

N° d'ordre : 4145

# THÈSE

présentée à

**L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

par **M Nicolas CANDELON**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR**

SPÉCIALITÉ : **CHIMIE ORGANIQUE**

\*\*\*\*\*

**CONCEPTION ET DEVELOPPEMENT D'UNE NOUVELLE METHODE  
D'ANALYSE DE PRECEUSEURS CYSTEINYLES D'AROMES DU VIN ET  
D'INDICATEUR DE MATURITE**

\*\*\*\*\*

Soutenance le : 10/12/2010

Après avis de :

<b>MM.</b>	ANTONIOTTI Sylvain	Chargé de recherche, CNRS	<b>Rapporteur</b>
	MOSSALAYI Djavad	Professeur, Bordeaux 2	<b>Rapporteur</b>

Devant la commission d'examen formée de :

<b>MM.</b>	ANTONIOTTI Sylvain	Chargé de recherche, CNRS	<b>Rapporteur</b>
	MOSSALAYI Djavad	Professeur, Bordeaux 2	<b>Rapporteur</b>
	BENNETAU Catherine	Professeur, ENITA de Bordeaux	<b>Examineur</b>
	POIX Svitlana	IR, ENITA de Bordeaux	<b>Examineur</b>
	FOUQUET Eric	Professeur, Bordeaux 1	<b>Président</b>
	BENNETAU Bernard	Directeur de recherche, CNRS	<b>Directeur de thèse</b>
	DUBOURDIEU Denis	Professeur, Bordeaux 2	<b>Directeur de thèse</b>

- 2010 -

A mes Parents, à ma Femme, à ma Fille,

A ma Famille,

A mes Amis.

# Remerciements

Je tiens à remercier Philippe Garrigues, directeur de l'ISM, pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein son institut. Je remercie également Thierry Toupance pour m'avoir accueilli dans son groupe (Matériau) et mis à disposition tout un équipement de qualité.

Un grand merci à MM. Antoniotti et Mossalayi d'avoir bien voulu faire partie de mon jury de thèse en tant que rapporteurs. De même, je remercie M Fouquet d'avoir accepté d'être examinateur de mon travail.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse Bernard Bennetau pour m'avoir proposé ce sujet de recherche et pour l'encadrement privilégié qu'il m'a fourni lors de ma thèse. Je lui exprime toute ma reconnaissance pour la confiance et la liberté qu'il m'a accordées durant cette thèse.

Je remercie également mon codirecteur de thèse Denis Dubourdieu, directeur de l'ISVV, pour sa présence dans mon jury.

Un grand merci et hommage à Takatoshi Tominaga, pionnier de la recherche sur les précurseurs d'arôme, malheureusement disparu pendant cette thèse.

Un grand merci à Cathy Bennetau sans qui je n'aurai jamais pu réaliser tous les dosages immunologiques. Nos discussions ont souvent été fructueuses et elles m'ont appris beaucoup de notions en immunologie.

Je tiens à remercier également une personne qui a beaucoup compté pour moi tout au long de cette thèse et avec qui j'ai toujours eu une bonne relation, il s'agit de Svitlana Poix. Elle m'a transmis de nombreuses connaissances et appris la rigueur dans la façon de travailler. Elle m'a toujours fait confiance et je lui en serai toujours reconnaissant. Partager ton bureau a toujours été un plaisir, merci encore pour tout.

Toutes mes expériences n'auraient été possibles sans l'aide de Valérie Lamothe qui m'a appris du côté pratique les dosages immunologiques. Je la remercie pour tout ce qu'elle a fait pour moi durant cette thèse, je ne crois pas qu'une seule fois elle ait dit non à une de mes demandes. Merci aussi pour ta bonne humeur constante.

Je remercie très fortement le Dr. Pierre Babin pour tout le savoir qu'il a partagé avec moi et aussi pour toute la bonne humeur qu'il apportait dans le laboratoire.

Un grand merci également à Jean-Marie Schmitter pour la détermination des taux de couplages en spectrométrie de masse.

Je tiens à remercier Laurent Thomas qui est devenu bien plus qu'un collègue au cours de cette thèse.

Merci aux membres du groupe Matériaux pour la bonne ambiance qu'il y règne (Luc, Marie, Jean-Paul, Bernard, Hervé, Marc, Céline, Yohann et Karine).

Un grand merci à Odile Babot qui est dévouée au bon fonctionnement du groupe Matériau et tout le traitement logistique.

Merci aux thésards et post doc du groupe Matériaux qui m'ont aidé à réaliser cette thèse chacun à leur façon : Daniel, Michaël, Laëtitia, Sana et Etienne, ce fut une très grande joie de passer ma thèse avec eux, Pascal, Edith et Marc qui m'ont apporté toute leur expérience. Merci à tous ceux qui sont passés par le labo et qui se reconnaîtront.

Je n'oublie pas non plus les membres de l'ENITA (Sandrine, Mylène, Annie, ...) qui m'ont permis d'aller travailler toujours dans des bonnes conditions.

Merci à Cécile et Elise pour avoir partagé avec moi leur savoir en œnologie.

Je tiens à remercier également tout le personnel administratif de l'ISM (Titi, Fabrice, Virginie,...) pour leur bonne humeur et tout le travail qu'ils fournissent au sein de l'institut.

Mes pensées vont également à mes amis qui m'ont soutenu au cours de ma thèse (Vince, Emilie, Eric et le schtroumpf, Alex et Cécile, Julie et Damien, Alya et Fab, Emilie et Olivier, Rédouane, entre autres).

Enfin, merci à ma Mère, à ma Femme, à ma Fille et à ma Famille qui m'ont toujours soutenu.

Je dédie tout ce travail à mon Père, malheureusement disparu pendant cette thèse, et à ma fille, Hanaé, arrivée pendant l'écriture de ce manuscrit.

Pour finir, j'exprime toute ma gratitude au CIVB pour le soutien financier tout au long de ma thèse.

## Sommaire

Remerciements .....	3
Abréviations .....	9
Introduction Générale.....	13
Chapitre I : Présentation du sujet .....	16
I – Arômes et dosages .....	17
I – 1 – Qu’est ce qu’un arôme ? .....	17
I – 2 – De la vigne au vin .....	17
I – 3 – Composants principaux de l’arôme du vin .....	19
I – 4 – L’influence du terroir et du climat .....	19
II – Les cépages.....	20
II – 1 – Qu’est-ce qu’un cépage ? .....	20
II – 2 – Les grands cépages rouges dans le bordelais.....	20
II – 3 – Les grands cépages blancs dans le bordelais .....	21
III – Les molécules à doser .....	22
III – 1 – Les thiols volatils et les précurseurs.....	22
III – 2 – Les composés aromatiques azotés : les pyrazines .....	26
III – 3 – Les dosages existants .....	29
IV – Les dosages immunologiques .....	29
IV – 1 – Brefs rappels sur le dosage immunologique .....	30
IV – 2 – Principe du dosage immunologique .....	31
IV – 3 – Mise au point d’un dosage immunologique .....	34
V – Conception de l’haptène .....	36
V – 1 - Haptènes.....	36
V – 2 – Bras espaceur.....	37
V – 3 – Couplage aux protéines porteuses .....	38
V – 4 – Contrôle du taux de couplage .....	39

VI – Production des anticorps .....	40
VI – 1 – Quelques définitions .....	40
VI – 2 – Comment obtient-on des IgG solubles spécifiques ? .....	42
Chapitre II : Synthèse du P3SH et de ses haptènes Dosage immunologique du P3SH .....	46
I – Synthèse du précurseur du P3SH .....	47
II – Synthèse et couplage des haptènes aux protéines porteuses.....	48
II – 1 – Nature des immunogènes envisagés .....	48
II – 2 – Synthèse des linkers et couplage des haptènes I et II .....	49
II – 3 – Synthèse et couplage de l’haptène III.....	51
II – 4 – Synthèse et couplage de l’haptène IV.....	53
II – 5 – Bilan des synthèses et des couplages.....	58
III – Mise au point des tests ELISA .....	59
III – 1 – Détermination des différents paramètres.....	59
III – 2 – Tests homologues et hétérologues.....	60
III – 3 – Tests croisés .....	61
III – 4 – Tests de gamme .....	67
III – 5 – Conclusion.....	69
Chapitre III : Synthèse du P4SMP et de son haptène Dosage du P4MSP .....	71
I – Synthèse du P4MSP .....	72
II – Etude structurale du P4MSP en fonction du pH.....	72
III – Synthèse, étude structurale et couplage de l’H <sub>1</sub> P4MSP.....	74
III – 1 – Synthèse de l’haptène du P4MSP.....	74
III – 2 – Etude structurale de l’H <sub>1</sub> P4MSP .....	75
III – 3 – Couplage de l’H <sub>1</sub> P4MSP à la BSA .....	76
IV – Résultats préliminaires sur les tests ELISA .....	78
V – Conclusion.....	79
Chapitre IV : Synthèses de méthoxypyrazines, de leurs haptènes et .....	80

dosages immunologiques de l'IBMP et de l'IPMP .....	80
I – Synthèses d'alkylméthoxy-pyrazines substituées ou non .....	83
I – 1 – Substitution en position 6- .....	83
I – 2 – Substitué en position 5-.....	84
I – 3 – Produit naturel.....	85
II – Synthèse des haptènes de MP .....	86
II – 1 – Haptène de l'IBMP .....	86
II – 2 – Haptène de l'IPMP .....	86
III – Couplage des haptènes des alkylméthoxy-pyrazines.....	87
IV – Mise au point des dosages immunologiques .....	89
III – Conclusions .....	91
Conclusion générale et perspectives .....	98
Modes Opératoires .....	100
I - Techniques d'analyse .....	101
I - 1 - Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) .....	101
I - 2 – Chromatographie .....	101
I - 3 – Spectroscopie Infrarouge .....	101
I – 4 – Solvant et réactifs.....	101
II – Synthèse.....	102
III – Couplage.....	122
IV – Immunisation des lapins.....	126
V – Test ELISA.....	127
Bibliographie.....	130

# Abréviations

Molécules cibles:

3MSB	2-méthyl-3-sulfanylbutan-1-ol
3SH	3-sulfanylhéxan-1-ol
4MSP	4-méthyl-4sulfanylpentan-2-one
4MSPOH	4-méthyl-4sulfanylpentan-2-ol
A3SH	acétate de 3-sulfanylhéxyl
IBMP	2-isobutyl-3-méthoxy-pyrazine
IPMP	2-isopropyl-3-méthoxy-pyrazine
MP	alkylméthoxy-pyrazines
P3SH	précurseur du 3-sulfanylhéxan-1-ol
P4MSP	précurseur de la 4-méthyl-4sulfanylpentan-2-one
SBMP	2- <i>sec</i> -butyl-3-méthoxy-pyrazine

Autres

Ac	anticorps
[Ac I]	dilution des anticorps primaires
Ag	antigène
AL	antigène libre
Arg	arginine
B	blanc
B <sub>0</sub>	liaison maximale entre l'anticorps primaire et le coating
BSA	bovine serum albumin
[C]	concentration de coating
CCM	chromatographie sur couche mince
CPA	cellule présentatrice d'antigène
DCM	dichlorométhane
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
ENITA	école nationale d'ingénieur des travaux agricoles
GC	chromatographie gazeuse
GC-MS	chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
HIV	virus de l'immunodéficience humaine
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation experiment
HPLC	chromatographie liquide à haute performance
<i>i</i> Bu	<i>iso</i> -butyl

IC <sub>50</sub>	concentration d'inhibition : sensibilité
Ig	immunoglobuline
<i>i</i> Pr	<i>iso</i> -propyl
IR	infrarouge
ISM	institut des sciences moléculaires
LC-MS	chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
Lys	lysine
MALDI	matrix assisted laser desorption ionisation
M	molarité
MM	masse molaire
UV	ultraviolet
RMN	résonance magnétique nucléaire
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis
NS	non spécifique
OPD	<i>ortho</i> -phénylène diamine
<i>s</i> Bu	<i>sec</i> -butyl
Thyr	thyroglobuline

Unités :

% v/v	pourcentage volume / volume
°C	degré Celsius
Da	dalton
g	gramme
g.L <sup>-1</sup>	gramme par litre
g.mol <sup>-1</sup>	gramme par mole
h	heure
min	minute
mg	milligramme
mL	millilitre
mm	millimètre
mol	mole
mmol	millimole
μmol	micromole
μL	microlitre

$\mu\text{g.mL}^{-1}$	microgramme par millilitre
$\text{ng.L}^{-1}$	nanogramme par litre
$\text{ng.mL}^{-1}$	nanogramme par millilitre
nm	nanomètre
ppm	partie par million

# Introduction Générale

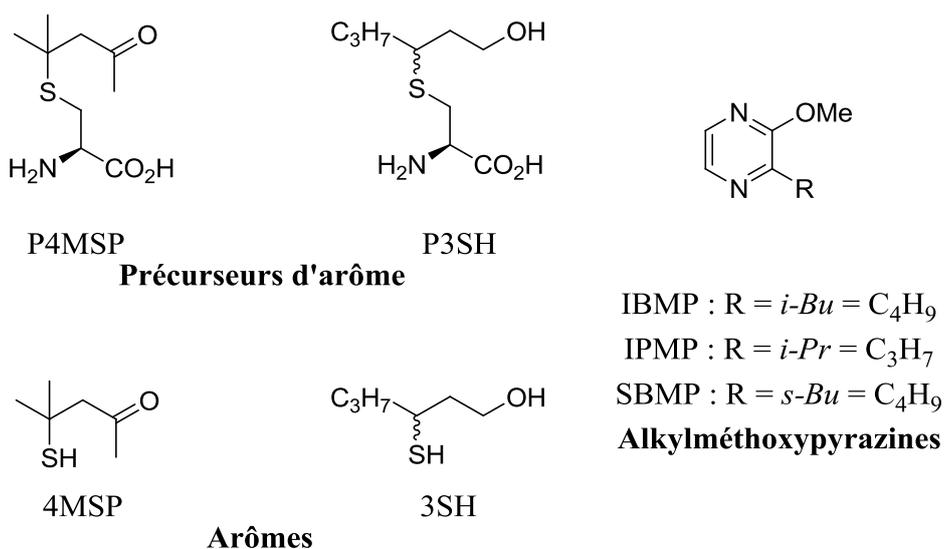
La quantification des arômes du vin prend aujourd'hui un essor considérable, pour expliquer sur le plan scientifique les effets de typicité des terroirs et sur le plan professionnel pour aider à caractériser la qualité des cépages et des assemblages afin d'améliorer la vinification.

Des analyses performantes pour un certain nombre de composés aromatiques parmi les plus pertinentes ont été développées. Cependant les techniques utilisées, en particulier la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, présentent de nombreux inconvénients (prétraitement des échantillons, coût élevé du matériel, mise en œuvre par du personnel qualifié) d'où leur utilisation réservée à la recherche dans les laboratoires spécialisés et non applicable à la production au sein des exploitations.

Cette Thèse a eu pour objectif de rechercher un nouveau type de dosage (dosage immunologique) directement adapté sur le terrain, peu onéreux et simple à mettre en œuvre.

Les molécules visées sont principalement présentes dans les vins de Cabernet Sauvignon (alkylméthoxy-pyrazines) et de Sauvignon blanc (précurseurs cystéinylés d'arômes et alkylméthoxy-pyrazines). Pour les composés cystéinylés, il s'agit du précurseur de la 4MSP (4-méthyl-4-sulfanyl-pentan-2-one) noté ici P4MSP, ainsi que celui du 3SH (3-sulfanylhexan-1-ol) noté ici P3SH (Figure 1). Après clivage enzymatique, les thiols volatils sont libérés et sont responsables d'arômes de pamplemousse et de fruits de la passion pour le P3SH. Le P4MSP est responsable d'arômes de buis à faibles doses et d'arôme désagréable "d'urine de chat" à forte concentration.

Pour les alkylméthoxy-pyrazines (MP), il s'agit du 2-isobutyl-3-méthoxy-pyrazine (IBMP), du 2-isopropyl-3-méthoxy-pyrazine (IPMP) et du 2-*sec*-butyl-3-méthoxy-pyrazine (SBMP) responsables d'odeurs poivrées vertes, composés herbacés dont il convient de limiter les concentrations dans les vins rouges. Ces arômes disparaissent au cours de la maturation des baies de raisin, ils sont donc des marqueurs de maturité. En conséquence, il serait très utile de détecter et de mesurer la concentration de ces composés au cours de la maturation, afin de donner aux professionnels un outil d'aide à la décision, avec d'autres paramètres pertinents, du meilleur moment de la récolte.



**Figure 1.** Structure des molécules cibles faisant l'objet de ce travail.

La méthode d'analyse envisagée est un dosage immunologique de type ELISA. Il est basé sur la détection d'un composé (l'antigène) par un anticorps sélectif et spécifique. La difficulté majeure dans la mise au point d'un test immunologique est l'obtention des anticorps spécifiques. Ceux-ci sont des protéines de la famille des immunoglobulines (IgG) que tout animal fabrique en réponse à un contact humoral avec une molécule, particule, ou cellule étrangère. Toutefois, les composés visés (précurseurs d'arômes, alkylméthoxypyrazines) étant de faibles poids moléculaires, ils ne sont pas immunogènes et n'induisent donc pas la production d'anticorps spécifiques lorsqu'ils sont injectés directement à un animal. Pour obtenir les anticorps indispensables à la mise au point des dosages, il faut synthétiser une molécule proche structurellement de la cible visée mais modifiée chimiquement afin de la coupler à une protéine, et de la rendre immunogénique. Les anticorps produits sont ensuite collectés et les tests de titration, de spécificité ainsi que la mise au point des conditions optimales de dosages peuvent alors être réalisés.

Ces tests immunologiques pourraient donc constituer un apport scientifique et technique original à la filière vitivinicole régionale et au delà, puisque les molécules ciblées sont présentes dans les vins de Sauvignon blanc et de Cabernet Sauvignon, cultivés dans toutes les régions viticoles du monde, ainsi que dans d'autres cépages.

Chapitre 1 :  
Présentation du sujet

# I – Arômes et dosages

## I – 1 – Qu'est ce qu'un arôme ?

Le mot arôme vient du grec *arôma* qui signifie épice, dont dérive le latin *aromate* et parfum. Au XII<sup>ème</sup> siècle, il prend le sens unique de parfum, émis par des essences végétales ou toute autre substance volatile. Aujourd'hui, le terme "arôme" fait référence à une famille d'odeurs. Un classement distingue les odeurs agréables non alimentaires, dénommées parfums, des odeurs attachées aux aliments, qui sont les arômes. Une seule exception : les arômes des glaces sont appelés parfums.<sup>1</sup>

En dégustation, l'arôme n'est pas perçu uniquement en tant qu'odeur ; il est aussi flaveur, c'est-à-dire goût et odeur perçus simultanément en bouche et par voie rétronasale.

## I – 2 – De la vigne au vin

### I – 2 – 1 – La grappe de raisin

La matière première du vin est le raisin. Ce dernier est le fruit de la vigne, espèce botanique appartenant au genre *Vitis* dont les inflorescences sont des grappes. Les vins sont élaborés à partir d'une vendange comprenant des parties diverses (Figure 2) :<sup>2</sup>

- la rafle qui est la charpente de la grappe ;
- les fruits, comprenant une peau (la pellicule), une chair (la pulpe) et des graines (les pépins).

La rafle atteint ses dimensions définitives à véraison. A maturité, elle représente 3 à 6 % du poids de la grappe. La rafle est constituée de :

- tanins : 3 % du poids de la rafle,
- eau : 78 à 80 % du poids de la rafle,
- substances minérales : 2 à 3 % du poids de la rafle.

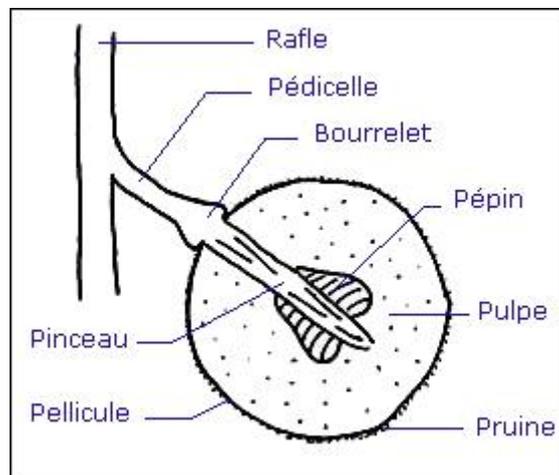
La pellicule du raisin est constituée de l'épiderme et de l'hypoderme (plusieurs couches de cellules riches en substances élaborées). La pellicule renferme :

- des composés phénoliques,

- des substances odorantes sous forme libre et de précurseurs d'arômes, mélange spécifique du cépage,
- des substances pectiques,
- des substances minérales.

La pulpe est la partie la plus importante de la vendange. Elle représente 80 à 85 % du poids de la grappe. Les constituants essentiels de la pulpe de raisin, en dehors de l'eau, sont les sucres et les acides.

Les pépins sont constitués de composés phénoliques (tanins), qui représentent 5 à 8 % du poids des pépins, et d'huiles, qui nuisent à la qualité du vin.<sup>2</sup>



**Figure 2.** Structure de la baie de raisin.

### I – 2 – 2 – La vendange

Le vin est élaboré à partir d'une matière première hétérogène :

- une phase solide : la rafle, la pellicule et les pépins ;
- une phase liquide (moût), qui correspond au jus libéré par la pulpe du raisin.

La composition chimique de la vendange dépend de nombreux facteurs viticoles sur lesquels le viticulteur n'a que peu d'action (météorologie, climatologie, terroir...), mais aussi d'autres facteurs dont, au contraire, il se préoccupe notamment la date de la vendange, le mode de ramassage, le tri avant mise en cuve. Il est donc important de suivre l'évolution du raisin sur pied et de connaître l'incidence des différents constituants chimiques de la grappe sur les qualités de la production.<sup>3</sup>

### **I – 3 – Composants principaux de l'arôme du vin**

L'arôme des vins résulte du mélange d'une multitude de substances odorantes aux origines diverses.

Les "arômes variétaux", ou "arômes primaires", proviennent de la matière végétale. Ils peuvent naître de tous les éléments de la grappe de raisin. La rafle et les pépins possèdent un potentiel aromatique particulier, agréable ou désagréable selon la manière dont le vigneron le laissera s'exprimer (famille des arômes herbacés). Dans certains cas cependant, la rafle n'est pas utilisée et seules les baies sont mises en cuve. Il existe dans la baie de raisin des précurseurs d'arômes inodores qui sont à même de libérer des molécules volatiles soit par action mécanique, soit par une action chimique ou biochimique. Certains arômes sont caractéristiques des cépages. Cependant, si les arômes naissent du raisin, il ne faut pas oublier que la vigne se nourrit dans un sol spécifique et que ce dernier influence également les arômes primaires.<sup>4</sup>

Les arômes secondaires portent aussi le nom d'arômes fermentaires, car ils sont produits par le travail des levures sur les moûts, lors des différents types de macérations et lors des fermentations alcoolique et malolactique. Le vinificateur peut choisir les souches de levures qui lui semblent intéressantes pour enrichir le potentiel aromatique de son vin. Ces arômes évoquent les petits fruits rouges dans la plupart des vins rouges encore jeunes. Dans les vins blancs du même âge, une note fréquente et facile à reconnaître est celle de la pomme golden.<sup>5</sup>

Les arômes tertiaires correspondent à l'évolution des composants aromatiques au cours de l'élevage du vin en fût, puis en bouteille. Ils forment un faisceau de parfums que les dégustateurs appellent "bouquet".<sup>6</sup>

### **I – 4 – L'influence du terroir et du climat**

Le mot "terroir" désigne l'ensemble des facteurs caractéristiques d'un vignoble : le sol, le sous-sol, le relief, le régime hydrique, l'exposition et le microclimat ainsi que le savoir faire traditionnel associé à la région géographique que l'on considère. Ainsi, les facteurs humains, c'est-à-dire l'ensemble des techniques et des habitudes culturelles locales, doivent également être pris en compte.<sup>7</sup>

Il n'existe pas de climat idéal pour la culture de la vigne. La vigne se rencontre *grosso modo* dans le monde entre les 30<sup>ème</sup> et 50<sup>ème</sup> parallèles nord et les 30<sup>ème</sup> et 40<sup>ème</sup> parallèles sud. Les zones de production sont plus ou moins sous influence océanique ce qui montre la grande plasticité de la vigne. Les vigneron s'intéressent donc aux particularités de chaque aire où ils font prospérer tel ou tel cépage, ainsi qu'aux données climatiques qui influencent les qualités aromatiques de leurs crus.<sup>7</sup>

## **II – Les cépages**

### **II – 1 – Qu'est-ce qu'un cépage ?**

Un cépage est un cultivar de vigne c'est-à-dire une variété au sein d'une population composée d'individus génétiquement différents mais qui présentent des caractéristiques proches (par exemple : forme des feuilles et des grappes), plutôt qu'une variété de vigne au sens botanique. Le cépage ne peut être multiplié que par voie végétative (bouture, marcottage ou greffe). Il existe quelque dix mille cépages dans le monde. Pourtant, une part infime de ce nombre est réellement cultivée aujourd'hui pour une production commerciale de raisins de table à manger, de raisins secs ou de raisin de cuve destiné à la vinification.<sup>8</sup>

### **II – 2 – Les grands cépages rouges dans le bordelais**

Le jus des cépages rouges n'est pas forcément coloré. En effet, les cépages de qualité possèdent un jus incolore. La peau du raisin contient des pigments colorés (anthocyanes). C'est en laissant macérer ces pellicules avec le jus que la coloration rouge est obtenue. Il est donc parfaitement possible d'obtenir un vin blanc avec des cépages rouges.<sup>9</sup>

Les principaux cépages rouges sont : le Merlot, la Cabernet franc et le Cabernet Sauvignon. On s'intéresse plus particulièrement au Cabernet Sauvignon. En effet, c'est une variété peu exigeante tant sur le plan du sol que sur celui du climat ; il résiste bien aux maladies et produit un vin que les connaisseurs identifient rapidement. Le Cabernet Sauvignon n'est pas le cépage le plus planté en Bordelais (il s'agit du Merlot). En effet, le Cabernet Sauvignon est rarement utilisé seul. Cependant, lors des assemblages, ce dernier devient incontournable. La plupart des Bordeaux qui vieillissent bien ont une forte proportion de Cabernet Sauvignon. Même dans le Médoc et les Graves où le Cabernet Sauvignon est le principal cépage dans l'assemblage des meilleurs châteaux, sa proportion n'atteint jamais 50% de l'ensemble.<sup>10, 11</sup> Dans le Médoc, ce cépage exprime son austérité minérale à Saint-

Estèphe, son intensité parfumée de violette à Margaux, ses arômes de cassis et de rognures de crayons à Pauillac, de cèdre et de boîte à cigares à Saint Julien ; plus doux et riche à Moulis, on le trouvera vaguement boueux à Listrac. Dans le Pessac-Léognan, le Cabernet Sauvignon retrouve son austérité minérale. Les terroirs mineurs tels que le sud des Graves offrent de bonnes saveurs de cassis, sans l'intensité des meilleures régions.<sup>12</sup>

Deux autres cépages sont importants dans le bordelais : il s'agit du Merlot et du Cabernet franc. Le Merlot est un cépage assez vigoureux qui se plaît principalement dans les terres fraîches qui conservent suffisamment d'humidité pendant l'été. C'est en Gironde que le Merlot s'est surtout développé avec un peu moins de 60000 hectares.<sup>13</sup>

Enfin, le Cabernet franc a aussi son importance en Bordelais. Il est essentiellement planté sur la rive droite de la Dordogne et de la Gironde. Il trouve là un terroir de choix dans le Libournais, sur des sols sablo-graveleux assez chauds pour la bonne maturation des ses raisins. Ses vins sont alors finement structurés.<sup>14</sup> Après avoir été rejeté, le petit Verdot constitue aujourd'hui un cépage d'appoint en Gironde où il apporte une touche de complexité dans les assemblages. Il a été réintroduit dans le Médoc et en Pessac-Léognan malgré sa maturité tardive car ce caractère tend à devenir moins limitant avec le réchauffement du climat.

## **II – 3 – Les grands cépages blancs dans le bordelais**

La peau des raisins blancs ne contient pas les pigments colorants rouges (anthocyanes), mais d'autres qui lui donnent une teinte jaune plus ou moins soutenue.<sup>15</sup>

Parmi les cépages blancs bordelais, le Sauvignon blanc représente à peu près 20%. Le Sauvignon blanc est connu sous différents noms à travers le monde (blanc fumé ou tout simplement fumé dans la Nièvre, en Australie et en Californie il est connu sous le nom de Sauvignon blanc...).<sup>16</sup> Un climat propice est indispensable pour obtenir l'équilibre presque insaisissable entre maturité des sucres, acidité et arômes. Le climat est la première condition à observer avant de planter du Sauvignon blanc ; la nature du sol compte, mais elle est accessoire. La qualité du Sauvignon blanc s'est énormément améliorée dans le Bordelais depuis dix ans. Ce Bordeaux présente une fraîcheur assez fiable. A Sauternes et Barsac, ainsi que dans les appellations isolées de vins doux (Loupiac, Cérons, Cadillac et Sainte-Croix-Du-Mont) le Sauvignon blanc occupe 10 à 40% des vignobles. Sa pellicule fine le rend très sensible au botrytis, et son acidité ajoute de la fraîcheur aux assemblages.<sup>17</sup>

Deux autres cépages blancs sont très utilisés dans le bordelais : le Sémillon et la Muscadelle. Si le Sémillon reste en France le deuxième cépage blanc le plus planté (après l'Ugni blanc), ses superficies sont en constante régression. Ce prestigieux cépage reste fidèle à la Gironde et, plus généralement, au Sud-Ouest, où il fait parti de tous les grands vins blancs d'appellation de cette région.<sup>18</sup>

La Muscadelle est essentiellement cultivée en Gironde et en Dordogne. Elle semble être originaire d'Aquitaine. Elle n'appartient pas à la grande famille des muscats, bien que ses raisins, très mûrs, présentent un parfum légèrement musqué.<sup>19</sup>

### **III – Les molécules à doser**

Les composés volatils ont un impact sur la qualité du vin (odeur et goût). Ils sont présents en très faible quantité dans le vin. Certains composés sont responsables d'odeurs ou de goûts agréables, une augmentation de leur concentration est donc souhaitée. Au contraire, d'autres ont un impact négatif sur la qualité du vin, ils sont donc à éliminer. Afin de pouvoir évaluer leur importance on parle de seuil de perception. Ce dernier correspond à la limite à laquelle un individu peut percevoir une saveur. Le goût varie entre chaque personne en fonction de deux critères qui sont l'âge de la personne et son hygiène de vie (habitudes alimentaires). Ainsi en fonction de ces deux critères les seuils de perception aux différentes saveurs qui sont l'acidité, l'amertume, le sucré et le salé varient considérablement. Il est nécessaire au dégustateur de connaître au mieux ses différents seuils de perception et sa sensibilité avant de pouvoir évaluer un vin non pas en fonction de son propre goût mais bien en fonction de l'équilibre de ce dernier. Il est important aussi de noter qu'en vieillissant le dégustateur verra ses préférences changer en matière de type de vins en fonction de l'évolution de son propre goût et ainsi en fonction de l'évolution de ses papilles gustatives.

#### **III – 1 – Les thiols volatils et les précurseurs**

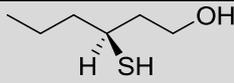
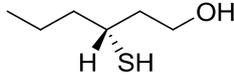
Les thiols volatils et les précurseurs d'arômes sont des molécules extrêmement étudiées en œnologie car elles sont responsables d'arômes fruités dans les vins blancs. Elles ont été identifiées et caractérisées pour la première fois à la Faculté d'Œnologie de Bordeaux II par l'équipe du Professeur Dubourdieu et du Dr. Tominaga.

### III – 1 – 1 – Les thiols volatils

Les thiols volatils constituent une famille chimique prépondérante dans l'arôme de nombreux vins. Ils possèdent des seuils de perception olfactive très faibles, inférieurs à la centaine de  $\text{ng.L}^{-1}$ . Malgré les concentrations souvent inférieures au  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , ils ont donc un impact majeur sur le profil aromatique global.

Parmi ces composés, la 4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-one (4MSP)<sup>20-22</sup> et l'acétate de 3-sulfanylhexanol (A3SH)<sup>23</sup> aux odeurs puissantes de buis et de genêt, ainsi que le 3-sulfanylhexan-1-ol (3SH)<sup>24, 25</sup> aux notes fruitées d'agrumes ont été identifiés comme des contributeurs majeurs de l'arôme des vins de Sauvignon blanc. Les travaux de l'équipe du Professeur Denis Dubourdieu, depuis une vingtaine d'année, ont permis d'identifier et de quantifier les principaux thiols volatils.<sup>21-28</sup> Pour chaque thiol volatil présenté, il est exposé dans le Tableau 2 sa formule chimique, sa teneur dans les vins ainsi que son seuil de perception.

Toutes ces molécules possèdent la même structure générale. En, effet, la fonction sulfanyle est éloignée par trois carbones de toutes autres fonctions (alcool ; cétone, ester). Le 3SH, composé le plus important, possède un arôme de fruit de la passion qui a été identifié pour la première dans le fruit portant le même nom.<sup>29, 30</sup> Ce composé est une molécule chirale possédant un centre asymétrique. Chaque énantiomère possède sa propre odeur. L'énantiomère *R* évoque le pamplemousse tandis que l'énantiomère *S* évoque une odeur de fruit de la passion (Tableau 1).<sup>31</sup> Dans les vins blancs, le mélange énantiomérique se trouve dans des proportions 50:50. Cependant, les proportions du mélange énantiomérique peuvent varier jusqu'à un mélange de 30:70.

