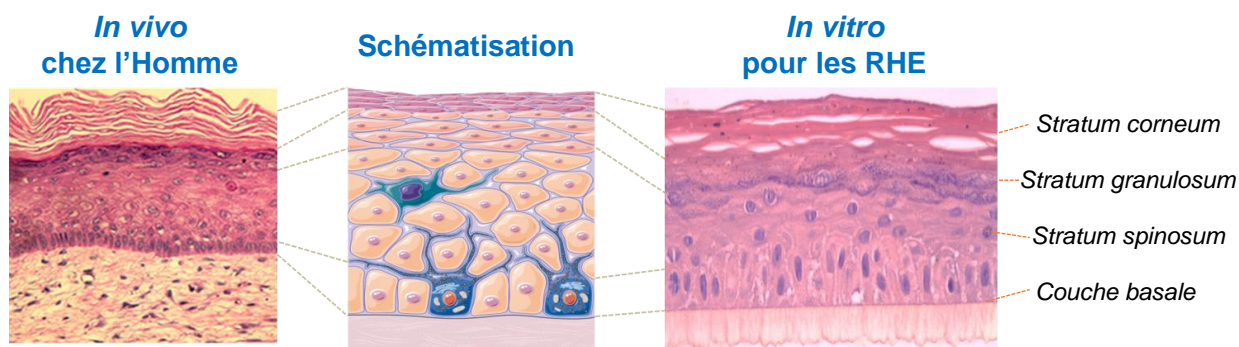


Figure 69 : Comparaison des coupes histologiques entre la peau humaine (gauche) et les RHE AlternaSkin[™] (droite) au travers de la schématisation de leurs couches cellulaires (figure modifiée venant de cellalternativ.fr)

Outre les coupes histologiques, la conformité de ces RHE est évaluée par un test de viabilité cellulaire au bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (MTT). Le dosage des marqueurs de l'inflammation ou encore de la perméation cutanée notamment par un test de résistance électrique transépithéliale (TEER) sont également réalisés.

2.2.2. Étude de RPE-spin trapping

Méthodologie expérimentale

La procédure générale des tests effectués au sein des RHE a été développée au sein du laboratoire de Dermatochimie en collaboration avec le laboratoire POMAM (Institut de Chimie de Strasbourg, UMR 7177).^{80,151,152} Celle-ci a été adaptée dans notre cas avec des épidermes différents, étant passé de Episkin® à Cell Alternativ® comme fournisseur pour des raisons de prix, de logistique et de nouvelles potentielles collaborations entre les laboratoires. Dans un premier temps, dès leur réception, les RHE maintenus dans un gel d'agarose pour le transport sont replacés dans un milieu de culture à 37 °C riche en nutriments dans une plaque de 12 puits (1,5 mL par puit sous une hotte à flux laminaire en milieu stérile). Les RHE sont ensuite maintenus dans un incubateur saturé en humidité à 37 °C sous une atmosphère à 5% en CO₂ pendant 24 h. Sur trois jours où ces RHE sont utilisables le milieu de culture doit être remplacé toutes les 24 à 48 h. Ce milieu peut tenir jusqu'à 72 h si un volume de 2,5 mL est appliqué. Il est important d'éviter la formation de bulles d'air dans le milieu de maintenance, ainsi qu'à ne pas « noyer » le RHE dans ce milieu. La nutrition des RHE ne doit se faire que par en dessous, par voie systémique au travers de la membrane en polycarbonate.

Pour l'étude RPE, le RHE est retiré du milieu de culture et est tout d'abord déposé, dans son insert, dans une solution aqueuse de Dispase II à une concentration de 2,4 U.mL⁻¹ pendant 5 minutes. Les cellules que composent le RHE étant adhérentes, cette procédure permet de pouvoir décoller l'épiderme de sa membrane en polycarbonate et donc son extraction de l'insert. Ensuite, le RHE toujours dans son insert est déposé dans 1,5 mL de tampon HEPES (servant comme milieu d'« essai »), pour ajouter le **DEPMPO** par voie topique (30 µL à 400 mM pour une dose/surface de 20 µmol.cm⁻²), qui est ensuite incubé à 37 °C et dans une atmosphère saturée en humidité avec 5% de CO₂ afin de permettre une diffusion homogène du ST au sein du RHE. Le ST étant déjà sur place, ceci permet de piéger rapidement un radical qui se forme dans le RHE. Passé ce temps d'incubation (ca. 15 min), le substrat testé est appliqué de façon topique afin de mimer une exposition d'un individu. Ainsi, 30 µL d'une solution de substrat sensibilisant dans de l'acétone sont appliqués de manière homogène sur le RHE dans une concentration s'approchant des concentrations utilisées lors des tests épicutanés d'un patient (patch test, cf Introduction générale). Dans le cas de l'**Eug** et de l'**IsoEug** cette concentration est de 100 mM afin d'obtenir une dose/surface de 5 µmol.cm⁻² (équivalent à un patch test à 2% dans le pétrolatum).¹⁵³ Après 30 sec, le temps d'évaporation de l'acétone appliquée, le RHE est décollé de son support puis est posé sur une cellule plate

en quartz (Wilmad®, #WG-806-Q), qui après fermeture est placée dans la cavité du spectromètre afin d'obtenir la signature paramagnétique de l'échantillon (Figure 70).

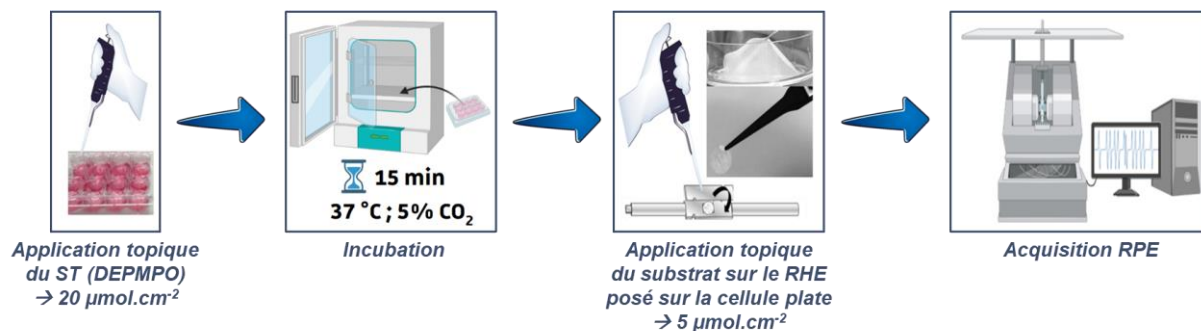


Figure 70 : Schéma de la procédure générale classique permettant les tests de RPE-*spin trapping* dans les RHE

Cette procédure développée préalablement au laboratoire pour les hydroperoxydes sensibilisants dérivés de l'autoxydation de terpènes allyliques n'utilise pas d'initiateur radicalaire externe supplémentaire^{80,109} : la peau seule étant à même d'induire la réactivité nécessaire à une sensibilisation cutanée (*i.e.*, donneurs d'électrons, ions métalliques, acides aminés, enzymes...).

Résultats et discussion

En préambule des études de *spin trapping* sur les RHE en présence d'**Eug** et **IsoEug**, une série d'expériences contrôle a été réalisée permettant de confirmer l'absence de signal même parasite après l'application du ST ou du substrat seuls (Figure 71). Aucun signal de spin-adduit n'a été détecté lors de ces expérimentations préliminaires dans les RHE. Il en a été de même lorsque les paramètres expérimentaux clés ont été modifiés (*i.e.*, changer le véhicule (solvant) du substrat, les temps d'incubations ou la concentration du substrat appliqué).

Néanmoins et *a contrario* des études précédentes faites au laboratoire sur les hydroperoxydes de terpènes allyliques, aucune signature RPE n'a été détecté dans nos conditions expérimentales en présence d'**Eug** et **IsoEug** (Figure 71).

L'absence de signal pour ces premières études témoigne de l'absence d'une initiation radicalaire efficace dans ces conditions. L'**Eug** et l'**IsoEug** ont été décrits en tant que pro-haptènes.^{53,154} Ces derniers ont besoin d'une action métabolique leur conférant la réactivité nécessaire vis-à-vis des protéines cutanées. La question s'est donc posée de savoir si le métabolisme d'un RHE en l'état était à même d'initier l'oxydation de ces dérivés phénoliques. D'autant plus que ces molécules requièrent une activation préalable (la génération du radical PhO[•]) conduisant à leur activité antioxydante. D'autre part, les pré-haptènes sont des composés nécessitant une activation extérieure pour devenir réactifs tels que la lumière, l'autoxydation à l'air *etc.*... Ainsi, nous nous sommes interrogés sur la nécessité d'appliquer un

stimulus extérieur à ces molécules au sein des RHE (e.g., l'implication d'une enzyme, une exposition solaire,...). Pour ce faire, nous avons cherché à favoriser l'action de ces dérivés comme antioxydants au sein des RHE : (i) en dopant le métabolisme des RHE pour permettre aux molécules de montrer une action comme pro-haptène, ou (ii) en exposant les RHE à une illumination solaire après application des substrats d'études permettant de caractériser une action de type pré-haptène provoquée par la lumière.

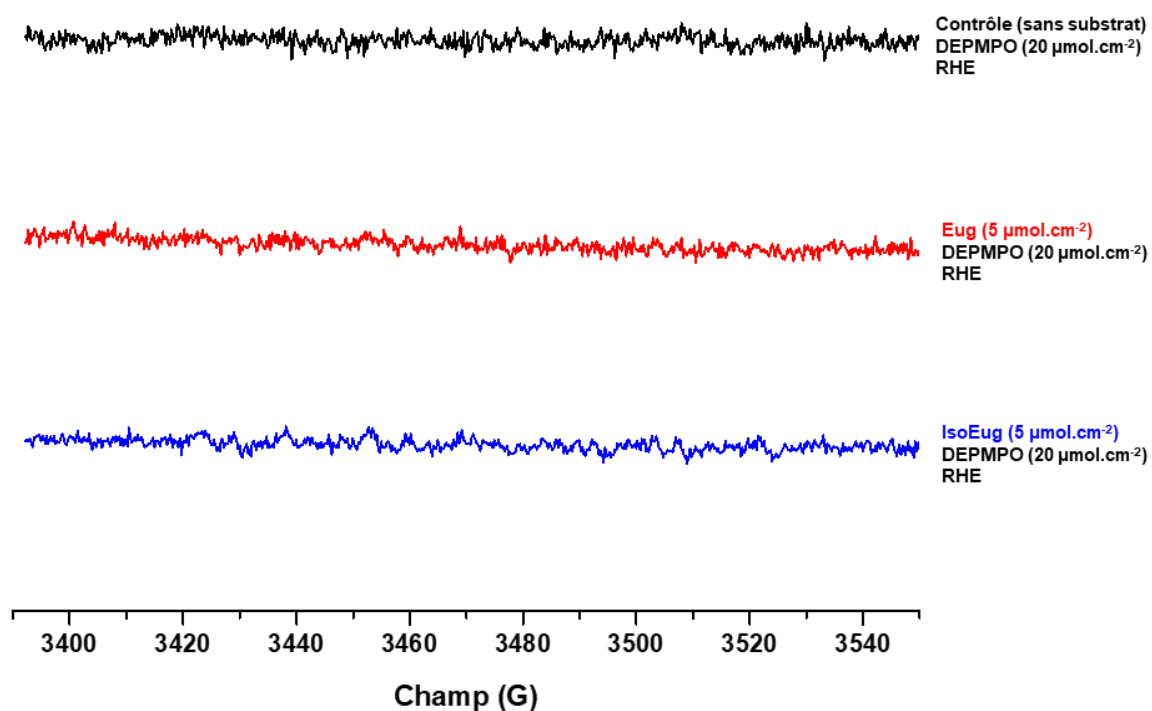


Figure 71 : Spectres RPE préliminaires dans les RHE exposés à l'**Eug** et à l'**IsoEug** en présence de **DEPMPO**

2.2.3. Étude de RPE-spin trapping dans les RHE dopés

Méthodologie expérimentale pour le dopage métabolique des RHE avec de la HRP

L'absence de détection de spin-adduits par RPE au sein des RHE par application seule de l'**Eug** et de l'**IsoEug** laisse penser que le modèle épidermique utilisé pour ces premières études ne serait pas métaboliquement complet. Ces épidermes peuvent ne pas avoir un environnement suffisamment oxydant pour que l'**Eug** et l'**IsoEug** puissent exercer leur rôle antioxydant. Ces modèles d'épidermes reconstruits *per se* peuvent être dépourvus de certaines protéines et/ou enzymes nécessaires au mimétisme du métabolisme *in vivo*. Dans le cas où l'**Eug** et l'**IsoEug** agiraient comme des pro-haptènes, une activation métabolique serait nécessaire afin d'induire une réactivité sensibilisante potentiellement radicalaire.

Dans cette optique et après discussion avec CellAlternativ® nous avons choisi de « doper » enzymatiquement le modèle AlternaSkin™ afin d'obtenir un système plus abouti et proche de

ce qui peut se présenter *in vivo*. Dans cette approche, il a été montré par Walzer et Frenk que les peroxydases endogènes sont impliquées dans de nombreuses pathologies cutanées.¹⁵⁵ L'activité de ces peroxydases a été démontrée dans la peau par les cellules de Langherans (*i.e.*, cellules dendritiques) ou encore des kératinocytes épidermiques humains suprabasaux, notamment dans le *stratum spinosum* et *granulosum*. Parmi les pathologies cutanées identifiées comme impliquant ces peroxydases venant des cellules de Langherans, il est possible de citer notamment la kératose actinique et le psoriasis, et celles engageant les peroxydases provenant des cellules de Langherans et/ou des kératinocytes sont notamment l'ichtyose vulgaire, la kératose séborrhéique, ou même encore directement la dermatite allergique de contact, soit l'ADC.¹⁵⁶

Afin donc d'identifier une potentielle implication des peroxydases dans la peau pour induire une réponse radicalaire de l'**Eug** et de l'**IsoEug**, nous avons incorporé de la HRP par voie systémique au sein des RHE utilisés. Pour ce faire, 48 à 72 heures avant l'utilisation de ces RHE, de la HRP (30 U.mL⁻¹) a été ajoutée au milieu de culture (2,5 mL) et incubé (37 °C, 5% de CO₂, saturé en humidité) jusqu'à utilisation (Figure 72).

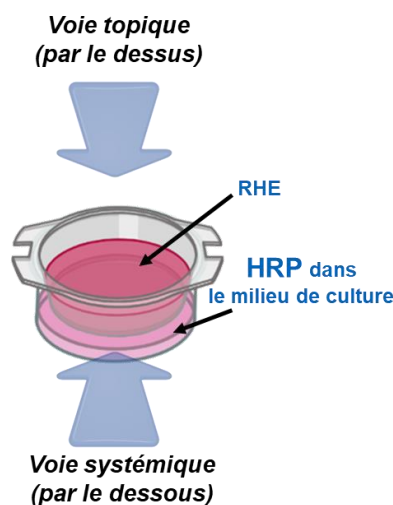


Figure 72 : Schématisation de l'incorporation de la HRP dans les RHE par voie systémique

Le RHE a ensuite été traité comme décrit précédemment. Néanmoins, la question de la fiabilité/viabilité de notre modèle s'est posée en préambule. Pour y répondre, des analyses de conformité ont été effectuées en collaboration directe avec le laboratoire de Cell Alternativ[®], en suivant *a posteriori* la procédure d'incorporation de HRP et en comparaison directe avec un RHE vierge. Un test de viabilité cellulaire par MTT a été effectué, celle-ci étant directement corrélée avec le potentiel irritant des composés chimiques.¹⁵⁷ La viabilité cellulaire est mesurée lors de l'action de la déshydrogénase succinique mitochondriale sur le MTT pour former un sel formazan bleu, mesuré quantitativement après son extraction des tissus. Un dosage de la densité optique de la solution colorée est mesuré par spectrophotométrie à 570 nm à l'aide

d'un lecteur de microplaques Molecular Devices VMAX et les valeurs d'absorbance sont enregistrées via le logiciel SOFTmax PRO v4.7.1. Ce simple dosage permet de connaître la quantité relative de cellules vivantes et métaboliquement actives. L'analyse statistique est réalisée à l'aide du logiciel Graph Pad Prism v5.03. Une réduction de 50% de la viabilité cellulaire étant synonyme d'irritation, les tests ont confirmé que la viabilité cellulaire n'est pas impactée par l'incubation de la HRP (Tableau 6). En effet, la viabilité cellulaire après 48 h et 72 h de contact avec la HRP à 30 U.mL⁻¹ dans le milieu basal a été augmentée de 4,2% et 0,5% respectivement. Ces résultats montrent que non-seulement l'incorporation de la HRP n'est pas irritante mais en plus elle n'abaisse en rien la viabilité du modèle.

Tableau 6 : Résultats des tests de viabilité cellulaire des RHE traités avec de la HRP de 48 à 72 h comparés à un RHE non-traité

Temps d'incubation avec la HRP	Description de l'échantillon	Viabilité en % par rapport au contrôle
48 h	Contrôle non-traité	100
	RHE traité	104,2
72 h	Contrôle non-traité	100
	RHE traité	100,5

Dans un second temps, une mesure TEER a été effectuée sur les RHE dopés. La TEER est une méthode permettant de mesurer l'impédance (en Ohm) de la barrière cutanée. Ceci permet notamment d'avoir des informations sur la perméabilité et l'étanchéité de la peau *via*, entre autres, ses jonctions serrées. Les mesures sont effectuées dans du PBS (Phosphate Buffer Saline) sans Mg²⁺ et Ca²⁺ grâce à un multimètre volt-ohm Merck Millipore, avant les traitements, puis après 48 ou 72 h suite à l'exposition à la protéine HRP à 30 U.mL⁻¹ dans le milieu basal. Une hausse de TEER a été observée pour chacune des conditions et pour les deux temps d'exposition (Tableau 7). Une analyse statistique (triplicata) a été réalisée afin de déterminer la signification de la réduction ou l'augmentation de la viabilité des cellules traitées avec chacun des échantillons par comparaison aux références, non traitées. D'après l'analyse test, aucune différence significative n'a cependant été constatée entre les mesures de TEER du témoin non traité et les mesures de TEER des épidermes traités avec la HRP à 30 U.mL⁻¹ dans le milieu à 48 h ou 72 h, restant largement dans les critères d'acceptabilité du modèle.

Tableau 7 : Moyenne des résultats (triplicata) des mesures de TEER des RHE traités avec de la HRP de 48 à 72 h comparé à un RHE non-traité comme référence

Temps d'incubation avec la HRP	Description de l'échantillon	TEER (Ohm) avant exposition à la HRP (t0)	TEER (Ohm) après exposition à la HRP (t48 ou t72)
48 h	Contrôle non-traité	4,61	5,73
	RHE traité	4,50	6,72
72 h	Contrôle non-traité	4,54	4,84
	RHE traité	4,68	5,35

Enfin, des coupes histologiques des modèles traités avec de la HRP ont été réalisées et comparées à celles des RHE non-traités. Pour ce faire, les RHE AlternaSkin™ ont été fixés dans du formaldéhyde à 10%, déshydratés par des bains successifs de différents solvants, puis enrobés en paraffine. Ensuite, des coupes de 3 à 4 µm d'épaisseur ont été réalisées au microtome. Ces coupes ont ensuite été colorées dans des bains d'hématoxyline-éosine-safran. Cette coloration associe l'hémalum qui colore les noyaux en violet, l'éosine les cytoplasmes en rose et le safran les fibres de collagène en jaune, afin d'apprécier le profil histologique des tissus (Figure 73).

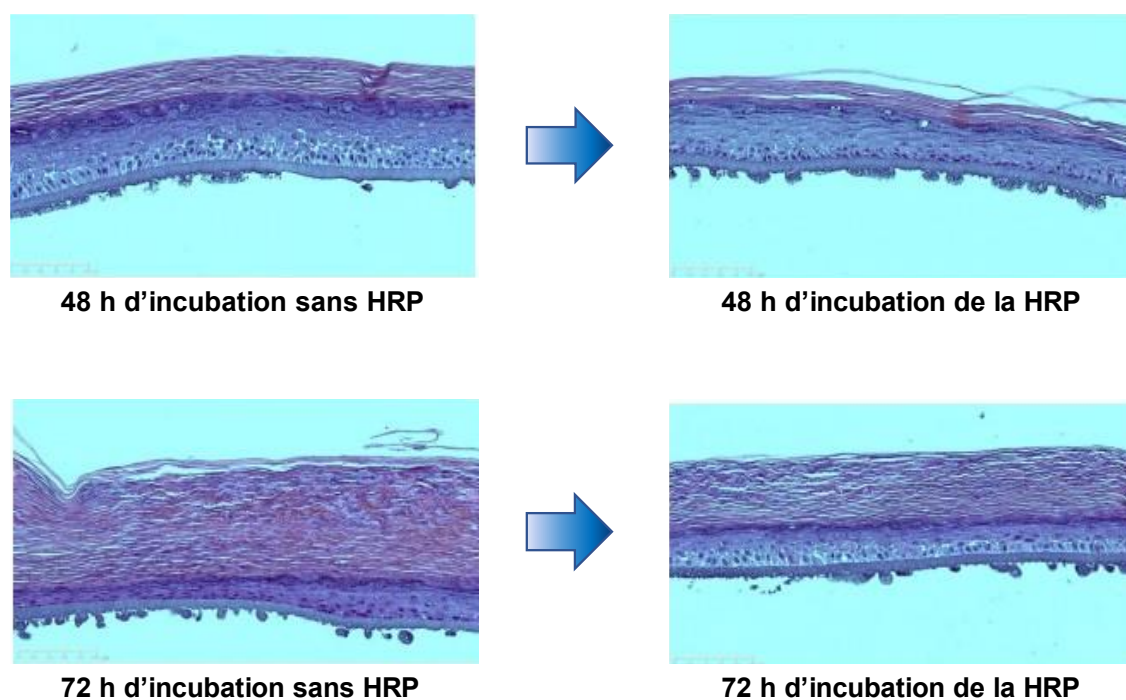


Figure 73 : Coupes histologiques des RHE après 48 h et 72 h d'incubation avec de la HRP dans le milieu de culture et RHE contrôles

Ce travail a été effectué par un prestataire extérieur au laboratoire Cell Alternativ® (Laboratoire Atlantic Bone Screen®). Il a été constaté que le *stratum corneum* des RHE traités et non traités n'avait pas la morphologie habituelle. Celui-ci est apparu épaissi, fractionné et endommagé (Figure 73). Ceci est attribué à la mesure TEER et l'application de PBS avant et après traitement pouvant endommager la surface des épidermes. Néanmoins, les RHE traités et non-traités semblent avoir subi les mêmes déstructurations du *stratum corneum*, laissant les autres couches épidermiques intactes et laissant supposer que l'épiderme reste histologiquement conforme bien que ces coupes nécessitent d'être reproduites sans mesure de TEER préalable.

Résultats et discussion

Suite à l'incorporation de la HRP au sein du modèle de RHE, les expériences de RPE-*spin trapping* avec l'application topique de l'**Eug** et de l'**IsoEug** dans des concentrations similaires à celles utilisées lors des patch tests ont pu être entreprises. Il est à noter que les modèles RHE ont été complétés par ajout seul de HRP mais sans peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) classiquement utilisé pour l'activation de l'enzyme.

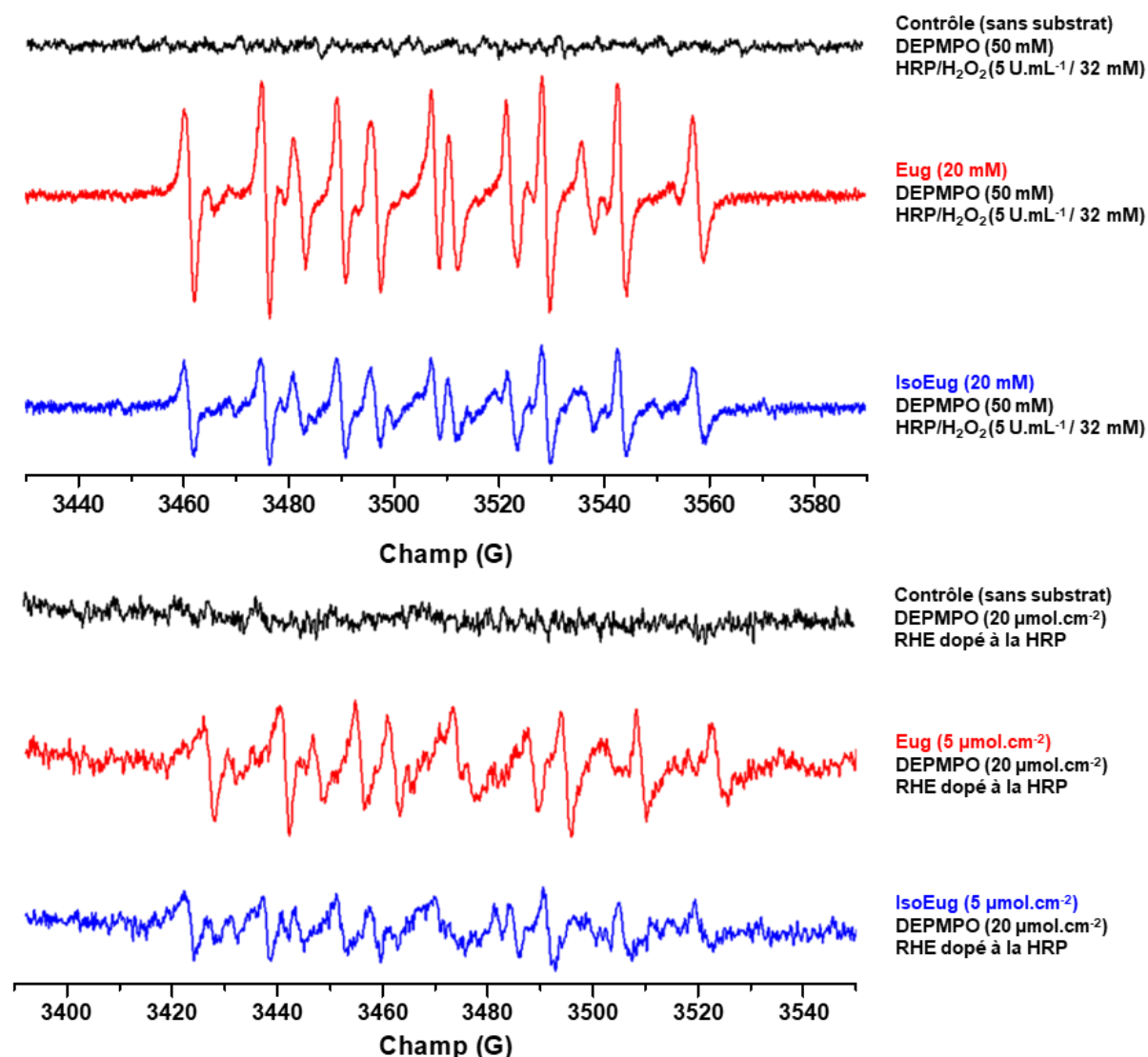


Figure 74 : Comparaison des spectres RPE-*spin trapping* en solution en présence HRP/H₂O₂ (haut) et dans des RHE dopés à la HRP (bas) de l'**Eug** et de l'**IsoEug**.

Les études de piégeage de spin menées sur ces RHE ont permis la détection de spin-adduits, preuve de la formation d'intermédiaires radicalaires (Figure 74). La présence de HRP semble nécessaire et suffisante pour initier l'oxydation de l'**Eug** et de l'**IsoEug**. Cela étant, le S/N obtenu dans des conditions expérimentales comparables est bien plus faible dans les RHE : par nature, la complexité de la matrice épidermique offre de nombreuses voies de

réduction des spin-adduits comme de neutralisation des intermédiaires radicalaires. Néanmoins, plusieurs signatures de spin-adduits ont pu être détectées et caractérisées dans les RHE traités avec de la HRP pointant vers les deux intermédiaires radicalaires identifiés en solution en présence du couple HRP/H₂O₂ : (i) un adduit caractéristique d'un radical carboné avec $a_H = 21,1$ G, $a_N = 14,5$ G, $a_P = 46,8$ G et un autre compatible avec un radical oxygéné de type peroxyde où $a_H = 10,9$ G, $a_N = 13,7$ G, $a_P = 50,2$ G (Figure 74).

Ces résultats mettent en évidence l'importance de l'action enzymatique des peroxydases au sein des RHE nécessaire à la génération d'espèces radicalaires au sein de l'épiderme. Une nature de pro-haptène peut alors prendre tout son sens pour l'**Eug** et l'**IsoEug**. Par ailleurs, l'absence d'utilisation d'H₂O₂ pour initier ce système indique que la seule action métabolique intrinsèque, outre l'enzyme incorporée, est nécessaire à l'activation de l'**Eug** et de l'**IsoEug**. En effet, les expériences de contrôles en solution avaient montré que si l'H₂O₂ n'était pas introduit dans le milieu réactionnel contenant les dérivés phénoliques en présence de HRP et de **DEPMPO**, aucune signature paramagnétique n'était observée.