Arôme	Odeur
 3SH (S)	Fruit de la passion
 3SH (R)	Pamplemousse

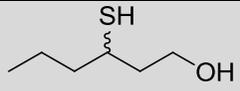
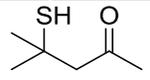
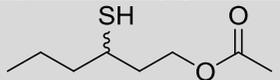
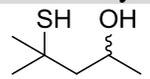
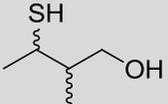
**Tableau 1.** Enantiomères du 3SH.

Les thiols participent fortement à l'arôme caractéristique du cépage utilisant souvent les descripteurs tels que "buis, genêt, pipi de chat...", plus ou moins agréables, mais aussi "agrume, citron, pamplemousse, fruit exotique...".

La typicité des vins de Sauvignon blanc est principalement liée à la présence de la 4MSP et du 3SH.<sup>22, 25, 26</sup> Ces thiols volatils ont également été retrouvés dans d'autres vins. Le 3SH a été identifié dans de nombreux vins blancs comme la petite Arvine de Suisse,<sup>32, 33</sup> Muscat, Riesling, et Gewürztraminer d'Alsace, Sémillon, Petit et Gros Manseng,<sup>34</sup> les vins de Champagne<sup>35</sup> mais également dans les vins rouges.<sup>36, 37</sup> La présence de la 4MSP est plus spécifique au Sauvignon<sup>38</sup> mais a toutefois été signalée dans les vins de Maccabeo,<sup>39</sup> de Schereube<sup>40, 41</sup> et de Grenache.<sup>40</sup>

Les thiols sont des composés très réactifs. Ils peuvent se dégrader par oxydation en formant des dimères.<sup>42, 43</sup> De plus, les thiols volatils peuvent réagir avec d'autres composants de la matrice du vin pour former des molécules responsables de défauts olfactifs comme des thioacétals.<sup>42, 44</sup> Enfin, par réaction de Michaël, ils peuvent former des adduits avec les quinones contenues dans le vin.<sup>45-47</sup> Du fait de leur grande réactivité, les thiols volatils peuvent donc être rapidement dégradés dans certains vins.

Dans les vins de pourriture noble, Tominaga *et al.* ont détecté le 3SH et la 4MSP en concentration très élevée en comparaison de vins blancs secs de même cépage.<sup>34</sup> La présence de thiols volatils dans les vins de pourriture noble met donc en évidence un paradoxe : malgré la botrytisation, l'arôme variétal des vins liquoreux est beaucoup plus stable que celui des vins blancs secs.<sup>48</sup> Il semble que la laccase oxyde les composés phénoliques en quinones, puis favorise leur polymérisation et leur précipitation. Ainsi, il y aurait moins de quinones disponibles pour réagir avec les thiols volatils libérés lors de la fermentation alcoolique.

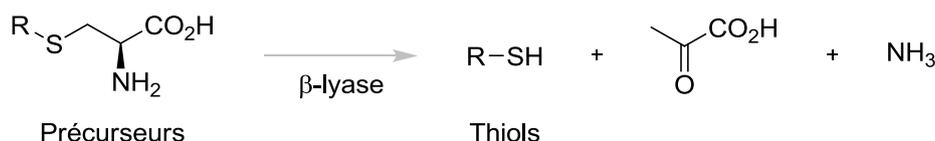
Composé Thiol Volatil	Structure et nomenclature	Descripteur	Seuil de perception (ng.L <sup>-1</sup> )		Teneurs dans le vin <sup>49</sup> (ng.L <sup>-1</sup> )		
			Eau	Solution modèle	Sauvignon blanc	Autre cépage blanc	Rosé et Clairet
3SH	 3-sulfanylhexan-1-ol	Pamplemousse, fuit de la passion	17 <sup>25</sup>	60 <sup>25</sup>	600-1300	40-300	68-2256
4MSP	 4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-one	Buis, genêt		0,8 <sup>22</sup>	4-44	0-3	
A 3SH	 Acétate de 3-sulfanylhexan-1-ol	Buis, pamplemousse, fruit de la passion		4,2 <sup>49</sup>	0-726	0-51	40
4MSPOH	 4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-ol	Agrume	20 <sup>25</sup>	55 <sup>25</sup>	18-111	0-45	
3MSB	 2-méthyl-3-sulfanylbutan-1-ol	Poireau cuit	Non déterminé <sup>28</sup>	Non déterminé <sup>28</sup>	78-128	1-1300	

Solution modèle : 5 g/L d'acide tartarique, 12% v/v éthanol, pH 3,5

**Tableau 2.** Les principaux thiols volatils présents dans les vins de la région de Bordeaux.

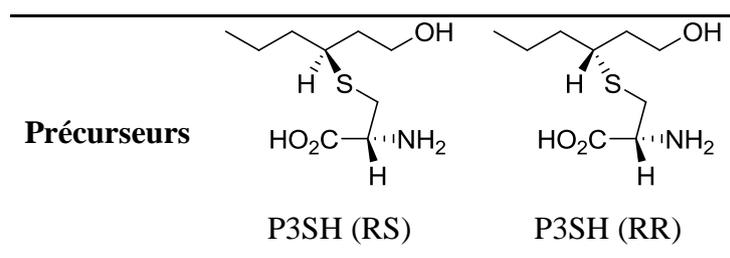
### III – 1 – 2 – Les précurseurs d'arômes

Les arômes des thiols volatils apparaissent dans les vins au cours de la fermentation alcoolique. Sous l'action de levure, les thiols volatils sont libérés à partir de précurseurs cystéinylés présents dans le moût (Figure 3).<sup>26, 50-52</sup> Cette enzyme libère outre le thiol, de l'ammoniac et de l'acide pyruvique. La libération des thiols volatils pendant la fermentation alcoolique est proportionnelle à la concentration de conjugué S-cystéiné dans le moût.<sup>53</sup>



**Figure 3.** Libération des thiols volatils.

Sous sa forme de précurseur, c'est-à-dire conjugué à la cystéine, le P3SH est sous forme d'un mélange de diastéréoisomères (Tableau 3).<sup>54</sup>



**Tableau 3.** Diastéréoisomères du P3SH.

Les concentrations des précurseurs d'arômes dans les moûts varient en fonction du cépage et de nombreux autres paramètres (Tableau 4).

Teneurs dans le vin (ng.L <sup>-1</sup> ) <sup>37, 53</sup>				
Cépages	Melon B	Sauvignon	Riesling	Gewurzstraminer
<b>P3SH</b>	nd	6000 - 40000	15000 - 31000	59000
<b>P4MSP</b>	876 - 4400	2200 - 6500	nd	600

**Tableau 4.** Quelques concentrations de précurseurs d'arômes dans les moûts.

### III – 2 – Les composés aromatiques azotés : les pyrazines

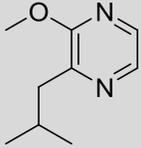
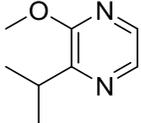
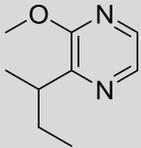
De nombreux hétérocycles sont responsables de la complexité des arômes dans le vin. Des travaux, prolongeant ceux de Bayonove,<sup>55</sup> montrent le rôle important joué par les pyrazines dans les caractères végétaux assez désagréables (de type poivron vert, asperge)

assez fréquent dans les vins<sup>56</sup> issus de raisins mal mûris des cépages Sauvignon blanc et Cabernet Sauvignon.<sup>57-59</sup> Les alkylméthoxy-pyrazines ont été trouvées dans plusieurs plantes,<sup>60</sup> dont trois (IBMP, IPMP, SBMP) sont présentes dans le raisin et le vin et jouent un rôle important sur la qualité du vin (Tableau 5).<sup>61</sup>

Initialement identifiée dans les grains de poivre (*Capsicum annuum*) par Buttery,<sup>62</sup> l'IBMP est un arôme extrêmement puissant. Cette molécule est responsable des arômes verts, herbacés ou végétatifs du vin. Elle évoque le poivron vert, l'asperge verte avec des nuances plus ou moins terreuses. Son seuil de perception est de 2 ng.L<sup>-1</sup> dans l'eau et de 2-16 ng.L<sup>-1</sup> dans le vin.<sup>63</sup> La teneur est très variable selon les cépages mais aussi la maturité, le climat. L'IBMP a été détectée pour la première fois dans les grappes de Cabernet Sauvignon par Bayonove,<sup>55</sup> signalée dans le Sauvignon blanc par Augustyn,<sup>64</sup> et dosée grâce à la GC-MS dans cette même variété par Allen.<sup>57, 65</sup>

Ces molécules sont surtout localisées dans la queue, la peau et les pépins tandis que la pulpe en contient très peu. Pendant le mûrissement, la proportion d'IBMP dans la queue et les pépins diminue, par contre elle augmente dans la peau.<sup>65</sup> Pendant le gonflement des raisins et le début de leur coloration (véraison), il y a une perte très rapide en teneur de méthoxy-pyrazines dans les baies. Par conséquent, la date de la récolte influence nettement l'intensité d'arôme de ces composants dans le vin.

Les deux autres alkylméthoxy-pyrazines (IPMP, SBMP), bien que possédant un seuil de perception très faible, sont beaucoup moins recherchées que l'IBMP car leurs teneurs dans les vins est moindre.

Pyrazine	Structure et nomenclature	Descripteur	Seuil de perception (ng.L <sup>-1</sup> ) <sup>61</sup>		Teneurs dans les vins français (ng.L <sup>-1</sup> )
			Eau	Solution modèle	
<b>IBMP</b>	 2- <i>iso</i> -butyl-3-méthoxypyrazine	Poivron vert	2	2-16	0,5-20 <sup>66</sup>
<b>IPMP</b>	 2- <i>iso</i> -propyl-3-méthoxypyrazine	Poivron vert, terreux	2		0,1-6 <sup>61</sup>
<b>SBMP</b>	 2- <i>sec</i> -butyl-3-méthoxypyrazine	Poivron vert	1		0-1 <sup>66</sup>

Solution modèle : 5 g/L d'acide tartarique, 12% v/v éthanol, pH 3,5

**Tableau 5.** Les principales méthoxypyrazines présentes dans les vins français.

### III – 3 – Les dosages existants

Plusieurs méthodes analytiques ont été rapportées pour la quantification des précurseurs cystéinylés dans les moûts. Des méthodes GC-MS ont été décrites et nécessitent soit une étape de clivage,<sup>37, 53</sup> soit une étape de dérivatisation en utilisant la N, O-bis-(triméthylsilyl)-trifluoroacétamide (BSTFA)<sup>37</sup> ou le chloroformiate d'éthyle.<sup>67</sup> Ces méthodes prennent beaucoup de temps et exigent des compétences pratiques. Plus récemment, le P3SH a été quantifié dans la Petite Arvine par HPLC-MS.<sup>68</sup> La plupart des méthodes décrites précédemment sont fondées sur la chromatographie en phase gazeuse qui est largement utilisée dans les aliments et le vin.

La quantification de l'IBMP et de l'IPMP dans les vins avec une limite de détection en dessous de son seuil de perception olfactive a été atteint en 1987 en utilisant une analyse des isotopes stables de dilution.<sup>69</sup> D'autres études ont quantifié l'IBMP dans les vins sans utilisation d'un standard interne marqué au deutérium.<sup>63, 66, 70</sup> Ces méthodes ont des inconvénients majeurs pour les viticulteurs : la nécessité de faire appel à des laboratoires d'analyse possédant ces équipements et du personnel qualifié pour les réaliser. Ceci est extrêmement coûteux pour les vigneron, de plus ils ne sont pas maîtres des délais d'analyse.

L'objectif de cette thèse est donc de développer de nouveaux dosages qui pourraient se faire directement dans les exploitations (utilisation de kits prêts à l'emploi).

### IV – Les dosages immunologiques

Les dosages immunologiques sont très utilisés dans la quantification de nombreuses cibles de tailles variables par exemple (pesticides,<sup>71</sup> stéroïdes,<sup>72</sup> virus HIV<sup>73</sup>) du fait de ces nombreux avantages. A notre connaissance, au début de ce travail, aucune tentative n'avait été menée pour doser les précurseurs d'arômes et les méthoxypyrazines avec des dosages immunologiques. Pourtant, ces derniers sont déjà utilisés dans le milieu viticole pour doser des toxines<sup>74, 75</sup> ou pour doser des pesticides.<sup>71, 76</sup>

Le dosage immunologique est un moyen de détection sûr et efficace s'il est développé correctement. Facile d'utilisation une fois standardisé, il ne nécessite qu'une faible qualification. Peu cher par rapport aux autres méthodes de détection physico-chimiques, il peut être utilisé directement sur le terrain. La différence des coûts suivant les revendeurs, la

qualité des anticorps (en terme de spécificité surtout) et les seuils de détection variant d'un kit à l'autre représentent les principaux inconvénients de cette méthode.

## **IV – 1 – Brefs rappels sur le dosage immunologique**

### **IV – 1 – 1 – Historique**

Les dosages immunologiques ont été développés pour la première fois par Yalow et al. en 1959.<sup>77</sup> L'objectif était de développer un dosage de l'insuline à des niveaux de concentrations proches du picogramme.

Comme son nom l'indique, le dosage immunologique utilise la capacité des anticorps à reconnaître spécifiquement, dans des milieux complexes, un antigène contre lequel ils sont dirigés. C'est ainsi que l'équipe de Yalow a réussi à faire des mesures de concentrations précises d'insuline dans des liquides physiologiques.

### **IV – 1 – 2 – Quelques définitions**

Une molécule antigénique est une molécule qui se fixe spécifiquement à un anticorps. Cependant, certains antigènes ne peuvent susciter la production d'anticorps par eux-mêmes.<sup>78</sup> Une molécule est dite immunogène lorsqu'elle peut susciter une réponse immunitaire une fois administrée à une personne ou un animal. En pratique, seules les molécules possédant une masse molaire supérieure à 1000 Da sont complètement immunogènes (Figure 4).

Les petites molécules organiques, comme les précurseurs d'arôme et les méthoxypyrazines, ne sont pas immunogènes. Cependant, des anticorps peuvent être produits contre de telles molécules si elles sont couplées de manière covalente à une protéine porteuse. Les petites molécules ont été appelées haptènes par l'immunologue Landsteiner, qui les étudia le premier au début des années 1900. Haptène vient du grec *haptein* qui signifie attacher.



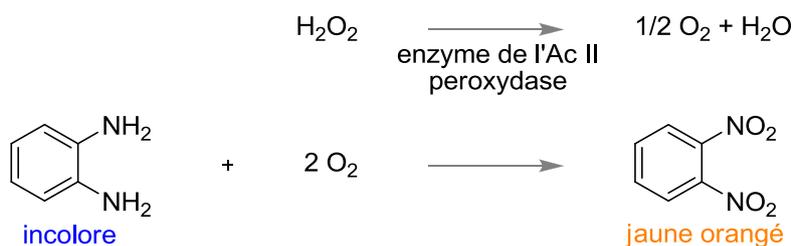
**Figure 4.** *Différence conceptuelle entre immunogène et antigène.*

## IV – 2 – Principe du dosage immunologique

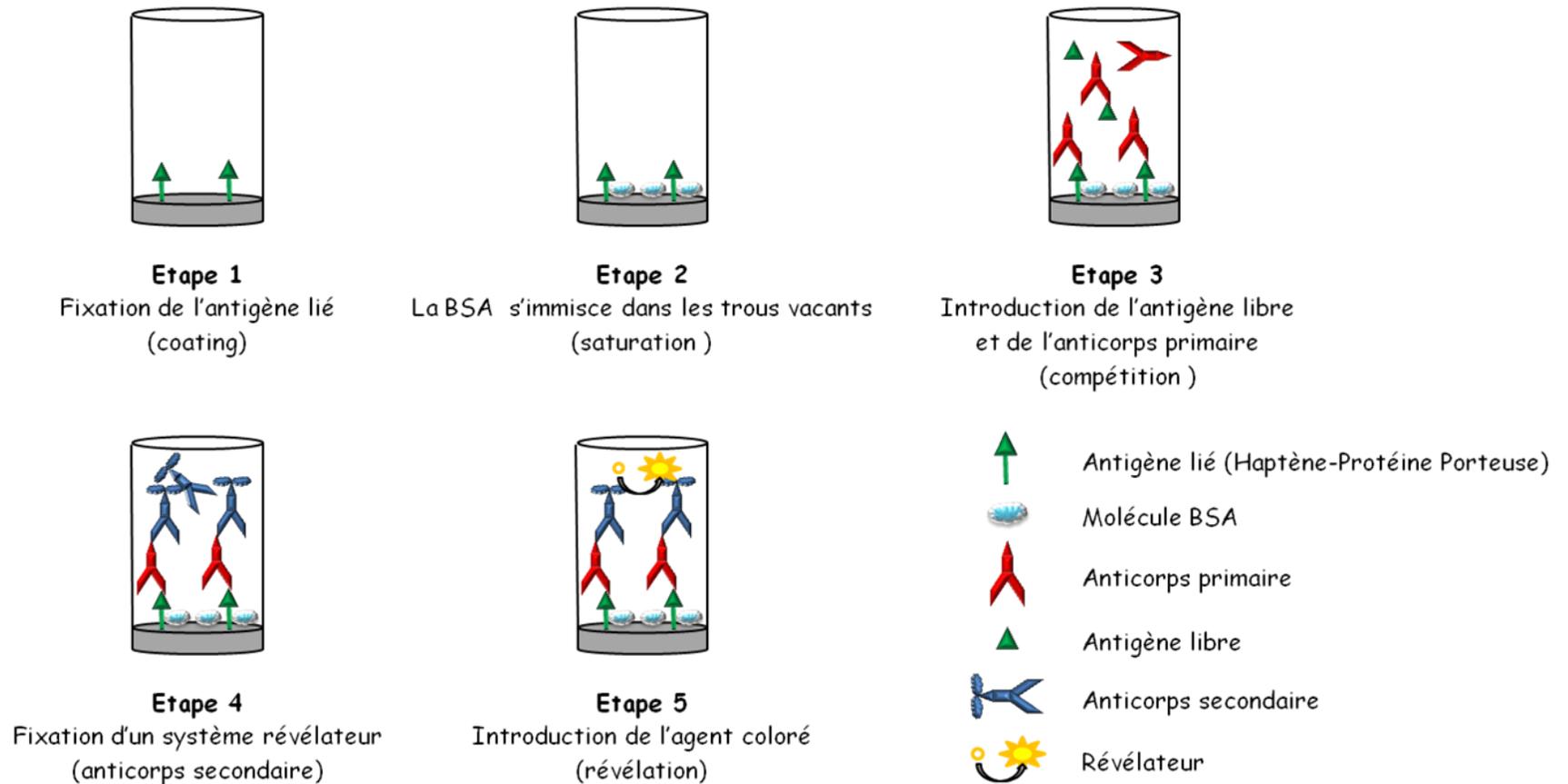
Le dosage immunologique envisagé est un test E.L.I.S.A. (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), (Figure 6). Cette technique repose sur une réaction de compétition entre un antigène libre et un antigène greffé au fond des plaques de microtitration pour les anticorps primaires. Les dosages immunologiques utilisent soit des anticorps polyclonaux (mélange d'anticorps avec des affinités et des spécificités variables) soit des anticorps monoclonaux (reconnaissance d'un seul épitope sur un antigène donné). Les anticorps primaires dans notre cas seront des anticorps polyclonaux.<sup>78</sup>

Dans l'ELISA compétitif, l'antigène lié (antigène couplé à une protéine porteuse : BSA ou Thyroglobuline) est fixé dans les puits de la plaque de microtitration par adsorption (Figure 6 : étape 1 : coating). Afin d'éviter les réactions non spécifiques, les puits sont saturés par de la Bovine Serum Albumine (BSA) apportée dans un tampon phosphate (Figure 6 : étape 2). L'étape suivante consiste en l'incubation pendant 2 heures de l'anticorps primaire (Ac I<sup>aire</sup>) et de l'antigène libre (étape 3). C'est pendant cette étape que se déroule la compétition. L'Ac I<sup>aire</sup> peut en effet réagir soit avec l'antigène libre apporté en quantité connue dans les solutions de gamme de titration soit apporté en quantité inconnue dans les échantillons déposés sur la plaque et comparés à la gamme de titration. La quantification est permise par cette étape. En effet, si l'antigène lié à la plaque est apporté toujours de la même façon, l'antigène libre lui varie en concentration. Plus elle sera importante et plus l'Ac I<sup>aire</sup> aura tendance à réagir avec lui au détriment de l'antigène greffé à la plaque. Au contraire plus la concentration d'antigène libre sera faible et plus l'Ac I<sup>aire</sup> se liera à l'antigène greffé au fond des puits. L'excès d'anticorps primaire, d'antigènes libres et le couple anticorps primaires/antigènes libres sont éliminés à la fin des deux heures d'incubation. Afin de déterminer la quantité d'anticorps primaire restant dans la plaque liée à l'antigène greffé, un anticorps secondaire (Ac II<sup>aire</sup>), spécifique de l'anticorps primaire et conjugué à un système de révélation (dans notre cas un polymère d'enzyme peroxydase : AMDEX) est ajouté (Figure 6 : étape 4). Après élimination des Ac II<sup>aire</sup> surnuméraires, l'étape 5 consiste à ajouter le substrat de l'enzyme : l'o-

phénylènediamine qui à la propriété de virer de l'incolore au jaune orangé lors de son oxydation. L'agent oxydant utilisé est le dioxygène provenant de la dégradation de l'eau oxygénée par l'enzyme. Dans la mesure où pour tous les puits (quelque soit les concentrations d'Ac II<sup>aire</sup> présent et donc d'AMDEX présent), le temps d'incubation avec le substrat est le même, on observe une relation de proportionnalité entre la coloration obtenue au temps T 30 minutes et la quantité d'enzyme dans le puit. Ainsi plus il y avait initialement d'antigène libre dans la solution considérée, moins l'Ac I<sup>aire</sup> s'est lié à l'antigène greffé au fond du puits, moins il y a donc d'Ac II<sup>aire</sup> fixé et donc moins la coloration au temps T 30 min sera intense. La Figure 7 montre le type de courbe attendue si l'on considère la densité optique ou une variable transformée de la densité optique en fonction de la concentration de l'antigène libre. En pratique, la variable transformée utilisée est (Bi-Blanc)/(Bo-Blanc) où Bi est la densité optique du puits considéré, Blanc est la densité optique moyenne obtenue dans des puits en l'absence de coating mais avec l'Ac I<sup>aire</sup> (il s'agit donc des réactions non spécifiques) et Bo est le témoin positif soit la densité optique correspondant à la moyenne obtenue dans une série de puits conduits sans antigène libre et donc pour lesquels la liaison de l'Ac I<sup>aire</sup> est maximale.



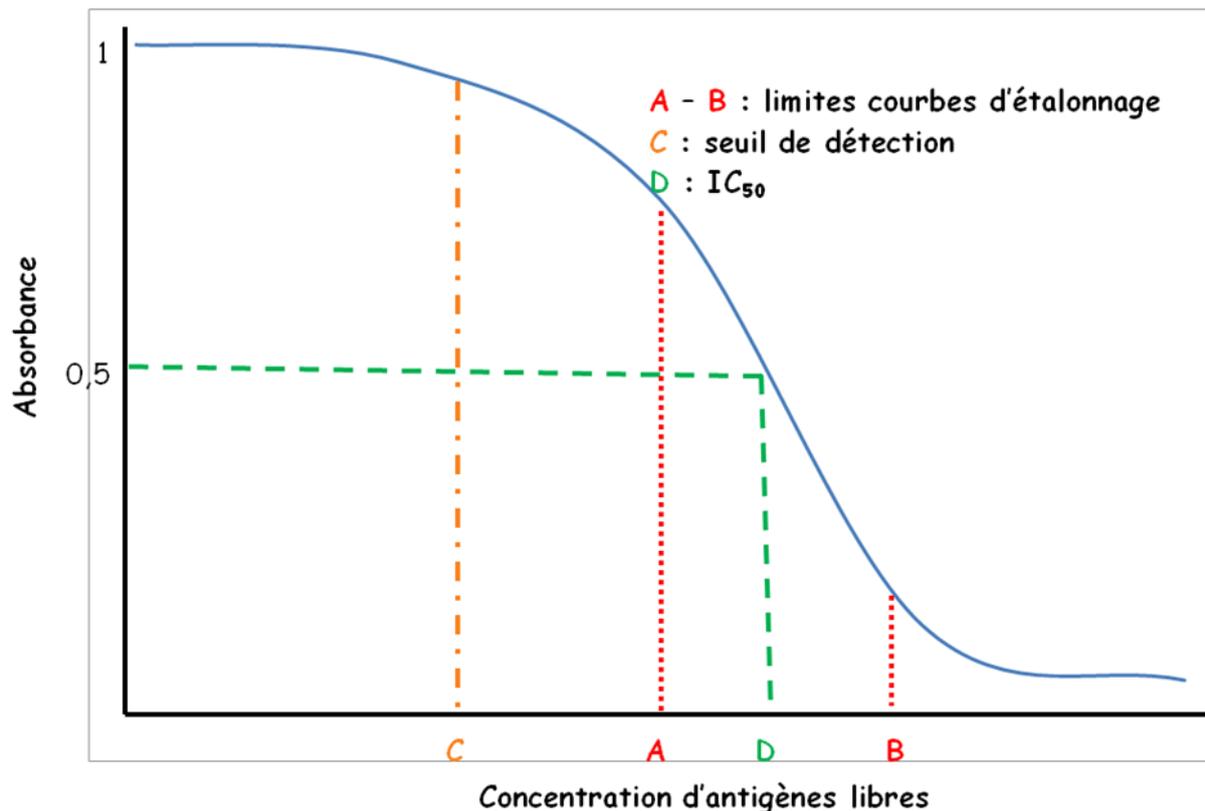
**Figure 5.** Réaction de révélation lors des tests ELISA.



**Figure 6.** Principe du test ELISA compétitif.

Les résultats sont obtenus sous forme d'une courbe sigmoïde qui sert à définir trois paramètres (Figure 7) :

- **A – B** : limites de la courbe d'étalonnage : partie linéaire de la courbe,
- **C** : seuil de détection : concentration minimale détectée par le dosage,
- **D** :  $IC_{50}$  : équilibre entre 50% des Ac I lié au coating et 50% des Ac I lié aux antigènes libres : sensibilité.



**Figure 7.** Exemple de courbes pour les tests ELISA.

#### IV – 3 – Mise au point d'un dosage immunologique

La mise au point d'un dosage immunologique est un travail interdisciplinaires entre chimistes et biologistes où toutes les compétences doivent être réunies pour arriver au but final (Figure 8).<sup>79</sup> Les premières étapes du développement d'un dosage, qui impliquent la conception et la synthèse de l'haptène, sont les plus difficiles. En effet, de nombreux paramètres, qui seront développés dans les chapitres ultérieurs, sont à prendre en compte.

Une fois la synthèse de l'haptène achevée, celui-ci peut-être couplé à une molécule porteuse (généralement une protéine) afin de réaliser l'immunisation des animaux.

Avec la synthèse des haptènes, l'étape d'immunisation est certainement l'une des plus longues. Le choix de l'animal hôte n'est pas fondamental en ELISA (rats, souris, et lapins sont les plus utilisés car les plus facilement manipulables). L'immunisation consiste en l'injection de l'agent immunogène, dans notre cas le conjugué protéine porteuse-haptène, par voie intramusculaire ou par voie intradermique. Les injections sont répétées plusieurs fois à quelques semaines d'intervalle. L'ensemble du processus s'étend généralement sur une période de trois mois.



**Figure 8.** Schématisation du développement d'un dosage immunologique.

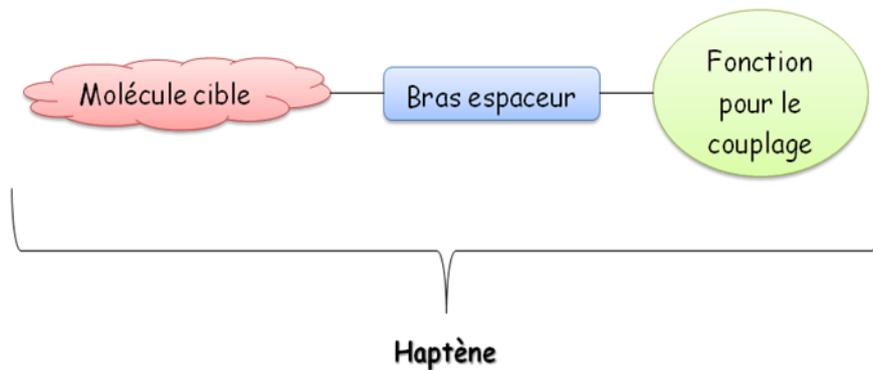
Le sérum obtenu doit subir de nombreux tests afin d'évaluer l'affinité des anticorps vis-à-vis de leurs antigènes. La spécificité des anticorps primaires est évaluée par des tests de croisement. Les résultats peuvent être faussés si les anticorps reconnaissent plusieurs antigènes.<sup>80</sup> Le problème est d'autant plus prégnant si les antigènes indésirables se trouvent présents dans les échantillons à doser. Plusieurs paramètres sont à déterminer : la concentration des antigènes liés, la dilution des sérums, le temps et la température d'incubation, la concentration des réactifs de révélation...

Une fois le dosage mis au point, il est nécessaire de s'assurer de sa fiabilité par une validation. Pour cela, il doit y avoir une bonne corrélation entre les différentes méthodes existantes (HPCL, GC).<sup>81</sup>

## V – Conception de l'haptène

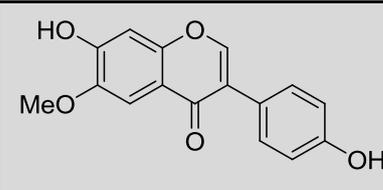
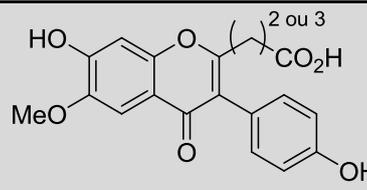
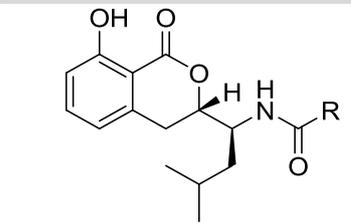
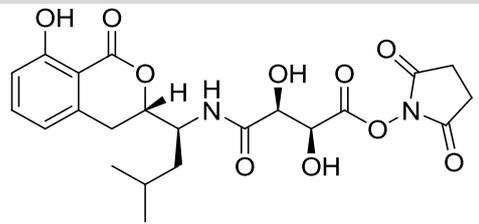
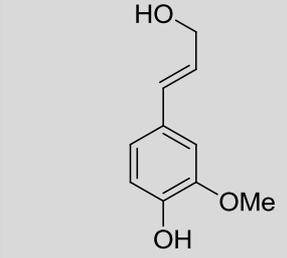
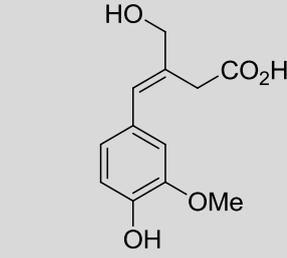
### V – 1 - Haptènes

Les haptènes doivent posséder sur leur structure une fonction adaptée permettant la formation d'une liaison peptidique avec la protéine porteuse. Idéalement, cette dernière doit être différente des fonctions déjà présentes sur la molécule cible pour la bonne spécificité des anticorps. De plus, cette fonction doit être éloignée de la molécule cible à l'aide d'un bras espaceur (Figure 9), (Tableau 6).



**Figure 9.** Schéma d'un haptène.

Les fonctions amine et acide sont les plus adaptées pour le couplage car elles permettent de créer une liaison peptidique avec les fonctions présentes sur les chaînes latérales de certains acides aminés (lysine, acide aspartique...) qui constituent les protéines porteuses.

Molécules cibles	Haptènes	Références
		81
		82
		83

**Tableau 6.** Exemples de molécules cibles et de leurs haptènes.

## V – 2 – Bras espaceur

### V – 2 – 1 – Nature et longueur

Pour une meilleure reconnaissance de la molécule cible par le système immunitaire, il est judicieux d'écarter le motif de reconnaissance de la masse globulaire de la protéine afin de l'exposer au maximum sans toutefois que le bras espaceur soit impliqué dans le processus de reconnaissance. La solution consiste dans l'ajout d'un bras espaceur au bout duquel viendra se placer la fonction nécessaire au couplage avec la protéine porteuse.

La nature du bras espaceur est très importante. Le but étant d'obtenir un dosage immunologique le plus spécifique possible, le bras espaceur ne doit pas présenter de groupement reconnaissable par des anticorps.

Un bras espaceur trop court entraînera la formation d'anticorps qui ne reconnaîtront que l'ensemble du conjugué protéine-haptène ou alors la protéine porteuse mais pas la molécule cible. Un bras espaceur trop long pourra être considéré comme épitope en lui-même et induire l'obtention d'IgG spécifiques. Par ailleurs il pourra se replier finissant par masquer l'haptène derrière la protéine ou encore empêchant les réactions de couplage.

D'après Szurdoki,<sup>84</sup> le meilleur compromis est obtenu par un bras espaceur constitué d'une simple chaîne carbonée dont la longueur idéale se situerait entre trois et six carbones.

### V – 2 – 2 – Point de fixation du bras espaceur sur la molécule cible

La nature du bras espaceur étant défini, il faut maintenant choisir un point de fixation. Il peut-être placé sur un hétéroatome ou sur un squelette carboné.

Très souvent, le bras espaceur est fixé sur un hétéroatome pour faciliter la synthèse de l'haptène. Certains auteurs rajoutent même un oxygène sur la structure de la molécule pour une fixation plus aisée du bras espaceur.<sup>85, 86</sup> Cela peut influencer la bonne spécificité du dosage. En effet, les fonctions impliquant des hétéroatomes sont des sites de reconnaissance très importants pour les anticorps. Par ailleurs, ces types de liaisons (C-O, C=N) sont susceptibles de dégradations enzymatiques dans les fluides biologiques des animaux hôtes.

Pour obtenir les meilleurs anticorps possibles, le mieux est de fixer le bras espaceur sur le squelette carboné. D'un point de vue purement chimique, cela demande un travail de synthèse plus important, mais une sélectivité et une sensibilité optimales pour le dosage final sont à ce prix.<sup>87, 88</sup>

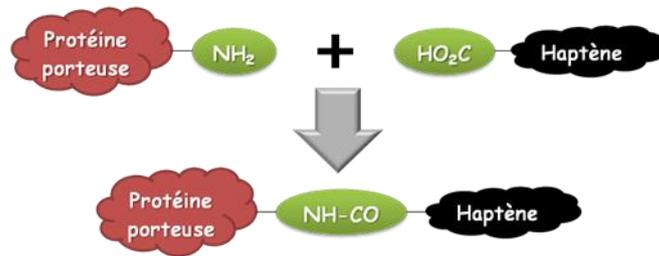
### V – 3 – Couplage aux protéines porteuses

Durant ce travail, deux protéines porteuses ont été utilisées : la Bovine Sérum Albumine (BSA) et la Thyroglobuline de porc (Thyr). Le couplage à la BSA a été utilisé lors de l'immunisation des lapins et lors des tests ELISA pour la fixation de l'antigène dans les plaques de microtitration. Le couplage à la Thyr a été utilisé uniquement lors de l'étape de coating. Ces deux protéines possèdent de nombreux résidus lysine (acide aminé avec un groupement amine sur sa chaîne latérale) disponibles pour le couplage car présentes en périphérie de la structure tertiaire de la molécule.

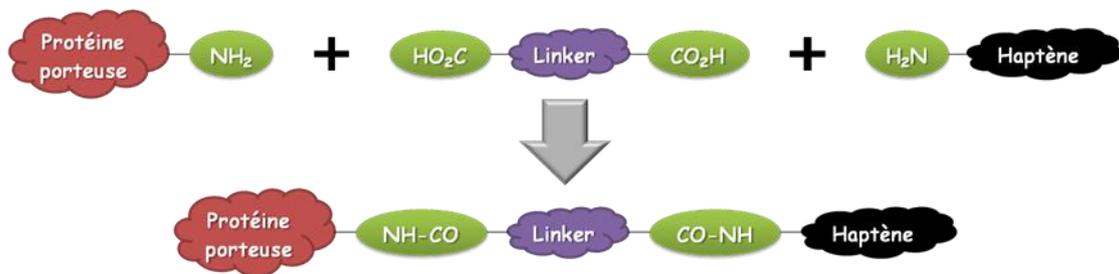
La BSA, est l'une des protéines extraites du sérum de bovin largement utilisée en laboratoire de biologie car sa structure est connue et sa pureté est correctement contrôlée. Cette albumine peut être utilisée comme agent diluant ou bloquant dans de nombreuses manipulations tel que l'ELISA et le Western blot. La BSA possède une masse molaire d'environ 67 000 Da et se compose de 607 acides aminés.<sup>89</sup> Parmi ceux-ci, on distingue 60 lysines dont au moins 26, en périphérie de la structure, permettent les couplages.<sup>89</sup>

La masse molaire de la Thyroglobuline, protéine provenant de la thyroïde de porc, est d'environ 670 000 Da (10 fois supérieur à celle de la BSA).

### A : Couplage peptidique direct



### B : Couplage avec un linker homobifonctionnel



**Figure 10.** Différents couplages utilisés.

La Figure 10 décrit deux types de couplages, les plus souvent utilisés, entre un haptène et une protéine porteuse. Tout d'abord, l'haptène, porteur d'une fonction acide, est couplé directement à la fonction amine des lysines des protéines porteuses (A). Le second type de couplage fait appel à un linker possédant à chaque extrémité des fonctions acides (B). Ces dernières servent à la formation de liaisons peptidiques d'une part entre la fonction amine de l'haptène et le linker, et d'autre part, entre la fonction amine des lysines de la protéine et le linker.

## V – 4 – Contrôle du taux de couplage

L'immunisation des animaux pour obtenir les anticorps est un processus long et coûteux. Il est donc recommandé de vérifier la qualité de couplage et le nombre d'haptènes fixé avant d'entamer cette étape. En effet, le taux de couplage est un compromis entre un nombre suffisamment grand pour permettre une immunisation rapide (3 mois) et un nombre assez petit pour obtenir une bonne spécificité. Idéalement, le taux de couplage se situe aux

alentours de 15 haptènes par protéine porteuse.<sup>90</sup> Pour déterminer le taux de couplage, deux méthodes sont utilisées (la spectrométrie de masse et les gels d'électrophorèse).

La méthode utilisée en spectrométrie de masse est la Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI). Elle permet l'analyse de biomolécules (des biopolymères comme les protéines, les peptides et les sucres) et de grosses molécules organiques (comme les polymères, les dendrimères et autres macromolécules). Ce procédé permet d'ioniser les molécules à l'aide d'un faisceau laser. Une matrice est de plus utilisée afin de protéger la macromolécule de la destruction par un faisceau direct et faciliter la vaporisation et l'ionisation.

L'électrophorèse (SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis) est la principale technique utilisée en biologie pour la séparation et la caractérisation des protéines. Une fois dénaturées, les protéines chargées négativement et uniformément grâce au SDS, migrent à l'aide d'un champ électrique à travers le gel ; la vitesse de migration dépendant uniquement de la taille de la protéine.<sup>91</sup> Plus les protéines possèdent une masse molaire importante et moins elles migreront sur le gel. Cette technique permet d'obtenir un ordre de grandeur du taux de couplage avec des incertitudes de mesures (10%) plus importantes que pour la spectrométrie de masse. Cependant, l'électrophorèse est plus facile d'accès et peut-être utilisée en routine.

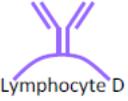
Il est impossible de déterminer le taux de couplage pour la thyroglobuline. En effet, cette dernière possède une masse molaire très élevée (670 000 Da). L'ajout d'une vingtaine d'haptènes sur cette protéine (environ 5000 Da) est impossible à détecter avec les méthodes d'analyse actuelles.

## **VI – Production des anticorps**

### **VI – 1 – Quelques définitions**

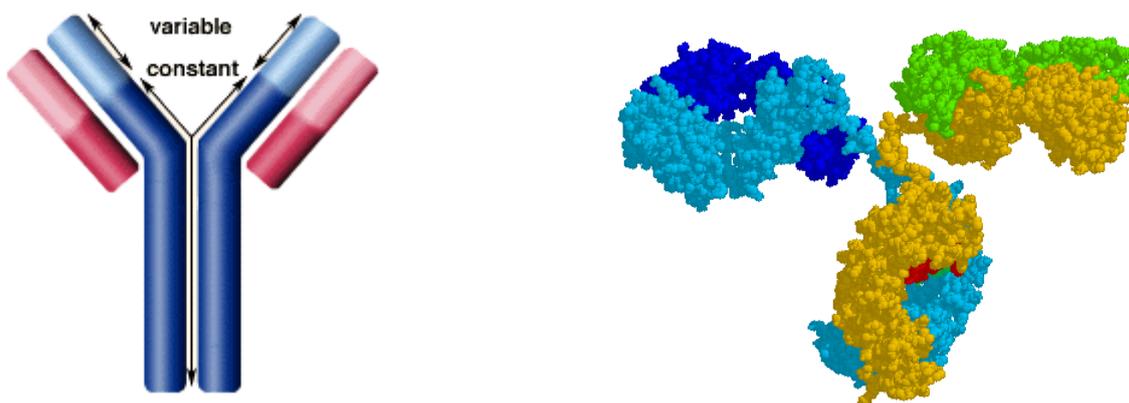
Un anticorps est une protéine intervenant dans l'immunité et réagissant spécifiquement avec un antigène. Ces anticorps appartenant à la grande famille des Immunoglobulines (Ig) peuvent être de plusieurs classes et sous-classes en fonction de la structure fine de leurs chaînes lourdes (IgA –IgA1 et IgA2–, IgD, IgE, IgG –IgG1, IgG2, IgG3, IgG4– et IgM). Ils sont constitués de deux paires de chaînes polypeptidiques (deux chaînes lourdes et deux

chaînes légères) dont seules les extrémités sont variables<sup>92</sup> (Figure 11). Cette variabilité permet de reconnaître spécifiquement les antigènes.

IgA	IgD	IgE	IgG	IgM
	 Lymphocyte D			
Protection des muqueuses	Activation des lymphocytes B	Impliquées dans l'allergie	Ig solubles et très concentrées	Première réponse à la présentation d'antigènes

**Tableau 7.** *Classification des Immunoglobulines.*

Les IgA sont sécrétées par les muqueuses et impliquées dans leurs protections spécifiques. Les IgD ne sont présentes normalement qu'à très faible dose et jouent un rôle dans l'adaptation de la réponse des lymphocytes. Les IgE interviennent dans les réactions allergiques. Les IgG et les IgM sont deux classes d'immunoglobulines intervenant séquentiellement dans la mise en œuvre des réactions immunitaires humorales générales, l'IgM étant sécrétée en premier.<sup>93</sup> Ce sont les IgG synthétisées lors d'une réaction immunitaire mature que l'on cherche à produire dans le cas des dosages ELISA.



**Figure 11.** *Schéma et modélisation d'un anticorps.*

La mise en place d'une réponse immunitaire, menant à la production d'anticorps solubles, requiert l'intervention de deux systèmes cellulaires. Le premier est le système phagocytaire mononucléé qui correspond aux macrophages, le second est le système lymphocytaire avec deux types cellulaires intervenant séquentiellement, les lymphocytes T puis les lymphocytes B.<sup>94</sup>

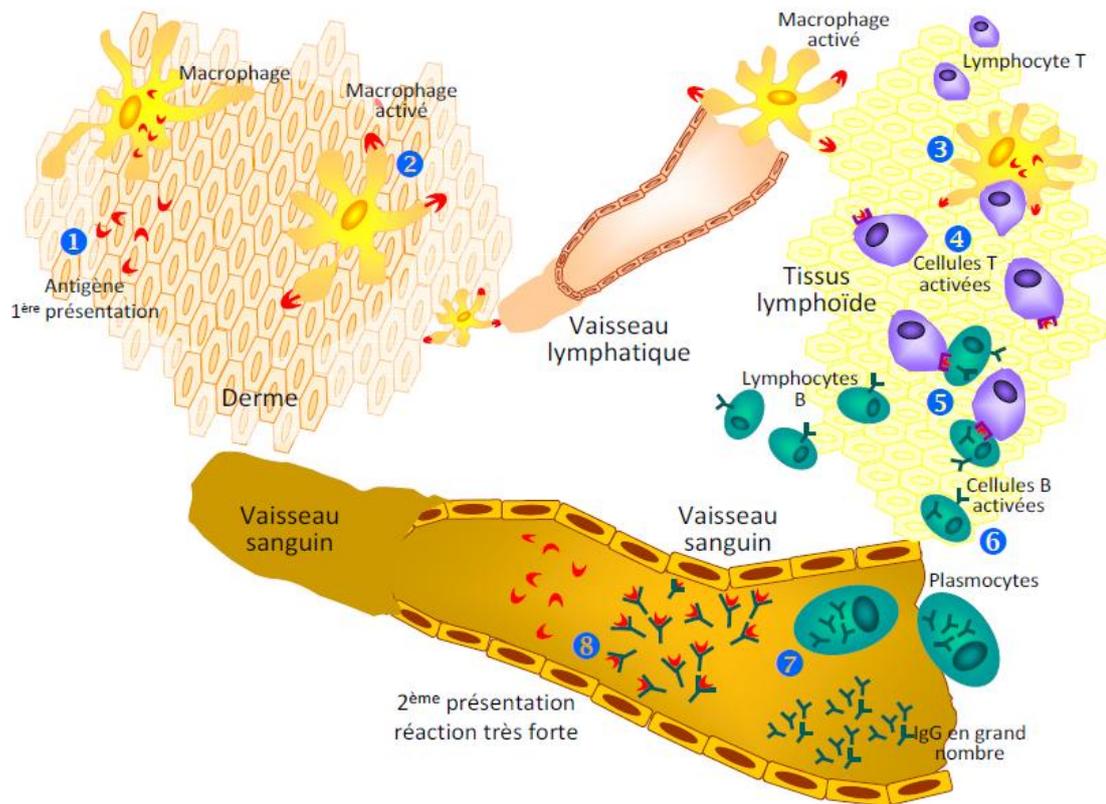
Les macrophages dérivent de cellules précurseurs présentes dans la moelle osseuse.<sup>93</sup> Les lymphocytes sont des cellules de l'immunité présentant des immunoglobulines à leur surface. Elles sont présentes dans le sang, la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques, la rate, les amygdales, les nodules du tube digestif et le thymus. Les lymphocytes sont principalement de type T (dérivant du thymus) ou de type B (dérivant de la moelle osseuse - Bone marrow en anglais-).<sup>93</sup>

## VI – 2 – Comment obtient-on des IgG solubles spécifiques ?

Lorsqu'un édifice moléculaire d'une masse molaire suffisante (> 1000 Da) entre dans un organisme il peut être reconnu comme un corps étranger par des cellules sentinelles, présentes dans l'ensemble de l'organisme.

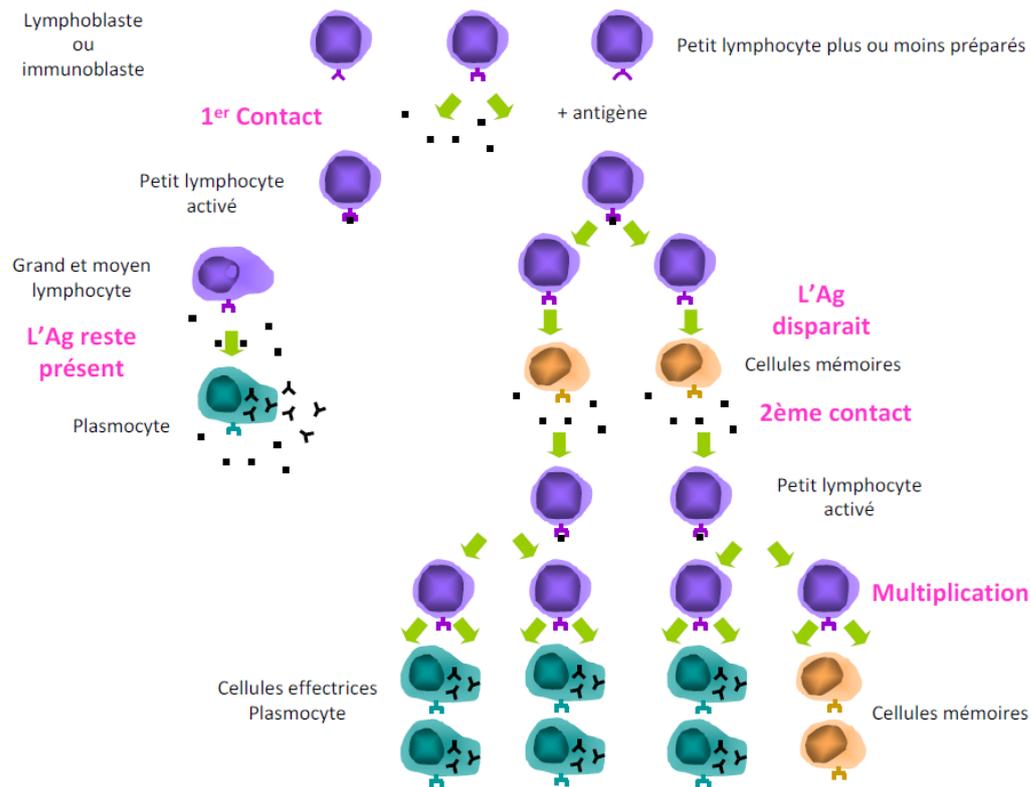
Ces sont les cellules dendritiques immatures ou encore des macrophages toutes deux de type phagocytaire (❶ et ❷ Figure 12). Ces cellules possèdent à leur surface des récepteurs qui reconnaissent les caractéristiques communes à de nombreux agresseurs de l'organisme. Les cellules sentinelles intégrant les molécules antigéniques les « apprêtent » c'est-à-dire les clivent en petites unités de masse molaires plus faibles et les présentent à leur surface. On considère alors que la cellule phagocytaire est activée en Cellule Présentatrice d'Antigène (CPA) (❶ et ❷ Figure 12). Les CPA présentent l'antigène apprêté à un lymphocyte T dit Helper (Lymphocyte TH).<sup>95</sup> Le lymphocyte TH est activé par l'antigène et produit en réponse des récepteurs comportant des parties variables adaptées à l'antigène et qui serviront ensuite de matrice pour la fabrication des IgG (❸ Figure 12). Lorsque les récepteurs des lymphocytes T sont très spécifiquement adaptés, la cellule les internalise dans sa membrane (❹). Les lymphocytes TH activent ensuite des lymphocytes B qui utilisent les récepteurs comme modèle pour fabriquer d'abord des IgM puis des IgG.

Lors d'une première stimulation, les lymphocytes B activés fabriquent des IgM pentamériques dont certaines sont relarguées dans le sang et d'autres s'internalisent dans la membrane cellulaire (❺ et ❻ Figure 12). A la suite d'une deuxième stimulation par l'antigène, les IgM membranaires agissent comme des récepteurs cellulaires. Ils activent la synthèse d'IgG cette fois, dans ce qu'on appelle dès lors un lymphocyte B mature ou plasmocyte (❼ et ❽ Figure 12).<sup>95</sup>



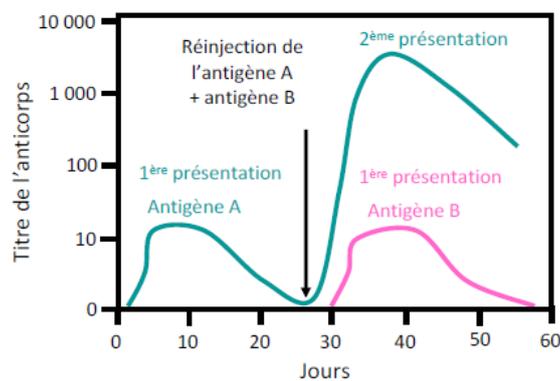
**Figure 12.** Formation des immunoglobulines solubles.

Si un temps suffisamment important s'écoule entre l'activation (première présentation) et la maturation (deuxième présentation), les lymphocytes B ont la capacité de se multiplier. Elles transmettent alors aux cellules de leur descendance (clones) l'organisation nucléotidique des régions variables des Ig qu'elles ont acquises lors de la première présentation. Ainsi toutes les cellules de ce clone ont la capacité de fabriquer les mêmes Ig. Si l'antigène ne se représente plus, la majorité des lymphocytes B entrent en apoptose sauf quelques cellules mémoires. Si au contraire l'antigène se présente à nouveau il est capté par les Ig de surface des lymphocytes B qui activent de façon très efficace la transcription des IgG et se mettent à se multiplier activement afin d'amplifier la réponse.<sup>95</sup>



**Figure 13.** Multiplication clonale des cellules immunitaires en fonction de la présence ou de l'absence d'antigène.

La sélection clonale et le recrutement à partir des cellules mémoires permettent de réactiver la production d'anticorps. L'évolution du titre des anticorps au cours d'un processus de vaccination ou de rappel est représentée ci-dessous (Figure 14).



**Figure 14.** Evolution du titre de deux anticorps au cours d'un processus d'injection.

La diversité structurale de la région variable qui est nécessaire à la reconnaissance spécifique de l'antigène est assurée par le même mécanisme moléculaire que celui qui préside à la fabrication des Ig. Il met en jeu la zone du génome impliquée dans l'expression du complexe d'histocompatibilité. Cette zone code pour des séquences nucléotidiques capables de se combiner quasiment à l'infini. Une fois que les différentes combinaisons ont abouti à la production d'un récepteur fonctionnel tout réarrangement supplémentaire est interdit. Ainsi chaque lymphocyte TH n'exprime qu'un seul type de récepteur spécifique. Une grosse molécule a pu être clivée initialement en différents segments, il peut donc y avoir pour une même molécule plusieurs types de lymphocytes TH spécifiques induits. La reconnaissance de l'antigène par le lymphocyte TH ne peut se faire que si ce dernier lui est présenté dans la gouttière de la cellule présentatrice d'antigène.

Chapitre II :

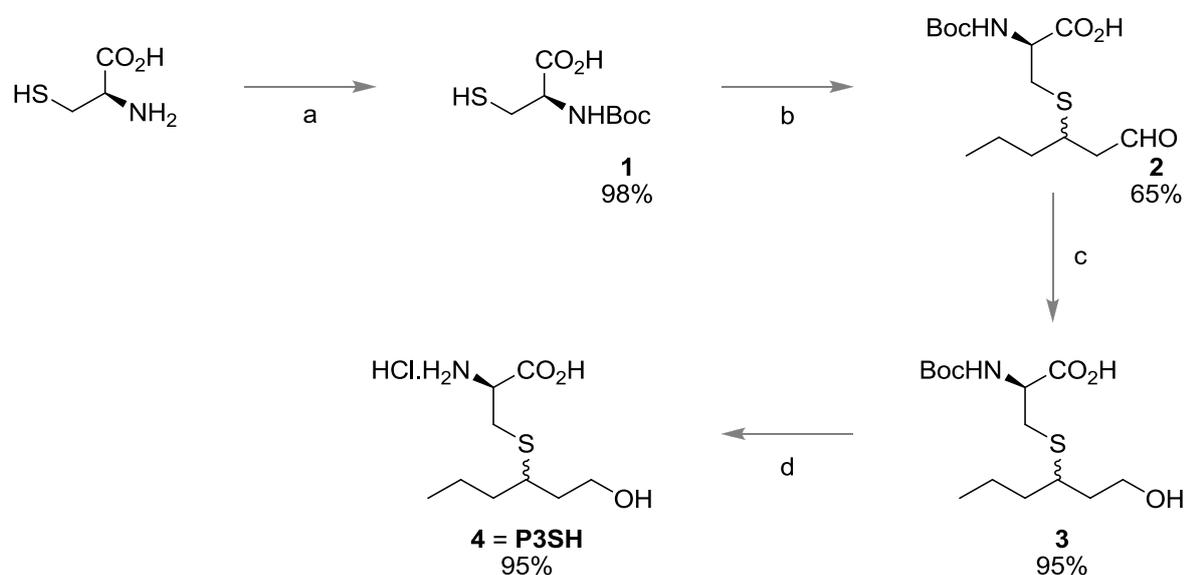
Synthèse du P3SH  
et de ses haptènes

Dosage immunologique  
du P3SH

## I – Synthèse du précurseur du P3SH

Le P3SH doit être synthétisé pour deux raisons : pour être utilisé comme haptène (avec deux linkers homobifonctionnels différents pour le couplage) et pour la mise au point des tests ELISA où il servira d'antigène libre pour les courbes de calibration.

La synthèse du P3SH a été réalisée en quatre étapes avec un rendement global de 58%. La première étape est une protection de la fonction amine de la cystéine par un groupement Boc, ce qui permet de faire réagir uniquement la fonction thiol lors de l'étape suivante de l'addition de Michael sur le *trans*-2-hexenal.<sup>96</sup> Lors de l'addition 1,4- du thiol de la cystéine sur l'hexenal, le contrôle de la stéréochimie n'est pas nécessaire car dans la nature le P3SH se trouve sous forme d'un mélange de diastéréoisomères. La troisième étape consiste en la réduction de la fonction aldéhyde en alcool primaire par du NaBH<sub>4</sub>. Enfin, une déprotection de la fonction amine par de l'acide chlorhydrique gazeux termine cette synthèse. L'étape limitante afin d'obtenir le P3SH est l'étape b. En effet, les rendements des autres étapes de la synthèse sont quasi-quantitatifs (Figure 15).<sup>54, 97, 98</sup>



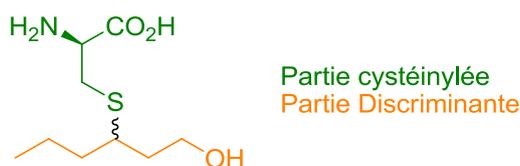
- a) Boc<sub>2</sub>O, NaOH, H<sub>2</sub>O, MeOH ; b) *trans*-2-hexenal, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>CN;  
c) NaBH<sub>4</sub>, EtOH; d) HCl<sub>g</sub>, DCM.

**Figure 15.** Synthèse du P3SH.

## II – Synthèse et couplage des haptènes aux protéines porteuses

### II – 1 – Nature des immunogènes envisagés

Le précurseur P3SH est constitué de la cystéine et d'une chaîne alkyle terminée par une fonction hydroxyle qui est la partie discriminante (Figure 16). Pour la conception des haptènes, il est important de bien présenter cette chaîne et ne pas la masquer à la surface des protéines.



**Figure 16.** Structure du P3SH.

Quatre conjugués (couples protéine-haptène) ont été choisis comme antigènes liés pour la production d'anticorps (Tableau 8). Les deux premiers haptènes sont constitués du P3SH couplé à une protéine à l'aide de linkers différents (seule la longueur du bras espaceur varie, pas la nature de la liaison). Le troisième haptène possède un bras espaceur court et est dépourvu de fonction acide. Enfin, le dernier haptène ne possède ni de bras espaceur ni de fonction amine.

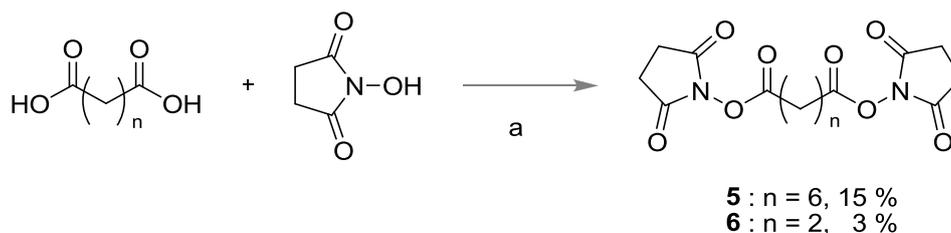
Bien que le premier linker ne corresponde pas aux critères énoncés par Szurdoki,<sup>84</sup> Weller a prouvé qu'un bras avec 8 carbones permettait l'obtention d'anticorps très spécifiques pour des petites molécules.<sup>99</sup> L'intérêt de posséder deux bras espaceurs avec une longueur de chaînes différentes est de pouvoir comparer la réactivité des différents anticorps.

		Structure
Conjugués		
I	Protéine-H <sub>1</sub> P3SH	
II	Protéine-H <sub>2</sub> P3SH	
III	Protéine-H <sub>3</sub> P3SH	
IV	Protéine-H <sub>4</sub> P3SH	

**Tableau 8.** Les différents conjugués du P3SH.

## II – 2 – Synthèse des linkers et couplage des haptènes I et II

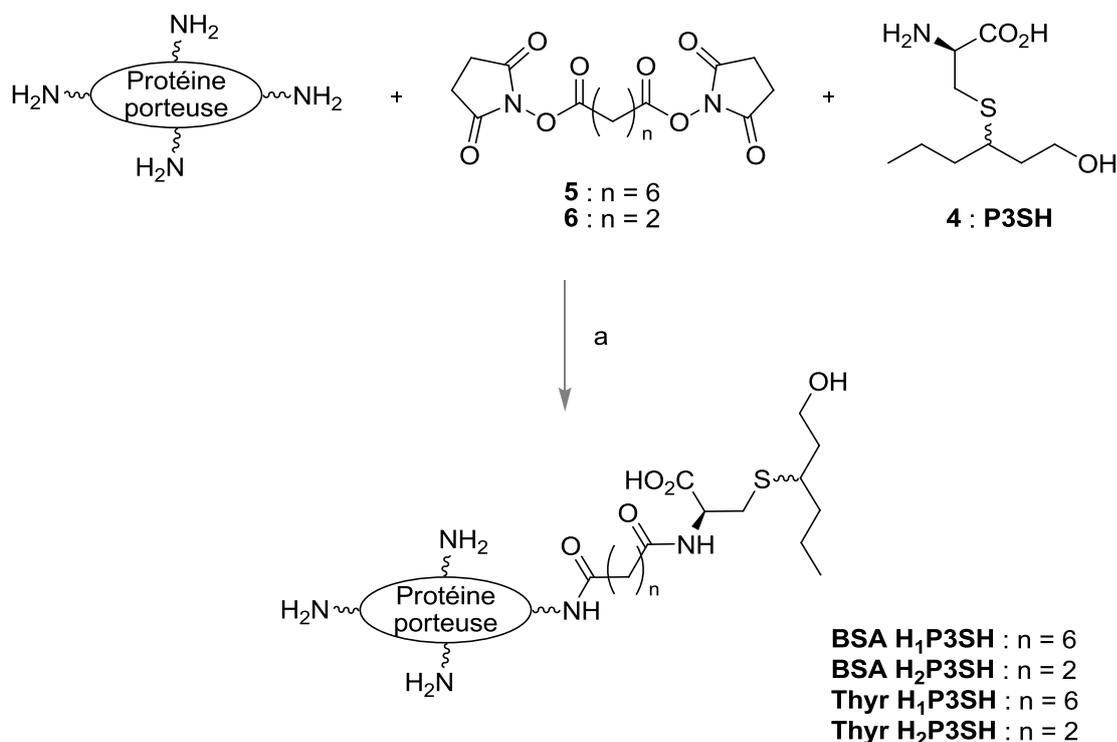
Les linkers homobifonctionnels permettent, grâce à leurs fonctions esters activés, de créer des liaisons peptidiques entre les fonctions amines libres des lysines des protéines porteuses et la fonction amine du P3SH. Ils sont déjà connus pour être utilisés comme agent liant entre des sucres à des protéines...<sup>100</sup> Le premier possède une chaîne principale de 8 atomes de carbones (composé **5** : bis (2,5-dioxopyrrolidin-1-yl) octanedioate) et le deuxième une chaîne plus courte (4 carbones, composé **6** : bis (2,5-dioxopyrrolidin-1-yl) succinate). Leurs synthèses ont été réalisées en une seule étape avec des rendements très faibles (Figure 17).<sup>101, 102</sup>



a) DCC, THF.

**Figure 17.** Synthèse des linkers homobifonctionnels.

Le P3SH a été couplé à deux protéines (BSA et Thyroglobuline) avec les deux linkers homobifonctionnels suivant le même mode opératoire (DMF et tampon carbonate pH = 9,3), (Figure 18).<sup>103</sup> Le précurseur (P3SH) et les linkers **5** et **6** forment les haptènes appelés H<sub>1</sub>P3SH et H<sub>2</sub>P3SH.



a) Tampon NaHCO<sub>3</sub> (pH = 9,3), DMF.