En parallèle, sur ces RHE dopés, les mêmes études ont été réalisées en utilisant le guaiacol, le vératrol, le méthyleugénol et le méthylisoeugénol en comparaison directe avec les expérimentations faites en solution. A ce stade, aucune des études menées dans ces conditions avec ces molécules n'ont permis la mise en évidence de radicaux. Si ce résultat est attendu pour les molécules dont l'hydroxyle phénolique est méthylé, empêchant la formation d'un radical PhO[•], il est plus surprenant pour ce qui est du guaiacol qui présentait en solution une signature RPE similaire à l'**Eug** et l'**IsoEug** avec le système HRP/H₂O₂.

Pour finir avec les expériences sur les RHE dopés, les molécules d'**Eug**, d'**IsoEug** ou de guaiacol synthétisées en contenant des substitutions isotopiques dans des positions spécifiques (*i.e.*, **(¹³C-MeO)-Eug**, **(¹³C-MeO)-IsoEug**, **β-(¹³C)-IsoEug** et **o-(¹³C)₂-guaiacol**) ont également été testées. Le guaiacol contenant les substitutions isotopiques n'a pas montré de signal à l'instar de son analogue non-substitué commercial. Aussi, de la même manière que dans les tests en solution avec l'HRP/H₂O₂ aucun spin-adduit issu d'un radical centré sur un ¹³C n'a été observé, indiquant que ces positions ne sont pas celles qui ont été réactives pour être piégées par le **DEPMPO**. L'absence de signal dans le cas du guaiacol substitué était prévisible, n'ayant pas pu identifier de signal de RPE avec le guaiacol commercial. On peut rappeler ici que les études en solution ont montré un signal similaire pour le guaiacol, l'**Eug** et l'**IsoEug** contenant ou non une substitution au ¹³C, suggérant une réactivité similaire impliquant le motif *ortho*-méthoxyphénol (Chapitre 2, Figure 67 et Figure 68). Cependant, ceci n'a pas été observé dans les RHE pour ces molécules.

2.2.4. Étude de RPE-spin trapping dans les RHE sous irradiation

Méthodologie expérimentale pour l'exposition solaire des RHE

L'exposition solaire, est connue pour être largement impliquée dans différentes pathologies cutanées.¹⁵⁸ Dans le cas de l'ADC, la PADC est un cas de plus en plus récurrent dû à l'utilisation de filtres solaires sensibilisants de substances photo-actives (*cf.* Chapitre 3). Il a été montré qu'une telle exposition puisse amorcer des dermatites allergiques ou tout du moins l'accentuer dans le cas des réactions d'hypersensibilité telle que l'ADC, notamment dans le cas de l'**Eug**.^{159,160} Ceci est particulièrement le cas lorsque la molécule sensibilisante est un pré-haptène, où une transformation externe non-métabolique est nécessaire pour initier une réponse immunitaire. Du fait de l'absence de signal RPE lors des études de piégeage de spin avec les RHE non-dopés métaboliquement, nous nous sommes intéressés au cas d'une exposition de l'épiderme au soleil en présence d'**Eug** et **IsoEug**.

Les expériences menées sont, en tout point, semblables à l'approche classique décrite précédemment (*i.e.*, non-dopés), mais comprenant une étape d'irradiation du RHE au sein de la cellule plate avant l'acquisition RPE (Figure 75). Dans cette optique, le soleil devrait pouvoir jouer le rôle d'initiateur radicalaire tel qu'il a été mis en évidence dans les études en solution.

Il est à noter qu'afin d'être certains que les radicaux se forment au sein même de l'épiderme et non en surface, les RHE sont lavés après incubation du ST avec du tampon HEPES avant d'appliquer la molécule d'études. Ceci permet de minimiser, voire d'exclure, les réactions en

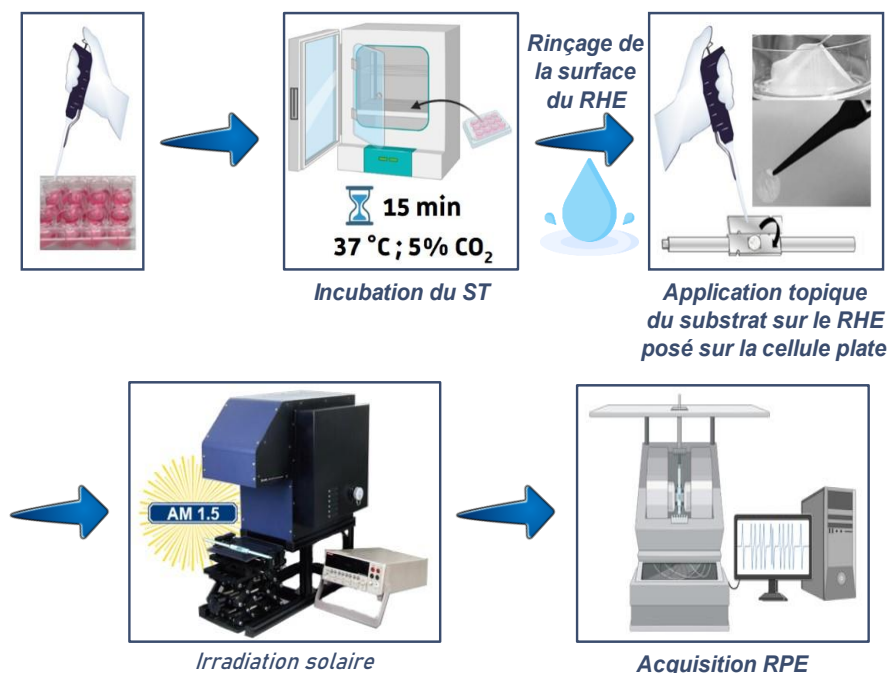


Figure 75 : Schéma de l'approche expérimentale de l'étude RPE-spin trapping dans les RHE en présence des molécules cibles et sous illumination par le simulateur solaire

solution et en surface hors de la matrice épidermique afin de considérer uniquement les réactions se produisant au sein du RHE.

Résultats et discussion

Dans un premier temps les tests ont été réalisés en utilisant de l'**Eug** et de l'**IsoEug** à des concentrations similaires à celles des tests épicutanés ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$). Ces expériences ont permis d'observer, pour la première fois, des radicaux issus de molécules sensibilisantes dans des RHE photo-exposés. En effet, des signatures spectrales similaires à celle observées en solution pour l'**Eug** et l'**IsoEug** exposés au simulateur solaire ont été observées (Figure 76). Après déconvolution de la signature spectrale ainsi obtenue, deux adduits de spin ont été identifiés. Le premier est caractéristique d'un radical centré sur le carbone, de *hfccs* spécifiques $a_{\text{H}} = 21,1 \text{ G}$, $a_{\text{N}} = 14,5 \text{ G}$ et $a_{\text{P}} = 46,8 \text{ G}$. Le second est compatible avec un radical centré sur l'oxygène de type peroxy où $a_{\text{H}} = 10,9 \text{ G}$, $a_{\text{N}} = 13,7 \text{ G}$ et $a_{\text{P}} = 50,2 \text{ G}$. Si ces résultats témoignent d'un caractère possible de pré-haptène de l'**Eug** et de l'**IsoEug**, ils tendent à suggérer un potentiel de sensibilisation cutanée exacerbé par une exposition conjointe au soleil.

L'expérience a été menée également avec le guaiacol afin d'identifier si ce composé commun aux deux mono-alkoxyphénols cibles en est l'origine (Figure 76). Elle montre une signature RPE similaire à celle induite par l'**Eug** et l'**IsoEug**, confortant l'hypothèse émise selon laquelle un radical carboné ($a_{\text{H}} = 21,1 \text{ G}$, $a_{\text{N}} = 14,5 \text{ G}$ et $a_{\text{P}} = 46,8 \text{ G}$) semble issu du noyau aromatique. Ces conditions ont permis d'observer des spin-adduits dans les RHE à partir du guaiacol contrairement à ce qui avait été observé dans les RHE dopés à la HRP.

Après avoir démontré la formation de radicaux au sein des RHE exposés conjointement aux molécules cibles et au « soleil », des études similaires ont été effectuées avec les composés analogues de l'**Eug** et de l'**IsoEug** substitués au ^{13}C comme décrits précédemment dans ce chapitre. Malgré de nombreuses tentatives aucune nouvelle constante de couplage due à la présence du ^{13}C n'a pu être mise en évidence. Ces positions ne semblent donc pas être celles piégées par le **DEPMPO**, ceci étant en accord avec les analyses effectuées avec des RHE dopés. En conséquence, le carbone en *ortho*- (6-C) reste ici le principal suspect à l'origine de la formation du radical carboné. Néanmoins, le guaiacol substitué au ^{13}C sur cette position ne montre pas non plus cette nouvelle *hfcc*. Bien que cela nous laisse sceptiques quant à la réactivité de cette position, le guaiacol, contrairement à l'**Eug** et l'**IsoEug**, n'a pas de substituant en *para*- (4-C). Ceci étant, les calculs DFT montrent que cette position *para*- possède la plus grande densité électronique en plus de ne pas être un carbone quaternaire, c'est-à-dire la plus à même de réagir. En revanche, le carbone *para*- étant quaternaire pour l'**Eug** et l'**IsoEug**, une réactivité différente n'excluant pas la position *ortho*- comme réactive

peut être envisagée, bien que les *hfccs* obtenues restent très similaires du fait de la proximité structurale de ces molécules.

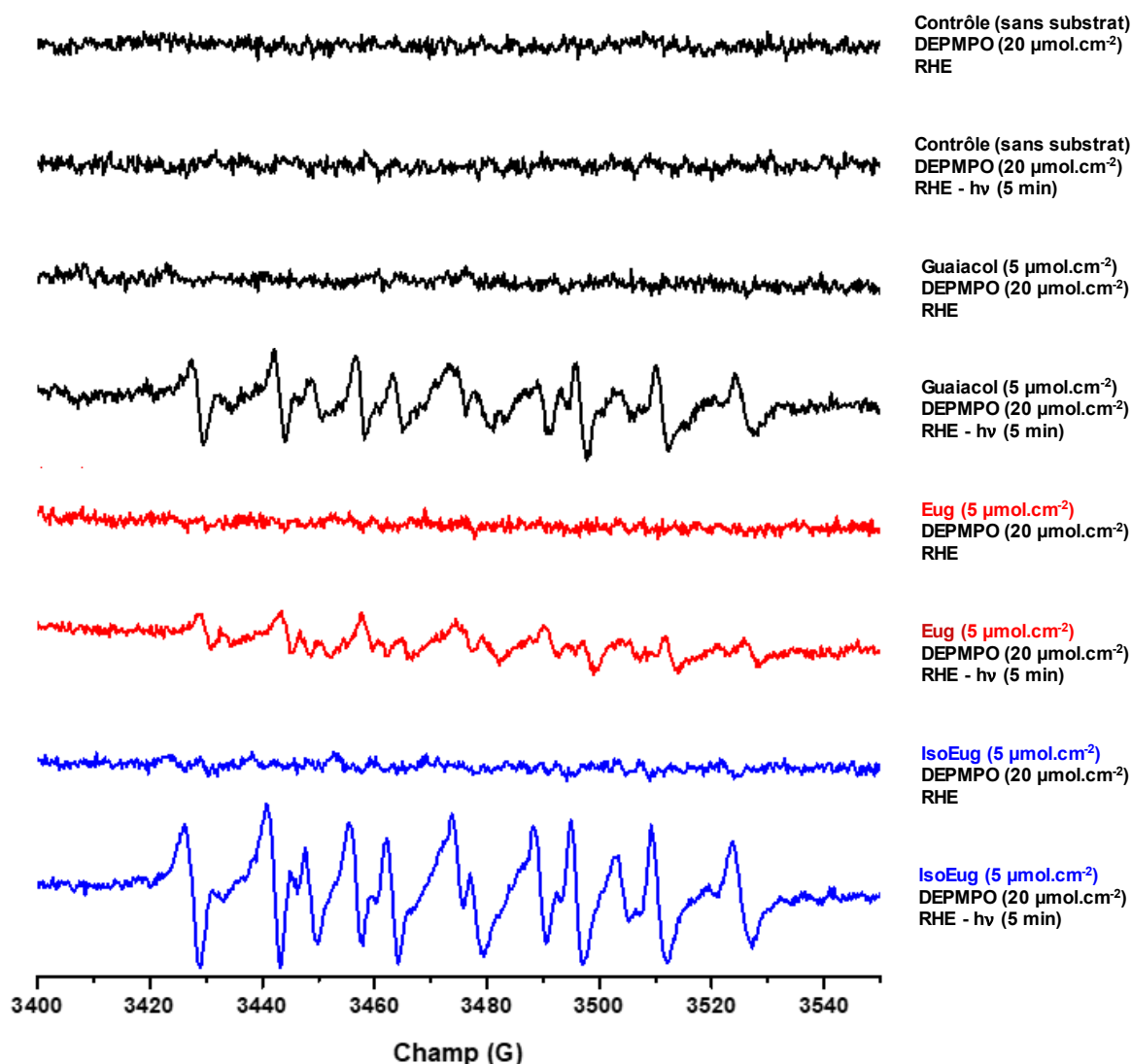


Figure 76 : Comparaison des spectres RPE-*spin trapping* obtenus dans les RHE en présence d'Eug, d'IsoEug et de Guaiacol exposés ou non au simulateur solaire

2.3. Étude de RPE-*spin scavenging* dans des RHE

Si le *spin trapping* permet d'apporter des informations substantielles quant à la nature des différents intermédiaires radicalaires formés au sein des RHE, d'autres approches RPE permettent de sonder la génération de radicaux. L'une d'entre elles, utilisée dans ce travail, est l'approche dite de *spin scavenging*. Elle permet notamment l'obtention d'informations cinétiques sur la génération de ROS et apparaît ici des plus pertinentes : des radicaux centrés sur l'oxygène ayant été mis en évidence lors des études sur les RHE. Aussi, le fait que les

RHE dopés par la HRP n'aient pas besoin de H_2O_2 pour initier la formation de radicaux issus de l'**Eug** et l'**IsoEug** nous conforte dans cette hypothèse.

2.3.1. Méthodologie expérimentale

La procédure demeure relativement semblable à celle du *spin trapping*. Le RHE est retiré du milieu de maintenance et est traité à la Dispase de type II à $2,4 \text{ U.mL}^{-1}$ pendant 5 min. Ce dernier est ensuite déposé dans 1,5 mL de tampon HEPES (10 mM, pH = 6.8), où le SC, **CmP** ou **CxP** ($30 \mu\text{L}$ à $100 \mu\text{M}$) sont appliqués par voie topique. Le RHE est alors incubé 10 min (37°C , 5% de CO_2 , atmosphère saturée en humidité) afin de permettre une distribution et une répartition du SC globale au sein du RHE. Après l'incubation du SC, le substrat est appliqué également de façon topique à une concentration proche de celles utilisées lors des tests épicutanés. Après 5 min d'incubation supplémentaire, l'épiderme est décollé de son support puis déposé sur une cellule plate (Wilma[®], #WG-806-Q) en quartz, scellée et placée dans la cavité du spectromètre RPE (Figure 77). L'expérience de contrôle est ici primordiale : un milieu cellulaire comme la matrice RHE étant réducteur par nature, le SC est soumis à une réduction même en l'absence de molécules cibles. Il convient donc de déconvoluer la perte du signal du SC due à cette bioréduction de celle liée à la génération de ROS induite par l'**Eug** ou l'**IsoEug**.

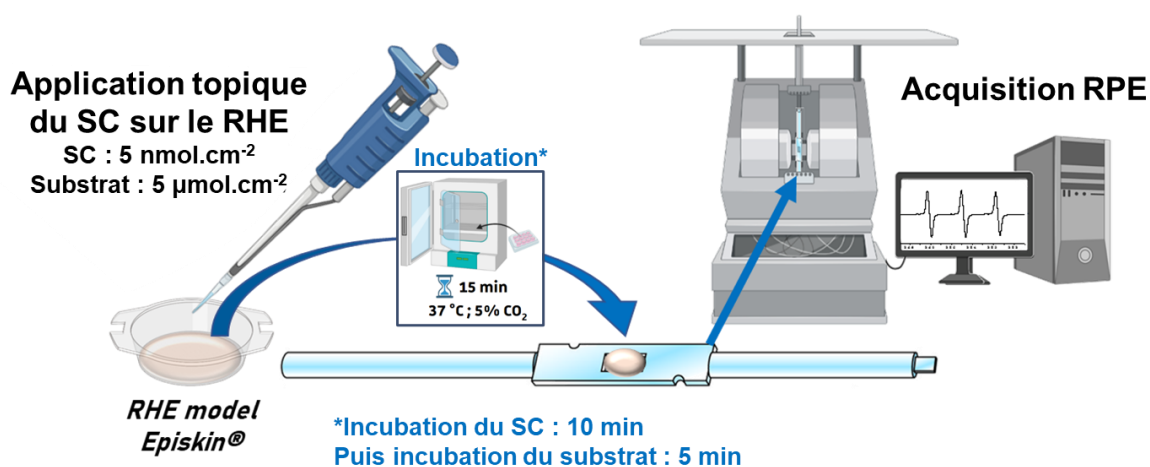


Figure 77 : Schéma illustrant l'approche expérimentale RPE-*spin scavenging* dans les RHE

2.3.2. Résultats et discussion

Le **CxP**, ne pouvant pas par nature pénétrer les cellules de l'épiderme, a montré que l'**IsoEug** est clairement capable de générer des ROS de façon extra-cellulaire. En effet, la cinétique de décroissance de l'intensité RPE du SC (I/I_0) est significativement plus rapide en présence d'**IsoEug** et ceci sans autre action extérieure (Figure 78). Cette activité radicalaire que possède l'**IsoEug** à la différence de l'**Eug**, pourrait par synergie expliquer son potentiel sensibilisant supérieur dans le cadre de l'ADC.

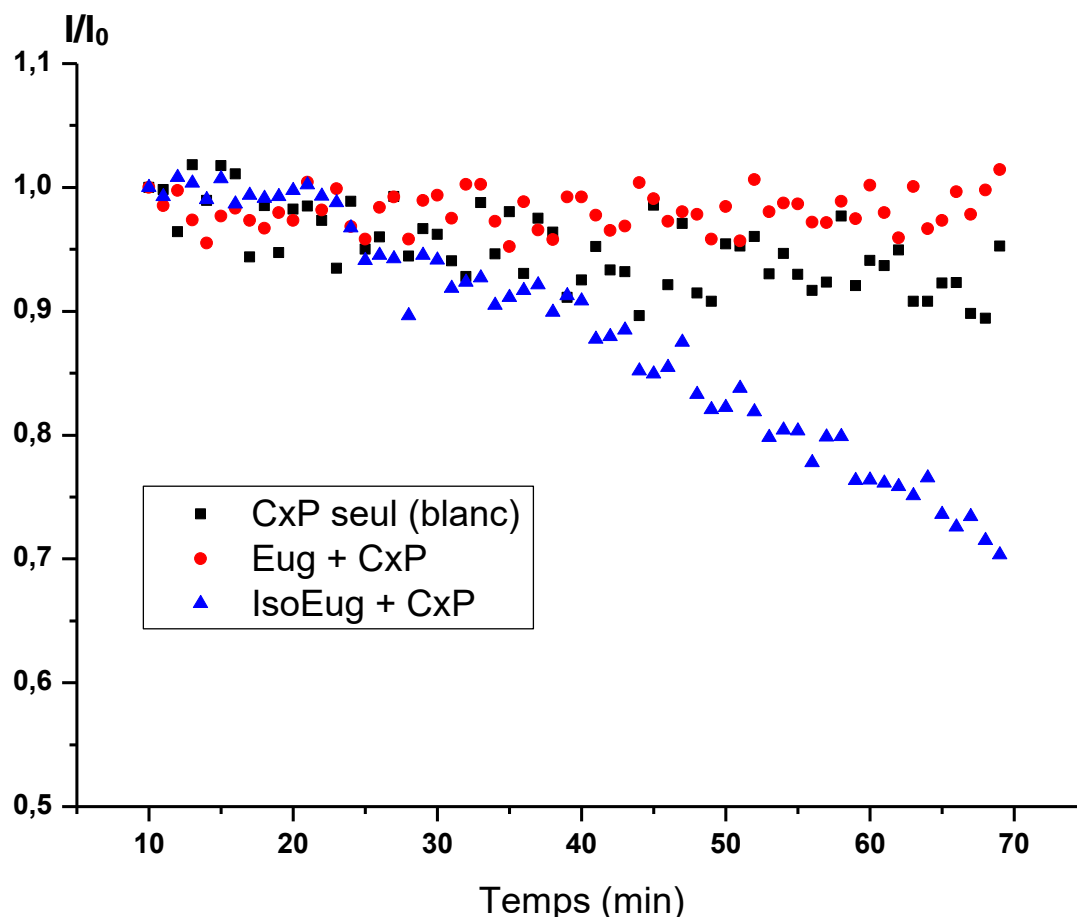


Figure 78 : Suivi temporel de l'intensité RPE relative (I/I_0) du **CxP** au sein de RHE en présence d'**Eug** et d'**IsoEug**

Bien que l'**Eug** semble ne pas présenter cette propriété qu'a son isomère, de générer des ROS au niveau extracellulaire au sein de l'épiderme, une génération intracellulaire ne peut être exclue. Afin d'évaluer cette éventualité, des expériences de *spin scavenging* avec le **CmP**, capable de pénétrer les cellules, ont été tentées à de multiples reprises. Cependant, les résultats obtenus sont non-reproductibles contrairement à ceux du **CxP** et ne permettent donc pas de conclure. Cette approche expérimentale nécessite encore d'être optimisée afin d'approfondir sur la formation des ROS induite par ces composés dans l'épiderme.

3. Réactivité de l'Eug et de l'IsoEug vis-à-vis d'acides aminés

La dernière partie de ce chapitre s'inscrit dans une optique de valorisation des travaux de synthèse menés (Chapitre 1) afin de caractériser la réactivité de l'**Eug** et l'**IsoEug** vis-à-vis d'acides aminés. Pour rappel, les substances allergisantes doivent former des liaisons covalentes avec les acides aminés endogènes pour former le complexe immunogène responsable de la sensibilisation cutanée. Cette étude porte donc sur l'exposition des molécules cibles à des acides aminés. Précédemment, il a été montré par *spin trapping* la

propension de l'**Eug** et l'**IsoEug** à générer des espèces radicalaires en solution et dans les RHE. La question qui se pose maintenant est de savoir si ces radicaux sont réactifs vis-à-vis d'acides-aminés pour mener à l'hapténisation, élément déclencheur du système immunitaire.

3.1. Calculs théoriques de réactivité radicalaire avec un acide aminé

En préambule, afin d'illustrer cette possible hapténisation, des calculs de DFT ont été entrepris afin d'évaluer l'aptitude des molécules cibles à réagir par recombinaison radicalaire avec un acide aminé. Le radical carboné proposé précédemment (*cf.* Chapitre 1, partie 1. Calculs théoriques, p.39) est délocalisé de manière statistique principalement sur les positions 2, 4, 6 de l'**Eug** et de l'**IsoEug**, ainsi que sur la position β pour l'**IsoEug**. Aussi, l'acide aminé utilisé pour les calculs DFT a été la cystéine dû à sa capacité bien connue de former un radical thiyle responsable des nombreux mécanismes radicalaires peptidiques *in vivo* (e.g., le glutathion dans les mécanismes de détoxification ou la formation de ponts disulfure) (Figure 79).

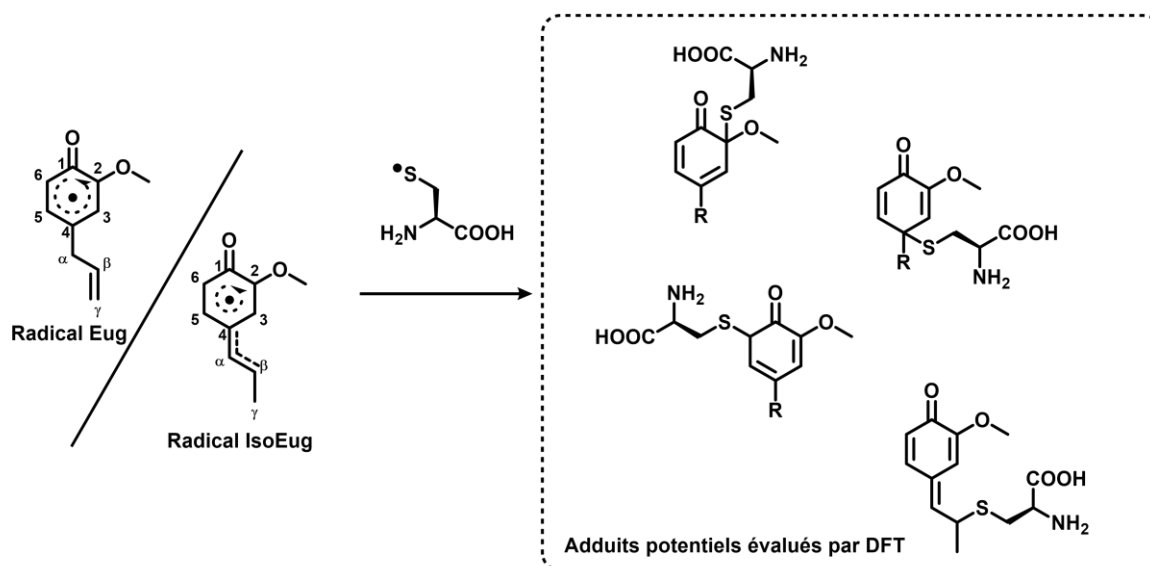


Figure 79 : Formation potentielle d'adduits entre les radicaux carbonés issus de l'**Eug** et de l'**IsoEug** avec la cystéine telle que prédite par DFT

Ces calculs ont été effectués par le Dr. Gourlaouen du Laboratoire de Chimie Quantique (UMR 7177 Institut de Chimie, Université de Strasbourg, France) et les mêmes paramètres que ceux décrits dans le Chapitre 1 ont été utilisés. Les résultats obtenus montrent que le couplage entre les radicaux carbonés issus de l'**Eug** et de l'**IsoEug** et la cystéine est toujours favorable quel que soit la position radicalaire. Cependant, le carbone en *ortho*-6-C (Figure 79) reste la position la plus favorable dans le cas de l'**Eug**, suivie par celle portée par la chaîne propényle β -C de l'**IsoEug** (Tableau 8).

Tableau 8 : Enthalpie libre (ΔG en kcal.mol⁻¹) de la réaction de recombinaison radicalaire entre le radical thiyle de la cystéine et différentes positions radicalaires carbonées de l'**Eug** et de l'**IsoEug** induites par délocalisation du radical PhO[•] préalablement formé

	2-C	4-C	6-C	β-C
Eug	- 16,5	- 15,9	- 10,8	
(Z)-IsoEug	- 19,3	- 11,7	- 9,7	- 22,3
(E)-IsoEug	- 16,9	- 9,3	- 8,6	- 20,6

3.2. Étude de la réactivité radicalaire en solution

Afin d'évaluer si l'hapténisation est possible dans des conditions radicalaires semblables à celles décrites dans ce chapitre (*i.e.*, enzymatique ou photo-induite), des études inspirées par le DPRA et le PPRA ont été initiés. Pour rappel, le DPRA validé par l'OCDE est une méthode d'évaluation *in chemico* du pouvoir sensibilisant d'une espèce associée à la première étape clé de nature chimique définie par l'AOP (*cf.* Introduction générale, Partie 3.4). Celle-ci met en corrélation le potentiel de sensibilisation des composés avec leur réactivité vis-à-vis de protéines en utilisant des peptides synthétiques. Les peptides synthétiques utilisés dans le DPRA présentent un acide aminé réactif de type cystéine ou lysine dans leur séquence permettant de cibler la réactivité de la chaîne latérale de ces acides aminés.¹⁰³ Le PPRA a été développé par la suite pour évaluer des pro-haptènes par une activation enzymatique avec le système HRP/H₂O₂¹⁰⁴

3.2.1. Méthodologie expérimentale

Afin de simplifier l'étude et de valoriser l'insertion d'un isotope (*i.e.*, ¹³C) au sein de l'**Eug** et de l'**IsoEug**, des essais de réactivité avec différents acides aminés ont été menés en solution. Pour ce faire, nous nous sommes inspirés des tests de RPE-*spin trapping* en solution décrites précédemment dans ce chapitre en remplaçant le ST par l'acide aminé choisi. Ainsi, l'**Eug** et l'**IsoEug** ont été mis en solution dans un tampon HEPES (10 mM, pH 6,8) avec l'acide aminé cible puis a été soit irradié avec le simulateur solaire, soit mis en présence du système HRP/H₂O₂ (Figure 80).

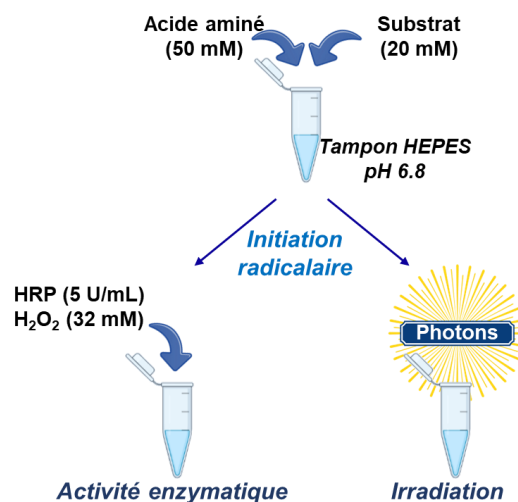


Figure 80 : Procédure générale de préparation des échantillons pour les études de réactivité de l'**Eug** et de l'**IsoEug** avec des acides aminés

Suite à cette approche le milieu réactionnel a ensuite été analysé par spectrométrie de masse. Initialement, les études ont été effectuées avec les composés cibles disponibles de façon commerciale. Dans un deuxième temps, les expériences ont été réalisées avec les composés substitués au ^{13}C , permettant de modifier le rapport m/z de l'adduit potentiel formé. L'augmentation d'une valeur de 1 pour le rapport m/z (lorsque $z = 1$) par rapport à l'adduit majoritairement observé pour les composés non substitués doit permettre de témoigner de la formation de l'adduit entre la molécule cible et l'acide aminé.

Les acides aminés choisis pour cette étude étaient protégés avec un groupement acétate (Ac) sur la fonction amine N-terminale et sous forme d'ester méthylique ou éthylique (Me ou Et) sur la fonction acide carboxylique C-terminale. Ceci permet de ne pas tenir compte de la potentielle réactivité de ces fonctions autrement impliquées dans les liaisons peptidiques nécessaires à la formation des protéines. Les acides aminés protégés qui ont été choisis pour cette étude sont la cystéine (**Cys**), le tryptophane (**Trp**), la tyrosine (**Tyr**), l'histidine (**His**) ou la lysine (**Lys**) (Figure 81). Ces acides aminés ont été choisis car ils sont connus pour être impliqués dans les différents mécanismes d'hapténisation.

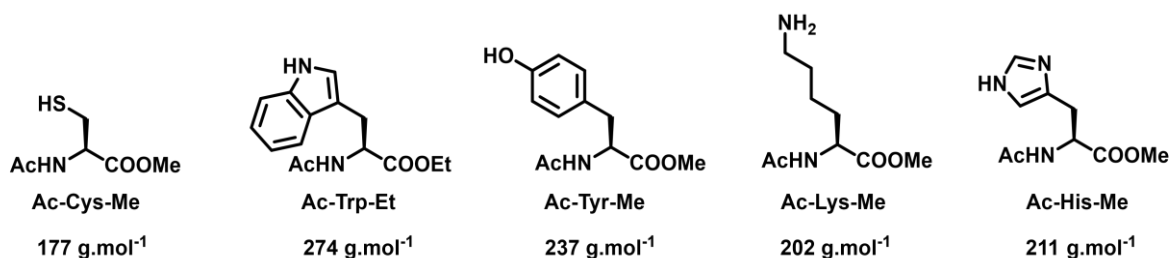


Figure 81 : Structure et poids moléculaires des acides aminés utilisés pour les études de réactivité

3.2.2. Résultats et discussion

Les premiers tests ont été réalisés avec l'**Eug** et l'**IsoEug** commerciaux afin d'identifier les acides aminés potentiellement intéressants pour cette étude. Dans ce cadre, trois acides aminés ont montré un intérêt particulier, la **Cys**, le **Trp** et la **Lys** (Tableau 9).

Tableau 9 : Rapports m/z observés pouvant correspondre à la formation d'une liaison entre l'acide aminé étudié et l'**Eug** ou l'**IsoEug**

Acide aminé	Eugénol		Isoeugénol	
	Irradiation (3 h)	HRP/H ₂ O ₂	Irradiation (3 h)	HRP/H ₂ O ₂
Ac-Cys-Me	[M+H] ⁺ : 340,12	[M+H] ⁺ : 340,12	[M+H] ⁺ : 340,12	[M+H] ⁺ : 340,12
Ac-Tyr-Me	-	-	-	-
Ac-Trp-Et	[M+H] ⁺ : 437,21	[M+H] ⁺ : 437,21	[M+H] ⁺ : 437,21	[M+H] ⁺ : 437,21
Ac-Lys-Me	-	[M+H] ⁺ : 365,13	-	-
Ac-His-Me	-	-	-	-

*M = adduit non ionisé entre l'acide aminé et **Eug** ou **IsoEug** de poids moléculaire 164 g.mol⁻¹*

Comme attendu suite aux calculs théoriques, un adduit avec la **Cys** semble pouvoir se former avec l'**Eug** ou dans le cas de l'**IsoEug** quel que soit l'initiation radicalaire utilisée (enzymatique ou par irradiation). En effet, un m/z compatible à la formation d'un adduit entre la **Cys** et les molécules d'études ($m/z = 340,12$) a été observé.

De la même manière, le **Trp** connu pour être fortement capable de réagir de manière radicalaire¹⁶¹ a montré une signature compatible avec la formation d'une liaison entre l'acide aminé et l'**Eug** ou l'**IsoEug** ($m/z = 437,21$).

La **Lys**, principalement connue pour mener à des réactions à transfert de deux électrons de type nucléophile-électrophile, a pu montrer l'apparition d'un signal pouvant correspondre à la formation d'un adduit **Lys-Eug** ($m/z = 365,13$). Mais cet adduit n'a été détecté que suite à l'activation enzymatique de l'**Eug** par le système HRP/H₂O₂, mais non par pas photo-activation (Tableau 9). Aucun m/z compatible avec un adduit **Lys-IsoEug** n'a été mis en évidence. De même, ni les études avec l'**His** et la **Tyr**, qui pourtant présente une fonction phénolique à l'instar de l'**Eug** et de l'**IsoEug**, n'ont été concluantes.

Afin de déterminer si les signaux observés correspondent à la formation d'adduits entre l'acide aminé concerné et l'**Eug** ou l'**IsoEug**, les expériences avec la **Cys** et le **Trp** ont été réitérées avec de l'**Eug** et de l'**IsoEug** tous deux substitués au ¹³C sur la position méthoxyle. Cette substitution devrait permettre l'identification du même signal que celui observé

précédemment mais avec un rapport m/z augmenté de 1 si l'adduit contient le motif **Eug** ou **IsoEug**. Ces résultats sont résumés dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Rapports m/z observés pouvant correspondre à la formation d'une liaison entre l'acide aminé étudié et l'**Eug** ou l'**IsoEug**, tous deux substitués au ^{13}C sur la fonction méthoxy

Acide aminé	Eugénol		Isoeugénol	
	Irradiation (3 h)	HRP/H ₂ O ₂	Irradiation (3 h)	HRP/H ₂ O ₂
Ac-Cys-Me	[M+H] ⁺ : 341,13	-	-	[M+H] ⁺ : 341,21
Ac-Trp-Me	[M+H] ⁺ : 438,22	[M+H] ⁺ : 438,23	[M+H] ⁺ : 438,23	[M+H] ⁺ : 438,22
Ac-Lys-Me	-	[M+H] ⁺ : 366,12	-	-

M = adduit non ionisé entre l'acide aminé et le ($^{13}\text{C-MeO}$)-Eug ou le ($^{13}\text{C-MeO}$)-IsoEug de poids moléculaire 165 g.mol⁻¹

Ainsi, la comparaison des spectres de masse obtenus dans des conditions similaires, mais avec le substrat contenant ou non un ^{13}C , permet de justifier de la liaison entre la molécule et l'acide aminé, comme montré dans la Figure 82 avec l'**IsoEug** et la **Cys** par activation enzymatique.

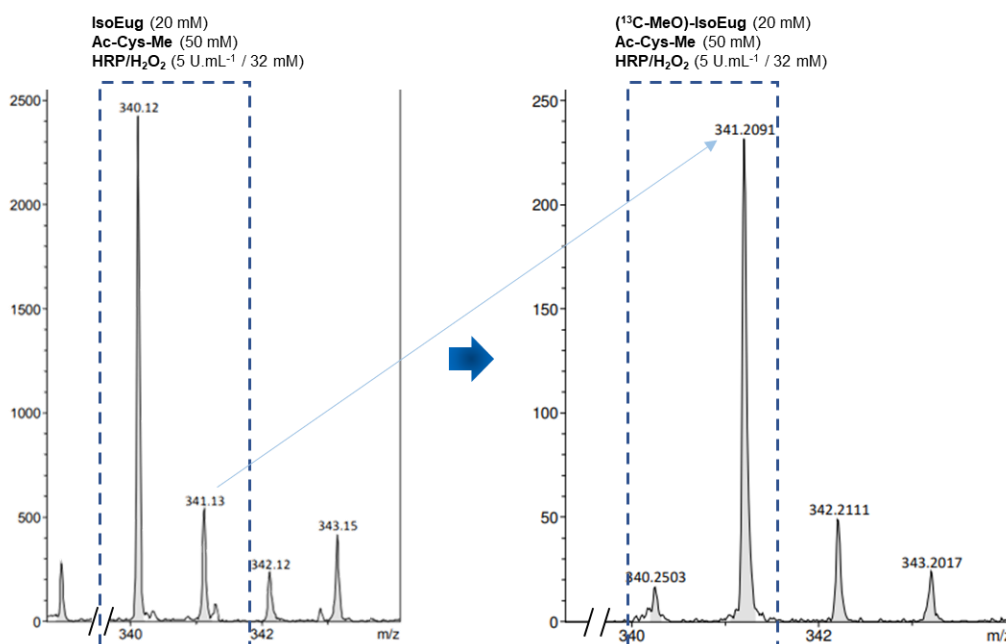


Figure 82 : Comparaison des spectres obtenus par spectrométrie de masse (ESI- μ TOF) des essais de l'**IsoEug** ou du ($^{13}\text{C-MeO}$)-**IsoEug** en solution avec de la **Ac-Cys-Me** et le système initiateur HRP/H₂O₂ montrant le déplacement d'une valeur de 1 du m/z en fonction de l'espèce isotopique utilisée

La liaison entre la **Cys** et l'**IsoEug** a notamment été mise en évidence après l'activation par l'HRP/H₂O₂ : un pic de m/z de 341,21 est apparu concomitant à la disparition du pic avec un m/z de 340,12. En revanche, sous irradiation aucun signal de m/z de 341 n'est apparu. A

contrario, pour l'**Eug** en présence de **Cys**, un pic de m/z à 341,13 est observé après exposition au simulateur solaire uniquement. Il a également été montré que le **Trp** se lie bien à l'**Eug** et à l'**IsoEug** au vu de l'apparition du nouveau pic correspondant à un m/z de 438,22 accompagné de la perte du signal associé à un m/z de 437,21. Cette observation a été faite quel que soit la méthode d'initiation radicalaire. Enfin, la **Lys** semble uniquement capable de réagir avec l'**Eug** et exclusivement lorsque soumis à une activation enzymatique.

4. Bilan

Les différentes expériences présentées dans ce chapitre apportent de nombreuses informations vis-à-vis de la compréhension du comportement que peuvent avoir l'**Eug** et l'**IsoEug** lors d'évènements radicalaires produits dans la peau. En préambule, des études en solution de RPE-*spin trapping* ont été effectuées sur ces molécules en utilisant deux modes d'initiation radicalaire distincts. Le premier utilise le système enzymatique HRP/H₂O₂ avec une réactivité connue pour les dérivés phénoliques agissant alors en tant qu'antioxydant et permettant ainsi de générer en premier lieu le radical PhO[•]. Le second utilise simplement un apport d'énergie par photo-irradiation *via* une exposition solaire normalisée (simulateur solaire de spectre AM 1.5). Ces études ont permis en effet de mettre en évidence la génération de : (i) un radical centré sur le carbone et (ii) un radical centré sur l'oxygène dont les constantes de couplages hyperfines sont compatibles avec un radical peroxy (ROO[•]). Ces résultats ont ensuite été comparés avec différents composés cibles synthétisés (*cf.* Chapitre 2) en contenant des ¹³C substitués aux positions potentiellement clés indiquées par les calculs DFT. Malheureusement, le dédoublement de la signature RPE, témoin de la présence d'un ¹³C dans le voisinage de la sonde paramagnétique et d'un couplage hyperfin correspondant, n'a pu être détecté. Ceci tend à indiquer que les positions substituées jusque-là ne sont pas porteurs du radical réactif formé et piégé en solution. D'autres molécules ont été testées tel que le guaiacol, brique de base commune à la structure de l'**Eug** et de son isomère et qui présente la même signature RPE que ces derniers. Mais là encore, le guaiacol substitué au ¹³C sur sa position *ortho*-, seule position carbonée clé sur les composés cibles dont la synthèse n'a pu être menée à son terme, n'apporte pas la constante de couplage supplémentaire suspectée.

Aussi, de manière intéressante, les molécules méthylées sur les fonctions phénoliques montrent que la structure de l'**Eug** est susceptible de générer les mêmes signatures radicalaires par photo-exposition sans pour autant passer par le radical PhO[•]. Des études plus approfondies nécessiteraient d'être menées sur cette particularité. Par après, le transfert expérimental sur les matrices épidermiques telles qu'elles n'a pas permis de mettre en évidence des intermédiaires radicalaires induits par l'**Eug** et l'**IsoEug**.

Cependant, après avoir réussi à intégrer une peroxydase (la HRP) dans le modèle de RHE afin de booster son métabolisme enzymatique sans pour autant altérer les épidermes, nous avons démontré qu'une signature spectrale similaire à celle observée en solution a été obtenue dans les RHE induits par l'**Eug** et l'**IsoEug**. Cela n'a pas été le cas du guaiacol, cœur commun structurellement parlant des deux molécules cibles, où aucun adduit de spin n'a été détecté dans ces conditions. Ceci tend à démontrer la nature pro-haptène de l'**Eug** comme de l'**IsoEug**, illustré par l'amélioration de la réactivité métabolique sans action supplémentaire (en absence de H₂O₂) de la matrice pour s'approcher aux conditions réelles de présence de peroxydases dans la peau.

Dans un esprit similaire, un caractère potentiel de type pré-haptène a aussi pu être avancé. En effet, une simple « exposition au soleil » nous a permis de caractériser la présence d'intermédiaires radicalaires induits par les molécules cibles. Ce résultat expérimental ouvre également la porte à de multiples investigations dans le cadre d'étude des phénomènes de photo-allergie de contact : des résultats préliminaires sont présentés dans le Chapitre 3 de ce manuscrit. L'étude de l'**Eug**, de l'**IsoEug** et même du guaiacol dans les RHE photo-exposés a également montré une signature radicalaire similaire à celle obtenue en solution mais ne présente pas de nouvelles constantes de couplages pour les analogues substitués au ¹³C.

Finalement, concernant les analyses de l'**Eug** et de l'**IsoEug** par RPE, les radicaux possiblement peroxydes identifiés lors des initiations radicalaires en solution apparaissent similaires à ceux observés dans les RHE dont le système enzymatique a été enrichi avec de la HRP. De façon intéressante, la formation de ces adduits de spin a été obtenue en absence d'H₂O₂ permettant d'avancer l'hypothèse que ces molécules soient capables d'induire la génération de ROS au sein des RHE. Des études RPE par spin scavenging au sein des RHE ont permis de mettre évidence l'aptitude de l'**IsoEug**, *a contrario* de l'**Eug**, à générer des ROS de manière extracellulaire. Combiné aux propriétés cytotoxiques supérieures de l'**IsoEug** par rapport à celles de l'**Eug**, ce résultat peut expliquer le pouvoir de sensibilisation cutanée accru de l'**IsoEug** comparé à celui de l'**Eug**.

Enfin, les travaux très préliminaires de réactivité conduits à l'aide de la spectrométrie de masse ont montré une possible réaction de l'**Eug** et de l'**IsoEug** soumis à des initiations radicalaires avec certains acides aminés. Nous nous sommes basés sur l'avantage obtenu du changement de poids moléculaire issu d'une substitution isotopique au sein de la structure des molécules cibles. Il a pu être montré au travers de cette étude que les deux composés, l'**Eug** et l'**IsoEug**, sont capables de se coupler avec le **Trp**. Aussi, il a également été prouvé que *via* un système enzymatique de type HRP/H₂O₂, l'**IsoEug** se lie à la **Cys** alors que sous irradiation cette capacité disparaît. Ceci est contraire à ce qui est observé pour l'**Eug** qui se lie

à la **Cys** sous irradiation et non pas par le système oxydant HRP/H₂O₂ dans ces conditions. Le **Trp** et la **Cys** étant connus pour réagir au travers de mécanismes radicalaires, les résultats obtenus seraient cohérents avec l'hapténisation par voie radicalaire de protéines contenant ces acides aminés par l'**Eug** et l'**IsoEug**.

Experimental part: Chapter 2

Materials & methods

Reagents, solvents and solutions

The spin-trap **DEPMPO** was synthesized as reported in literature^{139,140} with reactants purchased from Sigma Aldrich®.

The spin scavengers **CxP** and **CmP** were purchased from Sigma Aldrich.

HEPES buffer (10 mM, pH 6.8) was prepared with 1.19 g HEPES in 400 mL deionized water, 4 g NaCl and 0.1 g KCl. To attain pH 6.8, NaOH pellets were added. If the pH went too high, it was lowered back by carefully adding HCl until the pH remained stable to 6.8. Deionized water was added for a final volume of 500 mL.

The horseradish peroxidase enzyme (HRP) was purchased from Sigma Aldrich as a lyophilized powder. The batch used had an enzymatic activity per mass of 164 U.mg⁻¹.

Dispase II was purchased from Sigma Aldrich as a lyophilized powder with an enzymatic activity per mass of 0.5 U.mg⁻¹. A new solution of Dispase II for removing the RHE from the polycarbonate membrane was prepared for every week a range of RHE experiments was scheduled. This solution was prepared in HEPES buffer diluted in water (75 : 25) to have an enzymatic activity of the solution of 2.4 U.mL⁻¹.

Equipment

EPR acquisitions were performed at room temperature (295 K) with an EPR X-Band spectrometer (EMXplus, Bruker Biospin GmbH, Germany) equipped with a high sensitivity resonator (Bruker Biospin GmbH, Germany). The *g* calibration was performed using “strong pitch” Bruker standard (isotropic *g* factor of 2.0028). The spectrometer was operated at 9.87 GHz and the principal experimental parameters were: 10 scan accumulation, microwave power 5 mW in solution and 10 mW in RHE, modulation amplitude 2 G, sweep time 40 s. The EPR spectra were analyzed using simulation computed using labmade script based on Easyspin toolbox under Matlab (Mathworks) environment. The different figures were then made using OriginPro®.

Solar simulator Oriel Sol 3A with Xenon lamp to give a AM 1.5 spectrum. The distance to have the irradiance of the sun felt on earth is 30 cm.

RHE models used, AlternaSkin™, are purchased from Cell Alternativ. They are sent on Monday to receive the range of RHE on Tuesday. Upon receipt, RHE maintained in agarose gel need are put in a new culture medium (1.5 mL/well for a 12-well plate). The culture medium

should be freshly prepared by warming it to 37 °C and adding a complement provided with the maintenance medium (volume of the complement 1/200 to the maintenance medium). The RHE are then left for 24 h in an incubator (37 °C, 5% CO₂ in a saturated humidity atmosphere). After this time, the medium must be replaced every 24 h (1.5 mL/well) to 48-72 h (2.5 mL/well). In the case of HRP incorporation, the latter is added to the culture medium at a concentration of 30 U.mL⁻¹. Please note that the reliability of the RHE model is only guaranteed for 3 days (to be used from Wednesday to Friday).

General procedure for the assays in solution

Stock solutions were prepared for the target compounds (133.3 mM, organic solvent), the spin trap (333.3 mM in HEPES) and in the case of enzymatic activation the horseradish peroxidase (33.3 U.mL⁻¹ in HEPES) and hydrogen peroxide (233.3 mM in HEPES).

15 µL of spin-trap solution were mixed with 15 µL of target compound, and in the case of enzymatic activation 15 µL of horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. HEPES buffer was added to the solution for the final volume completed to 100 µL. This way, final concentrations in the reaction mixture were 50 mM spin trap, 20 mM of target compound and in the case of enzymatic activation 5 U.mL⁻¹ of horseradish peroxidase and 32 mM of hydrogen peroxide. The reaction mixture was subjected to stirring, further introduced into a glass capillary tube (Hirschmann, 20 µL), sealed on both ends and EPR spectra registered.

General procedure for the assays in RHE for Spin Trapping

For the experimentation, the RHE (AlternaSkin™, Cell Alternativ, 0.6 cm²) was first put in Dispase II solution for 5 min. Then the RHE was pre-treated with **DEPMPO** (400 mM, 30 µL) in dimethylsulfoxide/HEPES 1:1 and incubated during 15 min (37 °C, 5 % CO₂). After this time, pre-treated RHE were placed in an EPR tissue cell equipped with a silica window (Willmad, #ER162TC-Q) and substrate (100 mM in acetone, 30 µL) was topically applied to the epidermis taking care to ensure that the solution was only applied to it. The EPR tissue cell was then closed and EPR spectra were registered as soon as possible.

In the case of photo-tests, the pre-treated RHE was washed in a bath of HEPES solution before the topical application of the substrate. After the first acquisition (t₀), the RHE was put under the sunlight simulator through the tissue cell for 10 min before the next acquisition (t₁₀)

In the case of doped RHE, 48-72 h before the experiment, HRP was put in the culture medium (30 U.mL⁻¹). Then the following experimental procedure was the one described above

General EPR-spin scavenging procedure for the assays in RHE

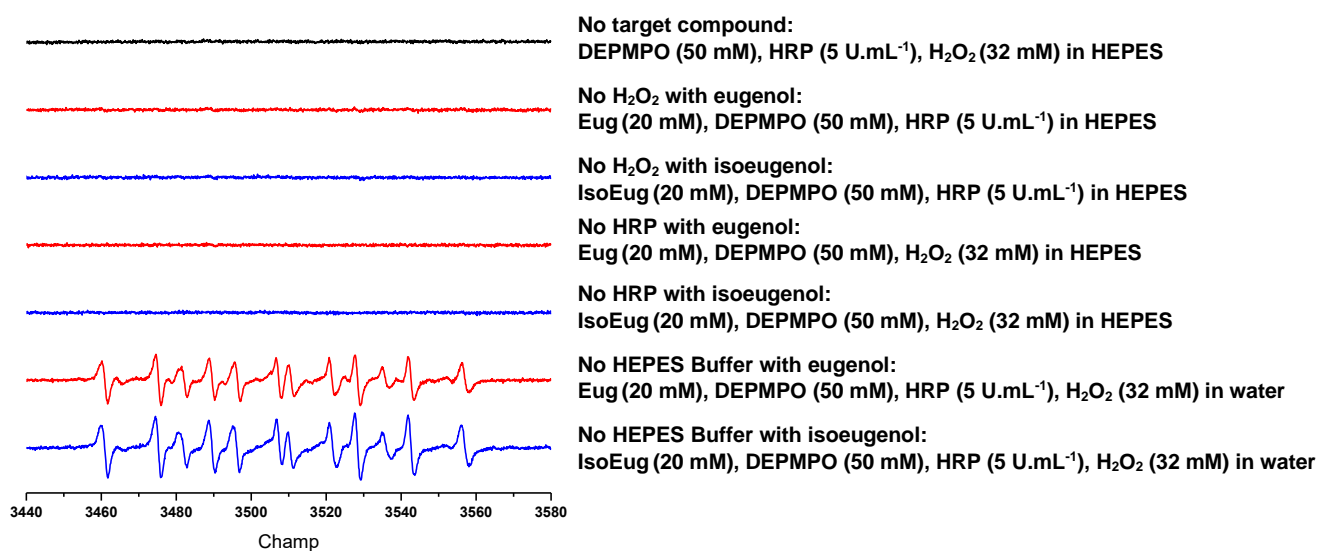
The RHE (AlternaSkin™, Cell Alternativ, 0.6 cm²) were first put in Dispase II solution for 5 min. Then the RHE was pre-treated with the spin scavenger (**CxP**) in dimethylsulfoxide (100 µM,

30 μL) 1:1 and incubated for 10 min (37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2). After this time, the target compound (100 mM in acetone, 30 μL) was topically applied to the epidermis and incubated for 5 min (37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2). The RHE was then placed in an EPR tissue cell equipped with a silica window (Willmad, #ER162TC-Q). EPR spectra were then recorded with the previously described EPR equipment. In here, the principal experimental parameters values were: microwave power 5 mW, modulation amplitude 1 G.

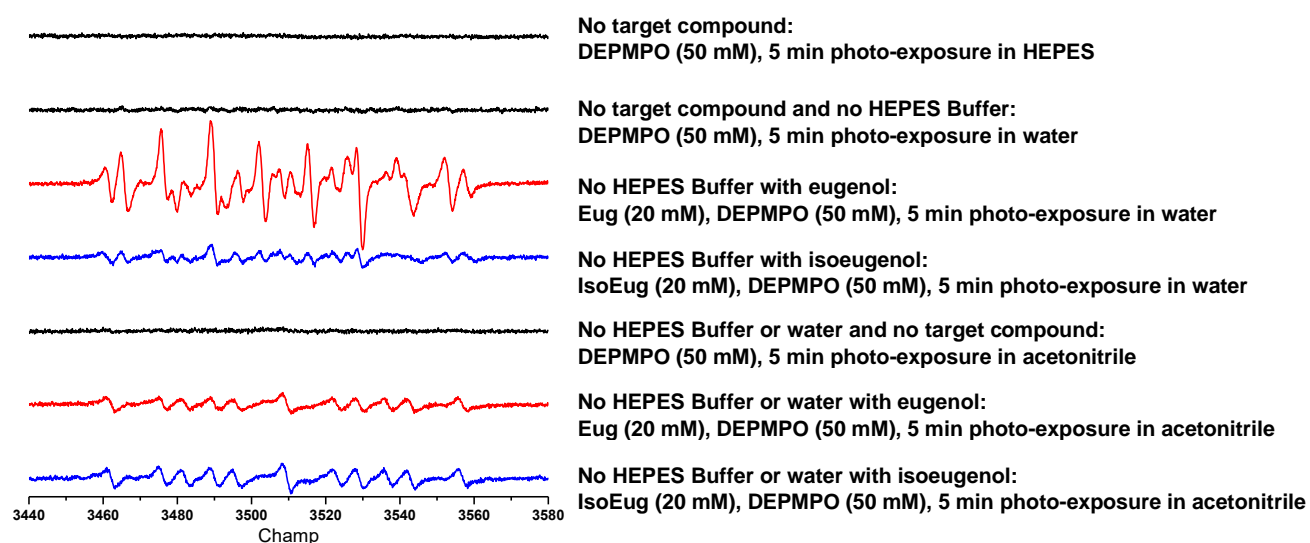
Control experiments for EPR-Spin trapping

Control experiments were crucial to confirm that the observed EPR signatures depend solely on the oxidation systems studied on the target molecules. These controls were carried out in solution by probing each experimental parameter.

Control experiments for spin trapping in solution with HRP/ H_2O_2



Control experiments for spin trapping in solution with photo-exposed:



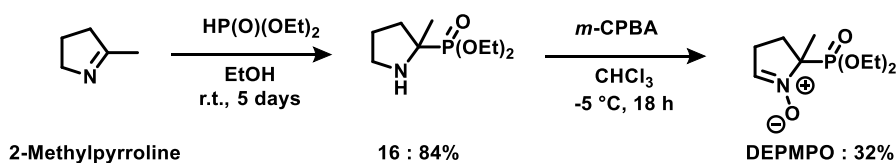
Controls carried out with the HRP/H₂O₂ showed the necessity to have the tandem together with the target compounds to observe radicals.

The photo-exposed controls pointed to have both the photo-mediated energy and the target molecules to detect radicals, while the sole illumination was not sufficient enough to react directly with DEPMPO.

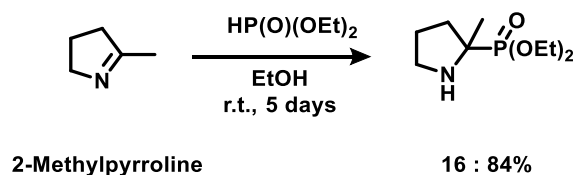
In all cases, HEPES buffer seemed not to be involved in the EPR signature.