**Figure 18.** Couplage de l'H<sub>1</sub>P3SH et de l'H<sub>2</sub>P3SH.

Le taux de couplage sur la BSA a été déterminé par gel d'électrophorèse et par spectrométrie de masse MALDI. Le nombre d'haptènes conjugués est obtenu en divisant la différence des masses molaires BSA avant et après la réaction de couplage par la masse molaire de l'haptène moins 18.

$$\text{Nombre d'haptènes couplés} = \frac{\text{MM conjugué-MM BSA}}{\text{MM haptène-18}}$$

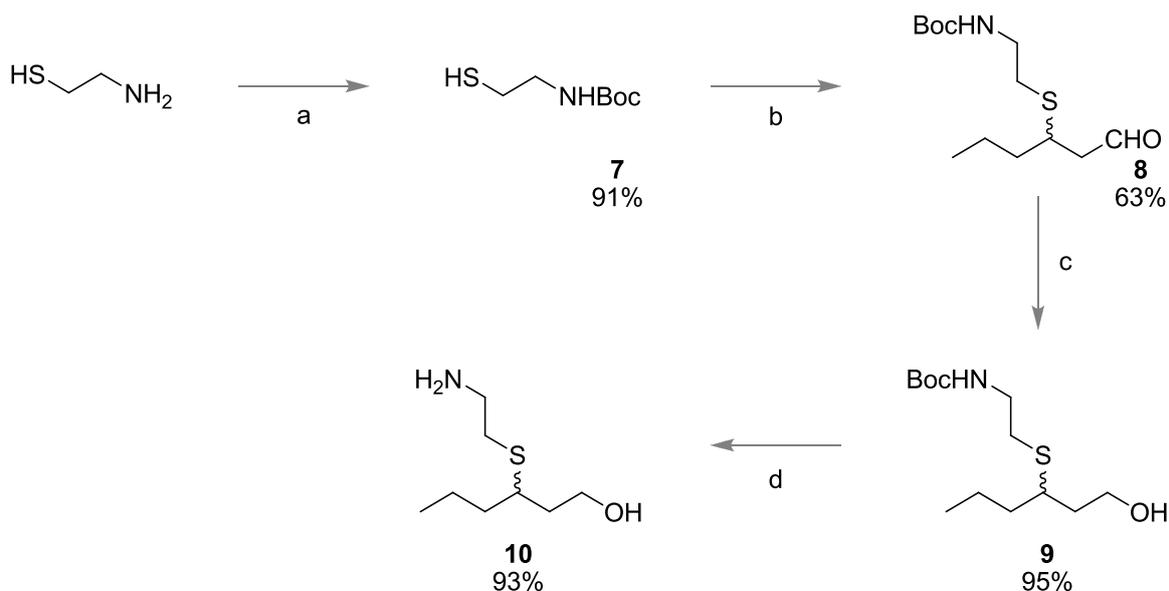
Les taux de couplage des conjugués BSA-H<sub>1</sub>P3SH et BSA-H<sub>2</sub>P3SH sont donnés dans le Tableau 9. Pour le conjugué BSA-H<sub>1</sub>P3SH, le taux de couplage est maximum, toutes les lysines de la périphérie de la BSA ont été couplées. Pour le conjugué BSA-H<sub>2</sub>P3SH, le taux de couplage de dix haptènes est suffisant pour l'étape d'immunisation. En effet, la présence au minimum de 5 haptènes est nécessaires pour une bonne immunisation.<sup>90</sup>

Haptène	Protéine	Pic Moléculaire observé	$\Delta M$ (MM <sub>conjugué</sub> - MM <sub>BSA</sub> )	Détermination du nombre Haptène par molécule de BSA par	
				MALDI	SDS PAGE
	BSA	66412			
H <sub>1</sub> P3SH	BSA H <sub>1</sub> P3SH	75800	9388	25,1	32
H <sub>2</sub> P3SH	BSA H <sub>2</sub> P3SH	69399	2987	9,8	15

**Tableau 9.** Détermination par MALDI du nombre d'haptène par molécule de BSA.

### II – 3 – Synthèse et couplage de l'haptène III

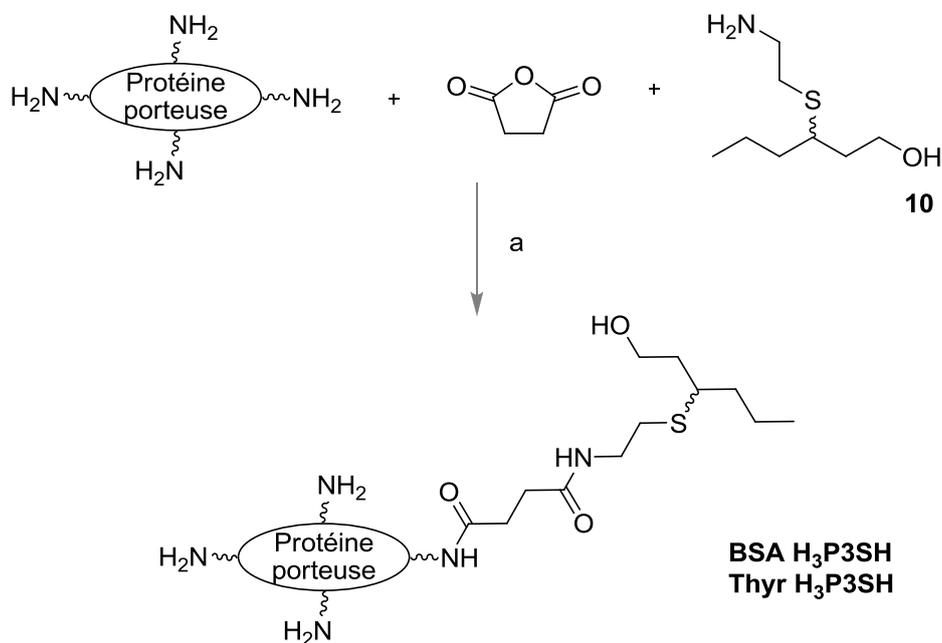
L'haptène (H<sub>3</sub>P3SH) se différencie des deux premiers par l'absence de la fonction acide sur la partie cystéinylée. Son bras espaceur est de même nature que pour le deuxième haptène (chaîne de 4 carbones). La synthèse de la partie précurseur d'arôme de l'haptène III a été réalisée selon le même mode opératoire que celui décrit pour les haptènes I et II (Figure 19). La première et les deux dernières réactions ont des rendements quasi-quantitatifs. Le composé **10** est obtenu avec un rendement global de 50%.



- a)  $\text{Boc}_2\text{O}$ , NaOH,  $\text{H}_2\text{O}$ , MeOH ; b) *trans*-2-hexenal,  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$  ;  
 c)  $\text{NaBH}_4$ , EtOH ; d)  $\text{HCl}_g$ , DCM.

**Figure 19.** Synthèse de l'haptène III sans son bras espaceur.

Le bras espaceur utilisé pour le couplage avec les protéines porteuses (BSA et Thy) est l'anhydride succinique (Figure 20).<sup>104</sup> Les couplages ont été réalisés par la méthode des esters activés (EDAC, NHS).<sup>105, 106</sup>



- a) EDAC, NHS, tampon borate/borique (pH 8,7), DMF.

**Figure 20.** Couplage de l' $\text{H}_3\text{P3SH}$ .

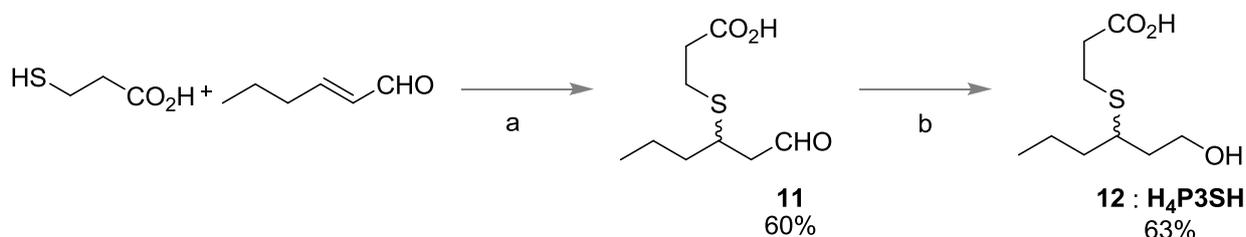
Le taux de couplage à la BSA a été déterminé par SDS PAGE et par spectrométrie de masse (MALDI), et il a été estimé à 22 haptènes par molécules de BSA (Tableau 10).

Haptène	Protéine	Pic Moléculaire observé	$\Delta$ MM ( $MM_{\text{conjugué}} - MM_{\text{BSA}}$ )	Détermination du nombre Haptène par molécule de BSA par	
				MALDI	SDS PAGE
	BSA	66412			
H <sub>3</sub> P3SH	BSA H <sub>3</sub> P3SH	72100	5688	21,8	30

**Tableau 10.** Détermination par MALDI du nombre d'haptène par molécule de BSA.

## II – 4 – Synthèse et couplage de l'haptène IV

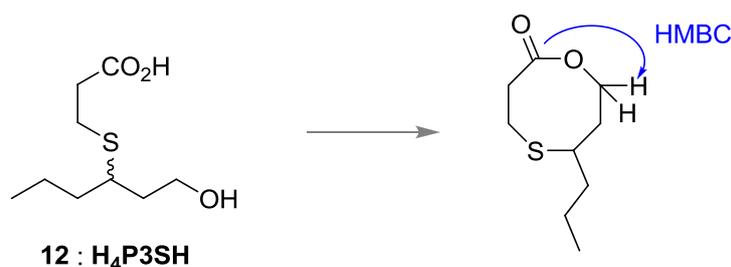
Le quatrième haptène ne possède ni de fonction amine en  $\alpha$ - de la fonction acide sur la partie cystéinylée ni de bras espaceur. Il a été obtenu par addition du thiol sur le *trans*-2-hexenal dans les mêmes conditions opératoires que pour les haptènes I, II et III.<sup>96</sup> La fonction aldéhyde est ensuite réduite en alcool. Le composé **12** est obtenu avec un rendement global de 38% (Figure 21).



a) Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>CN ; b) NaBH<sub>4</sub>, EtOH.

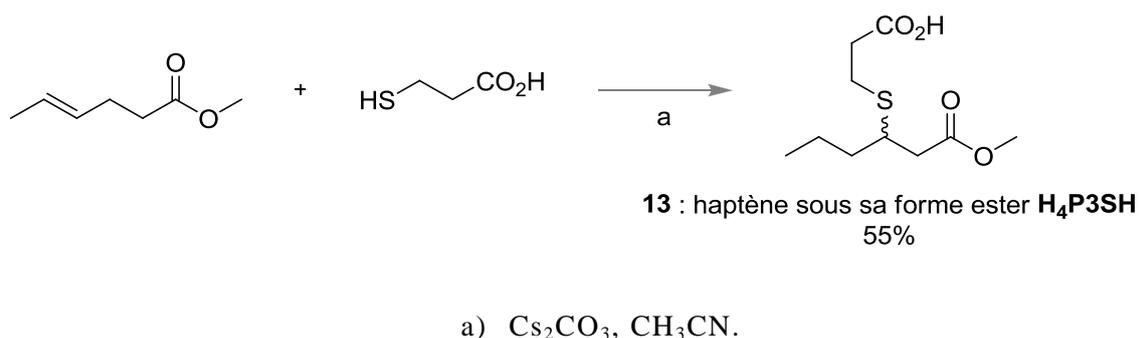
**Figure 21.** Synthèse de l'H<sub>4</sub>P3SH.

La lactonisation rapide de la molécule **12** au cours du temps ou lors du couplage (par la méthode des esters activés) a été démontrée par RMN (méthode HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation experiment), (Figure 22). En effet, les spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C de la molécule sous sa forme linéaire ou sa forme cyclique sont identiques. La confirmation de la lactonisation a pu se faire également par la spectrométrie de masse (perte d'une masse de 18 entre la forme linéaire et la forme cyclique) et l'IR (disparition de la bande OH et migration de la bande C=O).



**Figure 22.** Lactonisation de l'*H<sub>4</sub>P3SH*.

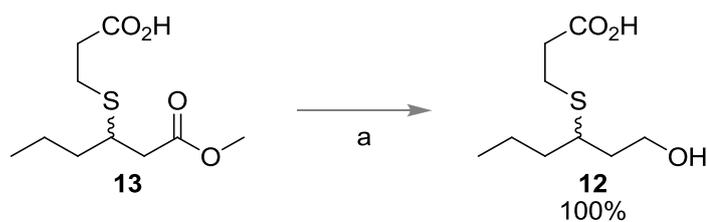
Afin d'éviter la lactonisation de **12** au cours du couplage, la fonction alcool a été protégée. Plusieurs types de protection ont été testés sans succès : introduction d'un groupement trityle, d'un groupement silylé (DPTBS)... Finalement, la fonction alcool a été protégée sous forme ester puis réduite en alcool une fois le couplage réalisé. Le composé **13** est synthétisé en une seule étape par une addition de Michael pour un rendement de 55% après purification (Figure 23).<sup>96</sup>



**Figure 23.** Synthèse de l'*H<sub>4</sub>P3SH* sous sa forme ester.

A cause de la présence de la protéine, la méthode classique de réduction des esters en alcool n'est pas applicable. Il est nécessaire de rechercher des conditions plus douces en tenant compte des problèmes de solubilité de la protéine et de la réduction quantitative de la fonction ester. Les conditions de cette réaction doivent être douces afin de ne pas dénaturer la protéine. La dénaturation de la protéine a souvent plusieurs conséquences importantes : perte de l'activité biologique, modification de la solubilité...

Après différents essais, la réduction de l'ester en alcool a été effectuée, avec 40 équivalents de NaBH<sub>4</sub> et en présence de PEG<sub>400</sub> comme solvant. Au cours de ces tests, de la BSA a été introduite dans le milieu réactionnel afin de vérifier si sa présence n'empêche pas la réduction de la fonction ester en alcool (Figure 24).<sup>107, 108</sup>



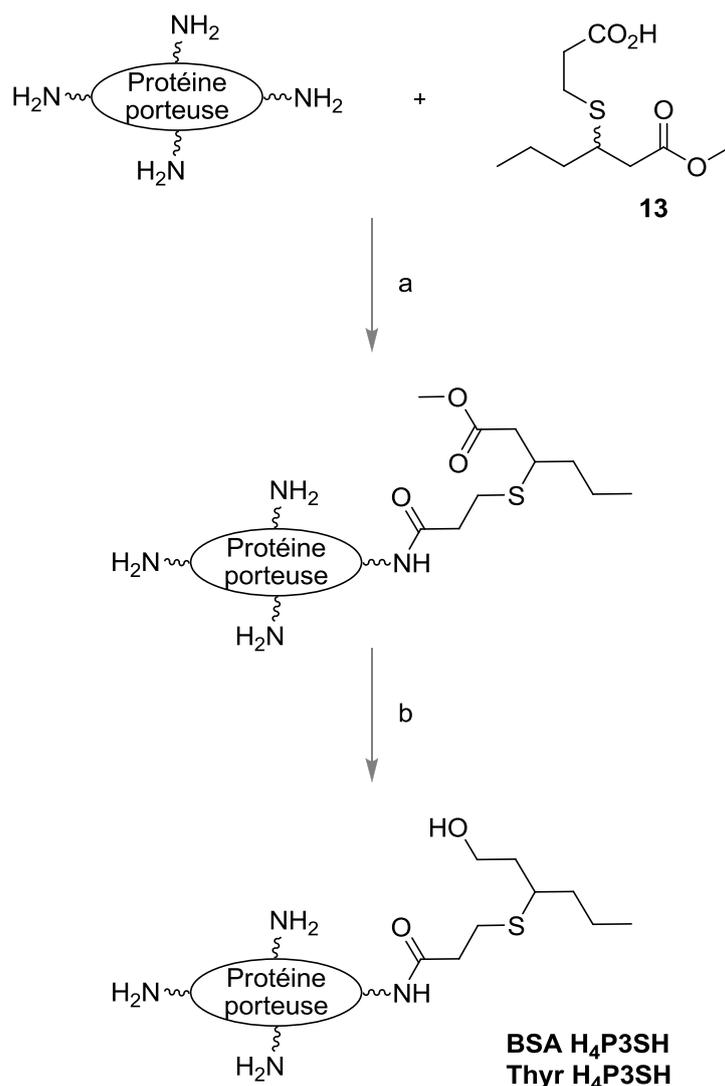
a)  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{PEG}_{400}$ , BSA.

**Figure 24.** Réduction de l'ester de l' $\text{H}_4\text{P3SH}$ .

L'haptène  $\text{H}_4\text{P3SH}$  sous sa forme ester (**13**) est couplé aux protéines porteuses par la méthode des esters activés (Figure 25). Ensuite, la fonction ester est réduite en alcool afin d'obtenir le conjugué désiré à l'aide de 40 équivalents d'agent réducteur ( $\text{NaBH}_4$ ) par haptène couplé et de  $\text{PEG}_{400}$  (Figure 25).

Afin de déterminer la quantité d'agent réducteur à introduire lors de l'étape suivante, le taux de couplage sur la BSA doit être estimé.

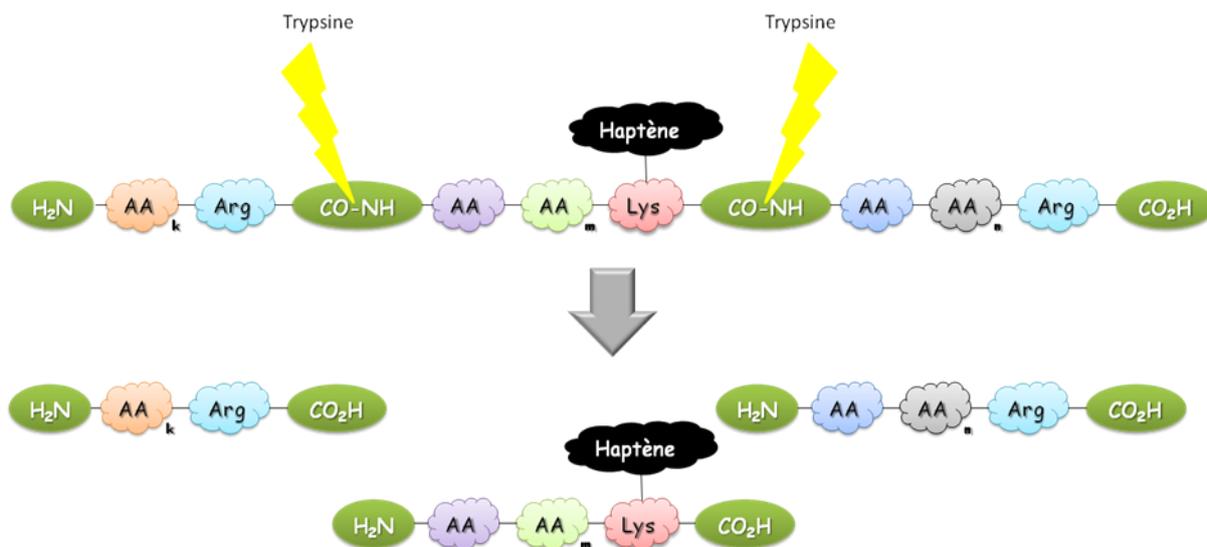
L'analyse en spectrométrie de masse (MALDI), après couplage, n'a pas pu être effectuée. En effet, l'insolubilité de la protéine conjuguée a empêché toute analyse possible. Deux hypothèses peuvent expliquer ce problème. Tout d'abord, les fonctions amines des lysines ont été remplacées par la molécule **13** (moins polaire), diminuant l'hydrophilie de la protéine. Ensuite, au cours de la manipulation, une importante quantité de DMF a été introduite. Il est possible que ce dernier ait dénaturé la BSA modifiant ainsi sa solubilité.



a) EDAC, NHS, DMF, tampon borate/borique (pH 8,7) ; b) NaBH<sub>4</sub>, PEG<sub>400</sub>.

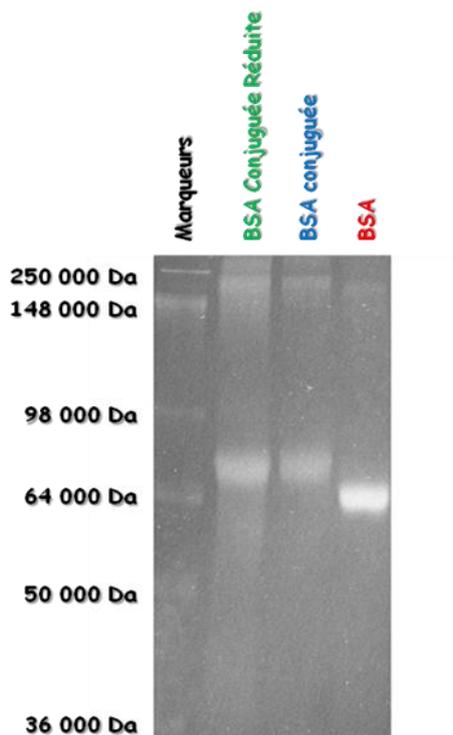
**Figure 25.** Couplage de l'H<sub>4</sub>P3SH sous sa forme ester et réduction de la fonction ester.

Une méthode permettant la détermination du taux de couplage alternative a été envisagée : il s'agit d'une carte peptidique. Ce procédé, réalisé en collaboration avec le Professeur Jean-Marie Schmitter (Université Bordeaux I), consiste à faire digérer des protéines par des enzymes spécifiques. Ces dernières ont la propriété de rompre les liaisons peptidiques après des acides aminés précis. Il est ainsi obtenu différents petits fragments de protéines, qui peuvent alors être analysés par MALDI. Par comparaison des peptides issus de la protéine conjuguée et de la protéine seule, une estimation du taux de couplage peut être effectuée. L'enzyme que nous avons utilisée (la trypsine) a la particularité de couper les liaisons peptidiques après chaque arginine (Arg) et après chaque lysine (Lys), (Figure 26). L'analyse et la comparaison des fragments peptidiques nous a permis d'estimer à 24 minimum, le nombre d'haptènes présents sur la BSA.



**Figure 26.** Principe de la carte peptidique.

La méthode utilisée permettant d'indiquer le nombre d'haptènes réduits est le SDS PAGE (Figure 27), (Tableau 11). Les résultats de cette technique permettent une bonne corrélation entre le taux de couplage et le taux de réduction.



**Figure 27.** Photographie du gel d'électrophorèse.

Protéine	Pic moléculaire observé	MM	Nombre d'haptènes
BSA	62937		
BSA conjuguée	72179	242	43 haptènes couplés
BSA conjuguée réduite	70964	215	41 haptènes réduits

**Tableau 11.** Bilan du gel d'électrophorèse.

Les calculs permettant d'obtenir ces résultats sont les suivants :

$$\text{Nbre d'haptènes couplés} = \frac{\text{MM BSA conjuguée} - \text{MM BSA}}{\text{MM haptène} - 18}$$

$$\text{Nbre d'haptènes réduits} = \frac{\text{MM BSA conjuguée} - \text{MM BSA conjuguée réduite}}{\text{MM perdue}}$$

## II – 5 – Bilan des synthèses et des couplages

Quatre synthèses différentes d'haptènes ont été réalisées. Ces derniers ont été couplés à la BSA et à la Thyroglobuline. Les taux de couplage des conjugués à la BSA ont été déterminés par deux méthodes : en spectrométrie de masse MALDI et en gel d'électrophorèse (Tableau 12).

Protéines	Taux de substitution déterminés par :	
	Gel d'électrophorèse	MALDI
BSA H <sub>1</sub> P3SH	32	26
BSA H <sub>2</sub> P3SH	15	10
BSA H <sub>3</sub> P3SH	30	22
BSA H <sub>4</sub> P3SH	43 <sup>§</sup> , 41 <sup>#</sup>	Au minimum 24 *

<sup>§</sup> haptènes couplés non réduits, <sup>#</sup> haptènes couplés réduits, \*carte peptidique

**Tableau 12.** Bilan des taux de couplage pour les haptènes du P3SH.

Les sérums ont été produits suivant un processus décrits dans la partie expérimentale par une entreprise extérieure (Proteogenix SA, Oberhausbergen France).

### III – Mise au point des tests ELISA

#### III – 1 – Détermination des différents paramètres

Plusieurs paramètres sont à optimiser pour la mise au point d'un test ELISA, certains l'ont été par l'équipe du Professeur Catherine Bennetau (ENITA Bordeaux).<sup>87, 109</sup> Il s'agit des temps, des températures d'incubation et de la quantité de révélateur introduite. Cependant, d'autres paramètres restent à optimiser, comme les concentrations d'anticorps primaires et d'antigènes liés au fond des puits. Il s'agit des tests croisés dont le principe reste identique à des tests classiques mis à part l'absence d'antigènes libres.

Les différentes concentrations d'anticorps primaire et d'antigènes liés sont introduites suivant le schéma de plaque Figure 28. Les résultats sont donnés sous forme de graphique indiquant l'évolution de l'absorbance dans les puits en fonction de la concentration de coating pour chaque concentration d'anticorps.

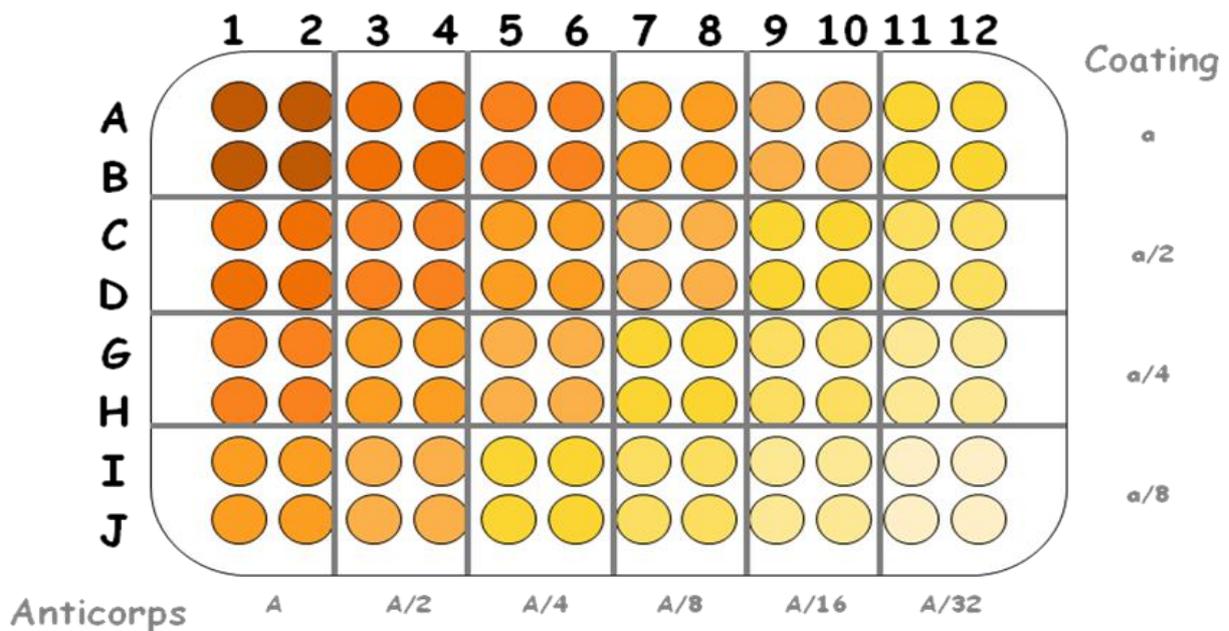
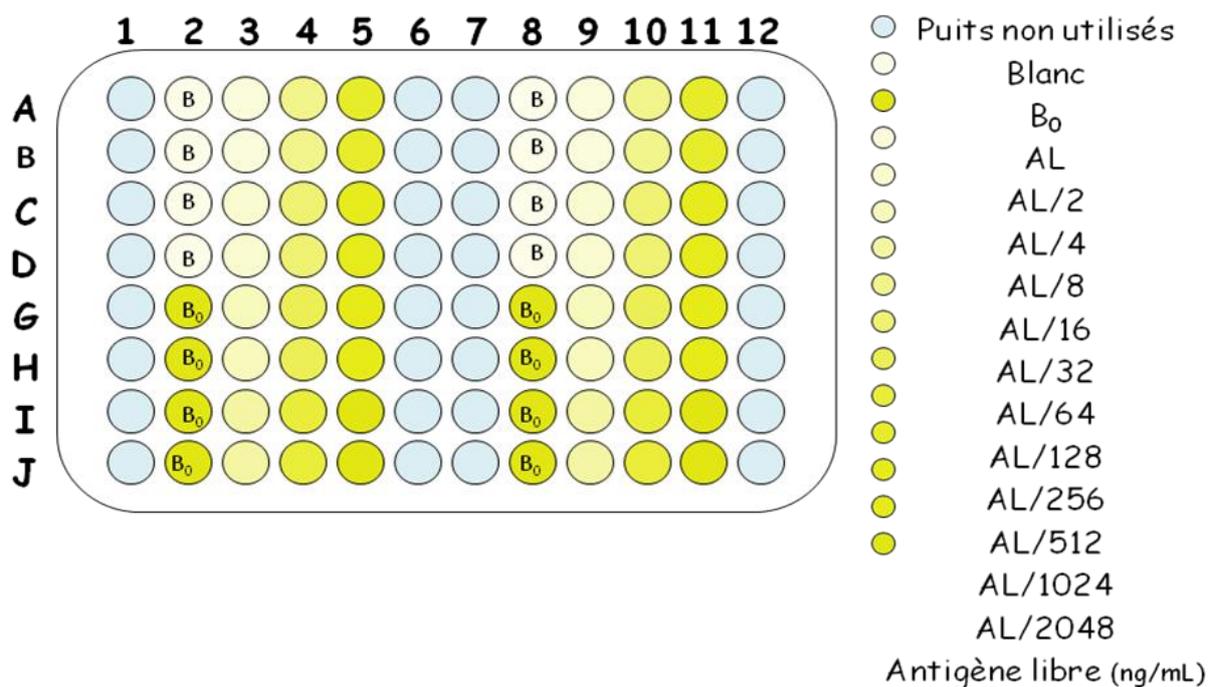


Figure 28. Schéma de plaque lors des tests croisés.

Afin de déterminer la concentration du coating et celle de l'anticorps, il est choisi une absorbance de 1,0. Ce seuil a été déterminé au préalable par notre équipe pour donner une bonne précision des dosages.<sup>88, 109</sup> Pour une Densité Optique de 1, la loi de Beer-Lambert s'applique et donc la densité optique est inversement proportionnelle à la concentration d'un analyte. Par ailleurs, les valeurs de Densité Optique, que nous mesurons variant sur une plage

de valeurs allant de 0 à 1, nous permettent de déterminer avec suffisamment de précision la dose mesurée sans la confondre avec une valeur voisine dans la gamme.

Les tests suivants (tests de gamme) permettent d'obtenir une courbe de calibration. Au cours de ce dosage, les antigènes libres sont introduits, en même temps que les anticorps primaires, dans les puits de la plaque de microtitration, avec une concentration précise et connue (Figure 29). Dans d'autres puits, on peut trouver les blancs (B : liaison non spécifique de l'anticorps primaire) et les B<sub>0</sub> (liaison maximale entre l'anticorps primaire et le coating).



**Figure 29.** Schéma de plaque lors des tests de gamme.

### III – 2 – Tests homologues et hétérologues

Quatre haptènes du P3SH ont été couplés à deux protéines différentes (BSA et Thy). Les couples haptène-BSA serviront à la production d'anticorps et comme antigènes liés dans certains tests de plaques ELISA. Les couples Thy-Haptène serviront uniquement d'antigènes liés dans les tests sur plaques. Au final, huit anticorps et huit antigènes liés différents sont obtenus.

L'utilisation au sein d'un même test d'un anticorps primaire et d'un antigène lié obtenus à partir du même haptène consiste en un test homologue. Lorsque l'antigène lié

contient un haptène qui n'est pas celui qui a permis d'obtenir l'anticorps primaire mis en œuvre, le test est dit hétérologue.

Il est impossible de prédire la meilleure combinaison. Dans la littérature, il a été rapporté que des tests hétérologues peuvent donner de meilleurs résultats que des tests homologues.<sup>71, 110-112</sup> Par exemple, Zhang *et al* ont démontré que parfois les couples hétérologues (coating de l'haptène A et anticorps de l'haptène B) sont plus sensibles que des couples homologues (coating de l'haptène A et anticorps de l'haptène A).<sup>113</sup>

### III – 3 – Tests croisés

L'objectif d'un test croisé est d'obtenir une combinaison entre la concentration d'antigène lié et la dilution de l'anticorps primaire permettant d'obtenir une densité optique de 1 en l'absence de compétiteur libre. Pour ce faire on teste plusieurs dilutions d'anticorps primaire *versus* plusieurs concentrations de coating. Celles-ci varient entre 1/5000 et 1/320000 pour les anticorps primaires et de 0,25 et 2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  pour le coating. Les anticorps obtenus sur deux lapins différents contre le même couple haptène-protéine porteuse ne présentent pas toujours la même réactivité.<sup>87, 88</sup> Ceci peut être expliqué entre autres par le fait que les épitopes peuvent être générés diversement d'un lapin à un autre lors de l'activation des cellules phagocytaires.

Les résultats sont donnés sous forme de tableaux (Tableau 13, Tableau 14) dans lesquels sont exprimés pour chaque cas la combinaison dilution d'anticorps / concentration d'antigène lié générant une densité optique de 1 (valeur en vert) après 30 min de révélation à l'OPD. Plusieurs combinaisons peuvent, la plupart du temps, permettre d'obtenir une densité optique de 1. Dans la pratique on s'aperçoit souvent que c'est celle qui allie la plus forte dilution d'anticorps qui donne au final la meilleure sensibilité. Les résultats en rouge démontrent la non réactivité de l'anticorps envers l'antigène lié. Sous chaque conjugué utilisé comme antigène lié, il est écrit, dans les tableaux, le ratio haptène/protéine utilisé lors de couplage.

Dans la plupart des cas et aux concentrations et dilutions testées, les combinaisons avec les différents conjugués Thy-Haptène ne permettent pas d'obtenir un absorbance de 1 (noté NR : non réactif, Tableau 13).

Pour le conjugué Thy-H<sub>4</sub>P<sub>3</sub>SH, on peut supposer qu'aucun haptène ne s'est couplé à la thyroglobuline. En effet, ce conjugué ne peut lier aucun anticorps. De plus aucune analyse MALDI, de gel d'électrophorèse n'a pu être réalisée et confirmer la présence d'haptène sur la protéine. Pour tous les autres conjugués Thy-Haptène, il y a toujours au moins une combinaison donnant des résultats positifs suggérant que la réaction de couplage a réussi.

Les anticorps dirigés contre les haptènes H<sub>2</sub>P<sub>3</sub>SH et H<sub>4</sub>P<sub>3</sub>SH ne donnent lieu à aucune des conditions appropriées pour les futurs tests de gamme. Cela peut-être lié à la petite taille du bras espaceur. Pour les anticorps dirigés contre les haptènes H<sub>1</sub>P<sub>3</sub>SH et H<sub>3</sub>P<sub>3</sub>SH, des conditions permettant d'obtenir une densité optique de 1 sont trouvées avec un coating utilisant, respectivement, l'haptène 1 et l'haptène 3. On parle de couples homologues (antigène lié et anticorps sont générés avec le même haptène). L'anticorps dirigé contre l'haptène H<sub>3</sub>P<sub>3</sub>SH réagit aussi positivement avec un coating à l'haptène 2 (couple hétérologue). Les deux haptènes se différencient par la présence ou non d'un groupe acide carboxylique en position  $\alpha$ - de la fonction amine. Les tests croisés peuvent indiquer que ce groupe n'est pas essentiel pour la reconnaissance, dans ce cas, probablement parce qu'elle est masquée par d'autres groupes fonctionnels du complexe Thy-haptène.