Synthesis procedures

Synthesis of DEPMPO



Diethyl-(2-methyl-2-pyrrolidiny)phosphonate: 16



Diethylphosphite (31.2 mL, 241.2 mmol, 1.2 eq) was slowly added to a solution of 2-methylpyrroline (20.0 mL, 201 mmol, 1.0 eq) in ethanol (60 mL) in a round bottom flask under an argon atmosphere. The reaction mixture was stirred for 7 days at room temperature. Then the solvent was evaporated under reduced pressure to give a brown oil. A solution of hydrochloric acid (10 % in water, 200 mL) was added and the solution was washed with dichloromethane (3 x 80 mL). The aqueous phase was basified with a saturated solution of sodium carbonate until pH 9. The aqueous phase was extracted with chloroform (3 x 100 mL). Combined organic phases were dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give the pure product.

Yield and aspect: 84% (37.35 g, 168.8 mmol) as a yellowish oil

Formula: C₉H₂₀NO₃P

MW: 221.24 Da

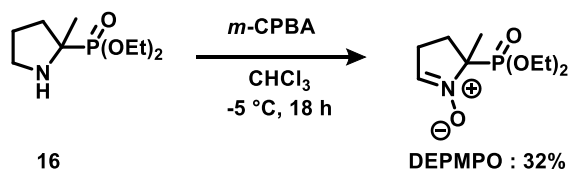
CAS: 157230-68-7

TLC: R_f = 0.6 (CH₂Cl₂/EtOH 9:1) ; Rev: PMA/Ce

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.27 (td, 2 × 3H, ³J_{H-H} = 6.9 Hz, ⁴J_{H-P} = 1.5 Hz, 2 × OCH₂CH₃), 1.30 (d, 3H, ³J_{H-P} = 15.8 Hz, **Me**), 1.53-1.85 (m, 2 × 2H, CH₂CH₂CH₂N), 2.12-2.21 (m, 1H, NH), 2.91-3.03 (m, 2H, CH₂N), 4.08-4.14 (m, 2 × 2H, 2 × OCH₂CH₃)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 16.6 (d, ³J_{C-P} = 6.2 Hz, 2 × -OCH₂CH₃), 24.3 (d, ²J_{C-P} = 6.2 Hz, **Me**), 25.8 (d, ³J_{C-P} = 5.0 Hz, CH₂CH₂N), 34.6 (d, ²J_{C-P} = 3.8 Hz, CH₂CH₂CH₂N), 47.2 (d, ³J_{C-P} = 6.3 Hz, CH₂N), 59.4 (d, ¹J_{C-P} = 163.7 Hz, **C**_{quaternaire}), 62.2 (d, ²J_{C-P} = 4.4 Hz, OCH₂CH₃), 62.4 (d, ²J_{C-P} = 4.4 Hz, OCH₂CH₃)

5-Diethoxy-phosphoryl-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide: DEPMPO



Diethyl-(2-methyl-2-pyrrolidyl)phosphonate (15.0 g, 67.8 mmol, 1.0 eq) was dissolved in chloroform (150 mL). The temperature of the solution was maintained under -5 °C. A suspension of 3-chloroperbenzoic acid (77 %, 31.0 g, 135 mmol, 2 eq) in chloroform was slowly added. The green solution became milky. A saturated solution of sodium carbonate (130 mL) was added and the solution was vigorously stirred. After 45 min, a clear green color appeared. Organic phases were washed with a sodium chloride saturated solution (150 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel chromatography (dichloromethane/ethanol 9:1) and 5-diethoxy-phosphoryl-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide (DEPMPO) was obtained as an orange oil (5.10 g, 21.7 mmol, 32 %).

Yield and aspect: 32% (5.10 g, 21.7 mmol) as a yellowish oil

Formula: C₉H₁₈NO₄P

MW: 235.22 Da

CAS: 157230-67-6

TLC: R_f = 0.6 (CH₂Cl₂/EtOH 9:1) ; Rev: PMA/Ce

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.29 (td, 2 × 3H, ³J_{H-H} = 6.9 Hz, ⁴J_{H-P} = 1.5 Hz, 2 × OCH₂CH₃), 1.63 (d, 3H, ³J_{H-P} = 15.8 Hz, **Me**), 1.99-2.09 (m, 1H, CH₂CH₂CHN), 2.49-2.57 (m, 1H, CH₂CH₂CHN), 2.69-2.76 (m, 1H, CH₂CHN), 2.77-2.84 (m, 1H, CH₂CHN), 4.12-4.17 (m, 2 × 2H, 2 × OCH₂CH₃), 6.86 (td, 1H, ³J_{H-H} = 2.8 Hz, ⁴J_{H-P} = 2.8 Hz, CHN)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 16.5 (d, ³J_{C-P} = 6.2 Hz, 2 × -OCH₂CH₃), 20.9 (**Me**), 25.9 (CH₂CHN), 31.1 (CH₂CH₂CHN), 62.9 (d, ²J_{C-P} = 7.5 Hz, OCH₂CH₃), 64.1 (d, ²J_{C-P} = 7.4 Hz, OCH₂CH₃), 75.8 (d, ¹J_{C-P} = 153.7 Hz, **C**_{quaternaire}), 134.9 (CHN)

CHAPITRE 3

Étude radicalaire de la photo-allergie de contact

--

Élargissement du potentiel d'utilisation
de systèmes photo-exposés

Sommaire de partie :

1. La photo-allergie de contact	134
1.1. Les photo-allergènes étudiés : les dérivés de benzophénone	134
1.1.1. La benzophénone (BP) et ses propriétés photochimiques	135
1.1.2. Le kétoprofène (KP), un anti-inflammatoire non-stéroïdien	136
1.1.3. L'octocrylène (OCT) et l'oxybenzone (OBZ), les filtres solaires	140
1.2. L'objectif : étude des systèmes photo-exposés	141
2. Résultats et discussion	142
2.1. Étude de la BP par RPE- <i>spin trapping</i>	142
2.1.1. En solution	142
2.1.2. Dans des RHE	142
2.2. Étude du KP par RPE- <i>spin trapping</i>	143
2.2.1. En solution	143
2.2.2. Dans des RHE	145
2.3. Étude de l'OBZ et de l'OCT par RPE- <i>spin trapping</i>	146
2.3.1. En solution	146
2.3.2. Dans des RHE	148
3. Bilan	149
Experimental part: Chapter 3	151

1. La photo-allergie de contact

Ce troisième et dernier chapitre de ce manuscrit de thèse est centré sur l'étude de la formation radicalaire photo-induite. En effet, ces travaux de thèse ont permis de développer une approche expérimentale originale, centrée sur la spectroscopie RPE et visant à comprendre les événements dermatologiques menant notamment à l'ADC pour les composés cibles que sont l'**Eug** et l'**IsoEug**. Il a notamment pu être mis en évidence qu'il est possible d'exposer à la lumière solaire ces composés cibles dans des modèles RHE, afin d'en étudier la propension à générer des intermédiaires radicalaires et leurs potentiels effets sur les chaînes latérales d'acides-aminés induits par cette irradiation.

C'est ce lien entre le « soleil » et l'ADC qui a tout naturellement poussé les recherches bibliographiques, ainsi que les discussions menées au sein du groupe, à se diriger vers une nouvelle thématique d'étude liée à la photo-allergie de contact (PADC). La PADC, comme l'ADC, est une pathologie cutanée résultant d'une réaction d'hypersensibilité retardée. Cependant, dans le cas de la PADC la molécule sensibilisante devient réactive par action de la lumière. Elle nécessite, en conséquence, une étape au préalable de photo-activation afin de pouvoir déclencher une réponse immunitaire. La lumière peut, en effet, permettre diverses réactions photochimiques au niveau moléculaire (e.g., une photo-oxydation) menant à l'haptène réactif.¹⁶²⁻¹⁶⁶ Dans le cas de composés *a priori* non-sensibilisants la lumière est donc un élément déclencheur qui peut survenir avant ou après exposition de la molécule sur la peau. Cette photosensibilisation est connue pour intervenir suite à l'utilisation de divers produits de la vie de tous les jours allant des médicaments aux produits cosmétiques et filtres solaires.

In fine, nous nous sommes donc demandés s'il ne serait pas possible d'évaluer le comportement des photo-allergènes de contact de la même manière que précédemment, en les appliquant sur des RHE soumis ensuite à une irradiation. Afin de valider cette approche expérimentale et d'étudier l'étendue de son potentiel d'application, j'ai eu l'occasion d'encadrer plusieurs stagiaires de Master sur ce sujet.

1.1. Les photo-allergènes étudiés : les dérivés de benzophénone

Parmi les principaux photo-allergènes les plus largement mis en cause dans la PADC, on citera en particulier les dérivés de type benzophénone (**BP**) connus notamment pour être sujets à la photo-oxydation décrite ci-dessus.^{113,116,162}

1.1.1. La benzophénone (BP) et ses propriétés photochimiques

La **BP** est un composé aromatique contenant deux noyaux phényles sur une fonction carbonyle. Le BP possède une bande d'absorption dans les environs de 350-365 nm.^{113,167} C'est un composé photo-actif qui est sûrement le photophore organique le plus utilisé aujourd'hui pour ses propriétés photochimiques. L'état photoexcité du photophore **BP** peut se relaxer à l'état fondamental de plusieurs manières, menant par exemple à la photosensibilisation, à une cycloaddition [2+2], à une abstraction d'hydrogène ou encore à une recombinaison radicalaire.¹¹³ Par absorption d'un photon, la **BP** passe de son état singulet fondamental à un état triplet conduisant à une forme biradicalaire de la molécule : le biradical benzophénone (**BP^{••}**), résultat de la rupture homolytique de la liaison- π portée par la fonction carbonyle (Figure 83).^{113,168} De par ses caractéristiques intrinsèques, le **BP^{••}** est impliqué dans de très nombreuses applications allant de la chimie de surface et des polymères aux bioconjugaisons ciblées, la chimie protéomique et la cartographie *in vivo* voire la chimie des interfaces de contact.¹¹³ Dans le travail présenté ici, nous nous sommes focalisé sur sa faculté de photosensibilisation.

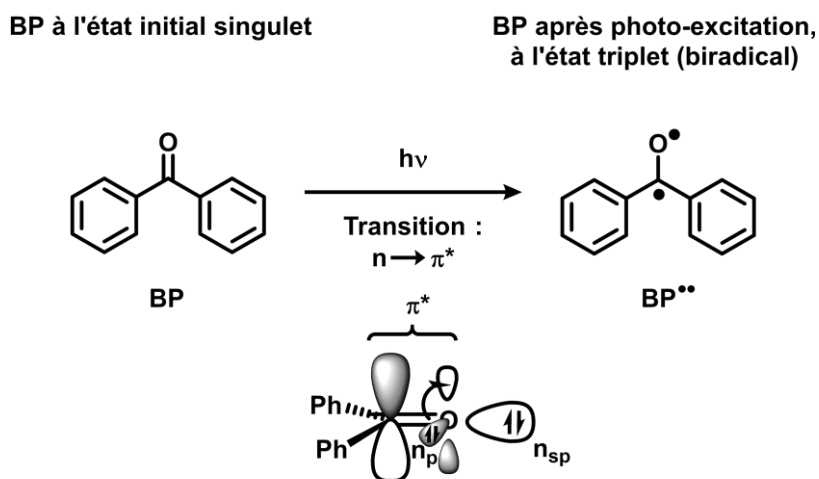


Figure 83 : Schéma réactionnel illustrant la génération photo-induite de l'état triplet du biradicalaire **BP^{••}** (transition $n-\pi^*$)

L'exposition de la **BP** à la lumière mène à l'excitation $n-\pi^*$ permettant de faire passer un électron de l'orbitale HOMO (orbitale du doublet non-liant, n) vers l'orbitale LUMO (orbitale anti-liante de la liaison π , π^*). Une transition $\pi-\pi^*$ aurait aussi pu être envisagée mais de coût énergétique plus conséquent. Si cette transition de l'état fondamental vers un état singulet second (S_2) est réalisée, elle tend par des conversions internes à rapidement revenir vers le premier état singulet excité (S_1) : l'état après la transition $n-\pi^*$. À ce stade, le niveau S_1 peut soit relaxer par fluorescence selon le diagramme de Jablonski (Figure 84), soit profiter d'un mécanisme de conversion inter-système permettant de peupler le second état triplet excité (T_2) très proches en énergie.¹¹³ Il a été montré par Yabumoto *et al.* que les états S_1 et T_2 sont

isoénergétiques expliquant notamment leur haut rendement quantique et leur transition presque instantanée de l'état S_1 vers l'état T_2 .¹⁶⁹ Dans cette configuration électronique, de rapides conversions internes conduisent finalement la **BP** dans son premier état triplet excité (T_1) avant d'effectuer un probable retour à l'état fondamental par phosphorescence (Figure 84).^{113,167,168}

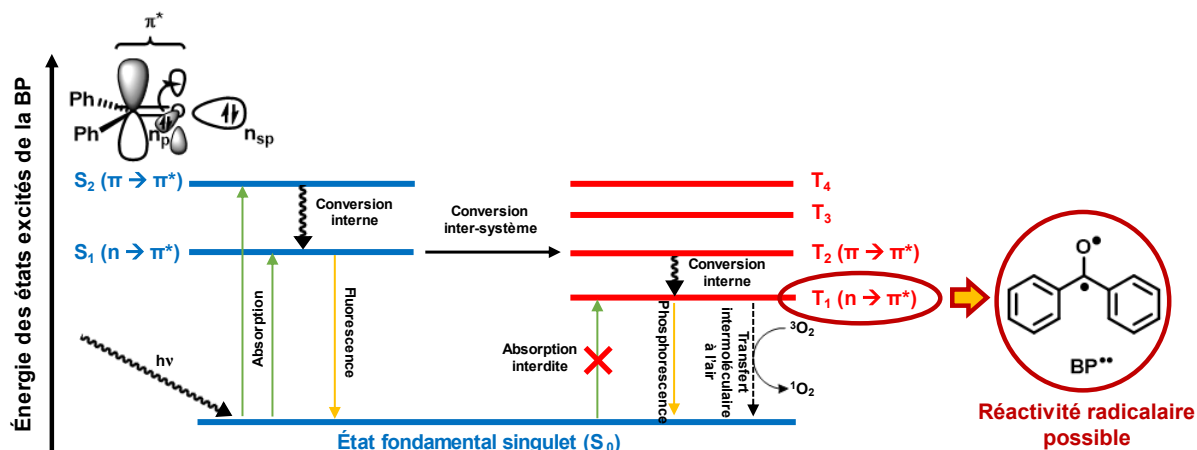


Figure 84 : Diagramme de Jablonski de la **BP** menant à la formation du biradical **BP****

Outre la phosphorescence, c'est au travers de son état triplet que la **BP** est active après photo-excitation sous la forme biradicalaire **BP****. Les orbitales n'étant pas complètes et de niveaux d'énergies différents, c'est le **BP**** qui est à la base de nombreuses réactions photo-induites. Les réactions photochimiques faisant suite à l'état triplet de la **BP**, comprennent (i) l'abstraction d'hydrogène, (ii) la formation de l'oxétane de Paterno-Büchi résultant de l'addition à une double liaison C=C, ou (iii) la dimérisation des états triplets.¹¹³ Cette liste non exhaustive des réactions potentielles atteste de la large capacité photo-réactive de la **BP** pouvant se produire au travers d'intermédiaires radicalaires.

1.1.2. Le kétoprofène (**KP**), un anti-inflammatoire non-stéroïdien

Le **KP** est une molécule dérivée de l'acide propionique, comportant un noyau **BP** comme substituant. Le **KP** est connu pour être utilisé dans de nombreux produits médicamenteux de type anti-inflammatoires présentant l'avantage d'être non-stéroïdiens. Cette propriété anti-inflammatoire du **KP** vient de sa capacité à inhiber la production de prostaglandine, molécule de la famille des cytokines et médiateur principal du message inflammatoire.¹⁷⁰ Ainsi, le **KP** est utilisé sous forme de gel pour les traitements localisés (e.g., blessures et traumatismes musculaires ou ligamentaires) mais aussi sous forme de gélule ou pilule pour des traitements plus diffus (e.g., les céphalées). Néanmoins, depuis les années 80, le **KP** est aussi devenu connu des dermatologues en raison du nombre de patients toujours croissant qui ont été diagnostiqués comme étant photosensibles à cette substance. Le **KP** est devenu par la suite

d'autant plus populaire que les symptômes cliniques induits suite à sa photo-exposition sont à la fois sévères et persistants (Figure 85).^{115,116,171}

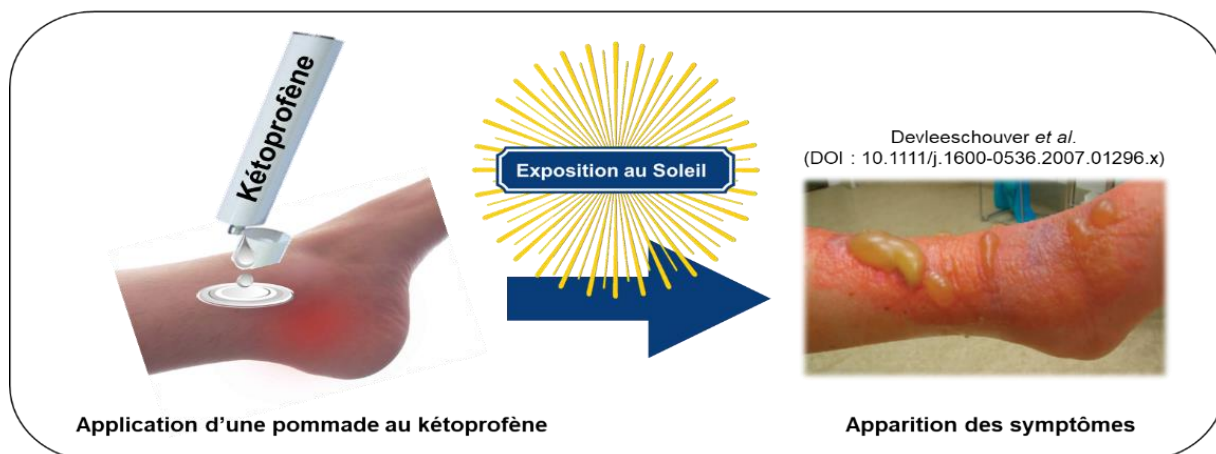


Figure 85 : Symptômes (ici une dermatite vésiculo-bulleuse) pouvant résulter de la PADC à une crème contenant du **KP**

Il a été montré que le **KP** peut se dégrader sous l'effet de la lumière produisant divers intermédiaires radicalaires (Figure 86). En partant du principe qu'il est nécessaire que le **KP** se lie directement à une protéine cutanée après irradiation afin d'enclencher un PADC, les intermédiaires radicalaires photo-induits sont d'autant plus des suspects potentiels. Ces intermédiaires radicalaires ont été montrés comme étant réactifs car capables de réagir avec un antioxydant (RH), de dimériser, de s'oxyder en réagissant avec des ROS, etc... (Figure 86).^{115,117,172} Aussi, Nakajima *et al.* ont notamment attribué à l'irradiation du **KP** le rôle de photo-activateur de l'oxygène et caractérisé la production de ROS *via* la présence du radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) mis en évidence par *spin trapping*.¹⁷²

Par ailleurs les travaux de Karlsson *et al.* ont également montré que les produits issus de la photo-excitation du **KP** réagissent rapidement (*ca.* 3 min d'irradiation) avec de l'éthanol utilisé comme solvant.¹¹⁵ Ceci laisse supposer une plus grande variété de délocalisations électroniques possibles au sein de la structure aromatique du noyau **BP**. En effet, ils ont été capables de caractériser par spectrométrie de masse, trois adduits issus très probablement du biradical **BP $\cdot\cdot$** . Il est à noter qu'une irradiation supérieure à 3 min engendrait la dégradation de l'adduit formé à partir de la position phénylique (Figure 87).¹¹⁵

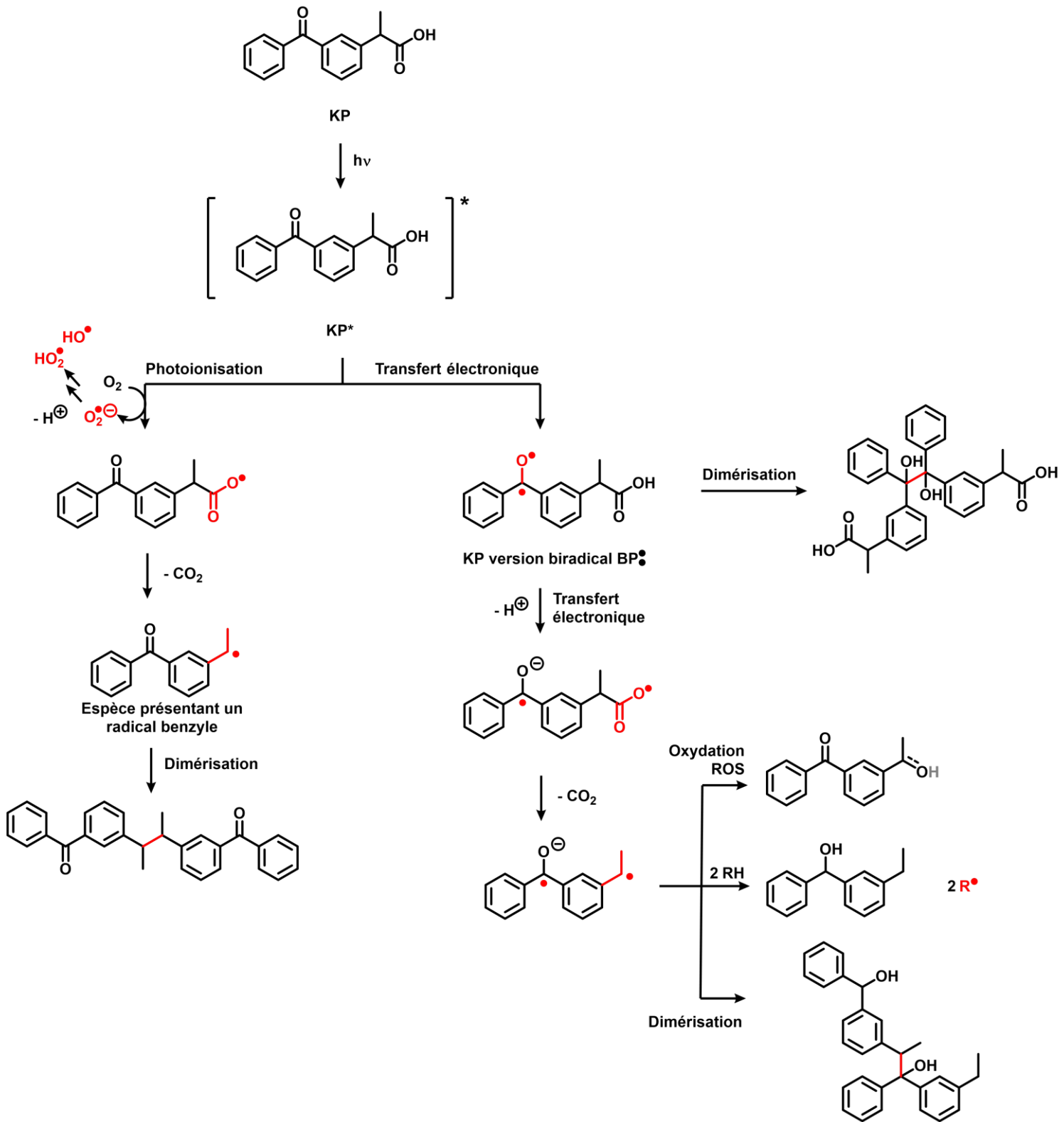


Figure 86 : Photo-dégradation du **KP** menant à la formation de radicaux potentiellement capables de dimériser en rouge

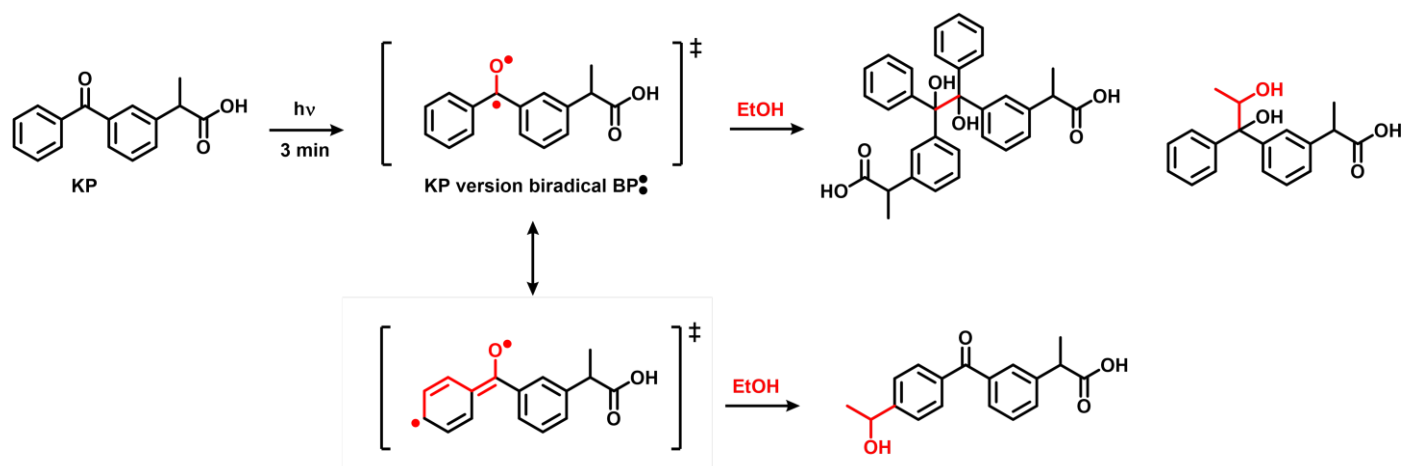


Figure 87 : Produits issus de la photo-excitation du **KP** dans de l'éthanol et proposition d'un schéma réactionnel impliquant des intermédiaires radicalaires

Il est intéressant de noter qu'il a été mis en évidence par les dermatologues que suite à la photosensibilisation de patients au **KP**, ces mêmes patients peuvent développer dans certains cas une photo-allergie dite « croisée » à d'autres allergènes.¹¹⁷ C'est-à-dire qu'un patient sensibilisé au **KP** réagit aussi à ces substances sans jamais y avoir été exposé. Ce sont, entre autres, les travaux de Le Coz *et al.* qui ont mis en évidence cette réaction croisée *via* l'utilisation de photo-tests épicutanés (*photo-patch test*).¹¹⁶ Parmi les molécules identifiées on peut citer d'autres composés possédant un cœur **BP** photo-actif comme l'oxybenzone (**OBZ**) et indirectement l'octocrylène (**OCT**, *cf.* Chapitre 3, Partie 1.1.3, p. 140), ainsi que des dérivés propioniques tels que l'acide tiaprofénique ou le suprofène (Figure 88). Ces derniers (*i.e.*, **OCT**, tiaprofène et suprofène) possèdent un cœur relativement proche à la **BP**, pouvant toujours être photo-actif dû à la forte délocalisation sur le noyau aromatique.^{115,116} Néanmoins, de façon intéressante Le Coz *et al.* soulignent que cette réactivité croisée semble être indépendante de la partie acide propionique des molécules. En effet, les patients ne montrent aucune PADC croisée entre le **KP** et l'ibuprofène, le fénoprofène, l'alminoprofène ou encore le flurbiprofène.¹¹⁶

Ces différentes observations suggèrent qu'un cœur photo-actif de type **BP** au sein de la structure de ces photo-allergènes soit responsable de la PADC croisée.