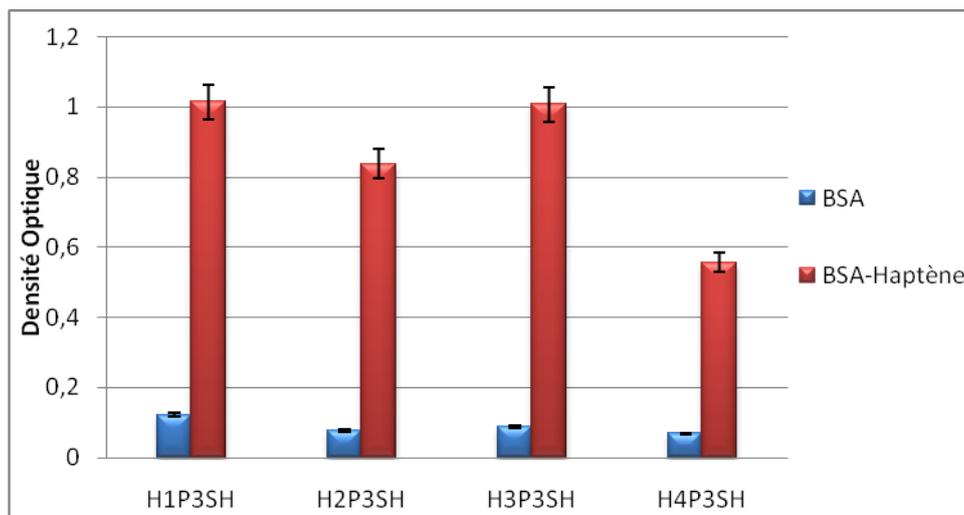
		Coating (Thyroglobuline-H <sub>n</sub> P3SH)									
		H <sub>1</sub> P3SH		H <sub>2</sub> P3SH		H <sub>3</sub> P3SH		H <sub>4</sub> P3SH			
Taux de couplage		1 : 20		1 : 5		1 : 50		1 : 20		1 : 20	
Ac I <sup>aire</sup> non épuisé	Sérums	[C]	[Ac I]	[C]	[Ac I]	[C]	[Ac I]	[C]	[Ac I]	[C]	[Ac I]
Ac H <sub>1</sub> P3SH	1	2	1:10000	0,3	1:20000	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.
		0,5	1:5000	0,15	1:10000						
Ac H <sub>1</sub> P3SH	2	2	1:5000	0,5	1:10000	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.
		4	1:5000	0,25	1:7500						
Ac H <sub>2</sub> P3SH	1	N.R.		N.R.		N.R.		N.R.		N.R.	
	2	N.R.		N.R.		N.R.		N.R.		N.R.	
Ac H <sub>3</sub> P3SH	1	N.R.		N.R.		2	1:5000	2	1:40000	N.R.	
		N.R.		N.R.		4	1:20000	0,5	1:20000	N.R.	
	2	N.R.		N.R.		4	1:5000	2	1:10000	N.R.	
		N.R.		N.R.		2	1:5000	0,5	1:5000	N.R.	
Ac H <sub>4</sub> P3SH	1	N.R.		N.R.		N.R.		N.R.		N.R.	
	2	N.R.		N.R.		N.R.		N.R.		N.R.	

N.R. : non réactif

[C]: concentration de coating in  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; [Ac I]: dilution des Anticorps primaire.

**Tableau 13.** Résultats des tests croisés avec un coating à la thyroglobuline.

Avant d'être utilisé contre un coating BSA-Haptène, les anticorps doivent être épuisés contre la BSA. En effet, un anticorps polyclonal contient un ensemble d'immunoglobulines chacune générée contre un épitope particulier. Lorsque l'anticorps a été généré contre un conjugué BSA-Haptène il contient forcément des IgG qui reconnaissent des épitopes de la BSA. Ainsi, lorsque l'on met en présence l'anticorps et un antigène lié à la BSA en coating, une réaction positive peut être attribuée au moins en partie à une reconnaissance de la BSA et pas à celle de l'haptène. La technique d'épuisement contre la BSA consiste à mettre en présence l'anticorps avec la BSA en conditions saturantes et pendant une durée suffisamment longue pour permettre la réaction antigène / anticorps. Une centrifugation à 10 000g permet d'éliminer l'essentiel des complexes formés. En pratique la confrontation se fait en deux étapes l'une de 2 heures à température ambiante suivie d'une autre d'une nuit à 4°C. L'anticorps qui est utilisé ensuite ne peut réagir qu'avec l'haptène. Afin de vérifier si l'épuisement a été total, les anticorps ont été mis en œuvre en tests croisés à différentes dilutions contre différentes concentrations de BSA coatées au fond des puits. Les résultats sont présentés dans la Figure 30.



**Figure 30.** Tests croisés des anticorps épuisés en homologue contre la BSA et le conjugué BSA-Haptène correspondant.

Le Tableau 14 montre les réactions positives et négatives avec tous les anticorps épuisés avec le coating BSA-Haptène en tests croisés. Il est à noter que l'Ac H4P3SH ne donne des résultats positifs que dans les conditions homologues. Cela peut s'expliquer par la structure de l'haptène utilisé pour l'obtenir. En effet, cet haptène ne possède pas de fonction amine alors que celle-ci est systématiquement retrouvée sur tous les autres haptènes. Cela

signifie que, même si l' $H_4P3SH$  est de petite taille, la spécificité de l'anticorps obtenu avec le conjugué  $H_4P3SH$  permet la discrimination des fonctions présentes. Toutes les autres combinaisons démontrent la bonne réactivité des anticorps avec les antigènes liés en tests homologues et hétérologues. Pour chacun des anticorps on a retenu deux dilutions possibles.

		Coating (BSA-H <sub>n</sub> P3SH)									
		H <sub>1</sub> P3SH		H <sub>2</sub> P3SH		H <sub>3</sub> P3SH		H <sub>4</sub> P3SH			
Taux de couplage		1 : 26		1 : 5		1 : 10		1 : 22		1 : 43	
Ac I <sup>aire</sup> épuisé	Sérums	[C]	[Ac I]	[C]	[Ac I]	[C]	[Ac I]	[C]	[Ac I]	[C]	[Ac I]
Ac H <sub>1</sub> P3SH	1	0,5 0,125	1:120000 1:80000	0,1 1	1:20000 1:80000	2 4	1:10000 1:20000	1 2	1:20000 1:40000	2 4	1:5000 1:5000
	2	0,25 0,5	1:80,000 1:80,000	0,15 0,2	1:10000 1:20000	1 2	1:10000 1:10000	0,25 2	1:10000 1:20000	2 4	1:5000 1:5000
Ac H <sub>2</sub> P3SH	1	0,25 1	1:20000 1:40000	0,25 1,5	1:10000 1:20000	0,5 2	1:40000 1:80000	0,25 0,1	1:40000 1:20000	1 0,25	1:10000 1:5000
	2	0,25 1	1:40000 1:80000	0,25 1	1:20000 1:40000	0,25 2	1:80000 1:160000	0,1 0,5	1:40000 1:80000	0,25 0,5	1:5000 1:10000
Ac H <sub>3</sub> P3SH	1	0,3 1	1:10000 1:40000	0,25 2	1:20000 1:80000	0,125 0,5	1:80000 1:160000	0,025 0,1	1:250000 1:320000	0,25 0,5	1:20000 1:40000
	2	0,5 2	1:10000 1:20000	0,5 1	1:10000 1:20000	0,25 1	1:80000 1:160000	0,02 0,1	1:100000 1:160000	0,2 0,4	1:10000 1:20000
Ac H <sub>4</sub> P3SH	1	N.R.		N.R.		N.R.		N.R.		0,5 1	1:4000 1:5000
	2	N.R.		N.R.		N.R.		N.R.		2 4	1:5000 1:5000

N.R. : non réactif

[C]: concentration de coating in  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; [Ac I]: dilution des Anticorps primaire.

**Tableau 14.** Résultats des tests croisés avec un coating à la BSA.

Ces différents résultats montrent qu'avec un coating à la thyroglobuline, les réponses négatives ne sont pas dues à des anticorps inefficaces, mais plutôt au manque de reconnaissance entre l'anticorps primaire et les complexes protéine-haptène présentés. Cela tendrait à indiquer que les IgG ont une zone de reconnaissance variable incluant un épitope associant l'haptène et une séquence d'acides aminés de la BSA. Ceci était envisageable compte tenu du faible poids moléculaire des haptènes et de ce que l'on sait des mécanismes de reconnaissance entre immunoglobuline et antigène mais nous avons espéré qu'il serait tout de même possible d'obtenir des sensibilités suffisantes.

### III – 4 – Tests de gamme

Quatre-vingt combinaisons ont été testées (16 pour les coating à la Thy et 64 pour les coating à la BSA). Le Tableau 15 expose les  $IC_{50}$  calculées à partir des différentes gammes obtenues avec chaque type de coating à la thyroglobuline combiné à chaque anticorps non épuisé. Pour chaque combinaison d'Ac primaire / antigène-lié on a retenu deux combinaisons de dilution / concentration. Les  $IC_{50}$  obtenues sont présentées l'une en dessous de l'autre. La meilleure sensibilité est obtenue avec le couple homologue H<sub>1</sub>P3SH avec une  $IC_{50}$  de  $140 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (coating à la Thyroglobuline). Cependant, cette valeur ne permet pas de doser directement les échantillons car la sensibilité obtenue est bien supérieure facteur 1000 au dessus de la concentration de P3SH dans le raisin (quelques dizaines de  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ).

		Coating (Thyr-H <sub>n</sub> P3SH)				
		H <sub>1</sub> P3SH	H <sub>2</sub> P3SH	H <sub>3</sub> P3SH	H <sub>4</sub> P3SH	
Taux de couplage		1 : 20	1 : 5	1 : 50	1 : 20	1 : 20
Ac I <sup>aire</sup> non épuisé	Sérums					
Ac H <sub>1</sub> P3SH	1	300 140	1400 1350	*	*	*
	2	300 300	1400 1350	*	*	*
Ac H <sub>2</sub> P3SH	1	*	*	*	*	*
	2	*	*	*	*	*
Ac H <sub>3</sub> P3SH	1	*	*	1250 1100	1500 1300	*
	2	*	*	800 900	1400 1300	*
Ac H <sub>4</sub> P3SH	1	*	*	*	*	*
	2	*	*	*	*	*

\* tests de gamme non effectués (absence de paramètres de départs)

Concentrations exprimé en  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

**Tableau 15.** Les IC<sub>50</sub> obtenus pour les combinaisons dilution d'anticorps / Thy-Haptène lié.

Contrairement aux coating à la thyroglobuline, le coating à la BSA permet l'utilisation de tous les anticorps. Cependant, aucune des combinaisons retenues ne donne de meilleurs résultats que le coating à la thyroglobuline (Tableau 16).

		Coating (BSA-H <sub>n</sub> P3SH)				
		H <sub>1</sub> P3SH	H <sub>2</sub> P3SH	H <sub>3</sub> P3SH	H <sub>4</sub> P3SH	
Taux de couplage		1 : 26	1 : 5	1 : 10	1 : 21	1 : 43
Ac I <sup>aire</sup> épuisé		Sérums				
Ac H <sub>1</sub> P3SH	1	2000	3000	1700	2700	1000
		1950	2400	2200	2700	1500
H <sub>1</sub> P3SH	2	2400	3500	1400	2550	1250
		2400	2700	2100	2550	1300
Ac H <sub>2</sub> P3SH	1	3500	3500	3000	3500	1300
		2400	3300	3500	2700	1600
H <sub>2</sub> P3SH	2	3000	4000	4000	3200	2000
		3000	4000	4100	3000	1250
Ac H <sub>3</sub> P3SH	1	2800	3500	1400	3000	1100
		2700	2000	1800	2400	1100
H <sub>3</sub> P3SH	2	2650	2400	1400	2550	1000
		2700	2300	1200	2800	1300
Ac H <sub>4</sub> P3SH	1	*	*	*	*	1150
						1200
H <sub>4</sub> P3SH	2	*	*	*	*	800
						*

\* tests de gamme non effectués (absence de paramètres de départs)

Concentrations exprimé en  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

**Tableau 16.** Les IC<sub>50</sub> obtenus pour les combinaisons dilution d'anticorps épuisés / BSA-Haptène lié.

### III – 5 – Conclusion

Compte tenu du caractère aléatoire de la formation des épitopes au cours du processus immunitaire nous avons testé toutes les combinaisons possibles sans en rejeter *a priori*. Les meilleurs résultats sont obtenus avec la combinaison homologue H<sub>1</sub>P3SH (coating à la Thy). Ces conditions de dosage permettent d'obtenir une IC<sub>50</sub> de 140  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . La raison de ce résultat est peut-être à rechercher dans la taille du complexe haptène / bras espaceur qui est ici le plus long.

La reconnaissance immunologique de l'haptène par les différents anticorps est démontrée. Cependant, la petite taille de la molécule conduit probablement à la formation d'épitopes englobant les bras espaceurs ainsi qu'une séquence d'acide aminé de la BSA trop associée à l'haptène pour être reconnue en intégralité par les anticorps (haptènes H<sub>2</sub>P3SH, H<sub>3</sub>P3SH et H<sub>4</sub>P3SH). La conséquence de ce phénomène est que le précurseur (P3SH) n'est reconnu que par une petite partie de la région variable des immunoglobulines qui constituent les anticorps polyclonaux. Ceci ne permet sans doute pas une liaison anticorps / antigène libre suffisamment stable (liaisons hydrogènes) et induit une plus forte affinité des anticorps pour les haptènes liés que pour les haptènes libres. Ceci ne va pas dans le sens d'une bonne sensibilité.

Dans le vin, la concentration du P3SH est de l'ordre de quelques dizaines de microgrammes par litre. La sensibilité obtenue avec le dosage ELISA mis au point est égale à 140 µg.mL<sup>-1</sup>, soit supérieure d'un facteur 1000 à celle requise pour le dosage. Pour pouvoir utiliser ce dosage, il faudrait augmenter la concentration du précurseur dans les échantillons de raisin par concentration. Cette hypothèse est bien entendu exclue pratiquement.

Il est donc nécessaire d'améliorer la sensibilité du dosage afin qu'il puisse être appliqué. Une solution serait de synthétiser un nouvel haptène en s'inspirant de la synthèse peptidique, c'est-à-dire un haptène qui serait un polymère de P3SH. En effet, la meilleure sensibilité est obtenue avec le bras espaceur le plus long, on peut donc supposer qu'une molécule plus grosse donnerait de meilleurs résultats.

Chapitre III :

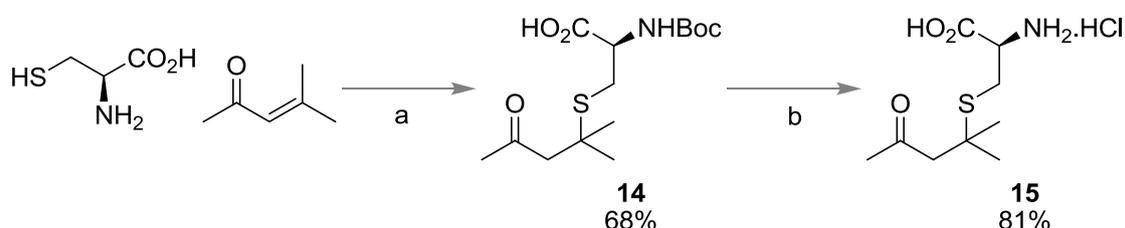
Synthèse du P4SMP et de  
son haptène

Dosage du P4MSP

## I – Synthèse du P4MSP

Le P4MSP doit être synthétisé afin de servir d'antigènes libres lors de la mise au point des tests ELISA.

La synthèse du P4MSP, comme celle du P3SH, est réalisée par une addition de Michael entre la cystéine et l'oxyde de mésityle.<sup>26, 114</sup> Le P4MSP avait déjà été préparé mais aucune caractéristique physico-chimique (RMN, IR, GC) n'était donnée.<sup>114</sup> Afin d'améliorer le rendement et la purification du produit final, l'addition de la cystéine sur l'oxyde de mésityle a été réalisée en présence de carbonate de césium. La fonction amine a été protégée (Boc) puis libérée sous forme de chlorure. <sup>98, 115-117</sup> La synthèse de ce composé se déroule en deux étapes avec un rendement global de 55% (Figure 31).



a) Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, Boc<sub>2</sub>O, THF ; b) HCl 10M

**Figure 31.** Synthèse du P4MSP.

## II – Etude structurale du P4MSP en fonction du pH

Au laboratoire, lors d'essais préliminaires pour la mise au point de dosage, il avait été montré que la structure de ce composé pouvait varier en fonction du pH.<sup>98</sup>

A pH ≤ 5,5, le spectre RMN <sup>1</sup>H de **15** (Figure 32) montre la présence du groupement CH<sub>3</sub> (1) en α- du carbonyle. A pH 5,5, ce signal disparaît et une diminution de l'intégration du signal du CH<sub>2</sub> (3) est observée. A pH 7, le signal de ce CH<sub>2</sub> a également disparu. Pour 5,5 < pH < 8, la molécule **15** se trouve vraisemblablement sous la forme céto-énolique. A un pH ≥ 10, la présence d'au moins deux composés avec des déplacements chimiques différents pour le CH (α) de la partie cystéine conforte cette hypothèse.<sup>98</sup>

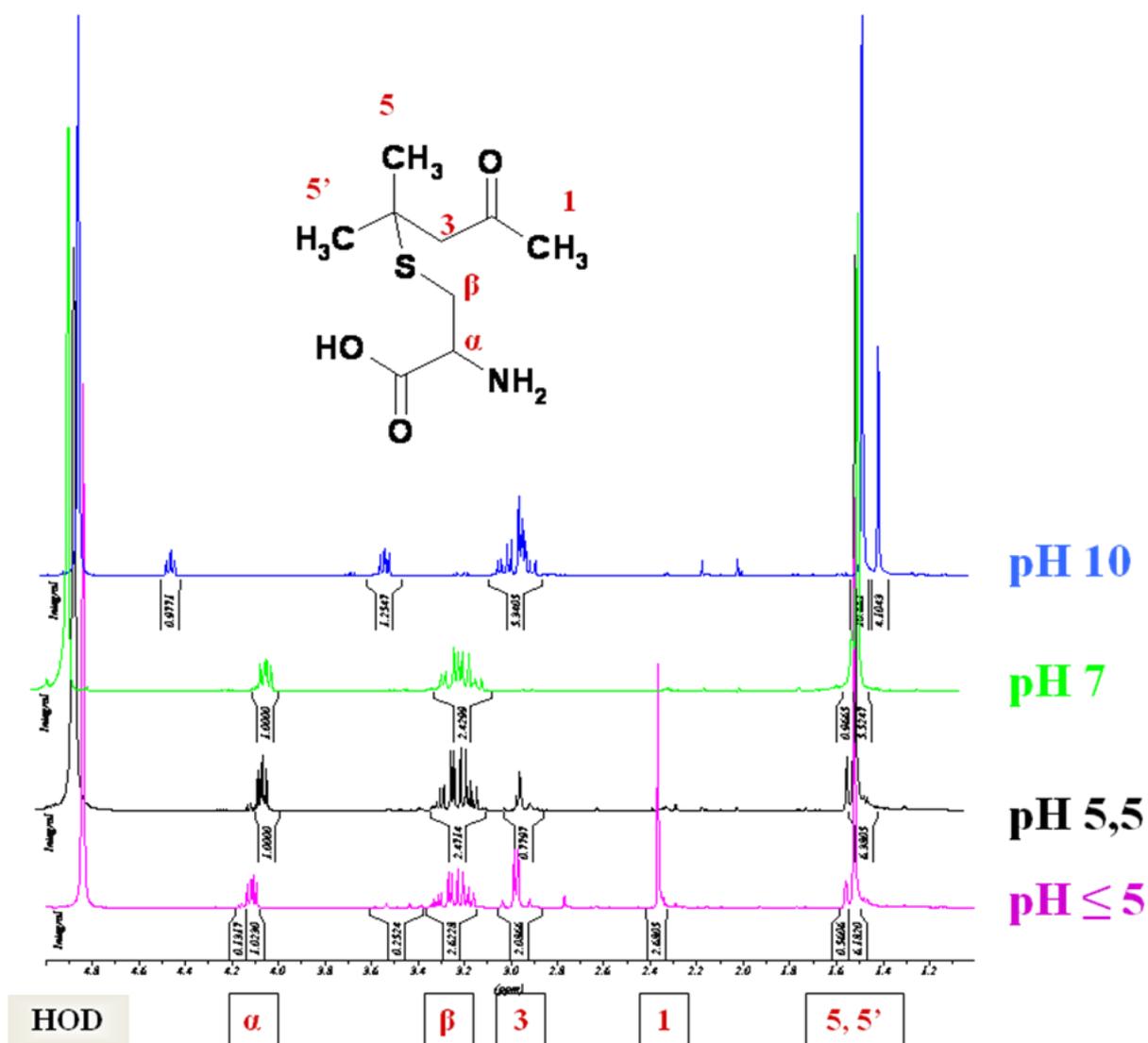
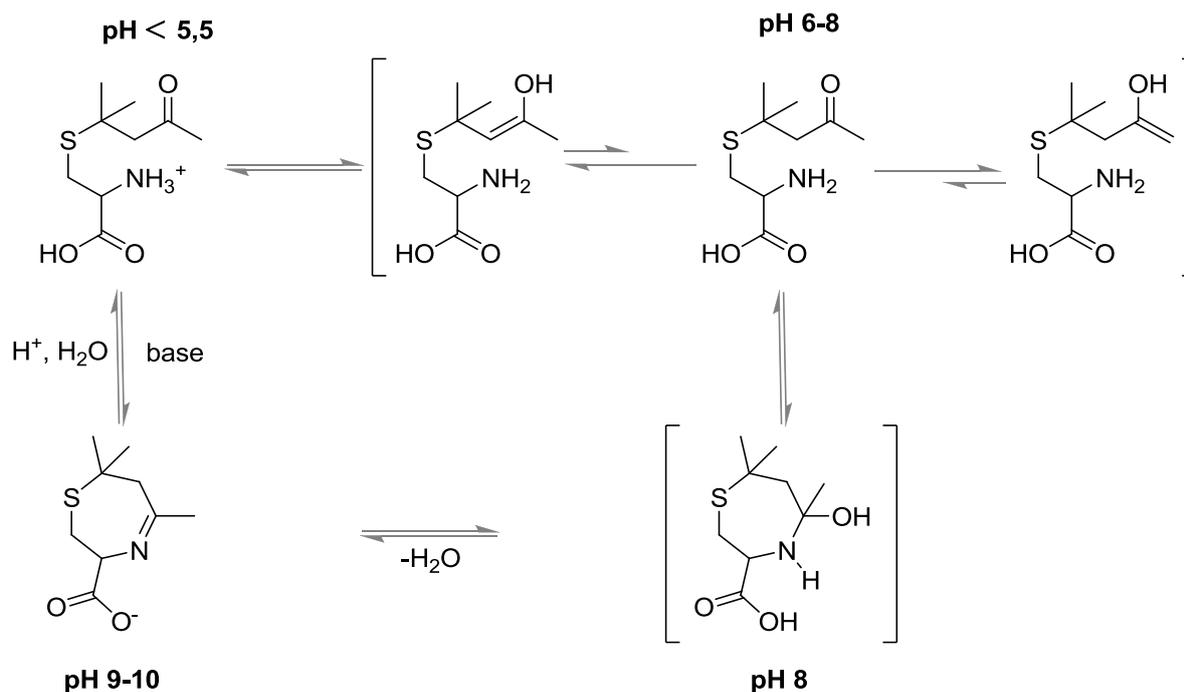


Figure 32. Spectre RMN  $^1\text{H}$  du P4MSP en fonction du pH.

Une analyse IR du P4MSP à deux pH différents (3 et 7) a confirmé l'hypothèse de l'équilibre céto-énolique. A pH = 3, une bande caractéristique ( $1740\text{ cm}^{-1}$ ) des C=O est observée ; à pH 7, cette bande a disparu mais elle est remplacée par une bande caractéristique des C=C ( $1624\text{ cm}^{-1}$ ).

De plus, à pH supérieur à 8, différentes analyses (GC-MS après dérivatisation et LC-MS<sup>n</sup> n=2 et 3) ont permis de confirmer la formation d'un cycle intramoléculaire.

Ces observations ont conduit à proposer l'existence d'un équilibre entre plusieurs formes structurales du P4MSP en fonction du pH (Figure 33) :



**Figure 33.** Tautomérie céto-énolique et cyclisation intramoléculaire du P4MSP.

Ces changements structuraux du P4MSP peuvent expliquer les difficultés rencontrées au Laboratoire lors du développement des méthodes de quantification directes (GC-MS, ELISA) pour ce précurseur.<sup>98</sup>

### III – Synthèse, étude structurale et couplage de l' $\text{H}_1$ P4MSP.

#### III – 1 – Synthèse de l'haptène du P4MSP

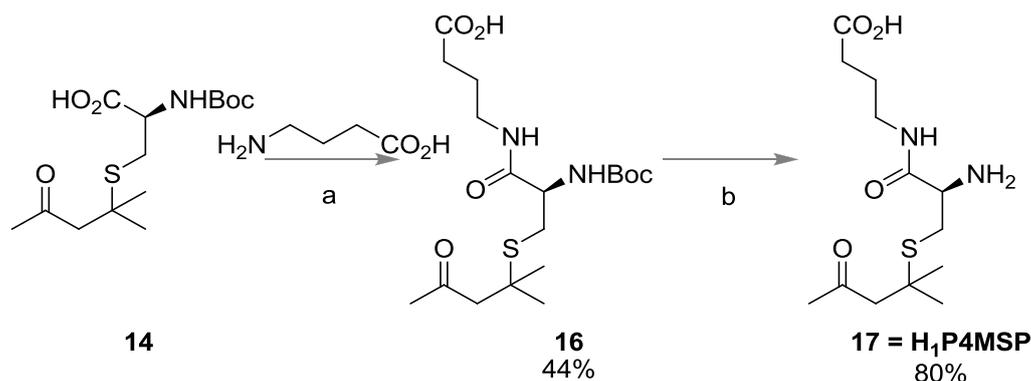
Comme pour le P3SH, la partie arôme est la partie discriminante du P4MSP (Figure 34). Pour la conception de l'haptène, cette chaîne doit toujours être présente sur l'immunogène. Lors de la mise au point des tests ELISA, les changements structuraux du P4MSP devront aussi être pris en compte.



**Figure 34.** Structure du P4MSP.

Pour accrocher le bras espaceur, deux fonctions sont disponibles : la fonction amine et la fonction acide de la partie cystéine. Les essais préliminaires menés au Laboratoire avaient

montré que la présence de la fonction amine sur l'haptène était indispensable pour mimer les variations structurales du P4MSP. La fonction acide reste donc la seule possibilité afin d'introduire le bras espaceur. Ce dernier possède une chaîne carbonée de quatre atomes. La synthèse est réalisée en deux étapes à partir du composé **14** : une formation d'une liaison amide puis déprotection de la fonction amine. L'haptène **17** (noté l' $H_1P4MSP$ ) est obtenu avec un rendement global de 35% (Figure 35).

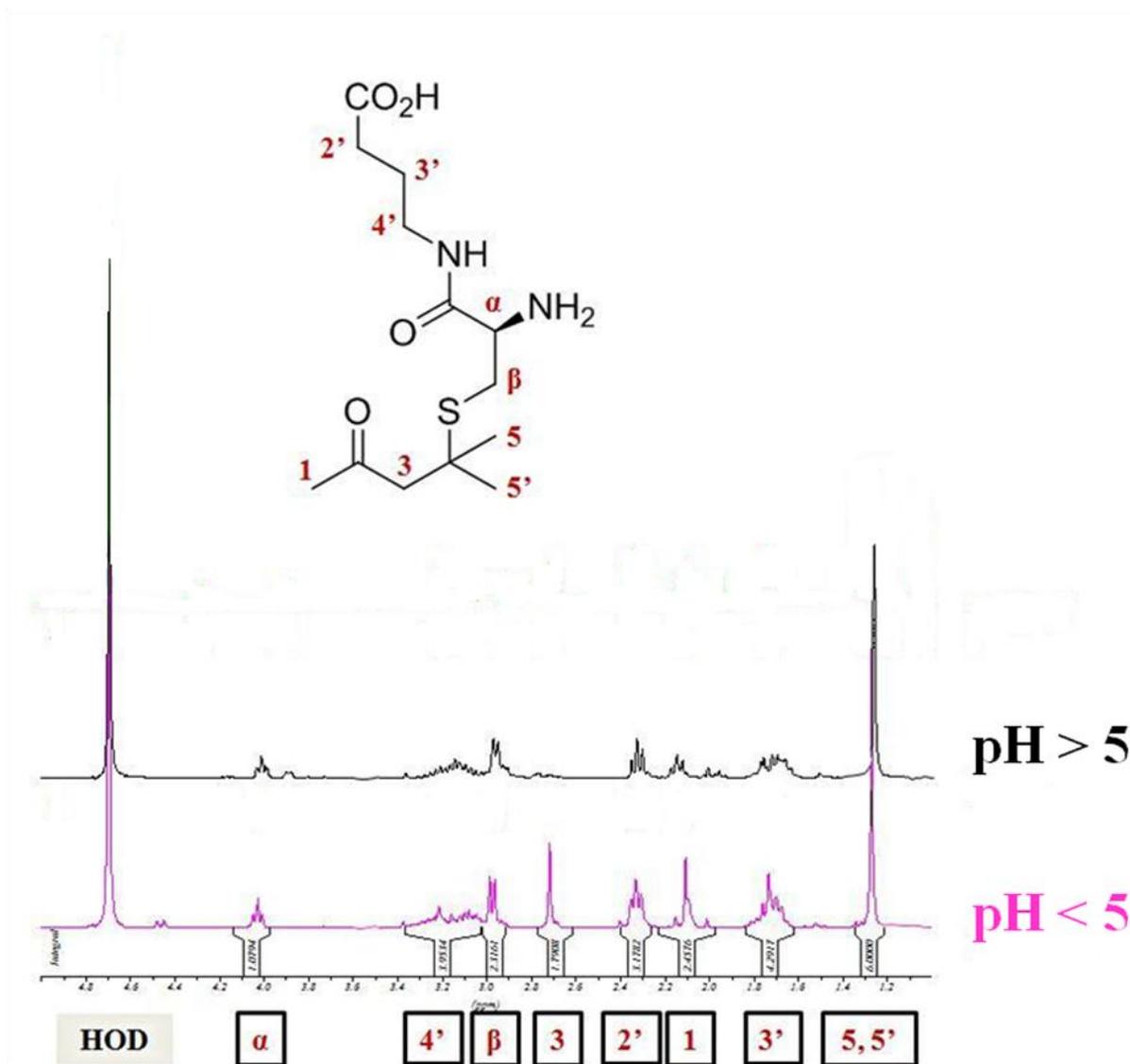


a) NHS, DCC, NaOH,  $Et_3N$ , DMF,  $H_2O$  ; b)  $HCl_g$ , DCM.

**Figure 35.** Synthèse de l' $H_1P4MSP$ .

### III – 2 – Etude structurale de l' $H_1P4MSP$

Les spectres RMN  $^1H$  de l'haptène  $H_1P4MSP$  ont été enregistrés pour des valeurs de pH comprises entre 3 et 9, par pas de 1. A  $pH < 5$ , l'haptène se trouve sous une forme cétonique. A  $pH > 5$ , les deux signaux, (1) et (3), en  $\alpha$ - du carbonyle disparaissent (Figure 36).



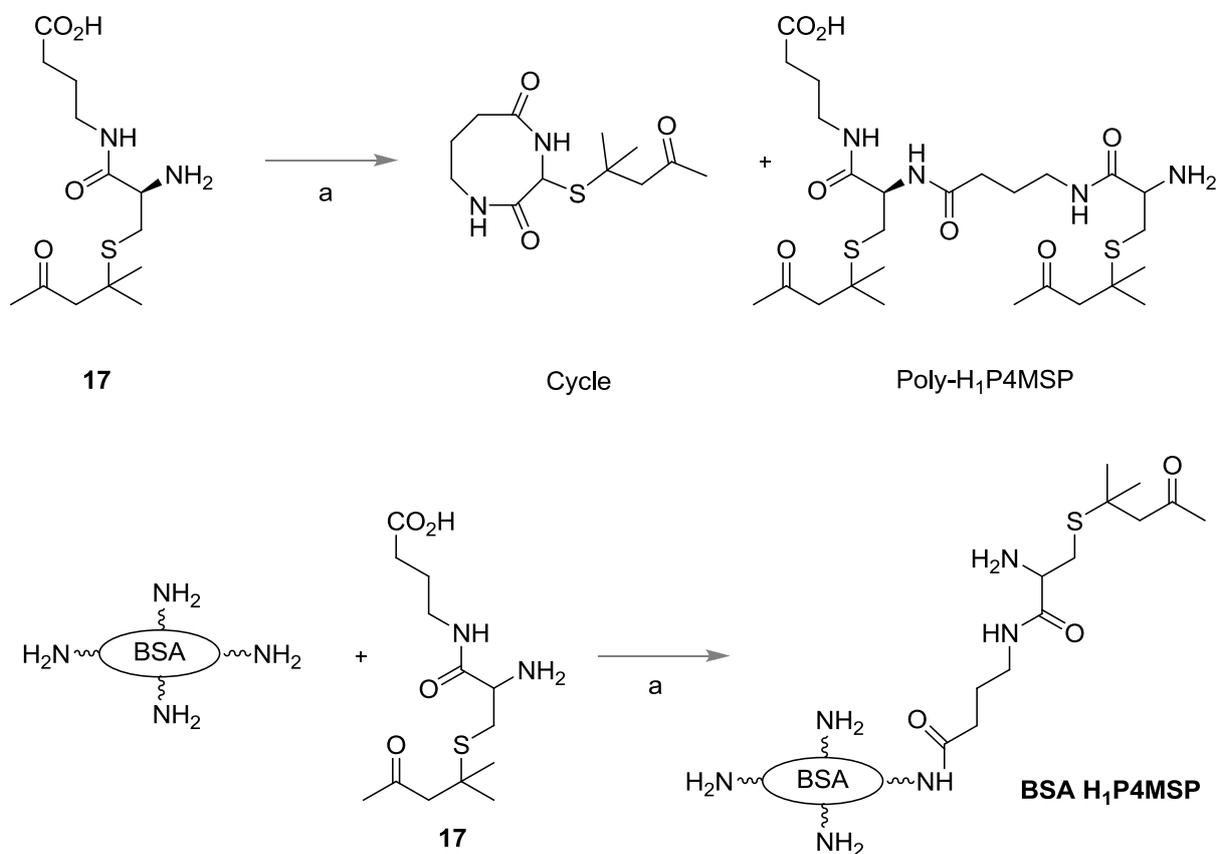
**Figure 36.** Spectre RMN <sup>1</sup>H de l'H<sub>1</sub>P4MSP en fonction du pH.

Comme pour le précurseur, les spectres RMN <sup>1</sup>H de l'H<sub>1</sub>P4MSP montrent les mêmes changements structuraux en fonction du pH.

### III – 3 – Couplage de l'H<sub>1</sub>P4MSP à la BSA

L'activation de la fonction acide par la méthode des esters activés est délicate à cause de la fonction amine libre présente sur l'haptène. En effet, à côté du produit conjugué attendu (BSA-H<sub>1</sub>P4MSP), des produits secondaires peuvent se former par cyclisation intramoléculaire ou polycondensation (Figure 37).

Différents modes opératoires, dans lesquels les temps d'activation de la fonction acide variaient, ont été essayés afin de pouvoir former le conjugué. Quatre temps d'activation ont été testés : 0 min, 30 min, 60 min et 120 min (Figure 37) :



a) DCC, NHS, tampon borate/borique (pH 8,7), DMF.

**Figure 37.** Cyclisation intramoléculaire, polycondensation et couplage à la BSA de l'*H<sub>1</sub>P4MSP*.

Pour chaque essai, le nombre d'haptène fixé à la BSA a été évalué par électrophorèse (Tableau 17).

Temps d'activation	MM (Da)	Nombre d'haptènes par molécule de BSA
	(MM <sub>conjuguée</sub> – MM <sub>BSA</sub> )	
0 min	300	1,1
30 min	4250	14,9
60 min	850	2,9
120 min	566	2,0

**Tableau 17.** Détermination par électrophorèse du nombre d'haptènes par molécule de BSA.

Le meilleur taux de substitution a été obtenu pour un temps d'incubation de 30 min et a été confirmé par spectrométrie de masse (MALDI, Tableau 18).

Echantillon	Pic	$\Delta MM$ (MM <sub>conjugué</sub> – MM <sub>BSA</sub> )	Nombre d'haptènes par molécule de BSA
	Moléculaire observé		
BSA	66431		
BSA H <sub>1</sub> P4MSP	72800	6369	22,1

**Tableau 18.** Détermination par MALDI du nombre d'haptènes par molécule de BSA.

Généralement, un taux de substitution  $< 5$  ne permet pas l'obtention d'anticorps spécifique.<sup>90</sup> C'est donc le conjugué BSA-H<sub>1</sub>P4MSP, avec le taux de coulage estimé à 20 haptènes/BSA qui a été utilisé pour l'immunisation des animaux.

## IV – Résultats préliminaires sur les tests ELISA

L'immunisation complète des lapins se terminera après la rédaction de ce Mémoire, cependant, des essais ont quand même été effectués sur des sérums intermédiaires.

Les tests croisés ont été effectués uniquement avec un coating avec BSA H<sub>1</sub>P4MSP. Les anticorps anti-BSA sont éliminés avant utilisation des sérums pour les tests croisés. Dans une plaque de microtitration, on fait varier la concentration des conjugués de 0,05 à 0,4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  et la dilution des anticorps de 1/10000 à 1/320000. Les couples de concentration/dilution pour lesquels on obtient une DO proche de 1 sont donnés dans le Tableau 19. Les 4 couples de valeur permettent d'obtenir au moins deux conditions (concentrations de coating et dilution d'anticorps) pour les tests de gamme qui sont aussi donnés dans le Tableau 19.

Ac I <sup>aire</sup>		Coating BSA-H1P4MSP				
	Sérum	[C]	[Ac I]	IC <sub>50</sub> *	Seuil de détection*	Limite courbe d'étalonnage*
Ac	1	0,1	1/80000	2500	500	625 – 10000
		0,005	1/40000	2500	500	625 – 10000
H <sub>1</sub> P4MSP	2	0,2	1/40000	1250	250	312 – 5000
		0,05	1/20000	1250	250	312 – 5000

[C] : concentration de coating en  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  ; [Ac I] : dilution des anticorps primaire ;

\* : concentration en  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

**Tableau 19.** Les différents paramètres obtenus pour le dosage du P4MSP.

La meilleure sensibilité obtenue ( $1250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) avec ces sérums intermédiaires ne permet pas de doser directement le P4MSP dans les moûts dont la teneur moyenne en P4MSP est voisine du millier de  $\text{ng.L}^{-1}$  (valeur trouvée par GC-MS).<sup>53</sup> Différents modes opératoires ont été testés (agitation pendant les incubations, préincubations à  $+4^\circ\text{C}$  et à  $+37^\circ\text{C}$  de l'antigène libre avec l'anticorps primaire) mais ils n'ont pas permis d'améliorer de façon significative la sensibilité du dosage.

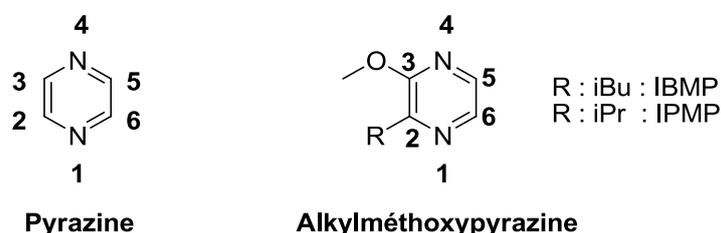
## V – Conclusion

Comme il l'a été rappelé dans ce chapitre, le P4SMP présente plusieurs formes structurales selon le pH du milieu, dont un équilibre céto-énolique à pH physiologique (pH usuel des tests ELISA). Nous avons donc conçu puis synthétisé un haptène du P4MSP capable d'adopter, aux pH requis, les mêmes variations structurales que le précurseur, ce qui a été confirmé par une étude RMN.

Des tests ELISA préliminaires, menés sur les sérums intermédiaires n'ont pas permis pour l'instant d'atteindre la sensibilité requise pour doser directement le précurseur d'arôme dans les moûts.

Chapitre IV : Synthèses de  
méthoxyypyrazines, de leurs  
haptènes et  
dosages immunologiques de  
l'IBMP et de l'IPMP

Les pyrazines sont des molécules planes à structure aromatique à six chaînons possédant deux atomes d'azote. Les dérivés de la pyrazine se différencient par la nature des substituants présents sur les quatre atomes de carbones (Figure 38).<sup>118</sup>



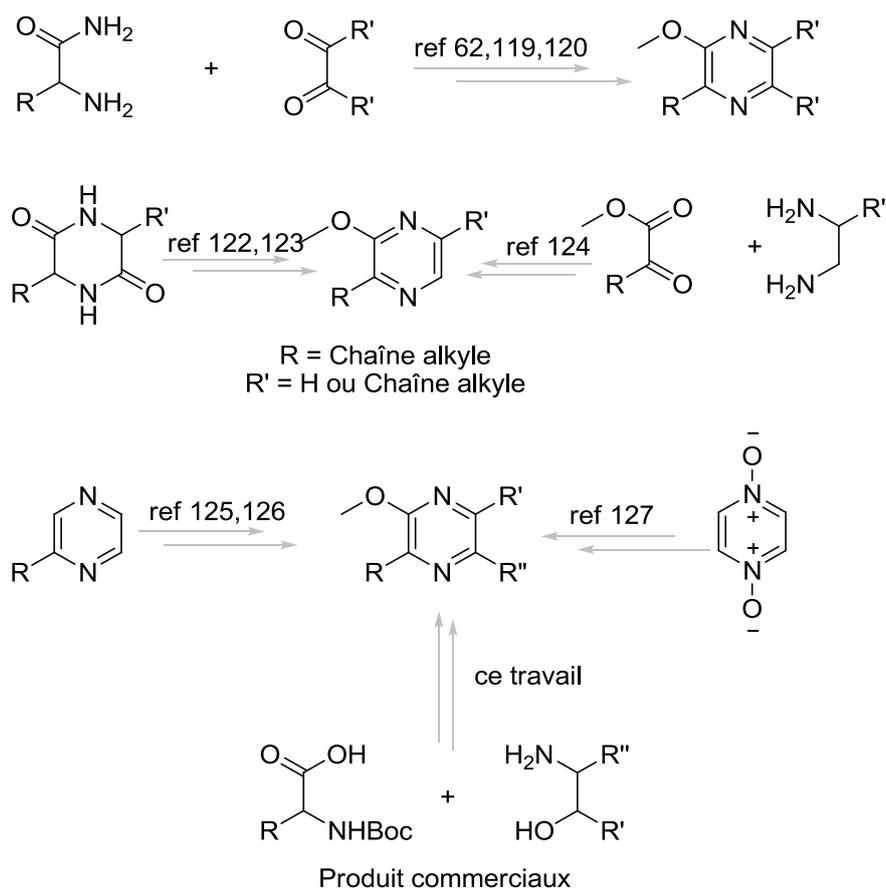
**Figure 38.** Structure des pyrazines et des alkylméthoxypyrazines.

Tout comme les précurseurs d'arômes, l'IBMP et l'IPMP sont des molécules trop petites pour être immunogènes. Il est donc nécessaire de concevoir, de synthétiser et de coupler leurs haptènes à des protéines porteuses (BSA).

Pour la conception de l'haptène, il est important de présenter le cycle des MP bien éloigné de la surface des protéines. La présence des fonctions méthoxyle et de la chaîne alkyle non modifiées est indispensable. Il est donc nécessaire d'introduire un bras espaceur soit sur la position 5- ou soit sur la position 6-. Dans un premier temps, la position 5- (position la plus éloignée des chaînes alkyle) a été choisie pour l'introduction du bras espaceur. Cette position permet une exposition maximale de la chaîne alkyle afin d'obtenir la meilleure spécificité pour deux MP cibles.

Dans la littérature, plusieurs synthèses de méthoxypyrazines sont décrites. (Figure 39) Dans la plupart des approches, un acide aminé est condensé avec des composés 1,2-dicarbonylés et de bons rendements sont annoncés lorsqu'un réactif dicarbonylé symétrique est utilisé.<sup>62, 119, 120</sup> Ce chemin de synthèse n'est pas approprié à la préparation de MP substitué en 5- ou en 6- à cause de la formation des isomères différents difficiles à séparer.<sup>121</sup>

Une autre approche a été décrite, incluant l'aromatisation de dipeptide cyclique par chloration et l'introduction ultérieure de groupe méthoxyle. Les rendements sont faibles à cause de la non-sélectivité de chloration.<sup>122, 123</sup> Il est aussi possible de synthétiser des MP soit par condensation du méthyle pyruvate et de l'éthylène diamine,<sup>124</sup> soit par chloration et alkylation de méthyle pyrazine,<sup>125, 126</sup> et soit par obtention de pyrazine *N,N* dioxyde.<sup>127</sup>



**Figure 39.** Différentes voies de synthèse pour des dérivés de MP.

Une nouvelle voie de formation du cycle pyrazine a été mise au point au Laboratoire en collaboration avec le Dr. Pierre Babin (Maître de Conférences à l'Université Bordeaux 2).<sup>128</sup> Cette dernière a pour avantage de pouvoir obtenir des méthoxypyrazines substituées par des groupements chiraux en position 2- et 5- ou 6-. Cette substitution en position 5- ou 6- par un méthyle permet d'obtenir des molécules sur lesquels des bras espaceur pourront être introduits par ajout d'une chaîne alkyle pour de futurs haptènes (Tableau 20).

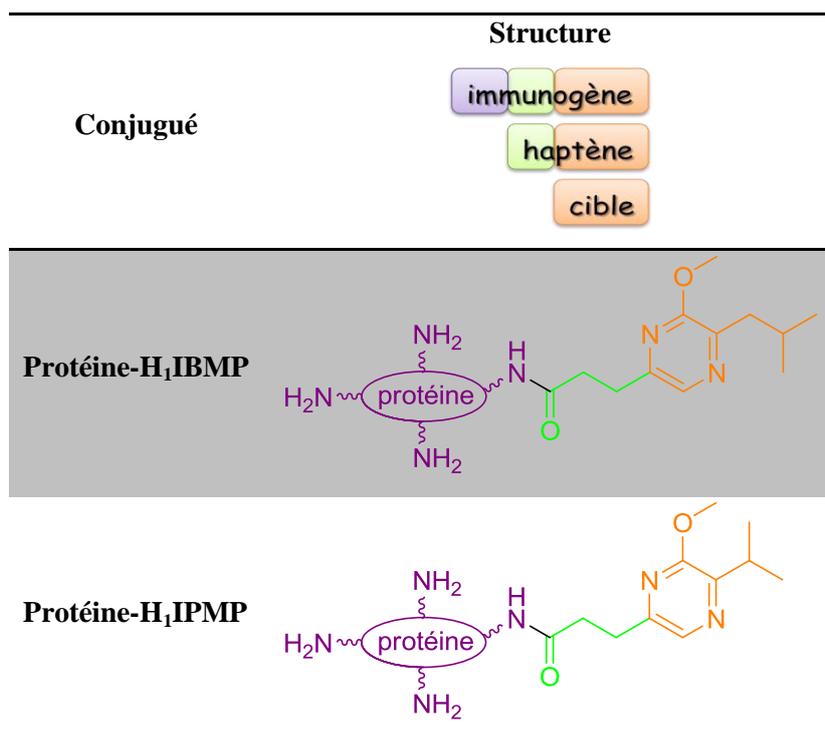
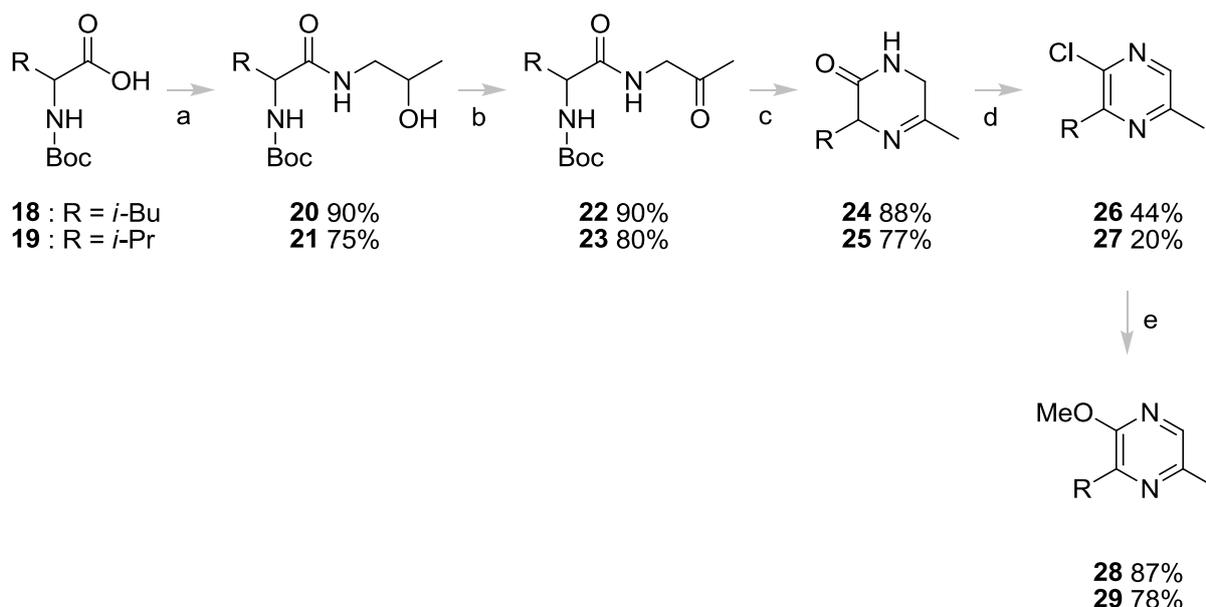


Tableau 20. Structures des conjugués de l'IBMP et de l'IPMP.

## I – Synthèses d'alkylméthoxypyrazines substituées ou non

### I – 1 – Substitution en position 6-

La synthèse de l'IBMP et de l'IPMP substituées en position 6- par un méthyle se déroule en cinq étapes (Figure 40). La première étape consiste en une protection de la fonction amine d'un acide aminé (IBMP : leucine ; IPMP : valine) par un groupement Boc. La fonction acide restée libre peut alors former par la méthode des esters activés une liaison amide avec le 1-aminopropan-2-ol. Une oxydation de la fonction alcool secondaire en cétone, par de l'eau de javel, permet l'obtention des composés **22** et **23**.<sup>129, 130</sup> A l'aide d'acide chlorhydrique gazeux, la fonction amine est déprotégée ce qui entraîne en présence d'une base (Et<sub>3</sub>N et tamis moléculaire) la formation d'une cycloimine. L'étape suivante est la chloration et aromatisation du cycle à l'aide de POCl<sub>3</sub> et de PCl<sub>5</sub>. Cette dernière est l'étape limitante de la synthèse car son rendement est très faible. Les dérivés MP substitués en position 6- sont obtenus après substitution du chlore par un groupement méthoxyle. Le composé final avec la chaîne isobutyle (**28**) est obtenu avec un rendement global de 27% et le composé (*i*-Pr) **29** avec un rendement de 7%. La différence de rendement est probablement due à une meilleure solubilité des composés avec l'*i*-Bu dans les différents solvants organiques.

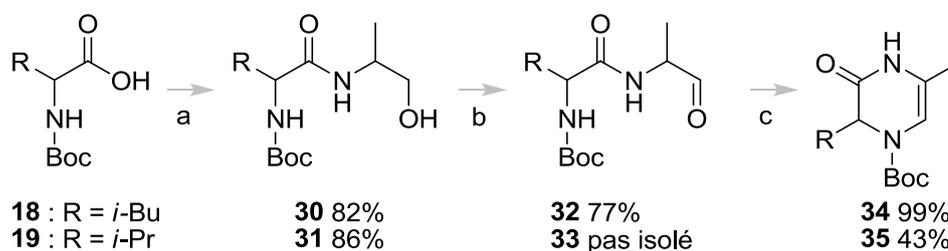


- a) 1-aminopropan-2-ol, NHS, DCC, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ; b) eau de javel, TEMPO, NaHCO<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ; c) HClg, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Et<sub>3</sub>N, Et<sub>2</sub>O, tamis moléculaire 4Å ; d) POCl<sub>3</sub>, PCl<sub>5</sub> ;  
 e) NaOMe, MeOH.

**Figure 40.** Synthèse des MP substituées en position 6-.

## I – 2 – Substitué en position 5-

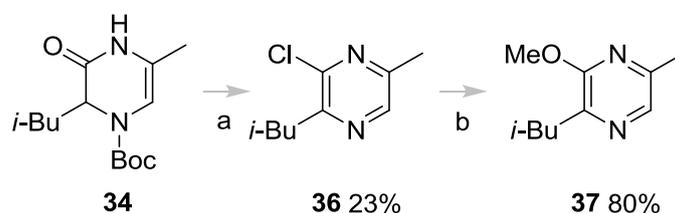
Afin d'obtenir les dérivés des MP substitués en position 5-, le 1-aminopropan-2-ol est remplacé par le 2-aminopropan-1-ol. Les premières étapes sont identiques (Figure 41). La fonction acide des composés **18** et **19** forme avec l'amine du 2-aminopropan-1-ol une amide. L'alcool primaire est ensuite oxydé, beaucoup plus rapidement que précédemment, en aldéhyde qui se cyclise facilement et rapidement pour obtenir les composés **34** et **35**. La chaîne latérale plus longue (*i*-Bu) permet l'obtention du produit avec un rendement meilleur (62%) par rapport à la série isopropyle (37%).



- a) 2-aminopropan-1-ol, NHS, DCC, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ; b) eau de javel, TEMPO, NaHCO<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ;  
 c) cyclisation spontanée en 24-36h.

**Figure 41.** Synthèse des MP substituées en position 5-.

Le traitement du composé **34** avec  $\text{POCl}_3/\text{PCl}_5$  permet d'effectuer la déprotection de la fonction amine, l'aromatisation du cycle et la chloration en une seule étape (Figure 42). Puis la fonction chlorée est substituée par un groupement méthoxyle. Le composé **35** ayant été obtenu avec un trop faible rendement, la synthèse n'a pas été poursuivie plus avant.

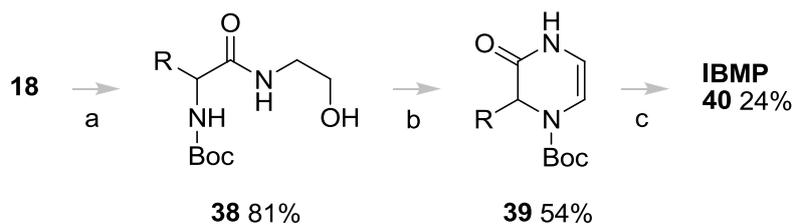


a)  $\text{POCl}_3$ ,  $\text{PCl}_5$  ; b)  $\text{NaOMe}$ ,  $\text{MeOH}$ .

**Figure 42.** Synthèse des MP substituées en position 5-.

### I – 3 – Produit naturel

De la même manière, cette nouvelle approche synthétique pour les MP a été appliquée pour l'obtention de l'IBMP qui servira d'antigènes libres lors des dosages immunologiques (Figure 43). L'acide aminé protégé **18** réagit avec le 2-aminoéthanol pour donner un alcool primaire qui lors de son oxydation en aldéhyde se cyclise (composé **39**). De la même manière, ce cycle est ensuite chloré et aromatisé puis méthoxylé. Après seulement une seule purification (**40**) au cours de la synthèse, l'IBMP est obtenu avec un rendement global de 10% ce qui est comparable aux synthèses déjà décrites.<sup>121</sup>



a) 2-aminoéthanol, DCC, NHS,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ;

b) Eau de javel, TEMPO,  $\text{NaHCO}_3$ , cyclisation ;

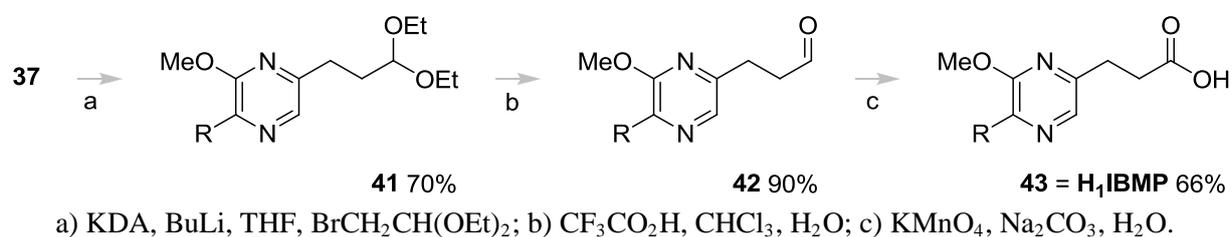
c)  $\text{POCl}_3$ ,  $\text{PCl}_5$  puis  $\text{NaOMe}$ ,  $\text{MeOH}$ .

**Figure 43.** Synthèse de l'IBMP.

## II – Synthèse des haptènes de MP

### II – 1 – Haptène de l'IBMP

L'ajout du bras espaceur en position 5- se réalise en trois étapes (Figure 44). Tout d'abord une super base (BuLi, KDA) est utilisée afin d'introduire sur le méthyle une chaîne carbonée portant une fonction aldéhyde protégée.<sup>131, 132</sup> La déprotection de la fonction aldéhyde et l'oxydation en acide de cette dernière constituent les deux dernières étapes et permettent d'introduire la fonction carboxylique nécessaire pour le couplage.<sup>133</sup> Le composé **43** est obtenu avec un rendement de 42% à partir du composé **37**.

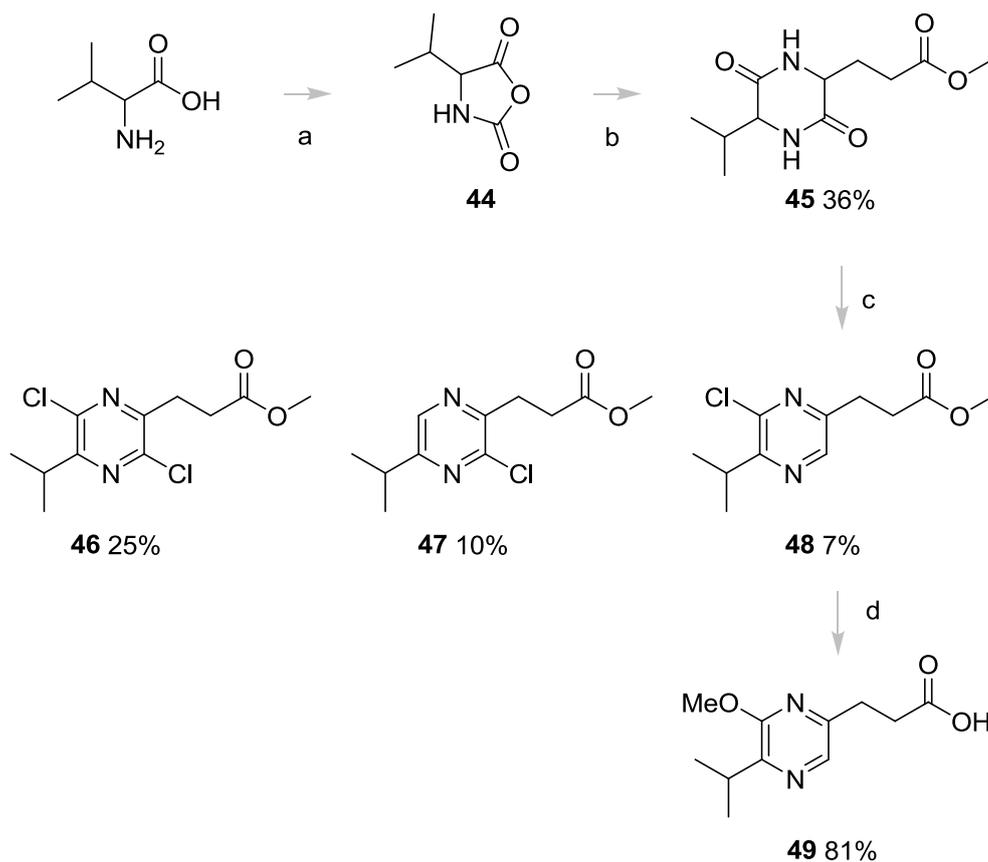


**Figure 44.** Synthèse de l'*H*<sub>1</sub>IBMP.

### II – 2 – Haptène de l'IPMP

La synthèse avec le composé **35** n'ayant pu aboutir. Il s'avère que l'intermédiaire clé est obtenu avec un rendement extrêmement faible du fait du remplacement de l'isobutyl par un isopropyl, probablement suite à une meilleure solubilité dans l'eau des produits intermédiaires ce qui complique l'isolation et la purification des produits. L'introduction directe d'un linker fonctionnalisé avec un groupe carboxylique a été envisagée pour obtenir l'haptène de l'IPMP.

Le composé **45** a été synthétisé suivant un mode opératoire déjà connu (Figure 45).<sup>134, 135</sup> La chloration de ce produit n'est pas régiosélective et conduit à un mélange de dichloropyrazine (**46**) et à deux monochloropyrazines (**47** et **48**). L'isolement de **48** a été réalisée par HPLC préparative avec un rendement de 7%. Enfin, le méthylation et la déprotection de la fonction carboxylique terminale ont été obtenus par un traitement avec du méthylate de sodium avec un rendement de 81%.

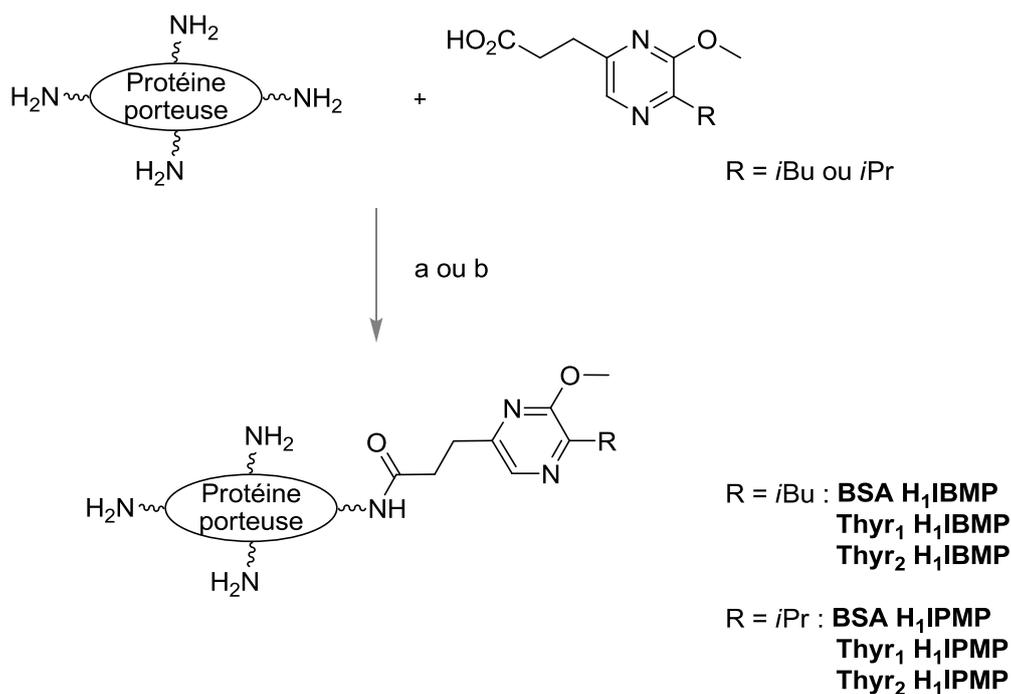


a)  $\text{ClCOOCCl}_3$ , THF ; b) diméthyl-2-aminopentanedioate,  $\text{Et}_3\text{N}$ , THF,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ; c)  $\text{POCl}_3$ ,  $\text{PCl}_5$ , séparation HPLC ; d)  $\text{NaOMe}$ ,  $\text{MeOH}$  puis  $\text{H}_2\text{O}$ .

**Figure 45.** Synthèse de l'HIIPMP.

### III – Couplage des haptènes des alkylméthoxypyrazines

Les haptènes ( $\text{H}_1\text{IBPMP}$  et  $\text{H}_1\text{IPMP}$ ) ont été couplés à la BSA ou la Thy, en utilisant la méthode chloroformiate d'isobutyle/tributylamine pour les conjugués haptène/BSA et haptène/Thy<sub>1</sub> ou la méthode NHS/DCC pour les conjugués haptène/Thy<sub>2</sub>, (Figure 46). Les deux couplages à la Thy ont été réalisés avec la même quantité d'haptènes avec un rapport de 1 : 20 et avec le rapport de 1:50 pour la BSA.



- a) Chloroformiate d'isobutyle, tributylamine, DMF, tampon borate/borique  
 b) NHS, EDAC, DMF, tampon borate/borique

**Figure 46.** *Couplages de l'H<sub>1</sub>IBMP et de l'H<sub>1</sub>IPMP aux protéines porteuses.*

Le taux de couplage pour la BSA a été déterminé en spectrométrie de masse MALDI en comparant le pic moléculaire de la protéine seule avec celui de la protéine conjuguée. Les taux de couplage sont estimés à 19 et 29 haptènes par molécule de BSA pour l'H<sub>1</sub>IBMP et l'H<sub>1</sub>IPMP respectivement (Tableau 21). Pour ce dernier couplage, il semblerait que toutes les fonctions amines des lysines de la périphérie de la BSA aient été substituées. Un fort taux de couplage conduit généralement à l'obtention rapide d'anticorps mais au détriment de leurs spécificités.<sup>90</sup>

Haptène	Protéine	Pic Moléculaire observé (Da)	$\Delta\text{MM}$ (Da) ( $\text{MM}_{\text{conjugué}} - \text{MM}_{\text{BSA}}$ )	Nombre Haptène par molécule de BSA
	BSA	66412		
<b>H<sub>1</sub>IBMP</b>	BSA H <sub>1</sub> IBMP	70672	4260	19,3
<b>H<sub>1</sub>IPMP</b>	BSA H <sub>1</sub> IPMP	72412	6000	28,9

**Tableau 21.** *Détermination par MALDI du nombre d'haptènes par molécule de BSA.*

*Rappel : le taux de greffage sur la Thyr ne peut pas être estimé par MALDI.*

Les conjugués ont été ensuite adressés à une entreprise extérieure (MILLEGEN, Rue Pierre et Marie Curie, BP 38183, 31681 LABEGE Cedex) pour la production des sérums. Le protocole expérimental d'immunisation est décrit dans la partie expérimentale.

#### IV – Mise au point des dosages immunologiques

Dans un premier temps, dans une plaque de microtitration, pour le dosage de l'IBMP, on fait varier la concentration des conjugués de 0,25 à 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  et la dilution des anticorps de 1/500 à 1/320000. Pour l'IPMP, la concentration des conjugués varie de 0,008 à 0,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  et la dilution des anticorps varie de 1/10000 à 1/9600000. Dans le Tableau 22, sont exprimés pour chacune des combinaisons concentration de coating/dilution d'anticorps primaire ayant permis une absorbance de 1. Dans tous le cas de coating à la BSA, les sérums qui ont été utilisés avec des coating à la BSA ont été préalablement épuisés.

Anticorps I aire		Coating					
		Thyr <sub>1</sub>		Thyr <sub>2</sub>		BSA	
Sérums		[C]	[Ac I]	[C]	[Ac I]	[C]	[Ac I]
		Ac H <sub>1</sub> IBMP	1	0,5	1/80000	2,5	1/1000
0,15	1/40000			1,25	1/500	0,18	1/340000
2	0,2		1/40000	1,5	1/1000	0,05	1/80000
	0,15		1/20000	0,5	1/80000	0,1	1/160000
Ac H <sub>1</sub> IPMP	1	0,062	1/160000	0,250	1/320000	0,150	1/400000
		0,080	1/160000	0,125	1/160000	0,037	1/100000
	2	0,125	1/160000	0,25	1/320000	0,037	1/800000
		0,062	1/80000	0,125	1/160000	0,018	1/800000

[C] : concentration de coating in  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; [Ac I] : dilution des Anticorps primaires.