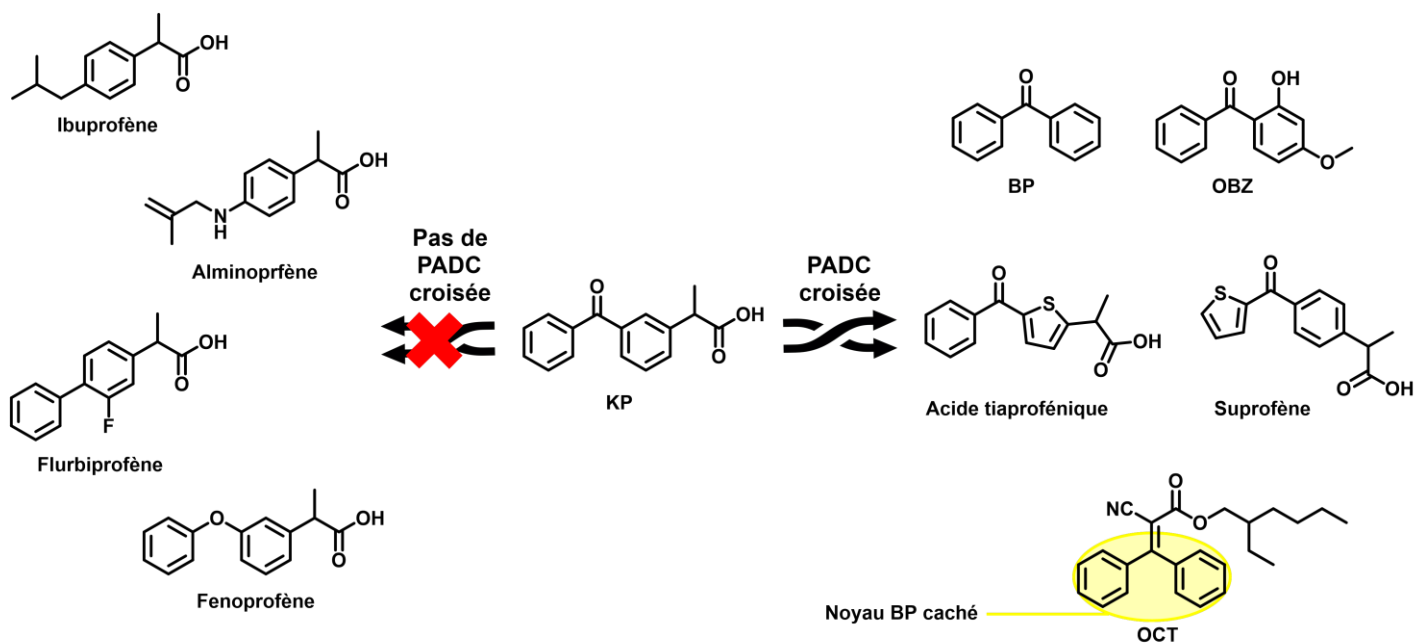


Figure 88 : Composés possédant des similitudes structurales avec le **KP** reconnu (droite) ou non (gauche) pour leur aptitude à induire une PADC croisée

1.1.3. L'octocrylène (OCT) et l'oxybenzone (OBZ), les filtres solaires

Dans ce contexte notre approche expérimentale initiée et décrite précédemment apparaît des plus pertinentes pour l'étude de l'**OCT** et l'**OBZ**. Ces deux molécules sont largement utilisées comme filtres solaires vue leur aptitude à absorber les UV. De fait, elles sont largement présentes dans la formulation de nombreuses crèmes solaires, et de par leur fonction se retrouvent fréquemment exposées au soleil. Concrètement, la photosensibilisation antérieure d'un individu à un dérivé sensibilisant analogue (e.g., le **KP** suite à un traitement médicamenteux) peut devenir handicapant lorsque l'individu s'expose au soleil après application de crème solaire.^{114,116,173}

L'**OCT** ne possède pas *per se* un noyau **BP**, mais possède une double liaison reliant une fonction nitrile et une fonction ester d'octanyle. Il demeure que c'est cette structure analogue à celle de la **BP** qui est soupçonnée d'être responsable des réactions photo-allergiques croisées.¹¹⁶ Lors de sa dégradation, l'**OCT** est capable de produire de la **BP** par coupure oxydante de sa double liaison ou par hydrolyse suivie d'une rétro-aldolisation (Figure 89).¹¹⁸ En d'autres termes, l'**OCT** photo-exposé donne-t-il la même signature radicalaire que la **BP** ? D'autre part, l'implication d'intermédiaires radicalaires après photo-excitation de l'**OCT** peut-elle être remise en cause du fait du caractère aromatique de la molécule, associé aux propriétés de photo-absorption ?

A contrario, l'**OBZ** est un composé directement dérivé de la **BP** possédant une fonction méthoxy et une fonction hydroxyle de type phénol sur l'un de ses cycles aromatiques (Figure 88). La présence de ces groupements électrodonneurs favorise la production du biradical **BP^{••}**.

L'étude de cette molécule permettrait ainsi d'apporter des informations pouvant se corrélérer directement avec la **BP** et par conséquent expliquant l'origine de la PADC croisée.

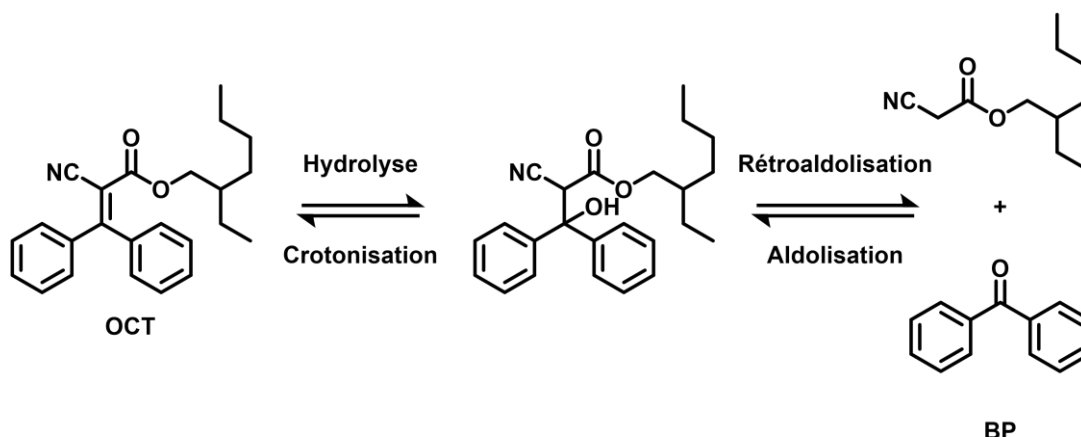


Figure 89 : Schéma proposé de *rétro-aldolisation* de l'**OCT** menant à la formation de **BP**

1.2. L'objectif : étude des systèmes photo-exposés

L'objectif de cette partie du travail a été de sonder l'aptitude de la **BP**, du **KP**, de l'**OCT** et de l'**OBZ** à générer des espèces radicalaires lorsqu'exposés au soleil. Ainsi, de la même manière que lors du Chapitre 2, ces études portent sur des analyses RPE-*spin trapping* en solution irradiée à l'aide du simulateur solaire, élargies à l'utilisation des RHE. Dans ces deux approches expérimentales, le simulateur solaire Oriol Sol 3A (décrit Chapitre 2) est utilisé afin de simuler une exposition au soleil lorsque la peau est préalablement exposée à ces molécules. Le reste de la procédure reste identique à celle décrite dans le Chapitre 2 que ce soit en solution ou dans des RHE, adaptant simplement les temps d'irradiation ou les concentrations en substrat (Figure 90).

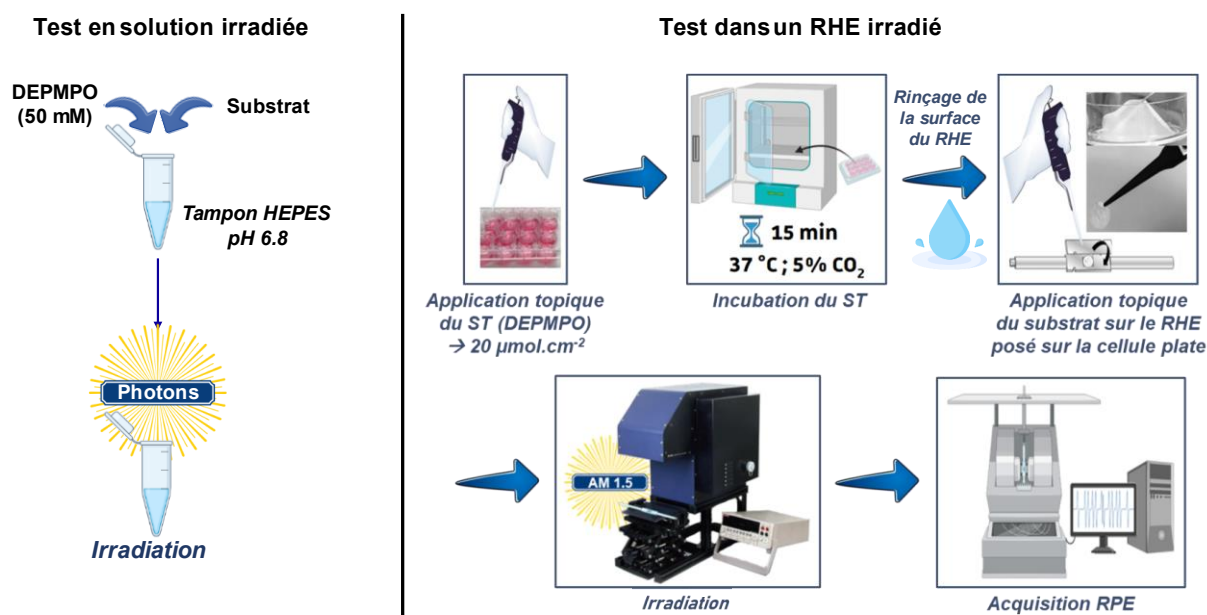


Figure 90 : Description schématique illustrant les modes opératoires pour la préparation de l'échantillon en solution irradié (gauche) ou pour le RHE irradié (droite)

2. Résultats et discussion

2.1. Étude de la BP par RPE-*spin trapping*

2.1.1. En solution

Le **DEPMPO** ainsi que la **BP** ont été mis en solution dans un tampon HEPES (10 mM, pH 6.8). Le milieu a été « exposé au soleil » initiant la formation de radicaux et, en conséquence, d'adduits de spin avec le **DEPMPO** permettant leur détection et leur identification par RPE.

De manière surprenante, les tests en solution ne montrent pas de formation de signature paramagnétique et donc d'adduits de spin issus du piégeage de radicaux oxygénés et/ou carbonés. Des acquisitions ont été effectuées à différents temps d'exposition à la lumière jusqu'à une durée maximale d'irradiation de 30 min dans le but de pouvoir identifier la formation potentielle d'adduits en fonction du temps. L'acquisition RPE a donc été réalisée après 30 sec, 1 min, 2 min, 3 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min et 30 min d'irradiation. Aucun spin-adduit n'a été observé dans ces conditions.

Plusieurs explications peuvent être proposées : (i) Il est possible d'imaginer que la **BP** puisse se dégrader sous l'effet de la lumière formant des dimères diamagnétiques *via* des intermédiaires radicalaires, avant même leur réaction avec le **DEPMPO** ; (ii) l'approche en solution peut être trop minimaliste et suite à sa photo-excitation la **BP** a besoin d'un élément ou facteur supplémentaire non-présent dans la solution, n'initiant donc pas de formation radicalaire ; (iii) la dernière hypothèse serait qu'aucun radical ne se forme.

2.1.2. Dans des RHE

Afin de vérifier si les observations faites en solution restent vraies au plus près d'un scénario d'exposition réel à ces photo-allergènes, une étude RPE-*spin trapping* a été menée avec des RHE en présence de **BP** suivie d'une irradiation. La concentration de ST appliquée est identique à celle utilisée lors des études décrites dans le Chapitre 2. Une dose de 2,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$ de **BP** a été appliquée topiquement aux épidermes, équivalente à celle utilisée lors des photo-patch tests au **KP** (1% dans le pétrolatum).¹⁵³

Contrairement aux études en solution, l'expérimentation faite sur les RHE sous irradiation a permis l'obtention d'une signature RPE montrant la formation d'un adduit de spin. Malgré un rapport signal sur bruit (S/N) modeste, une simulation du spectre expérimental a pu être réalisée après une exposition de 5 min conduisant aux *hfccs* : $a_H = 13,1 \text{ G}$; $a_N = 14,0 \text{ G}$ et $a_P = 47.1 \text{ G}$, caractéristiques d'un radical oxygéné de type d'hydroxyle (HO^\bullet) (Figure 91).^{146,174}

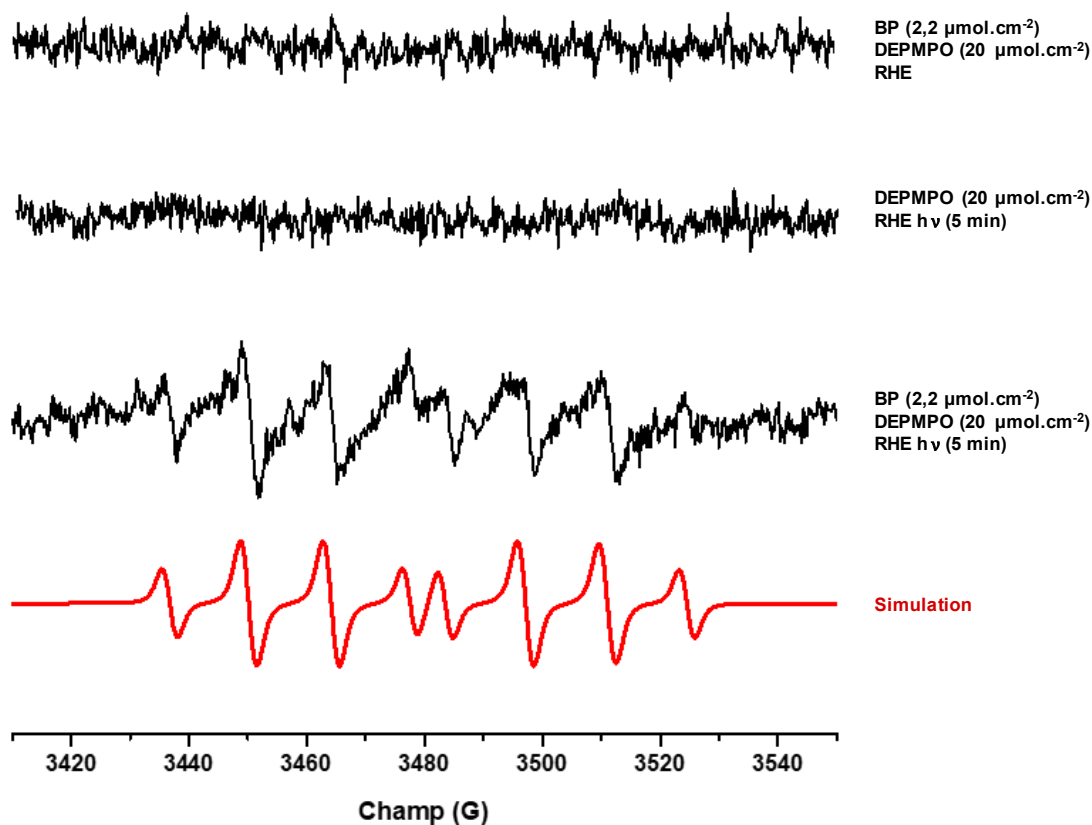


Figure 91 : Simulation globale (spectre rouge, caractéristique d'un spin-adduit issu du piégeage d'un radical ROS de type HO^\bullet : $g = 2,0058$; $a_{\text{H}} = 13,1 \text{ G}$; $a_{\text{N}} = 14,0 \text{ G}$ et $a_{\text{P}} = 47.1 \text{ G}$) du spectre de RPE expérimental dans un RHE obtenu pour la **BP** ($2,2 \mu\text{mol.cm}^{-2}$) en présence de **DEPMPO** ($20 \mu\text{mol.cm}^{-2}$) après 5 min d'irradiation

La présence de ROS de type HO^\bullet semble corroborer l'hypothèse émise précédemment sur l'approche paraissant comme trop minimaliste des études en solution, et la nécessité d'un autre paramètre pour détecter un adduit de spin. Il est connu que l'exposition prolongée de la peau à la lumière solaire forme des ROS, non-visibles dans notre étude lors de l'expérience de contrôle sans **BP**.^{107,110} Ainsi, l'irradiation du modèle en présence de **BP** semblerait favoriser la production de ROS. Ceci dit, la simple production de ROS comme le radical HO^\bullet ne peut à elle seule initier le mécanisme immunitaire de la PADC. Elle peut être néanmoins impliquée dans des événements dermatologiques produits par la **BP** sur une peau exposée au soleil.

2.2. Étude du KP par RPE-*spin trapping*

2.2.1. En solution

Du fait de ses multiples délocalisations radicalaires, le **KP** est le cas le plus complexe parmi les molécules étudiées dans ce chapitre (Figure 87).

Dans un premier temps, l'étude RPE menée en solution après irradiation dans un tampon HEPES (10 mM, pH 6,8) en présence de **DEPMPO** a permis l'obtention d'une signature spectrale et correspondant à la superposition de plusieurs adduits de spin. Après simulation et déconvolution du spectre expérimental, au moins deux adduits de spin ont été identifiés. Le premier système (spectre simulé bleu, Figure 92) semble mettre en évidence la présence d'un radical carboné ($a_H = 21,5 \text{ G}$; $a_N = 15,0 \text{ G}$; $a_P = 48,5 \text{ G}$)^{80,146}, tandis que le second système (spectre simulé vert, Figure 92) indique la présence d'un radical oxygéné ($a_H = 11,1 \text{ G}$; $a_N = 13,1 \text{ G}$; $a_P = 50,4 \text{ G}$)¹⁴⁶

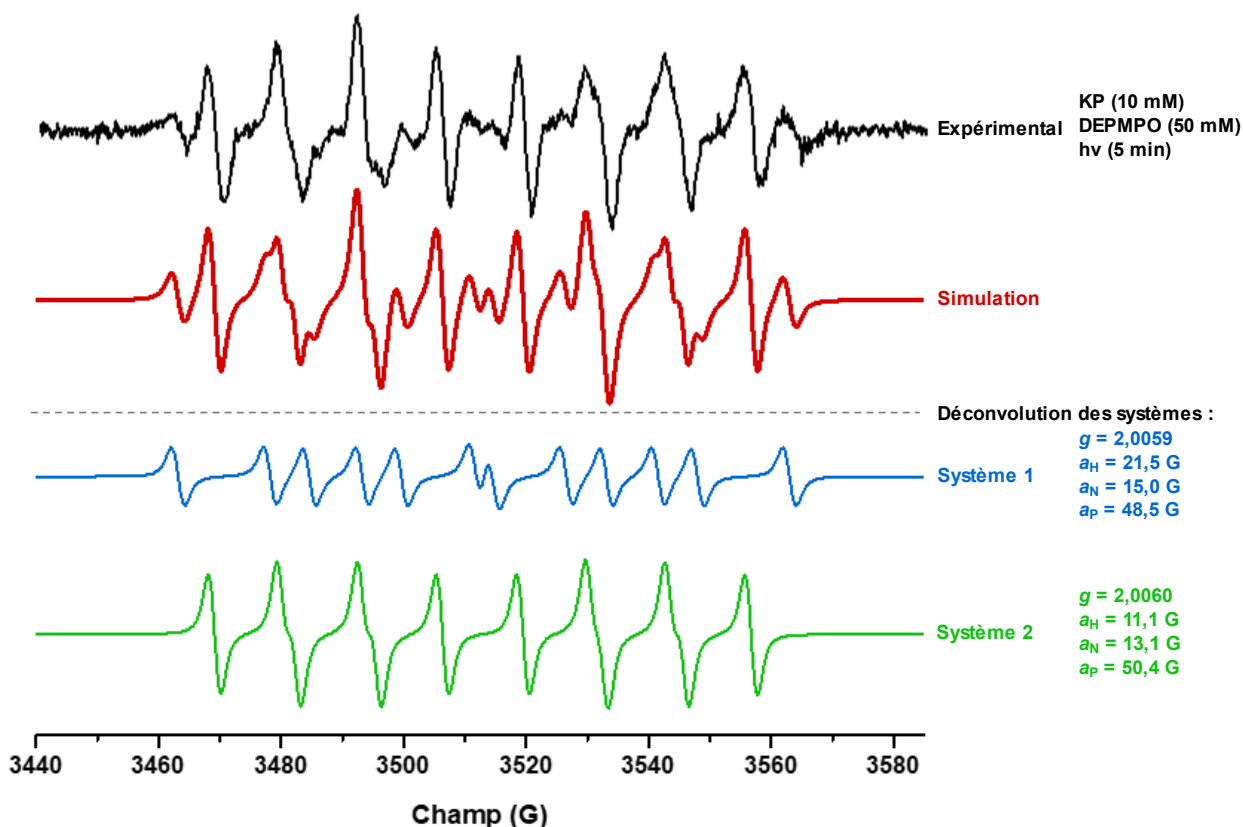


Figure 92 : Simulation globale (spectre rouge) et déconvolution (spectres bleu et vert) du spectre de RPE expérimental obtenu en solution avec le **KP** (10 mM) en présence de **DEPMPO** (50 mM) après photo-exposition (5 min)

Quand bien même ces résultats ne permettent pas de distinguer la nature exacte du radical carboné piégé (*i.e.*, fonction carbonyle et/ou porté par la position benzylique), c'est une introduction pertinente pour les études avec les RHE. D'autre part, la signature RPE de l'adduit de spin correspondant au piégeage d'un radical oxygéné est compatible avec un radical de type peroxyde (ROO^\bullet).¹⁴⁶ Ce dernier pourrait résulter de la production du radical anion superoxyde proposé comme étant un produit issu de la photo-dégradation du **KP** (Figure 86).

2.2.2. Dans des RHE

L'étude du **KP** au sein de RHE irradiés a mis en évidence des radicaux similaires à ceux observés en solution. En effet, après l'application de **KP** à une dose surface de $1,6 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$ (équivalente aux photo-patch tests à 1% dans le pétrolatum)¹⁵³ sur des RHE pré incubés avec du **DEPMPO**, et après 5 min d'irradiation : (i) un radical centré sur le carbone (spectre simulé bleu, Figure 93 ; $a_{\text{H}} = 21,1 \text{ G}$; $a_{\text{N}} = 14,6 \text{ G}$; $a_{\text{P}} = 47,3 \text{ G}$) et (ii) un radical centré sur l'oxygène de type ROO \cdot (spectre simulé vert, Figure 93 ; $a_{\text{H}} = 12,0 \text{ G}$; $a_{\text{N}} = 13,8 \text{ G}$; $a_{\text{P}} = 46,3 \text{ G}$) ont été détectés. Les variations des *hfccs* observées peuvent être attribuées à la différence d'environnement des adduits de spin générés.

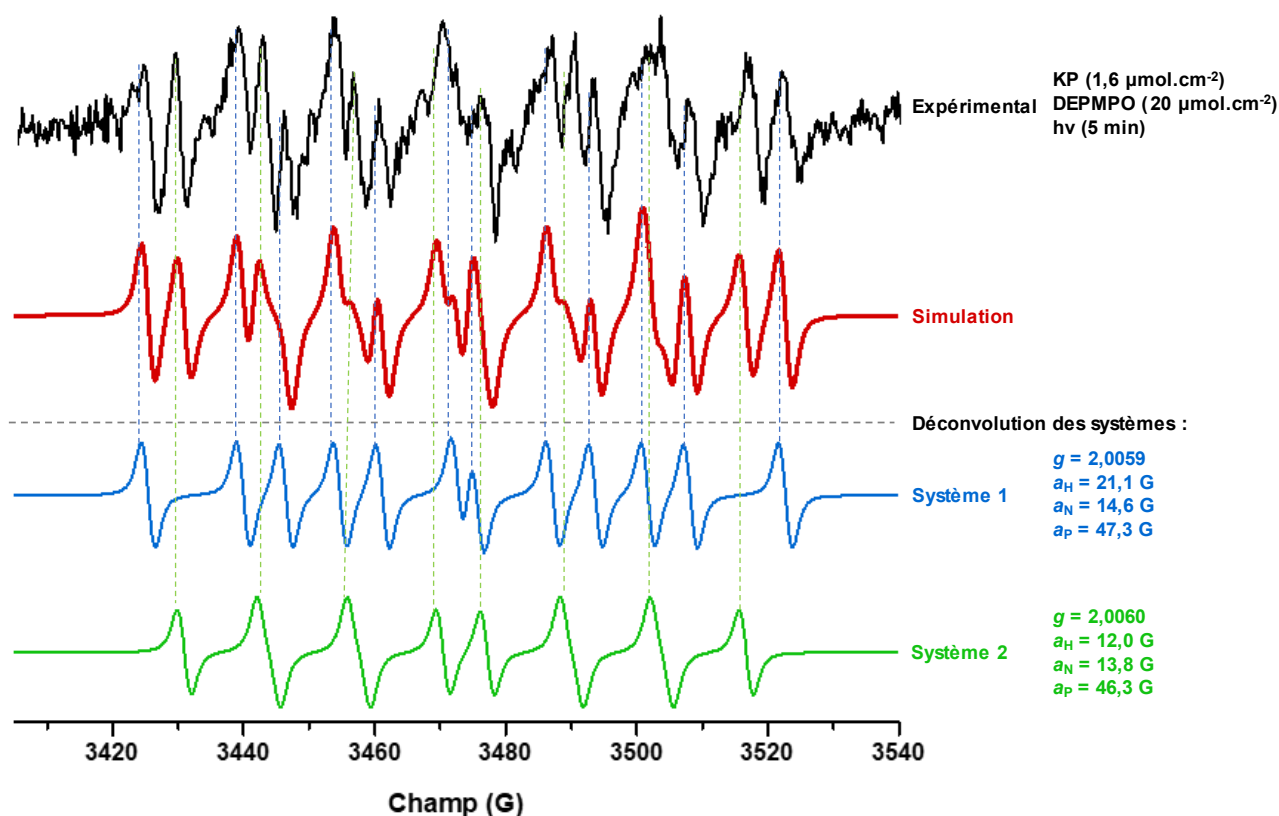


Figure 93 : Simulation globale (spectre rouge) et déconvolution (spectre bleu et vert) du spectre de RPE expérimental dans un RHE obtenu pour le **KP** ($1,6 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$) en présence de **DEPMPO** ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$) après 5 min d'irradiation

L'absence de radicaux carbonés dans le cas de la **BP** et la présence de radicaux carbonés dans le cas du **KP** peuvent laisser supposer que le radical carboné piégé n'est probablement pas porté par le noyau **BP** du **KP**. Par ailleurs, l'identification de radicaux oxygénés est compatible avec la photo-ionisation comme voie de photodégradation possible du **KP** (Figure 86). Elle conduit à la génération d'un radical centré sur le carbone de type benzylique. Pour confirmer ceci, une substitution de cette position au ^{13}C et la mise en évidence d'une nouvelle *hfcc* correspondante peut s'avérer des plus pertinente.

L'intermédiaire radicalaire centré sur le carbone (Système 1, Figure 93) est un candidat à l'initiation d'une PADC au **KP**. Une signature spectrale similaire obtenue avec les autres espèces (e.g., **OCT**, Figure 88) permettrait de justifier l'existence de la PADC croisée sans exclure qu'elle soit engendrée par un mécanisme indirect. En effet, les travaux de Karlsson *et al.*¹¹⁵ ont montré que le **KP** peut jouer un rôle de photosensibilisateur. En présence de dérivés d'acides aminés de type lysine et tryptophane il peut alors induire une réaction entre les deux acides aminés conduisant à la formation d'un complexe. Ce dernier peut être reconnu comme ne faisant pas partie du soi et déclencher la réaction du système immunitaire (Figure 94).¹¹⁵

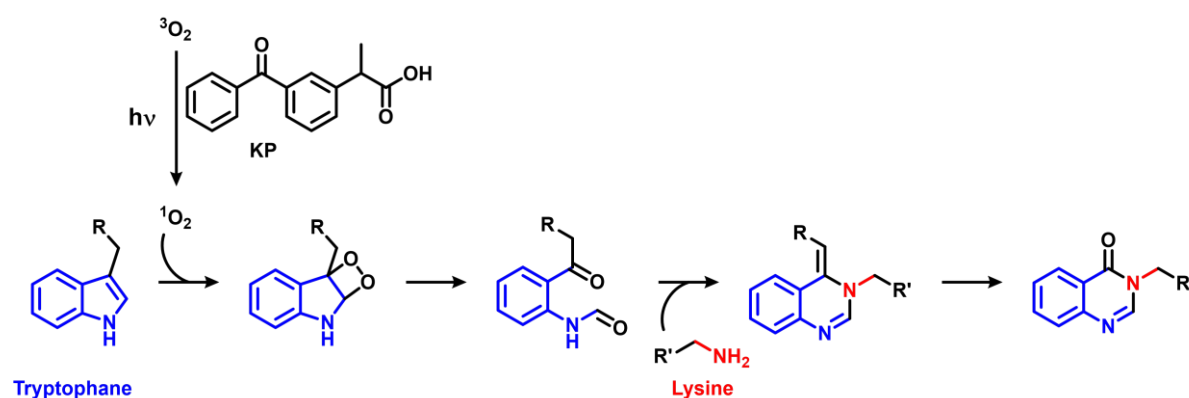


Figure 94 : Photo-réaction proposé par Karlsson *et al.* entre des résidus de type tryptophane (bleu) et de type lysine (rouge) soumis aux UV en présence de **KP**¹²

2.3. Étude de l'OBZ et de l'OCT par RPE-*spin trapping*

2.3.1. En solution

L'étude dans une solution HEPES (10 mM, pH 6,8) de l'irradiation des échantillons contenant de l'**OBZ** ou de l'**OCT** a montré des résultats bien différents pour ces deux filtres solaires. À l'instar de la **BP** et malgré de nombreuses tentatives à différents temps d'exposition et différentes concentrations d'**OBZ**, aucune signature spectrale n'a été obtenue. Dans le cas de l'**OCT**, une signature par RPE a été obtenue mais après un temps d'exposition plus long à la lumière relativement aux autres molécules étudiées. En effet, si aucune signature n'est visible après dix minutes d'exposition, un signal RPE apparaît après 15 min et c'est après 20 min d'illumination qu'il est clairement possible d'identifier au moins deux adduits de spin (Figure 95). L'un des deux tend rapidement à disparaître après des temps d'irradiation plus longs (30 min) (Figure 95).

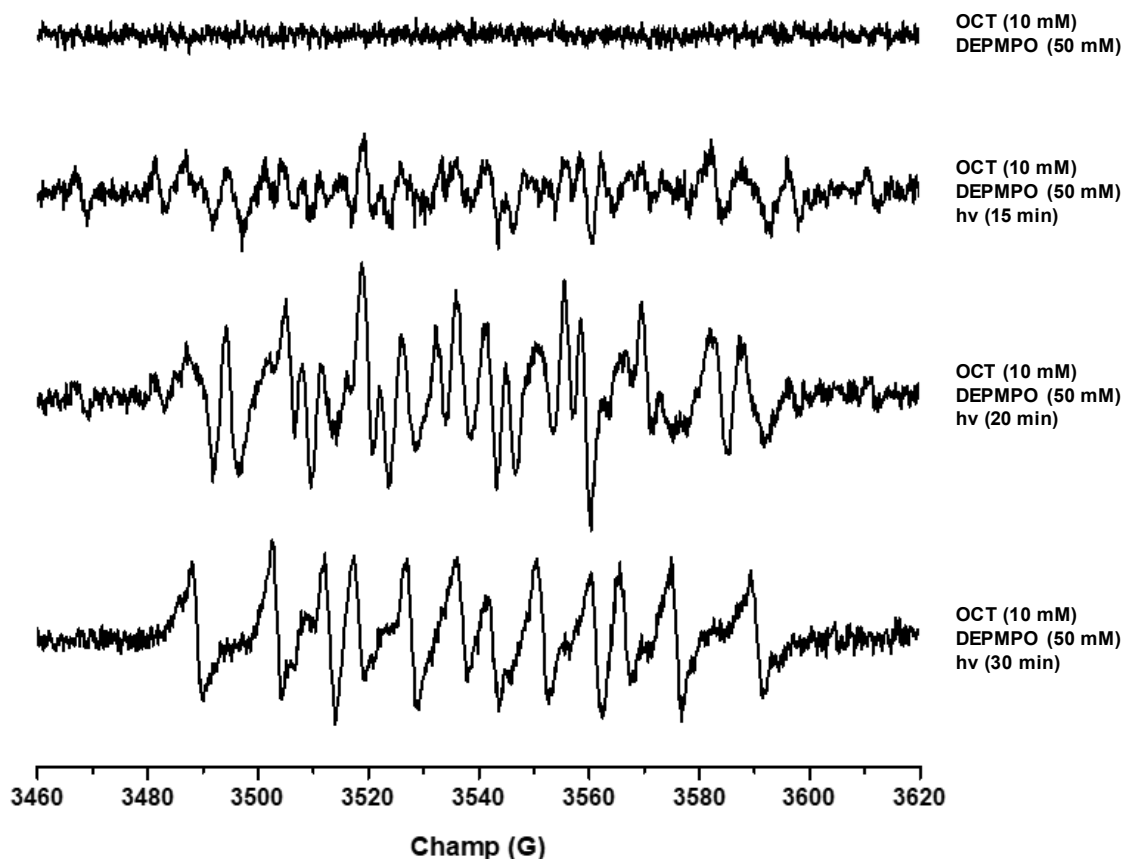


Figure 95 : Spectres de RPE-spin trapping de l'**OCT** (10 mM) en solution avec du **DEPMPPO** (50 mM) à différents temps d'irradiation

Afin de caractériser les espèces formées, une simulation du spectre expérimental à 20 min d'exposition solaire a été effectuée afin d'en faire une déconvolution des systèmes. Un radical carboné est clairement mis en évidence par son adduit de spin (spectre bleu, Figure 96 ; $a_H = 21,2 \text{ G}$; $a_N = 14,6 \text{ G}$; $a_P = 47,5 \text{ G}$) ainsi qu'un radical centré sur l'oxygène (spectre vert, Figure 96 ; $a_H = 12,4 \text{ G}$; $a_N = 14,0 \text{ G}$; $a_P = 47,7 \text{ G}$). Néanmoins, au moins un autre système est également visible, cependant nous n'avons pas été en mesure de le(s) simuler et le(s) caractériser correctement (croix, Figure 96).

Ces résultats préliminaires témoignent d'une réactivité différente pour les deux filtres solaires. Tandis que le comportement en solution de l'**OBZ** est similaire à celui observé avec la **BP**, l'**OCT** montre la production de radicaux carbonés suite à une photo-activation de la molécule.

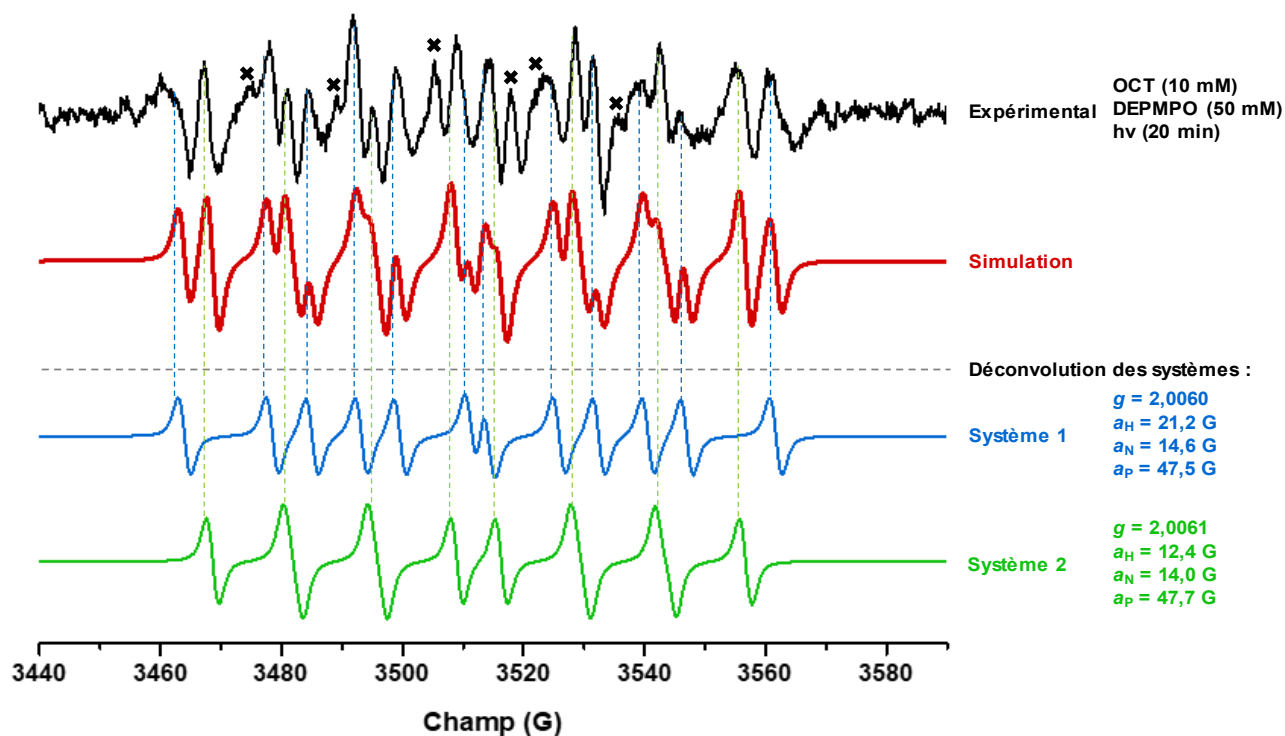


Figure 96 : Simulation globale (spectre rouge) et déconvolution (vert et bleu) du spectre RPE expérimental obtenu pour les RHE en présence d'**OCT** (10 mM) et exposé 20 min au spectre d'émission solaire en présence de **DEPMPO** (50 mM)

2.3.2. Dans des RHE

L'étude RPE-*spin trapping* dans des RHE irradiés n'a détecté aucune production radicalaire suite à l'application de l'**OBZ** dans des doses similaires à celles des photo-patch tests (10% dans le pétrolatum, correspondant à une dose par surface de $17,5 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$).¹⁵³ Ce résultat est surprenant s'il est comparé à la production potentielle de radicaux oxygénés que présente la **BP** dans des RHE irradiés, mais est en accord avec ce qui a été obtenu en solution.

Les expériences menées dans des RHE irradiés suite à l'application de l'**OCT** à une dose similaire aux photo-patch tests (10% dans le pétrolatum, soit une dose par surface de $11 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$)¹⁵³ donnent une signature RPE compatible avec celle obtenue en solution dans des proportions différentes (Figure 97, système 1 en bleu et système 2 en vert). Sur la base des seuls résultats des RHE il aurait été difficile de conclure attendu du très faible S/N, à la limite de la détection. L'analyse du spectre RPE a été néanmoins possible en se basant sur la signature précédemment obtenue en solution. Cela dit, certains signaux identifiables n'ont pas pu être attribués.

La caractérisation de radicaux centrés sur le carbone est compatible avec l'implication d'intermédiaires radicalaires dans la PADC à l'**OCT**. Cependant, des études plus approfondies sont nécessaires afin d'identifier l'espèce radicalaire mise en jeu (études DFT, substitutions

isotopiques). Aussi, ces analyses supplémentaires de calculs théoriques pourraient également nous éclairer sur les signaux correspondants au(x) système(s) non-identifiés.

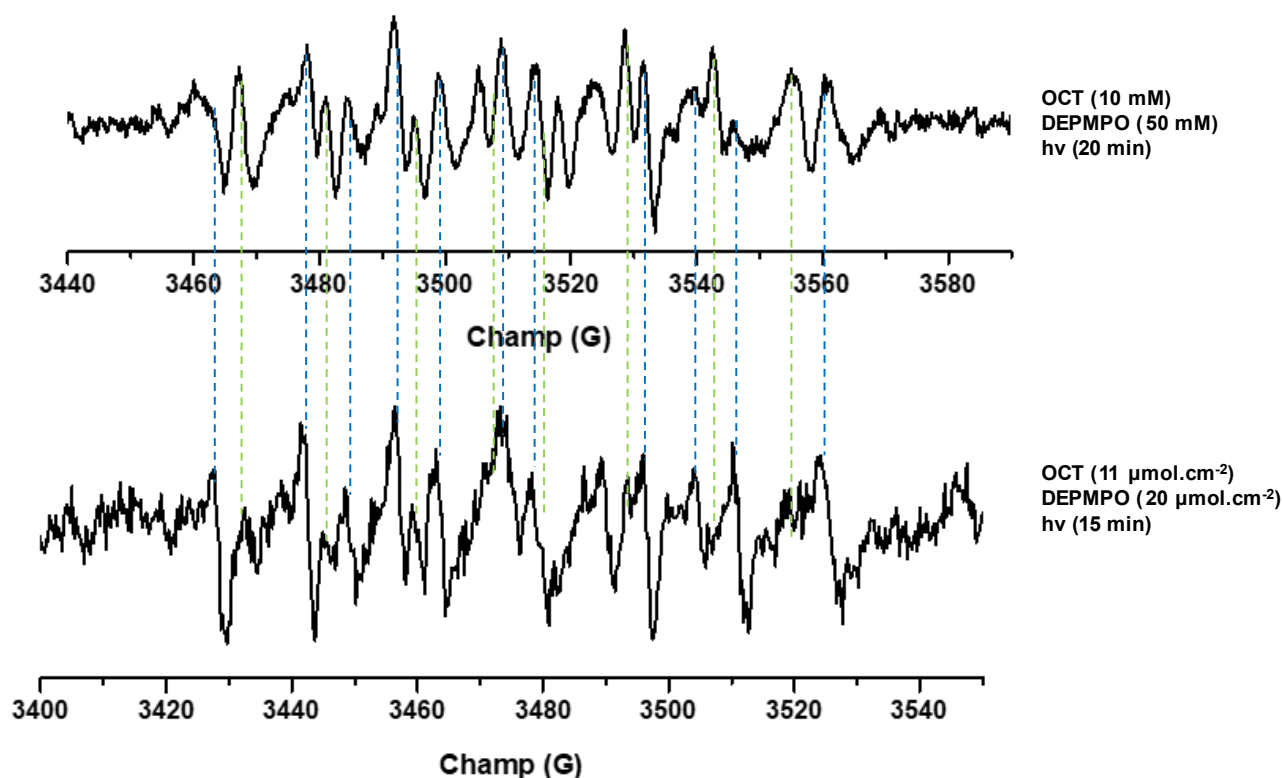


Figure 97 : Comparaison des spectres expérimentaux RPE-*spin trapping* de l'OCT en solution ou dans un RHE en présence de **DEPMPO**

3. Bilan

Cette étude a permis de valider notre approche expérimentale pour l'étude de la PADC. En effet, l'utilisation de RHE préalablement exposés à des molécules photo-actives en tandem avec l'utilisation d'un simulateur solaire a permis d'observer la formation d'espèces radicalaires au sein de l'épiderme, propres à la molécule étudiée.

Dans les conditions expérimentales utilisées, la capacité de la **BP** à générer des radicaux oxygénés a été mise en évidence dans les matrices épidermiques, *a contrario* des investigations menées en solution. L'approche en solution étant trop éloignée d'un scénario réel d'exposition par trop simpliste, un environnement cutané (RHE) semble ici nécessaire pour induire une photoréaction de la **BP**.

Le **KP** a montré sa propension à générer des radicaux oxygénés et carbonés dans des RHE à des temps d'exposition courts (quelques minutes). La partie **BP** du **KP** ne donnant pas des radicaux carbonés dans nos expériences, l'hypothèse que ceux-ci soient plutôt de type

benzyle pourrait être émise, *i.e.*, localisés sur le substituant propionique après décarboxylation. Cependant, cette hypothèse nécessite d'être validée en effectuant une substitution isotopique sur cette position.

De la même manière, la génération de radicaux carbonés et oxygénés au sein des RHE exposés au simulateur solaire et en présence d'**OCT** a été mise en évidence. Ces espèces radicalaires sont très similaires à celles identifiées en solution, mais elles ne sont détectables qu'après une exposition plus longue à la lumière (>10 minutes) comparé à ce qui est observé avec le **KP**.

Pour finir, aucun intermédiaire radicalaire n'a été détecté dans les études menées en présence d'**OBZ** quel que soit l'approche : en solution comme dans les RHE.

Pour conclure sur ces études très préliminaires, bien que n'ayant pas permis d'élucider l'origine de la réactivité croisée des molécules étudiées dans le cadre de la PADC, elles ont légitimé notre approche expérimentale quant à l'étude d'évènements dermatologiques photo-induits

Experimental part: Chapter 3

Materials & methods

Most of the procedures and materials were described in Chapter 2: preparation of HEPES buffer, Dispase II solution or **DEPMPO** ; the sunlight simulator used ; the RHE model used.

The target compounds (**BP**, **KP**, **OCT** and **OBZ**) were purchased from Sigma Aldrich®.

EPR acquisitions were performed at room temperature (295 K) with an EPR X-Band spectrometer (EMXplus, Bruker Biospin GmbH, Germany) equipped with a high sensitivity resonator (Bruker Biospin GmbH, Germany). The *g* calibration was performed using “strong pitch” Bruker standard (isotropic *g* factor of 2.0028). The spectrometer was operated at 9.87 GHz and the principal experimental parameters were: 10 scan accumulation, microwave power 5 mW in solution and 10 mW in RHE, modulation amplitude 2 G, sweep time 40 s. The EPR spectra were analyzed using simulation computed using labmade script based on Easyspin toolbox under Matlab (Mathworks) environment. The different figures were then made using OriginPro®.

General procedure for studies in solution

Stock solutions were prepared for **BP** (50, 100 or 250 mM in acetone), **KP** (50 mM in acetone), **OBZ** (50, 100 or 250 mM in acetone), **OCT** (50 mM in acetone) and **DEPMPO** (250 mM in HEPES (10 mM, pH 6.8)).

20 µL of spin-trap (**DEPMPO**) stock solution were mixed in an Eppendorf with 20 µL of target substrate (**BP**, **KP**, **OBZ** or **OCT**) stock solution. HEPES buffer (10 mM, pH 6.8) was added to the solution for a final volume completed to 100 µL. This way, final concentrations in the reaction mixture were 50 mM **DEPMPO** and 10, 20 or 50 mM of target compound. The reaction mixture was subjected to stirring, then the open Eppendorf was photo-exposed for different periods of time (min). The resulting mixture was further introduced into glass capillary tube (Hirshmann, 20 µL), sealed on both ends and EPR spectra registered.

General procedure for studies in RHE

The RHE (AlternaSkin™, Cell Alternativ, 0.6 cm²) were first treated systemically with a Dispase II solution (2.4 U.mL⁻¹) during 5 min. Then, the RHE was pre-treated with **DEPMPO** in dimethylsulfoxide/HEPES 1:1 (400 mM, 30 µL) and incubated during 15 min (37 °C, 5 % CO₂). After this time, pre-treated RHE was taken out from the insert and washed in a bath of HEPES before being placed in an EPR tissue cell equipped with a silica window (Willmad, #ER162TC-

Q). The target substrate was then topically applied (30 μL in acetone) with a concentration depending on the compound to get the same dose per area used in the photo-patch tests: 44 mM for **BP** ($2.2 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$), 32 mM for **KP** ($1.6 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$), 350 mM for **OBZ** ($17.5 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$) and 220 mM for **OCT** ($11 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$). The EPR tissue cell was then closed, sealed and EPR spectra recorded initially without photo-exposition (t_0 , blank), and after each illumination time.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Contexte

L'eugénol et l'isoeugénol sont deux alkoxyphénols présents dans de nombreuses huiles essentielles des plantes capables de les biosynthétiser et en sont les principaux agents odorants et gustatifs. Ils sont utilisés dans de nombreux secteurs industriels en tant que fragrances (e.g., cosmétique, aromathérapie, parfumerie...).⁴⁻⁸ En plus de ces propriétés, ces deux composés sont caractérisés pour (i) leurs propriétés antioxydantes-cytoprotectrices (e.g., contre les pathogènes alimentaires¹²), mais aussi (ii) leurs activités prooxydantes-cytotoxiques bien connues des dermatologues spécialisés en allergie de contact, ce qui contraint l'industrie à étiqueter leur présence sur les produits cosmétiques et parfumés.^{13,14}

L'allergie de contact demeure aujourd'hui une pathologie dont souffre près d'une personne sur cinq vis-à-vis d'au moins un allergène cutané. Cette expression d'immunotoxicité est considérée comme étant la plus fréquente chez l'Homme.^{65,66} L'allergie de contact représente donc un vrai problème de santé publique, car elle impacte de façon significative la qualité de vie des travailleurs ou des usagers exposés aux espèces sensibilisantes. La prévalence de cette pathologie incurable tendant toujours à augmenter, il est primordial de comprendre et prédire le potentiel sensibilisant des produits chimiques avant leur mise sur le marché.

Dans le cas de l'eugénol et de l'isoeugénol leur noyau de type alkoxyphénol est probablement à l'origine de leurs propriétés cytotoxiques, dans certains cas dérivées de leur action antioxydante. En effet, il est connu des composés phénoliques de pouvoir être oxydés en radical phénoxy (PhO^\bullet) en réduisant d'autres radicaux libres (action antioxydante). Historiquement, c'est la forme finale d'oxydation des alkoxyphénols (*i.e.*, quinone ou méthylène quinone) qui a été incriminée comme étant responsable de leur toxicité. Cependant, ces dérivés phénoliques se sont avérés capables de réagir au travers d'intermédiaires radicalaires, notamment dans le cas de la formation de lignines.^{51,52} En effet, l'électron non-apparié du radical PhO^\bullet peut se délocaliser au sein du noyau aromatique et des chaînes conjuguées formant ainsi divers intermédiaires radicalaires carbonés. Ces radicaux sont susceptibles de réagir avec des protéines de la peau pour former un complexe antigénique enclenchant la réponse d'immunotoxicité cutanée caractérisant l'allergie de contact.

L'objectif de ce travail de thèse a donc visé à allier la compréhension de la réactivité antioxydante en établissant des frontières menant à l'action cytotoxique et allergisante des molécules. Pour ce faire, l'investigation de la formation d'intermédiaires radicalaires réactifs dans la peau dans des conditions conventionnelles d'exposition et propices à leur formation (e.g., milieu oxydant, système métabolique, photo-exposition...) a été menée.

Synthèse et conclusions

La première étape de notre démarche expérimentale a été de synthétiser les molécules d'intérêt, l'eugénol et l'isoeugénol, contenant des substitutions au ^{13}C sur des positions sélectionnées à partir d'études bibliographiques et de calculs de DFT. Ces positions sont à même de porter l'électron non-apparié réactif après délocalisation électronique du radical PhO^{\bullet} . Les positions suivantes ont ainsi été mises en exergue : (i) la position méthoxyle, (ii) la position *ortho*- non-quaternaire (6-C) et (iii) la position conjuguée sur la fonction propénylique de l'isoeugénol (β -C). Néanmoins, la position benzylique de l'eugénol (α -C) et la position *para*- des deux molécules restent deux cibles éventuelles dont le développement de la stratégie de synthèse menant à la substitution au ^{13}C a été effectué. Cette approche permet une caractérisation circonstanciée de l'intermédiaire radicalaire par RPE¹¹¹ ou spectrométrie de masse.

La production de l'eugénol et de l'isoeugénol substitués au ^{13}C sur les positions méthoxyles (**($^{13}\text{C-MeO}$)-Eug** et **($^{13}\text{C-MeO}$)-IsoEug**), ainsi que la synthèse de l'isoeugénol substitué au ^{13}C sur la position propényle (**β -(^{13}C)-IsoEug**) ont pu être effectuées sans difficulté notable. *A contrario*, le développement de la synthèse permettant l'insertion d'un ^{13}C au sein de la position *ortho*- n'a pas été concluante. Seul le motif commun de type guaiacol a été synthétisé contenant une substitution isotopique sur les deux positions *ortho*- (**2,6-(^{13}C)-guaiacol**) afin de constituer un « motif de référence ». Cependant, un mélange a été obtenu contenant en plus de la molécule cible ce qui pourrait être son isotopomère (**1,3-(^{13}C)-guaiacol**). C'est donc ce mélange, dont la purification a été limitante, qui a été utilisé lors de nos études.

Pour la seconde étape de ce travail de thèse, nous avons cherché à étudier le comportement radicalaire des molécules cibles commerciales afin de les comparer aux analogues isotopiques mentionnés précédemment. Cette partie s'est ainsi consacrée à l'évaluation et la caractérisation de radicaux libres réactifs formés à partir des molécules cibles. Différents environnements se rapprochant progressivement des conditions réelles d'exposition ont été évalués. Puis, nous nous sommes interrogés sur la possible réactivité des intermédiaires radicalaires observés sur des acides aminés interlocuteurs privilégiés de la biochimie radicalaire peptidique.

En préambule, des études RPE-*spin trapping* à l'aide de **DEPMPO** ont été effectuées en solution et en utilisant deux modes d'initiation radicalaire distincts. Le premier est un système oxydant enzymatique HRP/ H_2O_2 permettant de mimer les peroxydases présentes *in vivo*. Ce binôme est connu pour réagir avec les dérivés phénoliques menant au radical PhO^{\bullet} avant toute autre délocalisation électronique.^{141,142} Le second se base sur l'apport d'énergie par exposition

du système au « Soleil » en utilisant un simulateur solaire normalisant son spectre d'émission et irradiance à la surface de la Terre. Ces deux systèmes ont mis en évidence à partir de l'eugénol, de l'isoeugénol ou encore du guaiacol, la génération d'au moins deux types de spin-adduit : (i) un issu du piégeage d'un radical centré sur le carbone et (ii) un autre compatible avec un radical centré sur l'oxygène et possédant des *hfccs* similaires à celles d'un radical peroxy (ROO^{\bullet}).⁸⁰ Cette signature de RPE a pu ainsi servir de référence en vue d'un transfert de procédure expérimentale sur des épidermes humains reconstitués (RHE).

L'approche RPE-*spin trapping* au sein des RHE n'a pas permis de mettre en évidence la production d'intermédiaires radicalaires induits par l'eugénol, l'isoeugénol ou le guaiacol contrairement à ce qui avait été observé avec des hydroperoxydes de terpènes allyliques.^{80,109} L'introduction d'un *stimulus* dans l'environnement épidermique a été nécessaire. Ceci s'est traduit expérimentalement par (i) un « dopage » du RHE avec de la HRP, pour compléter l'aspect enzymatique des modèles d'épiderme utilisés, ou (ii) une photo-initiation par exposition des RHE à la lumière du simulateur solaire en présence des composés cibles. Avec ces deux approches, nous avons identifié une signature RPE similaire à celle observée en solution pour l'eugénol et l'isoeugénol. Le guaiacol, par contre, a eu le même comportement dans les RHE photo-exposés uniquement. L'incorporation de la HRP comme la photo-exposition n'ont pas montré de signes de dégradation du modèle de RHE validant ainsi nos deux approches. Conséquemment nos études ont mis en lumière la dualité de ces molécules comme pro- ou pré-haptène selon les conditions nécessitant une activation enzymatique ou photo-induite, respectivement.

Les analyses RPE-*spin trapping* avec les analogues substitués n'a pas permis de montrer de nouvelle *hfcc* témoignant de la réactivité des positions carbonées substituées au ^{13}C , excluant *a priori* le méthyle de la fonction méthoxyle ainsi que le carbone conjugué de la fonction propénylique pour l'isoeugénol ($\beta\text{-C}$). Dans le cas du guaiacol, les positions 1-C, 2-C, 3-C et 6-C peuvent également être écartées, mais si les positions *ortho*- (*i.e.*, 2-C et 6-C) ne semblent pas réactives, elles peuvent l'être dans le cas de l'eugénol et de l'isoeugénol. Structuellement similaire, le guaiacol ne possède pas de substituant en *para*- limitant par effet stérique la réactivité de cette position (4-C). Même si, comme pour l'eugénol et l'isoeugénol, les calculs DFT menés sur le guaiacol ont montré que cette position porte la plus grande densité électronique après génération du radical PhO^{\bullet} , la présence d'un substituant en *para*- semble être déterminante. Le carbone *ortho*- (6-C) de l'eugénol et de l'isoeugénol demeure notre principal suspect car il présente la plus grande valeur de densité électronique pour un carbone non-quaternaire. Aussi, le carbone 6-C est aromatique au même titre que le carbone *para*- (4-C) du guaiacol proposant un « environnement équivalent à la sonde » pouvant expliquer les similitudes de signature RPE entre les différentes molécules commerciales.

De manière intéressante, les analyses RPE-*spin trapping* de l'eugénol et de l'isoeugénol au sein de RHE enrichi avec de la HRP sans ajout de H₂O₂ ont permis d'identifier la formation de radicaux oxygénés (compatibles à des peroxydes) laissant supposer une production de ROS. Des études de RPE-*spin scavenging* ont été effectuées au sein des RHE sans activation, montrant l'aptitude de l'isoeugénol à produire des ROS de manière extracellulaire dans cette matrice cutanée. Cette propriété n'a pas été mise en évidence dans le cas de l'eugénol et pourrait être une base d'explication vis-à-vis de la différence de cytotoxicité que possède l'isoeugénol par rapport à l'eugénol.¹⁴

La réactivité de l'eugénol et l'isoeugénol avec des acides aminés susceptibles de réagir par voie radicalaire a également été évaluée par spectrométrie de masse. Le tryptophane et la cystéine, connus pour réagir au travers de mécanismes radicalaires, ont notamment réagit avec les deux composés. Les adduits observés ont été validés par la variation de 1 de la valeur de *m/z* lorsque les molécules contenant une substitution au ¹³C ont été utilisées.

Suite à l'approche expérimentale de photo-irradiation décrite ci-dessus, la troisième partie de ce travail s'est centrée sur l'étude de la photo-allergie de contact. La méthodologie de RPE-*spin trapping* sous illumination a été adaptée pour l'étude de photo-allergènes. Ainsi, des molécules photo-actives connues pour être impliquées dans des allergies croisées et possédant un noyau photo-actif de type benzophénone ont été sélectionnées : la benzophénone, le kétoprofène, l'oxybenzone et l'octocrylène.¹⁶

Il a été montré que ces quatre composés ne réagissent pas de la même manière vis-à-vis d'une production d'intermédiaires radicalaires dans une matrice cutanée photo-exposée. La benzophénone produit un signal provenant d'un radical oxygéné seulement dans les RHE irradiés, et non pas en solution. Lorsque ce résultat a été comparé à deux autres benzophénones différemment substituées (*i.e.*, le kétoprofène, substitué d'une fonction acide propionique, et l'oxybenzone, substituée des fonctions hydroxyle et méthoxyle) les résultats obtenus sont très éclectiques. L'oxybenzone ne montre aucune signature RPE quel que soit la matrice irradiée utilisée. *A contrario*, le kétoprofène montre une production d'intermédiaires radicalaires carbonés et oxygénés induite par la lumière en solution et reproductible dans les RHE avec des temps d'illuminations courts (*ca.* 5 min). De la même manière, pour l'octocrylène les signatures RPE obtenues après photo-exposition ont montré la production de radicaux carbonés et oxygénés avec des temps d'exposition plus longs (*ca.* 20 min) que pour le kétoprofène. Il a été proposé dans la littérature que la dégradation de l'octocrylène par retro-aldolisation conduit à la libération de benzophénone, responsable de sa cytotoxicité.¹⁸ Cependant, nos études ont montré que des espèces réactives carbonées sont photo-induites

par l'octocrylène contrairement à la benzophénone. Ceci implique que la photoréactivité de ces photo-allergènes est bien plus complexe et nécessite d'études plus approfondies.