**Tableau 22.** Combinaisons de concentrations/dilution pour une DO de 1.

Les 12 combinaisons pour chaque MP permettent d'obtenir au moins deux conditions (concentrations de coating et dilutions d'anticorps) pour les tests de gamme. Le Tableau 23 présente les IC<sub>50</sub>, les seuils de détection et les limites de la courbe d'étalonnage obtenus avec les différents coating (Thyr et BSA).

Anticorps I <sup>aire</sup>		Coating					
		Thyr <sub>1</sub>			Thyr <sub>2</sub>		
Sérums	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	Seuil de détection <sup>a</sup>	Limites de la courbe d'étalonnage <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	Seuil de détection <sup>a</sup>	Limites de la courbe d'étalonnage <sup>a</sup>	
Ac	1	1250	156	312 – 5000	800	120	200 – 3000
		1250	156	312 – 5000	1500	250	500 – 6000
H <sub>1</sub> IBMP	2	625	78	156 – 2500	1250	156	312 – 5000
		625	78	156 – 2500	2700	400	800 – 10000
Ac	1	312	39	78 – 1250	2000	300	800 – 10000
		312	39	78 - 1250	3000	450	800 - 10000
H <sub>1</sub> IPMP	2	625	78	156 – 2500	5000	600	800 – 10000
		625	78	156 – 2500	5000	600	800 - 10000

<sup>a</sup> : concentrations exprimées en ng.mL<sup>-1</sup>.

**Tableau 23.** Les différents paramètres obtenus pour le dosage immunologique de l'IBMP et de l'IPMP en tests de gamme.

La meilleure sensibilité est observée (valeurs en gras) pour le conjugué Thy<sub>r</sub>1-H<sub>1</sub>IBMP obtenu par la méthode de couplage utilisant le chloroformiate d'isobutyle. Cependant, cette valeur de 625 ng.mL<sup>-1</sup> ne permet pas de doser l'IBMP dans des extraits de moûts, pour lesquels la concentration de celle-ci est de l'ordre de la dizaine de pg.mL<sup>-1</sup> (valeurs trouvées par GC-MS)<sup>63, 66, 70</sup>

Afin d'améliorer la sensibilité de ce dosage, différents protocoles expérimentaux (agitation lors des incubations, préincubations de la gamme avec les anticorps soit à +4°C soit à +37°C) ont été appliqués mais aucune amélioration n'a été constatée.

Tout comme pour l'IBMP, la meilleure sensibilité des dosages immunologiques de l'IPMP est obtenue pour la combinaison utilisant la thyroglobuline couplée avec la méthode au chloroformiate d'isobutyle (Thyr1). Mais là non plus, cette valeur de 312 ng.mL<sup>-1</sup> ne permet pas de doser l'IBMP directement dans les échantillons dont la concentration est de l'ordre de la dizaine de pg.mL<sup>-1</sup> (valeurs trouvées par GC-MS).<sup>63</sup> Le changement de conditions d'incubation (agitation ou non), la préincubation des antigènes libres avec les anticorps primaire à différentes températures n'ont pas permis l'amélioration des sensibilités du dosage.

### III – Conclusions

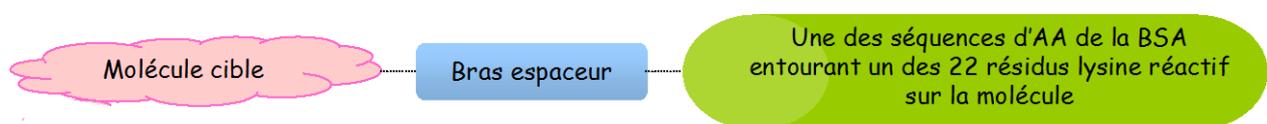
Pour chaque MP à doser (IBMP, IPMP), trois antigènes liés différents ont été préparés et utilisés. Dans tous les cas, c'est la Thy<sub>r</sub> couplée avec la première méthode qui donne les résultats les plus sensibles.

Les tests mis au point sont plus sensibles que pour les précurseurs d'arômes malgré le fait que les molécules soient de taille comparable. Cela peut s'expliquer par le fait que les MP ne sont pas constituées par des acides aminés mais possèdent un hétérocycle avec deux atomes azotes qui est beaucoup plus reconnaissable lors de l'immunisation. Cependant, les résultats obtenus ne permettent pas le dosage des échantillons car il y a un facteur 100 en trop. L'utilisation d'une méthode alternative de détection (fluorescence) faisant appel à l'ADHP (10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) permettrait peut-être d'augmenter la sensibilité du dosage.<sup>136, 137</sup>

Toutefois, comme pour les précurseurs d'arômes il est fort probable que le manque de sensibilité du dosage vienne d'une reconnaissance imparfaite de la molécule par les parties

variables des IgG. Là encore, la formation d'un polymère d'IBMP ou d'IPMP augmentant la taille du complexe à reconnaître et offrant des épitopes supplémentaires pourrait permettre d'améliorer la sensibilité.

Au cours de nos Travaux, nous avons choisi de travailler avec des anticorps polyclonaux plutôt qu'avec des anticorps monoclonaux. En effet, il avait été montré au Laboratoire que l'utilisation d'anticorps polyclonaux permettait d'obtenir de bonnes spécificités pour des molécules de faible poids moléculaire comme des polyphénols.<sup>138</sup> Cette grande spécificité s'explique par le fait que nous utilisons toujours un mélange d'IgG. Celles-ci ont été obtenues contre des édifices comportant une séquence variable d'acides aminés provenant de la BSA, le bras espaceur et le polyphénol d'intérêt fonctionnalisé. Les séquences variables d'acides aminés de la BSA correspondent à celles qui entourent les résidus lysine disponibles pour le couplage sur la molécule. Ils sont au nombre de 22 sur la BSA. Chacun des sites fournit donc un ou plusieurs motifs antigéniques (Figure 47) lors de l'opération d'apprêtement antigénique qui a lieu dans les cellules phagocytaires au tout début du processus de la réaction immunitaire.



**Figure 47.** Structure probable des motifs antigéniques générés lors de l'immunisation des lapins par l'injection de la BSA couplée aux haptènes des molécules à doser.

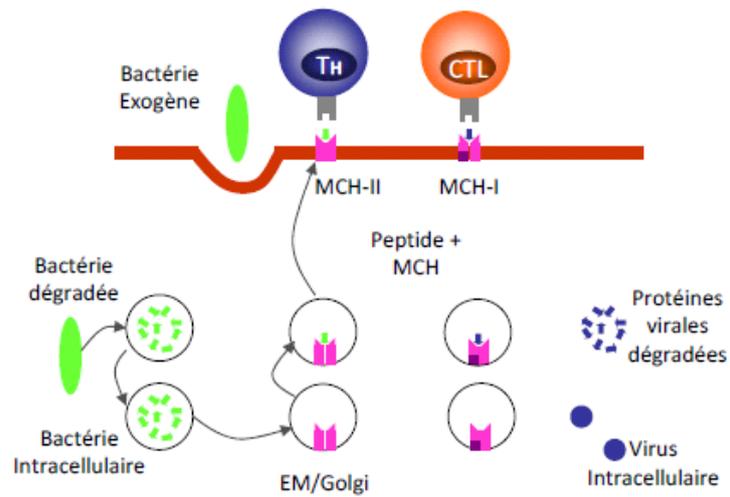
Plusieurs types d'IgG coexistent donc dans les sérums que nous utilisons. Leurs proportions sont variables suivant les lapins en fonction de la façon dont les clivages moléculaires sont intervenus lors de l'étape d'apprêtement antigénique. La proportion peut varier aussi en fonction de l'efficacité de reconnaissance des motifs antigéniques lors de l'étape de présentation des antigènes aux lymphocytes T. Un autre facteur jouant dans la variabilité des proportions d'IgG dans des sérums provenant de différents lapins tient aussi l'étape de multiplication des plasmocytes lors des procédures d'injections de rappel.

Lorsque nous mettons les antigènes de faible poids moléculaire comme les polyphénols en contact avec le sérum dans les conditions de compétition des puits des plaques de microtitration, l'ensemble des IgG est capable de reconnaître l'antigène libre mais pas forcément grâce aux mêmes épitopes. Lorsque nous mettons au point nos conditions de

dosage, nous cherchons en général à diluer le plus possible les sérums. A cette dilution le mélange reconnaît de façon optimale la molécule à doser. Si une molécule légèrement différente est présentée au mélange sérique, une partie des IgG ne la reconnaîtra pas car elles auront été générées contre un ou des épitope(s) qui n'existe(nt) pas dans la molécule parente. Ainsi, dans les conditions de dilution établies dans notre dosage, le sérum réagira moins avec la molécule présentée comme antigène libre qu'avec l'haptène coaté au fond de la plaque. Si on utilisait un anticorps monoclonal un seul épitope serait reconnu. Si ce dernier était présent sur une molécule proche, celle-ci pourrait être reconnue à tort. Ce simple rapport statistique d'occurrence de liaison est à l'origine, pour les petites molécules, de l'intérêt qu'il y a à mettre en œuvre des anticorps polyclonaux plutôt que monoclonaux. A l'évidence les anticorps polyclonaux ont tout de même leurs limites. Ils diffèrent dans leur réactivité d'un lapin à l'autre et doivent être testés à chaque lot. En revanche, dans la mesure où on les utilise fortement dilués les quantités de sérum recueillies sur un lapin permettent normalement, pour un laboratoire, de travailler pendant plusieurs centaines d'années.

En tout état de cause nous disposons donc toujours (quelque soit les haptènes que nous produisons) d'un cocktail d'IgG reconnaissant un édifice avec une partie constante (l'haptène et le bras espaceur) et une partie variable (une chaîne d'acides aminés provenant de la BSA). Dans le cas des polyphénols dont les masses molaires sont de l'ordre de 240 à 320 et la taille d'une extrémité à l'autre de l'ordre de 12 à 18 Å, nous obtenons des spécificités correctes et explicables par la position du bras espaceur sur l'haptène.<sup>88 87</sup> On aurait pu s'attendre pourtant avec les polyphénols à une absence de reconnaissance dans la mesure où il est dit dans la littérature que pour être antigénique un édifice moléculaire doit avoir une taille minimum de 100 Å.<sup>95</sup> C'est la taille minimum d'un décapeptide qui se glisse dans la gouttière des molécules de classe II du complexe histocompatibilité des cellules présentatrices d'antigènes.

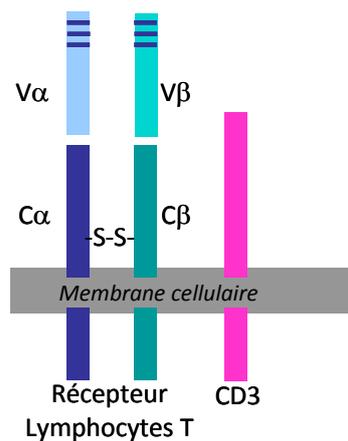
Rappelons ici qu'au cours du processus d'immunisation les macrophages interviennent en premier, clivent les objets antigéniques en petits éléments. Ces petits éléments génèrent ensuite la production d'un édifice complémentaire en forme de gouttière permettant la présentation de l'antigène à la surface du macrophage (Figure 48).



**Figure 48.** *Apprêtement des motifs antigéniques par la cellule phagocytaire et présentation et activation des lymphocytes TH.*<sup>95</sup>

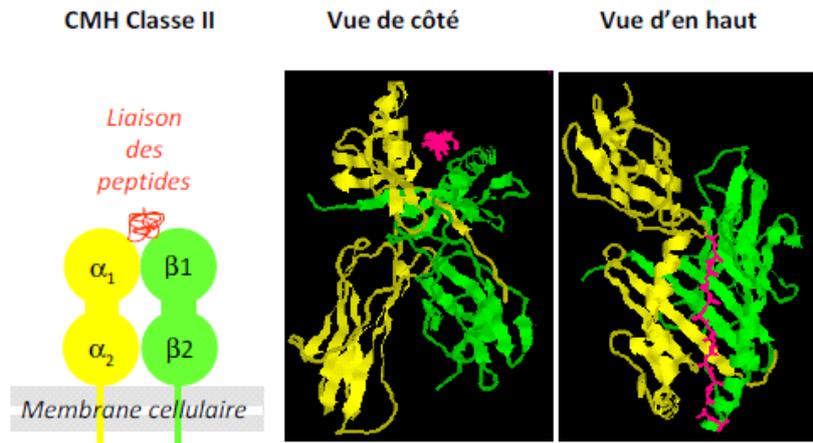
L'antigène apprêté sert ensuite à activer un lymphocyte TH (Lymphocyte T Helper) (Figure 48). Ce dernier, stimulé par le macrophage met en place des molécules transmembranaires de classe II du complexe d'histocompatibilité qui s'adaptent dans leur partie variable à la structure tridimensionnelle du fragment antigénique (Figure 49).

### Reconnaissance antigénique



**Figure 49.** Récepteur transmembranaire des lymphocytes TH avec leurs parties variables  $V\alpha$  et  $V\beta$  tridimensionnellement complémentaires de la structure de l'antigène.<sup>95</sup>

Les parties variables sont obtenues au cours d'un processus de type essais – erreur par la synthèse protéique à partir de zones particulières de l'ADN qui codent pour les molécules de classe II du complexe d'histocompatibilité. Cette zone comporte des ensembles nucléotidiques capables de se réarranger quasiment à l'infini jusqu'à générer des ARN messagers codant pour des protéines complémentaires des antigènes apprêtés. Lorsque les structures protéiques tridimensionnelles sont correctes, la transcription et la traduction sont fixées dans le lymphocyte T qui pourra donner ensuite des clones ne synthétisant que la région variable efficace pour la reconnaissance antigénique. La Figure 49 montre l'interaction du récepteur d'un lymphocyte T avec le motif antigénique.



**Figure 50.** Molécule de Classe II du Complexe Majeur Histocompatibilité (CMH-II) synthétisées par un lymphocyte T. Sur la molécule de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité, les polypeptides constituant sont en jaune et vert et le peptide antigénique est en rouge.<sup>95</sup>

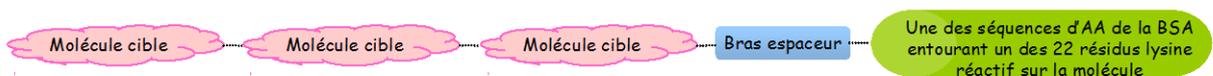
Les récepteurs des lymphocytes T Helper servent ensuite de matrice pour la fabrication des Immunoglobuline G par les lymphocytes B.

Compte tenu de nos premiers résultats sur les polyphénols, nous avons tenté d'obtenir des anticorps contre les arômes présentés ici et qui sont plus petits. On observe, si on analyse l'ensemble de ce travail, que la réaction immunitaire a bien eu lieu, conduisant à la production d'anticorps capables de reconnaître les haptènes synthétisés. Les résultats obtenus avec les tests croisés combinant les anticorps épuisés contre la BSA et le P-3SH-BSA en coating vont bien dans ce sens. Toutefois, dans tous les cas, nous n'avons pas obtenu les sensibilités que nous avons atteintes avec les polyphénols. Ceci peut s'expliquer par la nature des haptènes (taille mais aussi absence de fonction originale très immunogénique telle que fonction chlorée ou aromatique).

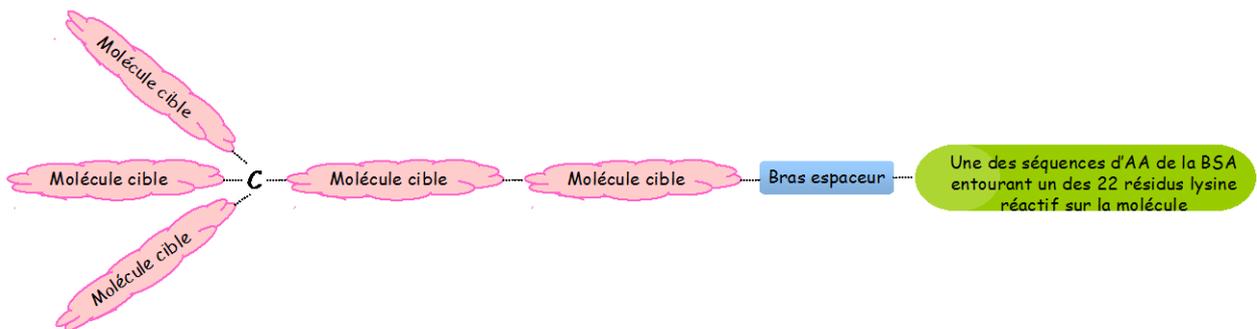
Ici encore, il est probable que les IgG contenues dans les sérums que nous avons obtenus présentent, au niveau de leurs régions variables des motifs reconnaissant l'haptène, le pont espaceur et une séquence variable d'acides aminés de la BSA. Toutefois, dans ce cas, la portion de la région variable de l'IgG reconnaissant l'haptène est sans doute trop limitée induisant une liaison à l'antigène insuffisamment stable. On peut aussi évoquer pour expliquer les défauts de sensibilité une meilleure affinité des IgG pour l'haptène (molécule cible + bras espaceur) que pour le précurseur d'arôme lui-même. Dès lors, deux stratégies peuvent être envisagées. Soit on cherche avec les mêmes anticorps à amplifier la réaction de révélation qui

matérialise la compétition entre antigène libre et antigène lié en passant en détection par fluorescence par exemple, soit on cherche à améliorer la reconnaissance antigénique. Pour ce faire, et tout en gardant la spécificité structurale de la région variable des IgG pour l'haptène, on pourrait envisager la synthèse de polymères en série et/ou en bouquet remplissant complètement la gouttière des complexes de classe II des molécules du système d'histocompatibilité (Figure 51).

### Solution 1



### Solution 2



**Figure 51.** Solution 1. Polymère en série de molécules cibles couplé aux résidus lysine de la BSA par un bras espaceur, Solution 2. Polymère en « bouquet » de molécules cibles couplé aux résidus lysine de la BSA par un espaceur.

La formation *en bouquet* pourrait de plus constituer un groupe d'atomes plus important en taille susceptible de présenter un effet antigénique supérieur. Par ailleurs, en *bouquet*, ce serait surtout les épitopes de la molécule plutôt que ceux du pont de liaison qui seraient mis en évidence. Présentant ainsi la molécule de manières différentes, ce type de structure pourrait générer de nombreux épitopes complémentaires susceptibles de donner au sérum une spécificité accrue. Il est possible que, dans ce cas, les IgG générées, mises en présence, dans un test hétérologue, avec les couplages de coating obtenus dans cette étude aient une meilleure affinité pour la molécule à doser que pour l'antigène lié au fond des puits. Ceci permettrait peut-être d'obtenir de meilleures sensibilités. Toutefois, l'antigène libre, très petit, ne pourrait toujours pas se lier de façon très stable à la région variable de l'IgG.

# Conclusion générale et perspectives

Au cours de nos travaux, de nombreux conjugués ont été synthétisés afin d'obtenir des anticorps spécifiques pour des petites molécules (P3SH, P4MSP, IBMP et IPMP).

La cible principale était le P3SH. Afin de pouvoir le doser, quatre conjugués ont été synthétisés et envoyés à la production d'anticorps. Ces derniers n'ont pas permis d'obtenir une sensibilité suffisante pour permettre de doser les échantillons. La nature de la molécule (petite taille et présence de la cystéine) inhibe toute reconnaissance spécifique lors de la production des anticorps. Pour remédier à ce problème, une synthèse d'un polymère d'haptène pourrait être envisagée. Elle permettrait de constituer un édifice moléculaire plus volumineux qui serait mieux reconnu par les régions variables des IgG. En présentant les haptènes en « bouquet » on peut aussi envisager une reconnaissance par différents épitopes. Ceci pourrait ensuite favoriser la spécificité des anticorps.

La deuxième cible étudiée est le P4MSP. Un seul conjugué a été synthétisé et envoyé à la production d'anticorps. La difficulté propre à cette molécule cible était son changement structural de conformation en fonction du pH. Il a donc fallu concevoir un haptène possédant les mêmes propriétés. Les résultats présentés sont réalisés avec les sérums intermédiaires (immunisation non complète). Les dosages immunologiques ne sont pas assez sensibles pour doser la molécule sur le terrain. Cependant, une amélioration est à espérer avec la fin de l'immunisation. La même stratégie mettant en œuvre des polymères pourrait être appliquée dans ce cas si la structure de la molécule peut-être préservée au cours de cette étape.

Nous nous sommes intéressés à deux méthoxypyrazines : l'IBMP et l'IPMP. Afin de pouvoir concevoir leurs haptènes, une nouvelle voie de synthèse a été mise au point. Cette dernière permet l'obtention d'alkylméthoxypyrazines dissymétriques. Les haptènes couplés à la protéine porteuse ont été envoyés à une société externe pour immunisation. Les résultats obtenus sont plus sensibles que dans le cas des précurseurs d'arômes ; ceci s'explique par la présence d'un cycle diazoté qui est beaucoup plus reconnaissable lors du processus d'immunisation. Cependant, la sensibilité n'est pas suffisante pour pouvoir appliquer ce dosage directement sur le terrain, un changement du mode de détection lors des tests ELISA permettrait peut-être d'y remédier. Dans la mesure où la sensibilité des dosages ne nous convenait pas, nous n'avons pas cherché à évaluer la spécificité des anticorps obtenus. Cependant s'il s'avère que l'utilisation d'haptènes polymérisés augmente la reconnaissance immunologique, ce pourrait être une piste à explorer pour ces deux molécules.

# Modes Opératoires

## **I - Techniques d'analyse**

### **I - 1 - Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)**

**RMN  $^1\text{H}$**  : Les spectres du proton ont été enregistrés sur des spectromètres BRUKER AC 300 (fréquence 300 MHz) et BRUKER AC 250 (fréquence 250 MHz).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  : Les spectres ont été enregistrés sur des spectromètres BRUKER AC 300 (fréquence 75,5 MHz) et BRUKER AC 250 (fréquence 62,5 MHz). L'expérience DEPT (Distorsion Enhanced by Polarization Transfer) a également été utilisée pour aider à l'attribution.

De plus des analyses 2D ont été utilisés (HMBC, HMQC, COSY).

Pour décrire les différents spectres, nous utiliserons les notations suivantes :  $\delta$ , déplacement chimique en ppm ; J, constante de couplage en Hz ; s, singulet ; d, doublet ; t, triplet ; q, quadruplet ; m, multiplet.

### **I - 2 – Chromatographie**

Chromatographie sur couche mince (CCM) : les chromatographies sur couche mince ont été réalisées sur des plaques MERCK de gel de silice (60 F 254, épaisseur : 0,25 mm).

### **I - 3 – Spectroscopie Infrarouge**

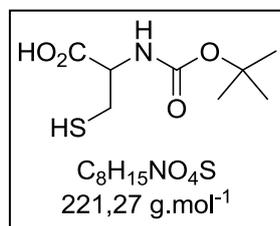
Les spectres ont été enregistrés avec un appareil Spectrum 100 PERKIN-ELMER, soit entre deux plaques de KBr, pour les liquides ou les huiles, soit par dispersion du solide à analyser dans une matrice de KBr.

### **I – 4 – Solvant et réactifs**

Les solvants utilisés ont été purifiés, si nécessaire, par distillation, selon des procédures connues. Les réactifs commerciaux ont été utilisés sans purification.

## II – Synthèse

### Synthèse de *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)cystéine **1**

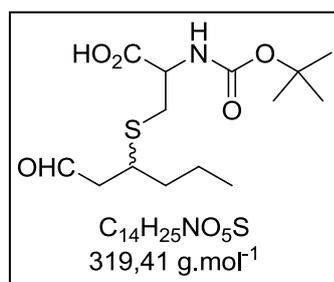


Une solution de di-*tert*-butyl dicarbonate (0,15 mol ; 32,7 g) dans du méthanol (30 mL) est ajoutée par un goutte à goutte à une solution de cystéine (0,1 mol ; 12,1 g), et d'hydroxyde de sodium (0,15 mol ; 6 g) dans de l'eau (60 mL) agités à 0°C. Après 12h d'agitation à température ambiante, le méthanol est éliminé par évaporation. La phase aqueuse est ensuite acidifiée à l'aide d'acide citrique en poudre jusqu'à pH 3-4. Le produit est extrait à l'aide d'acétate d'éthyle (3×50 mL). Les phases organiques réunies sont lavées avec de l'eau, et séchées sur MgSO<sub>4</sub> anhydre ; après évaporation du solvant une poudre blanche est obtenue (19,25 g ; 98%).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)) : 10,63 (s, 1H, CO<sub>2</sub>**H**); 6,74 (s, 1H, **NH**); 4,10 (m, 1H, **CH**CO<sub>2</sub>HNH); 2,95 (m, 2H, **CH**<sub>2</sub>-SH); 1,44 (s, 9H, **CC**<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)) : 178,8 (**C**); 160,6 (**C**); 79,5 (**C**); 62,7 (**CH**); 27,1 (**CH**<sub>3</sub>); 26,3 (**CH**<sub>2</sub>).

### Synthèse de *N*-[(*tert*-butoxycarbonyl)]-[1-(2-oxoethyl)butyl]cystéine **2**



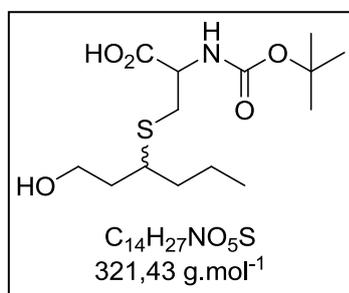
Le *trans*-2-hexenal (5 mmol ; 0,49 g) est ajouté par un goutte à goutte à une solution du composé **1** (4,5 mmol ; 0,99 g) et de carbonate de césium (2,5 mmol ; 0,81 g) dans de l'acétonitrile (20 mL). Après 12h d'agitation à température ambiante, le solvant est évaporé. Dissoudre le milieu réactionnel dans de l'eau (20 mL). L'excès de réactifs est éliminé à l'aide de diéthyle éther (20 mL).

La phase aqueuse est récupérée et acidifiée jusqu'à pH 3-4 à l'aide d'acide citrique en poudre. Le produit est extrait à l'aide de diéthyle éther (3×20 mL). Les phases organiques réunies sont lavées avec de l'eau et séchées avec MgSO<sub>4</sub> anhydre ; après évaporation du solvant une huile incolore est obtenue (0,93g ; 65%).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)) : 9,55 (s, 1H, **CHO**); 6,51 (s, 1H, **NH**); 5,50 (s, 1H, **COOH**); 4,28 (m, 1H, **CH**CO<sub>2</sub>HNH); 2,70 (m, 5H, **CH**<sub>2</sub>CHO, **CH**<sub>2</sub>S**CH**); 1,60 (m, 2H, **CH**<sub>2</sub>); 1,38 (s, 9H, **CH**<sub>3</sub>); 1,30 (m, 2H, **CH**<sub>2</sub>CHO); 0,81 (t, <sup>3</sup>J=7Hz, 3H, **CH**<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)) : 200,3 (C); 175,6 (CO<sub>2</sub>H); 160,9 (C); 79,6 (C); 58,6 (CH); 47,8 (CH<sub>2</sub>); 35,3 (CH<sub>2</sub>); 33,6 (CH); 31,3 (CH<sub>2</sub>); 30,6 (CH<sub>2</sub>); 28,7 (CH<sub>3</sub>); 15,6 (CH<sub>3</sub>).

### Synthèse du *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*S*-[1-(2-hydroxyethyl)butyl]cysteine 3



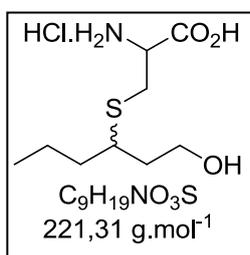
La réduction de la fonction aldéhyde est lancée sur le produit brut. NaBH<sub>4</sub> (276 mmol ; 10,5 g) est ajouté par petite fraction à une solution agitée à 0°C de produit 2 (42 mmol ; 13,54 g) dans de l'éthanol absolu (150 mL). Après 48h d'agitation à température ambiante, la réaction est stoppée avec de la glace. L'excès de réactifs est éliminé à l'aide de diéthyle éther (3 x 50 mL). La

phase aqueuse est récupérée et acidifiée jusqu'à pH 3-4 à l'aide d'une solution d'HCl à 10%. Le produit est extrait à l'aide de diéthyle éther (3x50 mL). Les phases organiques réunies sont lavées avec de l'eau et séchées avec MgSO<sub>4</sub> anhydre ; après évaporation du solvant une huile incolore est obtenue (12,94 g ; 95%).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)) : 6,51 (s, 1H, NH); 5,50 (s, 1H, COOH); 4,28 (m, 1H, CHCO<sub>2</sub>HNH); 3,60 (t, <sup>3</sup>J=6Hz, 2H, CH<sub>2</sub>OH); 2,70 (m, 3H, CH<sub>2</sub>SCH); 1,40 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,38 (s, 9H, CH<sub>3</sub>); 0,81 (t, <sup>3</sup>J=7Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)) : 176,6 (CO<sub>2</sub>H); 162,9 (C); 78,1 (C); 59,5 (CH<sub>2</sub>); 55,3 (CH); 39,9 (CH<sub>2</sub>); 37,4 (CH); 34,2 (CH<sub>2</sub>); 31,3 (CH<sub>2</sub>); 31,0 (CH<sub>2</sub>); 27,6 (CH<sub>3</sub>); 13,5 (CH<sub>3</sub>).

### Synthèse de *S*-[1-(2-hydroxyethyl)butyl]cystéine 4



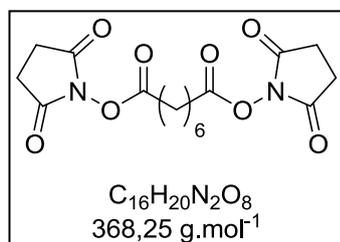
La déprotection de la fonction amine est lancée sur le produit brut. HCl gazeux barbotte dans une solution de produit 3 (6,2 mmol ; 2 g) dans du DCM (20 mL). Après une agitation de 2h à température ambiante, le solvant est évaporé jusqu'à obtenir une poudre blanche (1,33 g ; 95%).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)) : 4,32 (m, 1H, CHCO<sub>2</sub>HNH<sub>2</sub>); 3,65 (t, <sup>3</sup>J=6Hz, 2H, CH<sub>2</sub>OH); 3,10 (m, 2H, SCH<sub>2</sub>); 2,82 (m, 1H, SCH); 1,70 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH); 1,50 (m, 2H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 1,35 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 0,81 (t, <sup>3</sup>J=7Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)) : 175,6 (CO<sub>2</sub>H); 58,6 (CH<sub>2</sub>); 53,6 (CH); 40,0 (CH<sub>2</sub>); 36,9 (CH); 33,3 (CH<sub>2</sub>); 32,1 (CH<sub>2</sub>); 31,6 (CH<sub>2</sub>); 14,2 (CH<sub>3</sub>).

**SM-HR** (ESI+) m/z calculé 222,1158 pour C<sub>9</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>3</sub>S [M + H]<sup>+</sup>; trouvé 222,1168.

### Synthèse du bis(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl) octanedioate 5



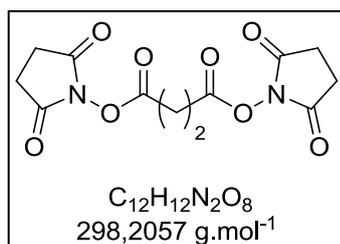
Une solution d'acide subérique (6,8 mmol ; 1,19 g), de N-hydroxysuccinimide (15 mmol ; 1,7 g), et de dicyclohexyl dicarbodiimide (15 mmol ; 3,10 g) dans du tétrahydrofuran (50 mL) est agitée 12h à température ambiante. Après avoir filtré le précipité formé, le filtrat est évaporé. La phase organique diluée dans du DCM (150 mL) est lavée avec une solution saturée en NaHCO<sub>3</sub> (2 x 50 mL), avec de l'eau (2 x 50 mL), séchées avec du MgSO<sub>4</sub> anhydre et évaporées. Le produit est obtenu en poudre blanche après une recristallisation à l'*iso*-propanol (375 mg ; 15%).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)) : 2,83 (s, 8H, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO); 2,61 (t, <sup>3</sup>J=7Hz, 4H, COCH<sub>2</sub>); 1,77 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 1,46 (m, 4H, CH<sub>2</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)) : 169,1 (C); 168,5 (C); 30,7 (CH<sub>2</sub>); 28,1 (CH<sub>2</sub>); 25,6 (CH<sub>2</sub>); 24,2 (CH<sub>2</sub>).

**SM-HR** (ESI+) m/z calculé 391,1111 pour C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na [M + Na]<sup>+</sup>; trouvé 391,1122.

### Synthèse du bis(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl) succinate) 6

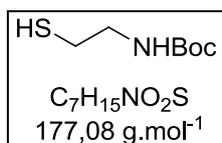


Une solution d'acide succinique (13,7 mmol ; 1,61 g), de N-hydroxysuccinimide (29,5 mmol ; 3,39 g), et de dicyclohexyl dicarbodiimide (29,5 mmol ; 6,08 g) dans du tétrahydrofuran (200 mL) est agitée une nuit à température ambiante. Après avoir filtré le précipité formé, le filtrat est évaporé. La phase organique diluée dans du DCM (50 mL) est lavée avec une solution saturée en NaHCO<sub>3</sub> (2 x 50 mL), avec de l'eau (2 x 50 mL), séchées avec du MgSO<sub>4</sub> anhydre et évaporées. Le produit est obtenu en poudre blanche après une recristallisation à l'*iso*-propanol (128 mg ; 3%).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)) : 3,06 (s, 4H, COCH<sub>2</sub>); 2,59 (s, 8H, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)) : 169,4 (C); 167,6(C); 27,1 (CH<sub>2</sub>); 26,6 (CH<sub>2</sub>).