Perspectives

Afin de finaliser les études de réactivité radicalaire des deux composés cibles, il serait intéressant d'optimiser et d'effectuer les dernières synthèses des isotopomères d'intérêts. Aussi, il serait intéressant d'effectuer d'autres études valorisant ces synthèses de substitution au ^{13}C . L'une de ces études pourrait se porter sur la réactivité avec les acides aminés suivie par RMN-HRMAS (*high resolution magic angle spinning*) au sein des RHE, comme il a été récemment montré pour la paraphénylènediamine.⁹¹ Une autre, serait d'effectuer une étude par RPE impulsionnelle (ESEEM/HYSCORE) des spin adduits obtenus après *spin trapping* dans les modèles utilisés précédemment. Cette approche permet de sonder les couplages plus faibles qu'en *cw*-RPE (et donc des distances plus grandes) entre l'électron non-apparié et le noyau ^{13}C . Une dernière approche serait d'utiliser la RPE en combinaison avec la spectrométrie de masse afin d'élucider plus précisément la structure moléculaire des espèces réactives formées.

D'un autre côté, l'enrichissement des RHE avec de la HRP pour compléter leur métabolisme ouvre une porte vers de nouvelles opportunités de complexification des modèles alternatifs utilisés (*e.g.*, insertion de nouvelles enzymes). Par ailleurs, l'incorporation de la HRP dans les RHE prouve de la capacité de l'eugénol et de l'isoeugénol à pouvoir agir comme pro-haptènes. Ce modèle pourrait, en conséquence, apporter des informations sur la nature potentielle en tant que pro-haptène d'autres molécules allergisantes.

De la même manière, les études avec des RHE exposés à la lumière d'un simulateur solaire ont illustré une nature possible de pré-haptène des composés cibles. Cependant, ces études devraient être optimisées en jouant sur plusieurs paramètres expérimentaux tels que le contrôle de la température du milieu (augmentant légèrement par effet de l'irradiation), la possibilité d'irradier *in situ* la cavité du spectromètre RPE, des mesures de cinétiques en modulant d'avantage les temps d'irradiation, l'utilisation de mélanges (molécules pouvant réagir en concert), etc... Enfin, il serait important d'évaluer par exposition au « Soleil » le comportement de molécules sensibilisantes dont le mécanisme d'hapténisation n'est pas bien compris. Peut-être des résultats surprenants mettant en jeu des espèces radicalaires pourraient être dévoilés. Les études de photo-exposition menées en solution et dans des RHE, y compris celles très préliminaires conduites avec des photo-allergènes connus, ouvrent la voie vers une nouvelle thématique de recherche visant à comprendre les pathologies dermatologiques photo-induites.

En parallèle, les études de RPE-*spin scavenging* ont mis en évidence la production de ROS à partir de l'eugénol et de l'isoeugénol. Cependant, les analyses ont été conduites dans des RHE sans *stimulus* supplémentaire. Il pourrait être donc intéressant de comparer les résultats obtenus avec ceux en utilisant un modèle épidermique irradié ou « dopé » enzymatiquement. Par ailleurs, seul le *spin scavenger* qui a permis d'obtenir des résultats reproductibles au sein des RHE est celui ne pouvant pas pénétrer dans les cellules. De cette façon, il serait intéressant de tester de nouvelles sondes afin d'avoir une vision plus large sur la compréhension de la production de ROS induite par l'eugénol et l'isoeugénol.

Pour finir, Herling *et al.* ont montré qu'il est possible de faire de l'imagerie RPE à partir de la signature spectrale du *spin scavenger* pour localiser dans la peau la production de ROS sous irradiation.¹¹⁰ Il serait donc très intéressant d'étendre nos études à l'imagerie RPE *in vivo* afin d'identifier où les espèces radicalaires se forment dans la peau et ainsi pouvoir approfondir la compréhension de leurs mécanismes d'action.

BIBLIOGRAPHIE

Outre les références bibliographiques, d'autres outils de référence ont été utilisés pour la conception de figures ou le traitement de données :

- Les molécules et structures chimiques ont été réalisées sur ChemDraw®
- Les figures biologiques ont été réalisées à l'aide des banques d'images mises à disposition par BioRender® ou par Servier® (Servier Médical Art, SMarT)
- Les RMN ont été traitées à l'aide du logiciel MestReNova®
- Les spectres RPE ont été enregistrés avec le logiciel Xenon®
- Les spectres RPE ont été simulés avec la boîte à outils Easyspin sur MatLab®

- (1) Vogt, T. Phenylpropanoid Biosynthesis. *Mol. Plant* **2010**, *3* (1), 2–20. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp106>.
- (2) Ververidis, F.; Trantas, E.; Douglas, C.; Vollmer, G.; Kretzschmar, G.; Panopoulos, N. Biotechnology of Flavonoids and Other Phenylpropanoid-Derived Natural Products. Part I: Chemical Diversity, Impacts on Plant Biology and Human Health. *Biotechnol. J.* **2007**, *2* (10), 1214–1234. <https://doi.org/10.1002/biot.200700084>.
- (3) Monti, D.; Gramatica, P. Biosynthesis of Phenylpropanoid Compounds. Part 1.1 Biosynthesis of Eugenol in *Ocimum Basilicum* L. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1974**, *5* (0), 1727–1731. <https://doi.org/10.1039/P19740001727>.
- (4) Sharmeen, J. B.; Mahomoodally, F. M.; Zengin, G.; Maggi, F. Essential Oils as Natural Sources of Fragrance Compounds for Cosmetics and Cosmeceuticals. *Molecules* **2021**, *26* (3), 666. <https://doi.org/10.3390/molecules26030666>.
- (5) Nazrul Islam Bhuiyan, M.; Begum, J.; Chandra Nandi, N.; Akter, F. Constituents of the Essential Oil from Leaves and Buds of Clove (*Syzygium Caryophyllatum* (L.) Alston). *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* **2012**, *6* (16), 451–454. <https://doi.org/10.5897/AJPP10.004>.
- (6) Kamatou, G. P.; Vermaak, I.; Viljoen, A. M. Eugenol—From the Remote Maluku Islands to the International Market Place: A Review of a Remarkable and Versatile Molecule. *Molecules* **2012**, *17* (6), 6953–6981. <https://doi.org/10.3390/molecules17066953>.
- (7) Bruze, M.; Johansen, J. D.; Andersen, K. E.; Frosch, P.; Goossens, A.; Lepoittevin, J.-P.; Rastogi, S. C.; White, I.; Menne, T. Deodorants: An Experimental Provocation Study with Isoeugenol. *Contact Dermatitis* **2005**, *52* (5), 260–267. <https://doi.org/10.1111/j.0105-1873.2005.00576.x>.
- (8) Rastogi, S. C.; Johansen, J. D. Significant Exposures to Isoeugenol Derivatives in Perfumes. *Contact Dermatitis* **2008**, *58* (5), 278–281. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2007.01283.x>.
- (9) *EUGENOL | Toute la formation dentaire continue | Agenda et billetterie des congrès, webinars, travaux-pratiques et conférences pour les chirurgiens-dentistes.* <https://www.eugenol.com/> (accessed 2022-08-26).
- (10) Flagg, J. F. Dental Pathology and Therapeutics. *Dent. Cosm.* **1875**, *17* (9), 465–469.
- (11) Sarrami, N.; Pemberton, M. N.; Thornhill, M. H.; Theaker, E. D. Adverse Reactions Associated with the Use of Eugenol in Dentistry. *Br. Dent. J.* **2002**, *193* (5), 257–259. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.4801539>.
- (12) Topal, F. Anticholinergic and Antidiabetic Effects of Isoeugenol from Clove (*Eugenia Caryophyllata*) Oil. *Int. J. Food Prop.* **2019**, *22* (1), 583–592. <https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1597882>.
- (13) Atsumi, T.; Fujisawa, S.; Tonosaki, K. A Comparative Study of the Antioxidant/Prooxidant Activities of Eugenol and Isoeugenol with Various Concentrations and Oxidation Conditions. *Toxicol. In Vitro* **2005**, *19* (8), 1025–1033. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.04.012>.
- (14) Loveless, S. E.; Api, A.-M.; Crevel, R. W. R.; Debruyne, E.; Gamer, A.; Jowsey, I. R.; Kern, P.; Kimber, I.; Lea, L.; Lloyd, P.; Mehmood, Z.; Steiling, W.; Veenstra, G.; Woolhiser, M.; Hennes, C. Potency Values from the Local Lymph Node Assay: Application to Classification, Labelling and Risk Assessment. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2010**, *56* (1), 54–66. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2009.08.016>.
- (15) Geier, J.; Uter, W.; Lessmann, H.; Schnuch, A. Fragrance Mix I and II: Results of Breakdown Tests: Fragrance Mix I and II: Results of Breakdown Tests. *Flavour Fragr. J.* **2015**, *30* (4), 264–274. <https://doi.org/10.1002/ffj.3247>.

- (16) Moad, G.; Solomon, D. H.; Moad, G. *The Chemistry of Radical Polymerization*, 2nd fully rev. ed.; Elsevier: Amsterdam ; Boston, 2006.
- (17) Afonso, V.; Champy, R.; Mitrovic, D.; Collin, P.; Lomri, A. Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases: rôle dans les maladies rhumatismales. *Rev. Rhum.* **2007**, *74* (7), 636–643. <https://doi.org/10.1016/j.rhum.2006.12.009>.
- (18) Migdal, C.; Serres, M. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences* **2011**, *27* (4), 405–412. <https://doi.org/10.1051/medsci/2011274017>.
- (19) Weidinger, A.; Kozlov, A. Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. *Biomolecules* **2015**, *5* (2), 472–484. <https://doi.org/10.3390/biom5020472>.
- (20) Cano, N.; Barnoud, D.; Schneider, S. M.; Vasson, M-P.; Hasselmann, M.; Leverve, X. *Traité de nutrition artificielle de l'adulte*; 3eme ed.; Springer: Paris; **2019**.
- (21) Harman, D. Aging: A Theory Based On Free Radical And Radiation Chemistry. *J. Gerontol.*, **1956**, *11* (3), 298-300. <https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298>.
- (22) Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. The Definition and Measurement of Antioxidants in Biological Systems. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, *18* (1), 125–126. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)91457-3](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)91457-3).
- (23) Hermes-Lima, M. "Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals" in Storey, K. B., *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*, Wiley-Liss: New Jersey; **2004**, 319-368.
- (24) McCord, J. M.; Fridovich, I. Superoxide Dismutase. *J. Biol. Chem.* **1969**, *244* (22), 6049–6055. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63504-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63504-5).
- (25) Pamplona, R.; Costantini, D. Molecular and Structural Antioxidant Defenses against Oxidative Stress in Animals. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2011**, *301* (4), R843–R863. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00034.2011>.
- (26) Yoshimoto, M.; Sakamoto, H.; Yoshimoto, N.; Kuboi, R.; Nakao, K. Stabilization of Quaternary Structure and Activity of Bovine Liver Catalase through Encapsulation in Liposomes. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *41* (6–7), 849–858. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.07.008>.
- (27) Halprin, K. M.; Ohkawara, A. The Measurement of Glutathione in Human Epidermis Using Glutathione Reductase**From the Division of Dermatology, University of Oregon Medical School, Portland, Oregon. *J Invest. Dermatol.* **1967**, *48* (2), 149–152. <https://doi.org/10.1038/jid.1967.24>.
- (28) Wu, G.; Fang, Y.-Z.; Yang, S.; Lupton, J. R.; Turner, N. D. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *J. Nutr.* **2004**, *134* (3), 489–492. <https://doi.org/10.1093/jn/134.3.489>.
- (29) Dalle-Donne, I.; Rossi, R.; Colombo, G.; Giustarini, D.; Milzani, A. Protein S-Glutathionylation: A Regulatory Device from Bacteria to Humans. *Trends Biochem. Sci.* **2009**, *34* (2), 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2008.11.002>.
- (30) Olvera-Bello, A. E.; Vega, L., "Role of Glutathione S-Transferase Enzymes in Toxicology, Pharmacology and Human Disease" in Elizondo Azuela, G. *Xenobiotic Metabolizing Enzymes and Xenobiotic Receptors. Pharmacological and Toxicological Aspects* **2010**, 45-66.
- (31) Ramsay, E. E.; Dilda, P. J. Glutathione S-Conjugates as Prodrugs to Target Drug-Resistant Tumors. *Front. Pharmacol.* **2014**, *5*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00181>.
- (32) Mills, G. C. Hemoglobin Catabolism. *J. Biol. Chem.* **1957**, *229* (1), 189–197. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)70608-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)70608-X).

- (33) Ganther, H. E. Selenium Metabolism, Selenoproteins and Mechanisms of Cancer Prevention: Complexities with Thioredoxin Reductase. *Carcinogenesis* **1999**, *20* (9), 1657–1666. <https://doi.org/10.1093/carcin/20.9.1657>.
- (34) Imam, M.; Zhang, S.; Ma, J.; Wang, H.; Wang, F. Antioxidants Mediate Both Iron Homeostasis and Oxidative Stress. *Nutrients* **2017**, *9* (7), 671. <https://doi.org/10.3390/nu9070671>.
- (35) Règlement (CE) No 1333/2008 du Parlement Européen et du Conseil du 16 décembre **2008** sur les additifs alimentaires.
- (36) Zoroddu, M. A.; Aaseth, J.; Crisponi, G.; Medici, S.; Peana, M.; Nurchi, V. M. The Essential Metals for Humans: A Brief Overview. *J. Inorg. Biochem.* **2019**, *195*, 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.03.013>.
- (37) Cadenas, E. Biochemistry Of Oxygen Toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* **1989**, *58*, 79-110. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.58.070189.000455>.
- (38) Bender, D. A. Nutritional Biochemistry of the Vitamins. 2nd ed., Cambridge University Press, **2003**.
- (39) Kligman, L. H.; Duo, C. H.; Kligman, A. M. Topical Retinoic Acid Enhances the Repair of Ultraviolet Damaged Dermal Connective Tissue. *Connect. Tissue Res.* **1984**, *12* (2), 139–150. <https://doi.org/10.3109/03008208408992779>.
- (40) Packer, J. E.; Mahood, J. S.; Mora-Arellano, V. O.; Wolfenden, B. S.; Slater, T. F.; Willson, R. L. Free Radicals and Singlet Oxygen Scavengers: Reaction of a Peroxy-Radical with B-Carotene, Diphenyl Furan And 1,4-Diazobicyclo(2,2,2)Atane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1981**, *98* (4), 901-906. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(81\)91196-7](https://doi.org/10.1016/0006-291X(81)91196-7)
- (41) Carr, A.; Frei, B. Does Vitamin C Act as a Pro-oxidant under Physiological Conditions? *FASEB J.* **1999**, *13* (9), 1007–1024. <https://doi.org/10.1096/fasebj.13.9.1007>.
- (42) Iecerf, J.; Luc, G.; Fruchart, J. Vitamine E, Antioxydants et Athérosclérose. *Rev. Médecine Interne* **1994**, *15* (10), 641–649. [https://doi.org/10.1016/S0248-8663\(05\)82178-2](https://doi.org/10.1016/S0248-8663(05)82178-2).
- (43) Herrera, E.; Barbas, C. Vitamin E: Action, Metabolism and Perspectives. *J. Physiol. Biochem.* **2001**, *57* (1), 43–56. <https://doi.org/10.1007/BF03179812>.
- (44) Macheix, J.-J.; Fleuriet, A.; Billot, J. *Fruit Phenolics*, Reissued.; CRC Press: Boca Raton London New York, **2018**.
- (45) Pereira, D. M.; Valentão, P.; Pereira, J. A.; Andrade, P. B. Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules* **2009**, *14* (6), 2202–2211. <https://doi.org/10.3390/molecules14062202>.
- (46) de Souza Farias, S. A.; da Costa, K. S.; Martins, J. B. L. Analysis of Conformational, Structural, Magnetic, and Electronic Properties Related to Antioxidant Activity: Revisiting Flavan, Anthocyanidin, Flavanone, Flavonol, Isoflavone, Flavone, and Flavan-3-Ol. *ACS Omega* **2021**, *6* (13), 8908–8918. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c06156>.
- (47) *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications*; Andersen, Ø. M., Markham, K. R., Eds.; CRC, Taylor & Francis: Boca Raton, FL, **2006**.
- (48) Kehrer, J. P. The Haber–Weiss Reaction and Mechanisms of Toxicity. *Toxicology* **2000**, *149* (1), 43–50. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00231-6](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00231-6).
- (49) Perron, N. R.; Brumaghim, J. L. A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. *Cell Biochem. Biophys.* **2009**, *53* (2), 75–100. <https://doi.org/10.1007/s12013-009-9043-x>.
- (50) Liu, L.; Zhang, L.; Ren, L.; Xie, Y. Advances in Structures Required of Polyphenols for Xanthine Oxidase Inhibition. *Food Front.* **2020**, *1* (2), 152–167. <https://doi.org/10.1002/fft2.27>.

- (51) Sherwin, E. R. Antioxidants for Vegetable Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1976**, *53* (6Part2), 430–436. <https://doi.org/10.1007/BF02605739>.
- (52) Bortolomeazzi, R.; Verardo, G.; Liessi, A.; Callea, A. Formation of Dehydrodiisoeugenol and Dehydrodieugenol from the Reaction of Isoeugenol and Eugenol with DPPH Radical and Their Role in the Radical Scavenging Activity. *Food Chem.* **2010**, *118* (2), 256–265. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.115>.
- (53) Bertrand, F.; Basketter, D. A.; Roberts, D. W.; Lepoittevin, J.-P. Skin Sensitization to Eugenol and Isoeugenol in Mice: Possible Metabolic Pathways Involving *Ortho*-Quinone and Quinone Methide Intermediates. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10* (3), 335–343. <https://doi.org/10.1021/tx960087v>.
- (54) Bolton, J. Quinone Methide Bioactivation Pathway: Contribution to Toxicity and/or Cytoprotection? *Curr. Org. Chem.* **2014**, *18* (1), 61–69. <https://doi.org/10.2174/138527281801140121123046>.
- (55) Melles, D.; Vielhaber, T.; Baumann, A.; Zazzeroni, R.; Karst, U. In Chemico Evaluation of Skin Metabolism: Investigation of Eugenol and Isoeugenol by Electrochemistry Coupled to Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. B* **2013**, *913–914*, 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.12.004>.
- (56) da Silva, S. L.; da Silva, A.; Honório, K. M.; Marangoni, S.; Toyama, M. H.; da Silva, A. B. F. The Influence of Electronic, Steric and Hydrophobic Properties of Flavonoid Compounds in the Inhibition of the Xanthine Oxidase. *J. Mol. Struct. Theochem* **2004**, *684* (1–3), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.theochem.2004.04.003>.
- (57) Cimanga, K.; de Bruyne, T.; Hu, J. P.; Cos, P.; Apers, S.; Pieters, L.; Tona, L.; Kambu, K.; Vanden Berghe, D.; Vlietinck, A. J. Constituents from *Morinda morindoides*, Leaves as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Scavengers of Superoxide Anions. *Pharm. Pharmacol. Commun.* **1999**, *5* (6), 419–424. <https://doi.org/10.1211/146080899128735009>.
- (58) Sirivibulkovit, K.; Nouanthavong, S.; Sameenoi, Y. Paper-Based DPPH Assay for Antioxidant Activity Analysis. *Anal. Sci.* **2018**, *34* (7), 795–800. <https://doi.org/10.2116/analsci.18P014>.
- (59) Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26* (9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
- (60) Wayner, D. D. M.; Burton, G. W.; Ingold, K. U.; Locke, S. Quantitative Measurement of the Total, Peroxyl Radical-Trapping Antioxidant Capability of Human Blood Plasma by Controlled Peroxidation. *FEBS Lett.* **1985**, *187* (1), 33–37. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(85\)81208-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)81208-4).
- (61) Luukkainen, P.; Aejmelaeus, R.; Alho, H.; Metsä-Ketelä, T.; Ikonen, S. R.; Salo, M. K. Plasma Chain-Breaking Antioxidants in Preterm Infants with Good and Poor Short-Term Outcome. *Free Radic. Res.* **1999**, *30* (3), 189–197. <https://doi.org/10.1080/10715769900300211>.
- (62) Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R. L. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49* (10), 4619–4626. <https://doi.org/10.1021/jf010586o>.
- (63) Benzie, I. F. F.; Strain, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239* (1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>.

- (64) Apak, R.; Güçlü, K.; Özyürek, M.; Bektaşoğlu, B.; Bener, M. Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity Assay for Antioxidants in Human Serum and for Hydroxyl Radical Scavengers. In *Advanced Protocols in Oxidative Stress II*; Armstrong, D., Ed.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2010; Vol. 594, pp 215–239. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1_15.
- (65) Alinaghi, F.; Bennike, N. H.; Egeberg, A.; Thyssen, J. P.; Johansen, J. D. Prevalence of Contact Allergy in the General Population: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Contact Dermatitis* **2019**, *80* (2), 77–85. <https://doi.org/10.1111/cod.13119>.
- (66) Adler, B. L.; DeLeo, V. A. Allergic Contact Dermatitis. *JAMA Dermatol.* **2021**, *157* (3), 364. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2020.5639>.
- (67) *Allergic Contact Dermatitis*; Lepoittevin, J.-P., Basketter, D. A., Goossens, A., Karlberg, A.-T., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **1998**. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-80331-4>.
- (68) Règlement (CE) no 1223/2009 du Parlement européen et du Conseil du 30 novembre **2009** relatif aux produits cosmétiques.
- (69) Rajan, T. V. The Gell–Coombs Classification of Hypersensitivity Reactions: A Re-Interpretation. *Trends Immunol.* **2003**, *24* (7), 376–379. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(03\)00142-X](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(03)00142-X).
- (70) González-Muñoz, P.; Conde-Salazar, L.; Vañó-Galván, S. Allergic Contact Dermatitis Caused by Cosmetic Products. *Actas Dermo-Sifiliográficas Engl. Ed.* **2014**, *105* (9), 822–832. <https://doi.org/10.1016/j.adengl.2014.09.007>.
- (71) McLafferty, E.; Hendry, C.; Farley, A. The Integumentary System: Anatomy, Physiology and Function of Skin. *Nurs. Stand.* **2012**, *27* (3), 35–42. <https://doi.org/10.7748/ns2012.09.27.3.35.c9299>.
- (72) Bos, J. D.; Meinardi, M. M. H. M. The 500 Dalton Rule for the Skin Penetration of Chemical Compounds and Drugs: The 500 Dalton Rule for Skin Penetration of Chemical Compounds and Drugs. *Exp. Dermatol.* **2000**, *9* (3), 165–169. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0625.2000.009003165.x>.
- (73) Abla, M. J.; Banga, A. K. Quantification of Skin Penetration of Antioxidants of Varying Lipophilicity. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2013**, *35* (1), 19–26. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2012.00728.x>.
- (74) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settingsq. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *24*. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0).
- (75) Lepoittevin, J.-P. Les bases chimiques de l'allergie de contact. *Rev. Fr. Allergol.* **2011**, *51* (3), 208–211. <https://doi.org/10.1016/j.reval.2011.01.011>.
- (76) Wiedersberg, S.; Guy, R. H. Transdermal Drug Delivery: 30 + Years of War and Still Fighting! *J. Controlled Release* **2014**, *190*, 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.022>.
- (77) Chapter 3, "Laser radiation hazards" in Henderson, R.; Schulmeister, K. Laser Safety., ed. Taylor & Francis Group LLC: New York, **2004**, 66-221.
- (78) van Smeden, J.; Janssens, M.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A. The Important Role of Stratum Corneum Lipids for the Cutaneous Barrier Function. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **2014**, *1841* (3), 295–313. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.11.006>.

- (79) 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* (1), 53–69. <https://doi.org/10.1021/tx7002239>.
- (80) Vileno, B.; Port-Lougarre, Y.; Giménez-Arnau, E. Electron Paramagnetic Resonance and Spin Trapping to Detect Free Radicals from Allergenic Hydroperoxides in Contact with the Skin: From the Molecule to the Tissue. *Contact Dermatitis* **2022**, *86* (4), 241–253. <https://doi.org/10.1111/cod.14037>.
- (81) Landsteiner, K.; Jacobs, J. Experiments on Immunization with Haptens. *Exp. Biol. Med.* **1932**, *29* (5), 570–571. <https://doi.org/10.3181/00379727-29-5981>.
- (82) Chipinda, I.; Hettick, J. M.; Siegel, P. D. Haptenation: Chemical Reactivity and Protein Binding. *J. Allergy* **2011**, *2011*, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2011/839682>.
- (83) *Contact Dermatitis*; Johansen, J. D., Frosch, P. J., Lepoittevin, J.-P., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2011**. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-03827-3>.
- (84) Romani, N.; Holzmann, S.; Tripp, C. H.; Koch, F.; Stoitzner, P. Langerhans Cells - Dendritic Cells of the Epidermis. *APMIS* **2003**, *111* (7–8), 725–740. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0463.2003.11107805.x>.
- (85) Moll, H. *The Immune Functions of Epidermal Langerhans Cells*; Medical Intelligence Unit; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **1995**. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-22497-7>.
- (86) Arrêté du 18 juillet 2000 relatif à l'interdiction de mise sur le marché de certains produits contenant du nickel, *JORF* **2000**, 165.
- (87) Lepoittevin, J.-P. Metabolism versus Chemical Transformation or Pro- versus Prehaptens? *Contact Dermatitis* **2006**, *54* (2), 73–74. <https://doi.org/10.1111/j.0105-1873.2006.00795.x>.
- (88) 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* (7), 1172–1178. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00148>.
- (89) Ogueta, I. A.; Brared Christensson, J.; Giménez-Arnau, E.; Brans, R.; Wilkinson, M.; Stingeni, L.; Foti, C.; Aerts, O.; Svedman, C.; Gonçalves, M.; Giménez-Arnau, A. Limonene and Linalool Hydroperoxides Review: Pros and Cons for Routine Patch Testing. *Contact Dermatitis* **2022**, *87* (1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/cod.14064>.
- (90) Lichter, J.; Silva e Sousa, M.; Peter, N.; Sahli, F.; Vileno, B.; Kuresepi, S.; Gourlaouen, C.; Giménez-Arnau, E.; Blömeke, B. Skin Sensitization to Fragrance Hydroperoxides: Interplay between Dendritic Cells, Keratinocytes and Free Radicals. *Br. J. Dermatol.* **2021**, *184* (6), 1143–1152. <https://doi.org/10.1111/bjd.19685>.
- (91) Srour, H.; Gosset, A.; Moussallieh, F.-M.; Elbayed, K.; Giménez-Arnau, E.; Lepoittevin, J.-P. Synthesis and *In Situ* Behavior of 1,4- and 2,5-(¹³C) Isotopomers of *p*-Phenylenediamine in Reconstructed Human Epidermis Using High Resolution Magic Angle Spinning NMR. *Chem. Res. Toxicol.* **2022**, *35* (10), 1881–1892. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.2c00151>.
- (92) Johansen, J. D.; Aalto-Korte, K.; Agner, T.; Andersen, K. E.; Bircher, A.; Bruze, M.; Cannavó, A.; Giménez-Arnau, A.; Gonçalves, M.; Goossens, A.; John, S. M.; Lidén, C.; Lindberg, M.; Mahler, V.; Matura, M.; Rustemeyer, T.; Serup, J.; Spiewak, R.; Thyssen, J. P.; Vigan, M.; White, I. R.; Wilkinson, M.; Uter, W. European Society of Contact Dermatitis Guideline for Diagnostic Patch Testing - Recommendations on Best Practice: Escd Patch Test Guideline. *Contact Dermatitis* **2015**, *73* (4), 195–221. <https://doi.org/10.1111/cod.12432>.

- (93) Vigan, M. Lecture des tests épicutanés. *Ann. Dermatol. Vénérologie* **2009**, *136* (8–9), 606–609. <https://doi.org/10.1016/j.annder.2009.06.009>.
- (94) Règlement (CE) N° 1907/2006 du 18 décembre **2006** Concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation Des Substances Chimiques, Ainsi Que Les Restrictions Applicables à Ces Substances (REACH), Instituant Une Agence Européenne Des Produits Chimiques (Considérants).
- (95) 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* (1), 259–270. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.10.018>.
- (96) Kimber, I.; Basketter, D. A. The Murine Local Lymph Node Assay: A Commentary on Collaborative Studies and New Directions. *Food Chem. Toxicol.* **1992**, *30* (2), 165–169. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(92\)90153-C](https://doi.org/10.1016/0278-6915(92)90153-C).
- (97) Frank Gerberick, G. F.; Ryan, C. A.; Dearman, R. J.; Kimber, I. Local Lymph Node Assay (LLNA) for Detection of Sensitization Capacity of Chemicals. *Methods* **2007**, *41* (1), 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.07.006>.
- (98) Kimber, I.; Weisenberger, C. A Murine Local Lymph Node Assay for the Identification of Contact Allergens: Assay Development and Results of an Initial Validation Study. *Arch. Toxicol.* **1989**, *63* (4), 274–282. <https://doi.org/10.1007/BF00278640>.
- (99) Lepoittevin, J.-P. Development of Structure-activity Relationships (SARs) in Allergic Contact Dermatitis. *Cell Biol. Toxicol.* **1999**, *15*, 47–55. <https://doi.org/10.1023/a:1007502723275>.
- (100) Johnson, C.; Ahlberg, E.; Anger, L. T.; Beilke, L.; Benigni, R.; Bercu, J.; Bobst, S.; Bower, D.; Brigo, A.; Campbell, S.; Cronin, M. T. D.; Crooks, I.; Cross, K. P.; Doktorova, T.; Exner, T.; Faulkner, D.; Fearon, I. M.; Fehr, M.; Gad, S. C.; Gervais, V.; Giddings, A.; Glowienke, S.; Hardy, B.; Hasselgren, C.; Hillegass, J.; Jolly, R.; Krupp, E.; Lomnitski, L.; Magby, J.; Mestres, J.; Milchak, L.; Miller, S.; Muster, W.; Neilson, L.; Parakhia, R.; Parenty, A.; Parris, P.; Paulino, A.; Paulino, A. T.; Roberts, D. W.; Schlecker, H.; Stidl, R.; Suarez-Rodriguez, D.; Szabo, D. T.; Tice, R. R.; Urbisch, D.; Vuorinen, A.; Wall, B.; Weiler, T.; White, A. T.; Whritenour, J.; Wichard, J.; Woolley, D.; Zwickl, C.; Myatt, G. J. Skin Sensitization in Silico Protocol. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2020**, *116*, 104688. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104688>.
- (101) Myatt, G. J.; Ahlberg, E.; Akahori, Y.; Allen, D.; Amberg, A.; Anger, L. T.; Aptula, A.; Auerbach, S.; Beilke, L.; Bellion, P.; Benigni, R.; Bercu, J.; Booth, E. D.; Bower, D.; Brigo, A.; Burden, N.; Cammerer, Z.; Cronin, M. T. D.; Cross, K. P.; Custer, L.; Dettwiler, M.; Dobo, K.; Ford, K. A.; Fortin, M. C.; Gad-McDonald, S. E.; Gellatly, N.; Gervais, V.; Glover, K. P.; Glowienke, S.; Van Gompel, J.; Gutsell, S.; Hardy, B.; Harvey, J. S.; Hillegass, J.; Honma, M.; Hsieh, J.-H.; Hsu, C.-W.; Hughes, K.; Johnson, C.; Jolly, R.; Jones, D.; Kemper, R.; Kenyon, M. O.; Kim, M. T.; Kruhlak, N. L.; Kulkarni, S. A.; Kümmerer, K.; Leavitt, P.; Majer, B.; Masten, S.; Miller, S.; Moser, J.; Mumtaz, M.; Muster, W.; Neilson, L.; Oprea, T. I.; Patlewicz, G.; Paulino, A.; Lo Piparo, E.; Powley, M.; Quigley, D. P.; Reddy, M. V.; Richarz, A.-N.; Ruiz, P.; Schilter, B.; Serafimova, R.; Simpson, W.; Stavitskaya, L.; Stidl, R.; Suarez-Rodriguez, D.; Szabo, D. T.; Teasdale, A.; Trejo-Martin, A.; Valentin, J.-P.; Vuorinen, A.; Wall, B. A.; Watts, P.; White, A. T.; Wichard, J.; Witt, K. L.; Woolley, A.; Woolley, D.; Zwickl, C.; Hasselgren, C. In Silico Toxicology Protocols. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2018**, *96*, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.04.014>.
- (102) Ridings, J. E.; Barratt, M. D.; Cary, R.; Earnshaw, C. G.; Eggington, C. E.; Ellis, M. K.; Judson, P. N.; Langowski, J. J.; Marchant, C. A.; Payne, M. P.; Watson, W. P.; Yih, T. D.

- Computer Prediction of Possible Toxic Action from Chemical Structure: An Update on the DEREK System. *Toxicology* **1996**, *106* (1–3), 267–279. [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(95\)03190-Q](https://doi.org/10.1016/0300-483X(95)03190-Q).
- (103) 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* (2), 332–343. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh213>.
- (104) Gerberick, G. F.; Troutman, J. A.; Foertsch, L. M.; Vassallo, J. D.; Quijano, M.; Dobson, R. L. M.; Goebel, C.; Lepoittevin, J.-P. Investigation of Peptide Reactivity of Pro-Hapten Skin Sensitizers Using a Peroxidase-Peroxide Oxidation System. *Toxicol. Sci.* **2009**, *112* (1), 164–174. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp192>.
- (105) Marteau, C.; Nardello-Rataj, V.; Favier, D.; Aubry, J.-M. Dual Role of Phenols as Fragrances and Antioxidants: Mechanism, Kinetics and Drastic Solvent Effect: Fragrance Phenols as Efficient Antioxidants Depending on the Solvent. *Flavour Fragr. J.* **2013**, *28* (1), 30–38. <https://doi.org/10.1002/ffj.3123>.
- (106) Bertrand, P. *Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy: Fundamentals*; Springer International Publishing: Cham, **2020**. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-39663-3>.
- (107) Bertrand, P. *Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy: Applications*; Springer International Publishing: Cham, **2020**. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-39668-8>.
- (108) Swartz, H. M.; Khan, N.; Khramtsov, V. V. Use of Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy to Evaluate the Redox State *In Vivo*. *Antioxid. Redox Signal.* **2007**, *9* (10), 1757–1772. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1718>.
- (109) Kuresepi, S.; Vileno, B.; Turek, P.; Lepoittevin, J.-P.; Giménez-Arnau, E. Potential of EPR Spin-Trapping to Investigate *in Situ* Free Radicals Generation from Skin Allergens in Reconstructed Human Epidermis: Cumene Hydroperoxide as Proof of Concept. *Free Radic. Res.* **2018**, *52* (2), 171–179. <https://doi.org/10.1080/10715762.2017.1420906>.
- (110) Herrling, T. UV-Induced Free Radicals in the Skin Detected by ESR Spectroscopy and Imaging Using Nitroxides. *Free Radic. Biol. Med.* **2003**, *35* (1), 59–67. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(03\)00241-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(03)00241-7).
- (111) Sahli, F.; Godard, A.; Vileno, B.; Lepoittevin, J.-P.; Giménez-Arnau, E. Formation of Methyl Radicals Derived from Cumene Hydroperoxide in Reconstructed Human Epidermis: An EPR Spin Trapping Confirmation by Using ¹³C-Substitution. *Free Radic. Res.* **2019**, *53* (7), 737–747. <https://doi.org/10.1080/10715762.2019.1624741>.
- (112) Lozzi, F.; Di Raimondo, C.; Lanna, C.; Diluvio, L.; Mazzilli, S.; Garofalo, V.; Dika, E.; Dellambra, E.; Coniglione, F.; Bianchi, L.; Campione, E. Latest Evidence Regarding the Effects of Photosensitive Drugs on the Skin: Pathogenetic Mechanisms and Clinical Manifestations. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (11), 1104. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111104>.
- (113) Dormán, G.; Nakamura, H.; Pulsipher, A.; Prestwich, G. D. The Life of Pi Star: Exploring the Exciting and Forbidden Worlds of the Benzophenone Photophore. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (24), 15284–15398. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00342>.
- (114) Medici, A.; Saviano, L.; Siciliano, A.; Libralato, G.; Guida, M.; Previtera, L.; Di Fabio, G.; Zarrelli, A. Octocrylene: From Sunscreens to the Degradation Pathway during Chlorination Processes: Formation of Byproducts and Their Ecotoxicity Assessment. *Molecules* **2022**, *27* (16), 5286. <https://doi.org/10.3390/molecules27165286>.
- (115) Karlsson, I.; Persson, E.; Ekebergh, A.; Mårtensson, J.; Börje, A. Ketoprofen-Induced Formation of Amino Acid Photoadducts: Possible Explanation for Photocontact Allergy to Ketoprofen. *Chem. Res. Toxicol.* **2014**, *27* (7), 1294–1303. <https://doi.org/10.1021/tx5001656>.

- (116) Coz, C. J.; Bottlaender, A.; Scrivener, J.-N.; Santinelli, F.; Cribier, B. J.; Edouard, E. H.; Grosshans, M. Photocontact Dermatitis from Ketoprofen and Tiaprofenic Acid: Cross-Reactivity Study in 12 Consecutive Patients. *Contact Dermatitis* **1998**, *38* (5), 245–252. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1998.tb05737.x>.
- (117) Bagheri, H.; Lhiaubet, V.; Montastruc, J. L.; Chouini-Lalanne, N. Photosensitivity to Ketoprofen: Mechanisms and Pharmacoepidemiological Data. *Drug Saf.* **2000**, *22* (5), 339–349. <https://doi.org/10.2165/00002018-200022050-00002>.
- (118) Downs, C. A.; DiNardo, J. C.; Stien, D.; Rodrigues, A. M. S.; Lebaron, P. Benzophenone Accumulates over Time from the Degradation of Octocrylene in Commercial Sunscreen Products. *Chem. Res. Toxicol.* **2021**, *34* (4), 1046–1054. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.0c00461>.
- (119) Rice, J. E.; Hussain, N.; Lavoie, E. J. Synthesis of [Methoxy-¹⁴C]Eugenol. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1987**, *24* (9), 1043–1049. <https://doi.org/10.1002/jlcr.2580240905>.
- (120) Higman, C. S.; de Araujo, M. P.; Fogg, D. E. Tandem Catalysis versus One-Pot Catalysis: Ensuring Process Orthogonality in the Transformation of Essential-Oil Phenylpropenoids into High-Value Products via Olefin Isomerization–Metathesis. *Catal. Sci. Technol.* **2016**, *6* (7), 2077–2084. <https://doi.org/10.1039/C5CY02038G>.
- (121) Merchan Arenas, D. R.; Rojas Ruíz, F. A.; Kouznetsov, V. V. Highly Diastereoselective Synthesis of New Heterolignan-like 6,7-Methylenedioxy-Tetrahydroquinolines Using the Clove Bud Essential Oil as Raw Material. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52* (12), 1388–1391. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2011.01.083>.
- (122) Nielsen, A. J.; Jenkins, H. A.; McNulty, J. Asymmetric Organocatalytic Stepwise [2+2] Entry to Tetra-Substituted Heterodimeric and Homochiral Cyclobutanes. *Chem. - Eur. J.* **2016**, *22* (27), 9111–9115. <https://doi.org/10.1002/chem.201601842>.
- (123) Curti, C.; Zanardi, F.; Battistini, L.; Sartori, A.; Rassu, G.; Pinna, L.; Casiraghi, G. Streamlined, Asymmetric Synthesis of 8,4'-Oxyneolignans. *J. Org. Chem.* **2006**, *71* (22), 8552–8558. <https://doi.org/10.1021/jo061521t>.
- (124) Ji, R.; Schäffer, A. Synthesis of ¹³C- and ¹⁴C-Labelled Catechol: Synthesis of ¹³C- and ¹⁴C. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2002**, *45* (7), 551–558. <https://doi.org/10.1002/jlcr.581>.
- (125) Loudon, J. D.; Scott, J. A. Ortho-Hydroxylation of Phenols. Part II.* Derivatives of Catechol. *J Chem Soc* **1953**, *0*, 265–268. <https://doi.org/10.1039/JR9530000265>
- (126) Kratzl, K. Spezifisch SPEZIFISCH (14)C-Kernmarkierte Phenolderivate 3. Mitt. Ox. Von (14)C-Kernmarkiertem Bikreosol In Waessrig-Alkalischer Loesung Mit Sauerstoff, *Chem. Inform.* **1972**, *3* (16). <https://doi.org/10.1002/CHIN.197216122>.
- (127) Loudon, J. D.; Robertson, J. R.; Watson, J. N.; Arron, S. D. Ortho-Hydroxylation of Phenols. A New Case of the Smiles Rearrangement. *J Chem Soc* **1950**, 55–58. <https://doi.org/10.1039/JR9500000055>.
- (128) Beyer, J. A Convenient Synthesis of 4-Hydroxy[1-¹³C]Benzoic Acid and Related Ring-Labelled Phenolic Compounds. *Synthesis* **1998**, *1998* (07), 1047–1051. <https://doi.org/10.1055/s-1998-2109>.
- (129) Marshall, L. J.; Cable, K. M.; Botting, N. P. The Synthesis of Substituted Phenols from Pyranone Precursors. *Tetrahedron* **2009**, *65* (39), 8165–8170. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2009.07.083>.
- (130) <https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1902/zeeman/facts/>.
- (131) Abbas, K.; Babić, N.; Peyrot, F. Use of Spin Traps to Detect Superoxide Production in Living Cells by Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Spectroscopy. *Methods* **2016**, *109*, 31–43. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.05.001>.

- (132) Triquigneaux, M.; Charles, L.; André-Barrès, C.; Tuccio, B. Ene-Reaction between a Dienolic Compound and 2-Methyl-2-Nitrosopropane: An EPR-MS Study. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51* (48), 6220–6223. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2010.09.051>.
- (133) Forrester, A. R.; Hepburn, S. P. Spin Traps. A Cautionary Note. *J. Chem. Soc. C Org.* **1971**, 701. <https://doi.org/10.1039/j39710000701>.
- (134) Ebersson, L. “Inverted Spin Trapping”. Reactions between the Radical Cation of α -Phenyl-N-Tert-Butylnitron* and Ionic and Neutral Nucleophiles. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1992**, 1807–1813. <https://doi.org/10.1039/P29920001807>
- (135) Suzen, S.; Gurer-Orhan, H.; Saso, L. Detection of Reactive Oxygen and Nitrogen Species by Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Technique. *Molecules* **2017**, *22* (1), 181. <https://doi.org/10.3390/molecules22010181>.
- (136) Lohan, S.; Lauer, A.-C.; Arndt, S.; Friedrich, A.; Tschersch, K.; Haag, S.; Darvin, M.; Vollert, H.; Kleemann, A.; Gersonde, I.; Groth, N.; Lademann, J.; Rohn, S.; Meinke, M. Determination of the Antioxidant Status of the Skin by In Vivo-Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Spectroscopy. *Cosmetics* **2015**, *2* (3), 286–301. <https://doi.org/10.3390/cosmetics2030286>.
- (137) Villaño, D.; Fernández-Pachón, M. S.; Moyá, M. L.; Troncoso, A. M.; García-Parrilla, M. C. Radical Scavenging Ability of Polyphenolic Compounds towards DPPH Free Radical. *Talanta* **2007**, *71* (1), 230–235. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.03.050>.
- (138) Samuni, A.; Goldstein, S.; Russo, A.; Mitchell, J. B.; Krishna, M. C.; Neta, P. Kinetics and Mechanism of Hydroxyl Radical and OH-Adduct Radical Reactions with Nitroxides and with Their Hydroxylamines. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (29), 8719–8724. <https://doi.org/10.1021/ja017587h>.
- (139) Chalier, F.; Hardy, M.; Ouari, O.; Rockenbauer, A.; Tordo, P. Design of New Derivatives of Nitronne DEPMPO Functionalized at C-4 for Further Specific Applications in Superoxide Radical Detection. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (21), 7886–7892. <https://doi.org/10.1021/jo071070s>.
- (140) Chalier, F.; Tordo, P. 5-Diisopropoxyphosphoryl-5-Methyl-1-Pyrroline N-Oxide, DIPPMPPO, a Crystalline Analog of the Nitronne DEPMPO: Synthesis and Spin Trapping Properties Electronic Supplementary Information (ESI) Available: Tables of Crystallographic Data. See <http://www.rsc.org/Suppdata/P2/B2/B206909c/>. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2002**, No. 12, 2110–2117. <https://doi.org/10.1039/b206909c>.
- (141) Veitch, N. C. Horseradish Peroxidase: A Modern View of a Classic Enzyme. *Phytochemistry* **2004**, *65* (3), 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.10.022>.
- (142) Akbar, H.; Sedzro, D. M.; Khan, M.; Bellah, S. F.; Billah, S. M. S. Structure, Function and Applications of a Classic Enzyme: Horseradish Peroxidase. *iJCEBE*, **2018**, *2* (2) 52–59. <https://doi.org/10.11648/j.ijcebe.20180202.13>.
- (143) Krainer, F. W.; Glieder, A. An Updated View on Horseradish Peroxidases: Recombinant Production and Biotechnological Applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99* (4), 1611–1625. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6346-7>.
- (144) Leary, G.; Switzer, G.; Kuntz, G.; Kaiser, T. Comparison of Xenon Lamp-Based and Led-Based Solar Simulators. In *2016 IEEE 43rd Photovoltaic Specialists Conference (PVSC)*; IEEE: Portland, OR, USA, 2016; pp 3062–3067. <https://doi.org/10.1109/PVSC.2016.7750227>.
- (145) Stoll, S.; Schweiger, A. EasySpin, a Comprehensive Software Package for Spectral Simulation and Analysis in EPR. *J. Magn. Reson.* **2006**, *178* (1), 42–55. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2005.08.013>.
- (146) <https://Tools.Niehs.Nih.Gov/Stdb/Index.Cfm>.

- (147) Frejaville, C.; Karoui, H.; Tuccio, B.; le Moigne, F.; Culcasi, M.; Pietri, S.; Lauricella, R.; Tordo, P. 5-(Diethoxyphosphoryl)-5-Methyl-1-Pyrroline N-Oxide: A New Efficient Phosphorylated Nitron for the in Vitro and in Vivo Spin Trapping of Oxygen-Centered Radicals. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 15, 1793-1794. DOI <https://doi.org/10.1039/C39940001793>.
- (148) Buettner, G. R. Spin trapping: ESR parameters of spin adducts, *Free Radic. Biol. Med.* **1987**, 3 (4), 259-303. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(87\)80033-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(87)80033-3).
- (149) <https://Cell-Alternativ.Fr/>.
- (150) Poumay, Y.; Dupont, F.; Marcoux, S.; Leclercq-Smekens, M.; Hérin, M.; Coquette, A. A Simple Reconstructed Human Epidermis: Preparation of the Culture Model and Utilization in in Vitro Studies. *Arch. Dermatol. Res.* **2004**, 296 (5), 203–211. <https://doi.org/10.1007/s00403-004-0507-y>.
- (151) Kuresepi, S. Alternative mechanisms in skin allergy processes: contribution of radical reactions from the molecule to the tissue, Thèse Université de Strasbourg, **2018**, France.
- (152) Sahli, F. Les allergènes cutanés réagissant au travers de processus radicalaires : de la molécule au tissu, Thèse Université de Strasbourg, **2019**, France.
- (153) <https://Www.Chemotechnique.Se/Products/Product-Search-/?Search=&haptent=Haptent>.
- (154) Barratt, M. D.; Basketter, D. A. Possible Origin of the Skin Sensitization Potential of Isoeugenol and Related Compounds: (I) Preliminary Studies of Potential Reaction Mechanisms. *Contact Dermatitis* **1992**, 27 (2), 98–104. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1992.tb05217.x>.
- (155) Walzer, C.; Frenk, E. Ultrastructural Demonstration of Endogeneous Peroxidase Activity in Mammalian Epidermis. *Histochemistry* **1983**, 78 (4), 491–501. <https://doi.org/10.1007/BF00496201>.
- (156) Walzer, C.; Frenk, E. Cytochemical Expression of Epidermal Peroxidase and Cytochrome Oxidase Activities in Pathological Skin Conditions of Man. *Arch. Dermatol. Res.* **1986**, 278 (6), 460–464. <https://doi.org/10.1007/BF00455164>.
- (157) Test Guideline No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Methods. **2021**.
- (158) Green, A.; Whiteman, D.; Frost, C.; Battistutta, D. Sun Exposure, Skin Cancers and Related Skin Conditions. *J. Epidemiol.* **1999**, 9 (6sup), 7–13. https://doi.org/10.2188/jea.9.6sup_7.
- (159) Kadoma, Y.; Atsumi, T.; Okada, N.; Ishihara, M.; Yokoe, I.; Fujisawa, S. Radical-Scavenging Activity of Natural Methoxyphenols vs. Synthetic Ones Using the Induction Period Method. *Molecules* **2007**, 12 (2), 130–138. <https://doi.org/10.3390/12020130>.
- (160) Atsumi, T.; Iwakura, I.; Fujisawa, S.; Ueha, T. Reactive Oxygen Species Generation and Photo-Cytotoxicity of Eugenol in Solutions of Various PH. *Biomaterials* **2001**, 22 (12), 1459–1466. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00267-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00267-2).
- (161) Ehrenshaft, M.; Deterding, L. J.; Mason, R. P. Tripping up Trp: Modification of Protein Tryptophan Residues by Reactive Oxygen Species, Modes of Detection, and Biological Consequences. *Free Radic. Biol. Med.* **2015**, 89, 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.08.003>.
- (162) Brinkley, M. A Brief Survey of Methods for Preparing Protein Conjugates with Dyes, Haptens and Crosslinking Reagents. *Bioconjug. Chem.* **1992**, 3 (1), 2–13. <https://doi.org/10.1021/bc00013a001>.

- (163) Elgendy, E. M.; Khayyat, S. A. Oxidation Studies on Some Natural Monoterpenes: Citral, Pulegone, and Camphene. *Russ. J. Org. Chem.* **2008**, *44* (6), 814–822. <https://doi.org/10.1134/S1070428008060067>.
- (164) Bitterling, H.; Lorenz, P.; Vetter, W.; Conrad, J.; Kammerer, D. R.; Stintzing, F. C. Rapid Spectrophotometric Method for Assessing Hydroperoxide Formation from Terpenes in Essential Oils upon Oxidative Conditions. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68* (35), 9576–9584. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03981>.
- (165) Ahn, J.; Avonto, C.; Chittiboyina, A. G.; Khan, I. A. Is Isoeugenol a Prehaptent? Characterization of a Thiol-Reactive Oxidative Byproduct of Isoeugenol and Potential Implications for Skin Sensitization. *Chem. Res. Toxicol.* **2020**, *33* (4), 948–954. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00501>.
- (166) Kyagova, A. A.; Mansurova, G. V.; Kozir, L. A.; Ponomarev, G. V.; Pavlov, V. Y.; Konstantinov, I. O.; Potapenko, A. Ya. Systemic Suppression of the Contact Hypersensitivity by the Products of Protoporphyrin IX Photooxidation. *Photochem. Photobiol.* **2005**, *81* (6), 1380. <https://doi.org/10.1562/2005-04-26-RA-500>.
- (167) Sharma, S. B.; Mudaliar, M.; Rao, B. S. M.; Mohan, H.; Mittal, J. P. Radiation Chemical Oxidation of Benzaldehyde, Acetophenone, and Benzophenone. *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101* (45), 8402–8408. <https://doi.org/10.1021/jp9718717>.
- (168) Aloïse, S.; Ruckebusch, C.; Blanchet, L.; Réhault, J.; Buntinx, G.; Huvenne, J.-P. The Benzophenone $S_1(n, \pi^*) \rightarrow T_1(n, \pi^*)$ States Intersystem Crossing Reinvestigated by Ultrafast Absorption Spectroscopy and Multivariate Curve Resolution. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112* (2), 224–231. <https://doi.org/10.1021/jp075829f>.
- (169) Yabumoto, S.; Sato, S.; Hamaguchi, H. Vibrational and Electronic Infrared Absorption Spectra of Benzophenone in the Lowest Excited Triplet State. *Chem. Phys. Lett.* **2005**, *416* (1–3), 100–103. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2005.09.025>.
- (170) Kantor. Ketoprofen: A Review of Its Pharmacologic and Clinical Properties. In *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*; 1986; Vol. 3, pp 93–136.
- (171) Devleeschouwer, V.; Roelandts, R.; Garmyn, M.; Goossens, A. Allergic and Photoallergic Contact Dermatitis from Ketoprofen: Results of (Photo) Patch Testing and Follow-up of 42 Patients. *Contact Dermatitis* **2008**, *58* (3), 159–166. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2007.01296.x>.
- (172) Nakajima, A.; Tahara, M.; Yoshimura, Y.; Nakazawa, H. Determination of Free Radicals Generated from Light Exposed Ketoprofen. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **2005**, *174* (2), 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2005.03.015>.
- (173) Kumasaka, R.; Kikuchi, A.; Yagi, M. Photoexcited States of UV Absorbers, Benzophenone Derivatives. *Photochem. Photobiol.* **2014**, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/php.12257>.
- (174) Sahli, F.; Vilenó, B.; Gourlaouen, C.; Giménez-Arnau, E. Autoxidized Citronellol: Free Radicals as Potential Sparkles to Ignite the Fragrance Induced Skin Sensitizing Pathway. *Food Chem. Toxicol.* **2022**, *166*, 113201. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113201>.

Yannick PORT-LOUGARRE

Systèmes antioxydants *versus* prooxydants lors d'évènements dermatologiques :

Nouvelle approche par RPE pour étudier les espèces radicalaires induites par des xénobiotiques dans la peau

L'eugénol et l'isoeugénol sont des composés présents dans de nombreuses huiles essentielles et sont largement utilisés dans les cosmétiques et la parfumerie pour leurs propriétés odorantes. Ces deux composés sont caractérisés par (i) leurs propriétés antioxydantes et cytoprotectrices, mais aussi (ii) leurs activités prooxydantes et cytotoxiques bien connues des dermatologues spécialisés dans l'allergie de contact, ce qui contraint l'industrie européenne à étiqueter leur présence sur les produits cosmétiques manufacturés.

Afin de combiner la compréhension de la réactivité des antioxydants avec l'établissement des frontières menant à l'action allergisante de ces molécules, l'objectif de ce travail était d'étudier la formation potentielle d'intermédiaires radicalaires réactifs dans la peau et de comprendre leurs mécanismes d'action.

Dans ce contexte, le travail de recherche s'est articulé autour des axes suivants : (i) synthèse d'eugénol et d'isoeugénol contenant des substitutions isotopiques ciblées (^{13}C), (ii) utilisation de la résonance paramagnétique électronique combinée à des sondes de spin (*i.e.*, *spin trapping* et *spin scavenging*) sur des modèles d'épiderme humain reconstitué, histologiquement similaires à la peau humaine, afin d'évaluer ce qui pourrait se passer *in vivo*, (iii) utilisation de techniques alternatives permettant d'apporter des informations complémentaires pour valoriser l'enrichissement isotopique (études de réactivité sur les acides aminés) et (iv) validation de l'utilisation d'un système d'irradiation épidermique par une étude préliminaire sur des composés photo-sensibilisants.

Mots-clés : (Iso)eugénol, substitution isotopique, résonance paramagnétique électronique, allergie de contact, antioxydants, piégeage de spin, épiderme humain reconstitué, photo-exposition, système enzymatique, mécanismes radicalaires

Eugenol and isoeugenol are compounds present in many essential oils and are widely used in cosmetics and perfumery because of their odorant features. Both compounds are identified for (i) their antioxidant-cytoprotective properties, but also (ii) their prooxidant-cytotoxic activities well known to dermatologists specialized in allergic contact dermatitis, which compels the European industry to label their presence on cosmetics manufactured products.

In order to combine the understanding of antioxidant reactivity with the establishment of boundaries leading to the allergenic action of these molecules, the objective of this work was to investigate the potential formation of reactive radical intermediates in the skin and to understand their mechanisms of action.

In this context, the research work was articulated around the following axes: (i) synthesis of eugenol and isoeugenol containing targeted isotopic substitutions (^{13}C), (ii) use of electron paramagnetic resonance combined with spin probes (*i.e.*, spin trapping and spin scavenging) on reconstructed human epidermis models, histologically similar to human skin, in order to evaluate what could happen *in vivo* under conditions close to human exposure, (iii) use of alternative techniques allowing to bring complementary information valorizing isotopic enrichment (reactivity studies on amino acids) and (iv) validation of the use of an epidermal irradiation system by a preliminary study on photo-sensitizing compounds.

Keywords : (Iso)eugenol, isotopic substitution, electron paramagnetic resonance, allergic contact dermatitis, antioxidants, spin trapping, reconstructed human epidermis, photo-exposition, enzymatic system, radical mechanisms