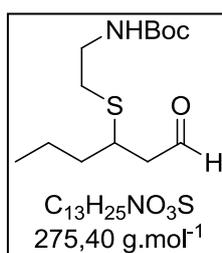
### Synthèse du *tert*-butyl (2-sulfanylethyl)carbamate **7**



Une solution de di-*tert*-butyl dicarbonate (0,15 mol ; 32,7 g) dans du méthanol (30 mL) est ajoutée par un goutte à goutte à une solution de 2-aminoethanethiol (0,1 mol ; 7,70 g), et d'hydroxyde de sodium (0,15 mol ; 6 g) dans de l'eau (60 mL) agités à 0°C. Après 12h d'agitation à température ambiante, le méthanol est éliminé par évaporation. La phase aqueuse est ensuite acidifiée à l'aide d'acide citrique en poudre jusqu'à pH 3-4. Le produit est extrait à l'aide d'acétate d'éthyle (3×50 mL). Les phases organiques réunies sont lavées avec de l'eau, et séchées sur MgSO<sub>4</sub> anhydre ; après évaporation du solvant une poudre blanche est obtenue (16,11 g ; 91%).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)) : 5,05 (s, 1H, **NH**); 3,41 (m, 2H, **CH**<sub>2</sub>); 2,87 (m, 2H, **CH**<sub>2</sub>); 1,43 (s, 9H, C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

### Synthèse du *tert*-butyl (2-[[1-(2-oxoethyl)butyl]sulfanyl]ethyl)carbamate **8**

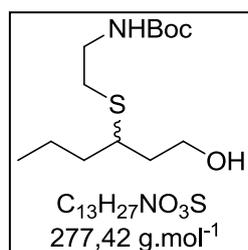


Le *trans*-2-hexenal (5 mmol ; 0,49 g) est ajouté par un goutte à goutte à une solution du composé **7** (4,5 mmol ; 0,99 g) et de carbonate de césium (2,5 mmol ; 0,81 g) dans de l'acétonitrile (30 mL). Après 12h d'agitation à température ambiante, le solvant est évaporé. Dissoudre le milieu réactionnel dans de l'eau (30 mL). L'excès de réactifs est éliminé à l'aide de diéthyle éther (30 mL). La phase aqueuse est récupérée et acidifiée jusqu'à pH 3-4 à l'aide d'acide citrique en poudre. Le produit est extrait à l'aide de diéthyle éther (3×30 mL). Les phases organiques réunies sont lavées avec de l'eau et séchées avec MgSO<sub>4</sub> anhydre ; après évaporation du solvant une huile incolore est obtenue (0,78 g ; 63%).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)) : 9,25 (s, 1H, **CHO**); 5,07 (m, 1H, **NH**); 3,25 (m, 2H, **NHCH**<sub>2</sub>); 2,67 (m, 5H, **CH**<sub>2</sub>CHO, **SCH**, **SCH**<sub>2</sub>); 1,55 (m, 4H, **CH**<sub>3**CH**<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, **CH**<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>**CH**<sub>2</sub>); 1,41 (s, 9H, C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 0,91 (t, <sup>3</sup>J = 7 Hz, 3H, **CH**<sub>3</sub>).</sub>

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)) : 200,3 (**C**); 156,6 (**C**); 78,3 (**C**); 47,8 (**CH**<sub>2</sub>); 40,9 (**CH**<sub>2</sub>); 35,3 (**CH**<sub>2</sub>); 33,8 (**CH**); 32,4 (**CH**<sub>2</sub>); 29,0 (**CH**<sub>2</sub>); 27,9 (**CH**<sub>3</sub>); 14,6 (**CH**<sub>3</sub>).

## Synthèse du tert-butyl (2-[[1-(2-hydroxyethyl)butyl]sulfanyl]ethyl)carbamate **9**

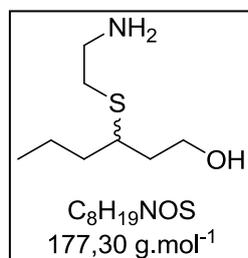


La réduction de la fonction aldéhyde est lancée sur le produit brut. NaBH<sub>4</sub> (100 mmol ; 3,80 g) est ajouté par petite fraction à une solution agitée à 0°C de produit **8** (40 mmol ; 11,10 g) dans de l'éthanol absolu (150 mL). Après 48h d'agitation à température ambiante, la réaction est arrêtée avec de la glace. L'excès de réactifs est éliminé à l'aide de diéyle éther (3 x 50 mL). La phase aqueuse est récupérée et acidifiée jusqu'à pH 3-4 à l'aide d'une solution d'HCl à 10%. Le produit est extrait à l'aide de diéyle éther (3x50 mL). Les phases organiques réunies sont lavées avec de l'eau et séchées avec MgSO<sub>4</sub> anhydre ; après évaporation du solvant une huile incolore est obtenue (10,5 g ; 95%).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)) : 4,45 (m, 1H, CHCO<sub>2</sub>HNH<sub>2</sub>); 3,75 (t, <sup>3</sup>J=6Hz, 2H, CH<sub>2</sub>OH); 3,20 (m, 2H, SCH<sub>2</sub>); 2,42 (m, 1H, SCH); 1,71 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH); 1,54 (m, 2H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 1,45 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1,30 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 0,81 (t, <sup>3</sup>J=7Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)) : 155,5 (C); 79,5 (C); 59,5 (CH<sub>2</sub>); 41,9 (CH<sub>2</sub>); 39,9 (CH<sub>2</sub>); 37,4 (CH); 35,8 (CH<sub>2</sub>); 31,4 (CH<sub>2</sub>); 29,7 (CH<sub>2</sub>); 27,3 (CH<sub>3</sub>); 13,0 (CH<sub>3</sub>).

## Synthèse du 3-[(2-aminoethyl)sulfanyl]hexan-1-ol **10**



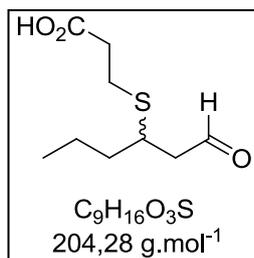
La déprotection de la fonction amine est lancée sur le produit brut. HCl gazeux barbotte dans une solution de produit **9** (7,2 mmol ; 2 g) dans du DCM (20 mL). Après une agitation de 2h à température ambiante, le solvant est évaporé jusqu'à obtenir une poudre blanche (1,18 g ; 93%).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)) : 3,65 (t, 3J=6Hz, 2H, CH<sub>2</sub>OH); 3,11 (m, 2H, SCH<sub>2</sub>); 3,02 (m, 2H, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 2,83 (m, 1H, SCH); 1,70 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH); 1,50 (m, 2H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 1,35 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 0,81 (t, 3J=7Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)) : 59,4 (CH<sub>2</sub>); 42,0 (CH); 39,2 (CH<sub>2</sub>); 36,5 (CH<sub>2</sub>); 36,3 (CH<sub>2</sub>); 26,9 (CH<sub>2</sub>); 19,3(CH<sub>2</sub>); 13,3 (CH<sub>3</sub>).

**SM-HR** (ESI+) m/z calculé 222,1158 pour C<sub>9</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>3</sub>S [M + H]<sup>+</sup> ; trouvé 222,1168.

## Synthèse de l'acide 3-[[1-(2-oxoethyl)butyl]sulfanyl]propanoïque **11**



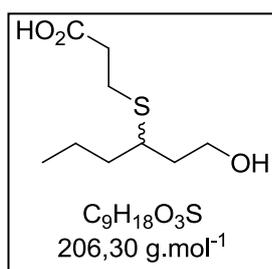
Le *trans*-2-hexenal (5 mmol ; 0,49 g) est ajouté par un goutte à goutte à une solution d'acide 3-sulfanyl propanoïque (4,5 mmol ; 0,47 g), et de carbonate de césium (2,5 mmol ; 0,81 g) dans de l'acétonitrile (20 mL). Après 12h d'agitation à température ambiante, le solvant est évaporé. Dissoudre le milieu réactionnel dans de l'eau (20 mL). L'excès de réactifs est éliminé à l'aide de diéthyle éther (20 mL). La phase aqueuse est récupérée et acidifiée jusqu'à pH 3-4 à l'aide d'acide citrique en poudre. Le produit est extrait à l'aide de diéthyle éther (3×30 mL). Les phases organiques réunies sont lavées avec de l'eau et séchées avec MgSO<sub>4</sub> anhydre ; après évaporation du solvant une huile incolore est obtenue (0,55 g ; 60%).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)) : 9,75 (s, 1H, CHO); 8,00 (s, 1H, CO<sub>2</sub>H); 3,14 (m, 1H, CHS); 2,78 (t, <sup>3</sup>J=7Hz, 2H, CH<sub>2</sub>S); 2,65 (t, <sup>3</sup>J=7Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H); 1,56 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CHS); 1,46 (m, 2H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>); 0,93 (t, <sup>3</sup>J=7Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)) : 201,1 (CHO); 177,6 (CO<sub>2</sub>H); 48,9 (CH<sub>2</sub>CHO); 39,7 (CHS); 37,5 (CH<sub>2</sub>CHS); 34,6 (CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H); 25,2 (CH<sub>2</sub>-S); 20,0 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>); 13,8 (CH<sub>3</sub>).

**SM-HR** (ESI+) m/z calculé 227,0717 pour C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>NaS [M + Na]<sup>+</sup> ; trouvé 227,0715.

## Synthèse de l'acide {1-(2-hydroxyethyl)butyl}sulfanyl}propanoïque **12**



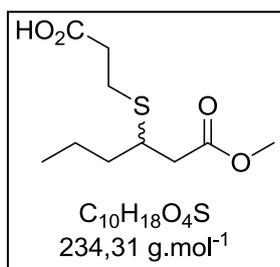
NaBH<sub>4</sub> (60 mmol ; 2,3 g) est ajouté par petites fractions à une solution de produit **11** (30 mmol ; 6,1 g) dans de l'éthanol absolu (30 mL) agité à 0°C. Après un 48h d'agitation à température ambiante, la réaction est arrêtée avec de la glace. L'excès de réactifs est éliminé à l'aide de diéthyle éther (3 x 50 mL). La phase aqueuse est récupérée et acidifiée jusqu'à pH 3-4 à l'aide d'une solution d'HCl à 10%. Le produit est extrait à l'aide de diéthyle éther (3×50 mL). Les phases organiques réunies sont lavées avec de l'eau et séchées avec MgSO<sub>4</sub> anhydre ; après évaporation du solvant une huile incolore est obtenue (3,89 g ; 63%).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)) : 9,0 (s, 2H, OH); 3,90 (m, 2H, CH<sub>2</sub>O); 3,03 (m, 1H, CHS); 2,72 (m, 4H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH); 1,70 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O); 1,50 (m, 4H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH); 0,87 (t, <sup>3</sup>J=7Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)) : 172,5 (CO<sub>2</sub>H); 59,5 (CH<sub>2</sub>); 39,9 (CH<sub>2</sub>); 37,4 (CH); 35,8 (CH<sub>2</sub>); 32,6 (CH<sub>2</sub>); 31,4 (CH<sub>2</sub>); 24,4 (CH<sub>2</sub>); 13,3 (CH<sub>3</sub>).

**SM-HR** (ESI+) m/z calculé pour C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>NaS, 229,0868 [M + Na]<sup>+</sup>; trouvé 229,0874.

### Synthèse de l'acide 3-[[1-(2-methoxy-2-oxoethyl)butyl]sulfanyl} propanoïc 13



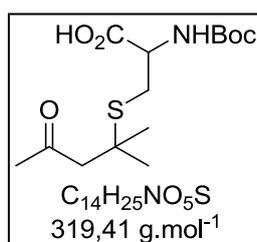
Le carbonate de césium (10 mmol ; 3,4 g) et de l'acide 3-sulfanyl propanoïc (20 mmol ; 2,1 g) sont additionnés à une solution de méthyle *trans*-2-hexenoate (31 mmol ; 4 g) dans de l'acétonitrile (20 mL). Après une nuit d'agitation à 40°C, la réaction est arrêtée avec de l'eau (50 mL). L'excès de réactifs est éliminé à l'aide de diéthyle éther (50 mL). La phase aqueuse est récupérée et acidifiée jusqu'à pH 3-4 à l'aide d'acide citrique en poudre. Le produit est extrait à l'aide de diéthyle éther (3×50 mL). Les phases organiques réunies sont lavées avec de l'eau et séchées avec MgSO<sub>4</sub> anhydre ; après évaporation du solvant une huile incolore est obtenue. Le produit est obtenu après une chromatographie sur colonne (éluant : Pentane/Acétate d'éthyle (50/50), révélateur : KMnO<sub>4</sub>), (2,57 g ; 55%).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)) : 10,14 (s, 1H, CO<sub>2</sub>H); 3,71 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,08 (m, 1H, CHS); 2,80 (t, <sup>3</sup>J=7Hz, 2H, CH<sub>2</sub>S); 2,67 (t, <sup>3</sup>J=7Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H); 2,59 (d, <sup>3</sup>J=7Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,56 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CHS); 1,46 (m, 2H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>); 0,93 (t, <sup>3</sup>J=7Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)) : 177,7 (CO<sub>2</sub>H); 172,2 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 51,8 (OCH<sub>3</sub>); 42,0 (CHS); 40,8 (CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 37,3 (CH<sub>2</sub>CHS); 34,7 (CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H); 25,3 (CH<sub>2</sub>S); 20,0 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>); 13,8 (CH<sub>3</sub>).

**SM-HR** (ESI+) m/z calculé 229,0818 pour C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>NaS [M + Na]<sup>+</sup>; trouvé 257,0818.

### Synthèse du *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*S*-(1,1-diméthyl-3-oxobutyl)cystéine 14



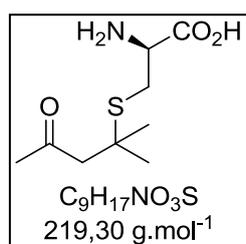
L'oxyde de mésityle (22 mmol ; 2,2 g) est ajouté à une solution de cystéine (20 mmol ; 2,4 g) et de carbonate de césium (10 mmol ; 3,2 g) dans de l'eau distillée (20 mL). Après 2h d'agitation à température ambiante, l'excès d'oxyde de mésityle est éliminé par une extraction à l'aide de diéthyle éther (2 x 30 mL). Une solution de di-*tert*-butyl dicarbonate (21 mmol ; 4,6 g) dans du THF (20 mL) est ajouté par un goutte à goutte à la phase aqueuse refroidie à 0°C. Après une nuit d'agitation à température ambiante, le THF est

éliminé par évaporation sous vide et la phase aqueuse est acidifiée à l'aide d'acide citrique en poudre jusqu'à un pH 2-3. Le produit est extrait à l'aide d'acétate d'éthyle (3×50 mL). Les phases organiques réunies sont lavées avec de l'eau et séchées avec MgSO<sub>4</sub> anhydre ; après évaporation du solvant une huile incolore est obtenue (4,35 g ; 68%).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)) : 10,75 (s, 1H, CO<sub>2</sub>**H**); 5,41 (d, 3H = 7,9 Hz, N**H**); 4,56 (m, 1H, CH<sub>2</sub>**CH**); 3,02 (m, 2H, S**CH**<sub>2</sub>CH); 2,68 (s, 2H, C**H**<sub>2</sub>CO); 2,16 (s, 3H, C**H**<sub>3</sub>CO); 1,42 (s, 9H, C(C**H**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1,39 (s, 6H, C(C**H**<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)) : 207,1 (C**O**); 174,4 (C**O**<sub>2</sub>H); 155,4 (C**O**, Boc); 80,4 (C(C**H**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 54,3 (C**H**<sub>2</sub>CO); 53,0 (CH<sub>2</sub>**CH**); 44,0 (C(C**H**<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 32,2 (C**H**<sub>3</sub>CO); 30,3 (C**H**<sub>2</sub>CH); 28,3 (C(C**H**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 28,2 (C(C**H**<sub>2</sub>)<sub>3</sub>).

### Synthèse du S-(1,1-diméthyl-3-oxobutyl)cystéine **15**



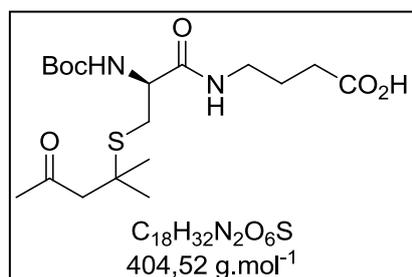
La déprotection de la fonction amine est lancée sur le produit brut. HCl gazeux barbote dans une solution du produit **14** (6,2 mmol ; 2 g) dans du DCM (20 mL). Après une agitation de 2h à température ambiante, le solvant est évaporé jusqu'à obtenir une poudre blanche (1,10 g ; 81%).

**RMN <sup>1</sup>H** (D<sub>2</sub>O, δ (ppm)) : 4,23 (dd, <sup>3</sup>J = 6,8 Hz et <sup>3</sup>J = 4,6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>**CH**); 3,16 (dd, <sup>2</sup>J = 14,0 Hz et <sup>3</sup>J = 4,6 Hz, 1H, S**CH**<sub>2</sub>CH); 3,05 (dd, <sup>2</sup>J = 14,0 Hz et <sup>3</sup>J = 6,8 Hz, 1H, S**CH**<sub>2</sub>CH); 2,80 (d, <sup>2</sup>J = 15,5 Hz, 1H, C**H**<sub>2</sub>CO); 2,74 (d, <sup>2</sup>J = 15,5 Hz, 1H, C**H**<sub>2</sub>CO); 2,09 (s, 3H, C**H**<sub>3</sub>CO); 1,26 (s, 6H, C(C**H**<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (D<sub>2</sub>O, δ (ppm)) : 213,3 (C**O**); 170,3 (C**O**<sub>2</sub>H); 53,5 (C**H**<sub>2</sub>CO); 52,8 (CH<sub>2</sub>**CH**); 44,5 (C(C**H**<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 31,8 (C**H**<sub>3</sub>CO); 28,1 (C(C**H**<sub>2</sub>)<sub>3</sub>); 27,7 (C**H**<sub>2</sub>CH).

**SM-HR** (ESI+) m/z calculé 242,2904 pour C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>O<sub>3</sub>NNaS [M + Na]<sup>+</sup> ; trouvé 242,2934.

### Synthèse du (S) – 4 - (2-(tert - butoxycarbonylamino) – 3 - (2 – méthyl – 4 – oxopentan – 2 - ylthio) propanamido) butanoic acid **16**



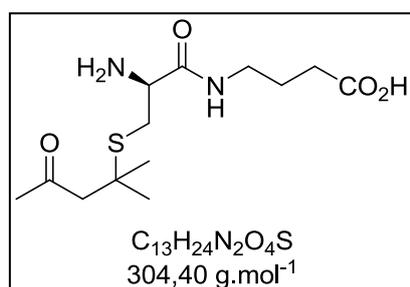
Le DCC (13 mmol ; 2,68 g) est ajouté à une solution du composé **15** (12,5 mmol ; 4 g) et de NHS (13 mmol ; 1,49 g) dans du DCM (90 mL). Après 4h d'agitation à température ambiante, le précipité formé est éliminé par filtration et le

filtrat est évaporé à sec et le précipité obtenu est repris dans du DMF (16 mL) pour être additionné rapidement à une solution d'acide 4-aminobutanoïque (13 mmol ; 1,34 g) et de soude (13 mmol ; 0,5 g) dans de l'eau (16 mL). Après une agitation de 48h à température ambiante après avoir ajusté le pH à 9 à l'aide d'Et<sub>3</sub>N, le solvant est évaporé. Le produit est extrait à l'aide d'acétate d'éthyle (3×50 mL). Les phases organiques réunies sont lavées avec de l'eau jusqu'à obtenir un pH des eaux de lavages de 7 et séchées avec MgSO<sub>4</sub> anhydre ; après évaporation du solvant une huile orangée est obtenue (2,22 g ; 44%).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)) : 4,66 (s, 1H, CHNHBoc); 3,39 (m, 2H, NHCHH<sub>2</sub>); 3,26 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 4Hz, SCHH<sub>2</sub>); 2,73 (s, 2H, COCHH<sub>2</sub>); 2,43 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CHH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H); 2,11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO); 1,92 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CHH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 1,47 (s, 15H, Boc + 2 CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (D<sub>2</sub>O (pH 2,3), δ (ppm)) : 206,3 (CO); 182,7 (CO<sub>2</sub>H); 171,7 (CO); 153,6 (CO); 79,6 (C); 58,4 (NHCHCO); 54,2 (COCHH<sub>2</sub>); 43,4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 35,3 (CH<sub>2</sub>); 31,5 (CH<sub>2</sub>); 28,4 (CH<sub>3</sub>); 27,8 (CH<sub>2</sub>); 26,8 (CH<sub>3</sub>); 25,6 (CH<sub>3</sub>); 23,9 (CH<sub>2</sub>).

#### Synthèse du 4-[[S-(1,1-diméthyl-3-oxobutyl)cysteinyl]amino]butanoic acid **17**



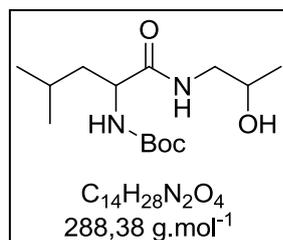
La déprotection de la fonction amine est lancée sur le produit brut. HCl gazeux barbotte dans une solution du produit **14** (4,9 mmol ; 2 g) dans du DCM (20 mL). Après une agitation de 2h00 à température ambiante, le solvant est évaporé jusqu'à obtenir une poudre blanche (1,2 g ; 80%).

**RMN <sup>1</sup>H** (D<sub>2</sub>O (pH 2,3), δ (ppm)) : 4,12 (m, 1H, NHCHCO); 3,30 (m, 2H, NHCHH<sub>2</sub>); 3,06 (d, <sup>3</sup>J = 6 Hz, 2H, CHCHH<sub>2</sub>); 2,81 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,42 (m, 2H, CHH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H); 2,19 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,82 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CHH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 1,36 (s, 6H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (D<sub>2</sub>O (pH 2,3), δ (ppm)) : 210,0 (CO); 177,7 (CO<sub>2</sub>H); 176,3 (CO); 53,4 (NHCHCO); 52,2 (COCHH<sub>2</sub>); 44,4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 38,6 (CH<sub>2</sub>); 31,5 (CH<sub>2</sub>); 27,8 (CH<sub>2</sub>); 27,1 (CH<sub>3</sub>); 25,4 (CH<sub>3</sub>); 23,6 (CH<sub>2</sub>).

**SM-HR** (ESI<sup>+</sup>) m/z calculé 327,3949 pour C<sub>13</sub>H<sub>24</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>NaS [M + Na]<sup>+</sup> ; trouvé 327,3965.

## N<sup>2</sup>-(*tert*-butoxycarbonyl)-N-(2-hydroxypropyl)leucinamide **20**



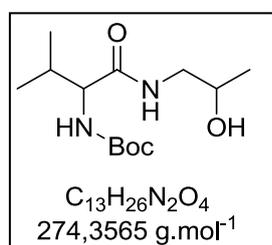
Une solution de DCC (2.88 g, 14 mmol) dans du dichlorométhane (50 mL) est ajoutée par un goutte à goutte à une solution plongée dans un bain de glace de *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)leucine (3 g, 13 mmol) et de *N*-hydroxysuccinimide (1.61 g, 14 mmol) dans du dichlorométhane (50 mL). Après retour à température ambiante, le mélange est agité pendant 4h, puis filtré. Une solution de 1-aminopropan-2-ol (2.9 g, 39 mmol) dans du dichlorométhane (10 mL) est additionné au filtrat. Après 12h d'agitation à température ambiante, laver avec de l'eau (100 mL). La phase aqueuse est extraite avec du dichlorométhane (2 x 50 mL). Les phases organiques réunies sont lavées avec de l'eau (50 mL) et du brine (50 mL), séchées avec du sulfate de magnésium anhydre, filtrées et évaporées sous vide pour obtenir une huile brune (3.37 g; 90%). La procédure décrite ci-dessus pour **20** a été utilisée pour la synthèse de **21**, **30**, **31**, et **38**.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 7,05 (s, 1H, **NH**); 5,25 (s, 1H, **NH**); 4,99 (s, 1H, **OH**); 4,10 (m, 1H, **NCHCO**); 3,90 (m, 1H, **CHOH**); 3,41 (m, 1H, **NHCH<sub>2</sub>**); 3,15 (m, 1H, **NHCH<sub>2</sub>**); 1,64 (m, 2H, **CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>**); 1,60 (m, 1H, **CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>**); 1,40 (s, 9H, **C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>**); 1,15 (d, 3J=7Hz, 3H, **CHOHCH<sub>3</sub>**); 0,92 (d, <sup>3</sup>J=7Hz, 3H, **CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>**); 0,90 (d, <sup>3</sup>J=7Hz, 3H, **CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>**).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 174,4 (**C**); 156,3 (**C**); 79,9 (**C**); 64,5 (**CH**); 52,6 (**CH**); 47,3 (**CH<sub>2</sub>**); 41,6 (**CH<sub>2</sub>**); 28,6 (**CH<sub>3</sub>**); 25,2 (**CH**); 22,2 (**CH<sub>3</sub>**); 21,1 (**CH<sub>3</sub>**); 20,8 (**CH<sub>3</sub>**).

**SM-HR** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* calculée pour C<sub>14</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Na, 311,1942 [M + Na]<sup>+</sup> ; trouvée 311,1948.

## N<sup>2</sup>-(*tert*-butoxycarbonyl)-N-(2-hydroxypropyl)valinamide **21**



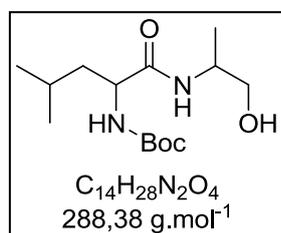
Huile marron, rendement 75%.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 6,66 (m, 2H, **NH**, **OH**); 5,16 (s, 1H, **NH**); 3,93-3,88 (m, 2H, **NHCHCO**, **CHOH**); 3,37 (m, 1H, **CH<sub>2</sub>**); 3,11 (m, 1H, **CH<sub>2</sub>**); 2,10 (m, 1H, **CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>**); 1,43 (s, 9H, **C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>**); 1,18 (d, 3J=7Hz, 3H, **CHOHCH<sub>3</sub>**); 0,93 (d, 3J=7Hz, 3H, **CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>**); 0,90 (d, 3J=7Hz, 3H, **CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>**).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 173,2 (**C**); 156,6 (**C**); 80,6 (**C**); 67,3 (**CH**); 60,8 (**CH**); 47,4 (**CH<sub>2</sub>**); 31,1 (**CH**); 28,7 (**CH<sub>3</sub>**); 21,0 (**CH<sub>3</sub>**); 19,7 (**CH<sub>3</sub>**); 18,3 (**CH<sub>3</sub>**).

**SM-HR** (ESI+)  $m/z$  calculée pour  $C_{13}H_{26}N_2O_4Na$ , 297,1784  $[M + Na]^+$ ; trouvée 297,1791.

### Synthèse du $N^2$ -(*tert*-butoxycarbonyl)- $N$ -(2-hydroxy-1-méthylethyl)leucinamide 30



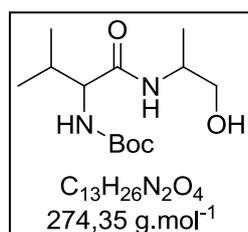
Huile marron, rendement 82%.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 6,80 (s, 1H, NH); 5,35 (s, 1H, NH); 4,00 (m, 2H, OH, COCHNH); 3,58 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OHCH, CH<sub>2</sub>OH), 3,40 (m, 1H, CH<sub>2</sub>OH); 1,65 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH, CH<sub>2</sub>CH); 1,40 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1,18 (d, <sup>3</sup>J=7Hz, 3H, CHCH<sub>3</sub>); 0,89 (d, <sup>3</sup>J=7Hz, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 0,87 (d, <sup>3</sup>J=7Hz, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 173,0 (C); 156,2 (C); 80,0 (C); 66,9 (CH<sub>2</sub>); 53,6 (CH); 47,5 (CH); 41,5 (CH<sub>2</sub>); 28,8 (CH<sub>3</sub>); 25,0 (C); 23,5 (CH<sub>3</sub>); 22,2 (CH<sub>3</sub>); 16,8 (CH<sub>3</sub>).

**SM-HR** (ESI+)  $m/z$  calculée pour  $C_{14}H_{28}N_2O_4Na$ , 311,1941  $[M + Na]^+$ ; trouvée 311,1947.

### Synthèse du $N^2$ -(*tert*-butoxycarbonyl)- $N$ -(2-hydroxy-1-méthylethyl)valinamide 31



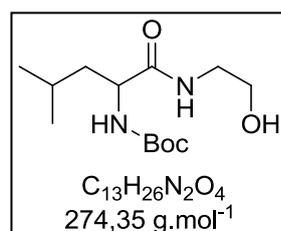
Huile marron, rendement 86%.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 6,50 (s, 1H, OH); 5,30 (s, 2H, NH); 4,10 (m, 1H, CH); 3,85 (m, 1H, CH); 3,50 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OH); 2,10 (m, 1H, CH); 1,43 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1,16 (d, <sup>3</sup>J=7Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 0,94 (d, <sup>3</sup>J=7Hz, CHCH<sub>3</sub>); 0,90 (d, <sup>3</sup>J=7Hz, 2H, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 172,1 (C); 156,1 (C); 80,1 (C); 66,7 (CH<sub>2</sub>); 66,3 (CH); 47,8 (CH); 33,7 (CH); 28,3 (CH<sub>3</sub>); 17,4 (CH<sub>3</sub>); 16,8 (CH<sub>3</sub>); 14,2 (CH<sub>3</sub>).

**SM-HR** (ESI+)  $m/z$  calculée pour  $C_{14}H_{28}N_2O_4Na$ , 275,1965  $[M + H]^+$ ; trouvée 275,1978.

### Synthèse du $N^2$ -(*tert*-butoxycarbonyl)- $N$ -(2-hydroxyethyl)leucinamide 38



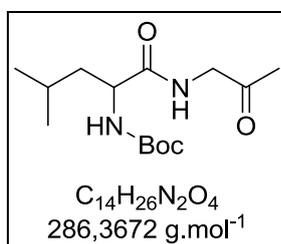
Huile marron, rendement 81%.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 7,26 (m, 1H, NH); 5,45 (s, 1H, NH); 4,73 (s, 1H, OH); 4,10 (m, 1H, CH); 3,64 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 3,40 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OH); 1,50 (m, 3H, CHCH<sub>2</sub>); 1,37 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 0,89 (d, <sup>3</sup>J=7Hz, CHCH<sub>3</sub>); 0,86 (d, <sup>3</sup>J=7Hz, 2H, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 174,4 (C); 156,4 (C); 80,4 (C); 61,9 (CH<sub>2</sub>); 53,7 (CH); 42,7

(CH<sub>2</sub>); 41,9 (CH<sub>2</sub>); 28,7 (CH<sub>3</sub>); 25,1 (CH); 23,3 (CH<sub>3</sub>); 22,3 (CH<sub>3</sub>).

### Synthèse du *N*<sup>2</sup>-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*-(2-oxopropyl)leucinamide **22**



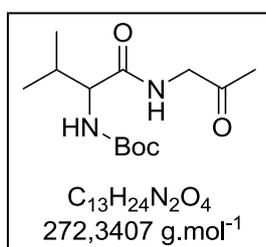
NaHCO<sub>3</sub> (6 g, 71 mmol) et TEMPO (2,2,6,6-tetraméthyl-1-piperidinyloxy; 0,2 g; 1,3 mmol) sont ajoutés à une solution de *N*<sup>2</sup>-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*-(2-hydroxypropyl)leucinamide (7,6 g, 26 mmol) dans du dichlorométhane (100 mL) plongée dans un bain de glace. L'eau de javel (4.8% NaOCl, 100 mL) est additionnée par un goutte à goutte. Le mélange est agité toute une nuit à température ambiante. Le produit est extrait avec du dichlorométhane (3x100 mL). Les phases organiques réunies sont lavées avec de l'eau (3 x 50 ml) et du brine (50 ml), séchées avec du sulfate de magnésium anhydre, filtrées et évaporées sous vide pour obtenir une huile (7 g, 90%). Le produit est utilisé pour la suite sans purification. La procédure décrite ci-dessus pour **22** a été utilisé pour la synthèse de **23**. Les aldéhydes oxydés (seulement en réaction avec l'eau de javel pendant 45 min) cyclisent spontanément pour donner **32**, **33**, et **39**.

**RMN<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 7,18 (s, 1H, NH); 5,27 (s, 1H, NH); 4,18 (m, 1H, NHCHCO); 4,08 (d, <sup>3</sup>J=5Hz, 2H, COCH<sub>2</sub>); 2,14 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>); 1,58-1,40 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1,38 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 0,93 (2d, <sup>3</sup>J=7Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**RMN<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 203,2 (C); 173,2 (C); 155,7 (C); 79,8 (C); 52,9 (CH); 49,7 (CH<sub>2</sub>); 41,4 (CH<sub>2</sub>); 28,2 (CH<sub>3</sub>); 27,1 (CH<sub>3</sub>); 24,6 (CH); 22,9 (CH<sub>3</sub>); 21,8 (CH<sub>3</sub>).

**SM-HR** (ESI+) m/z calculée pour C<sub>14</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Na, 309,1790 [M + Na]<sup>+</sup>; trouvée 309,1783.

### Synthèse du *N*<sup>2</sup>-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*-(2-oxopropyl)valinamide **23**

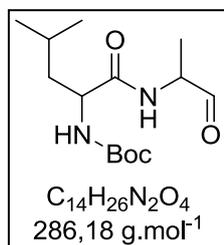


Huile incolore, rendement 80%.

**RMN<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 6,87 (s, 1H, NH); 5,19 (s, 1H, NH); 4,13 (d, <sup>3</sup>J=5Hz, 2H, COCH<sub>2</sub>); 4,01 (m, 1H, COCHNH); 2,17 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO); 2,11 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1,41 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 0,93 (d, <sup>3</sup>J = 7 Hz, 3H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 0,87 (d, <sup>3</sup>J = 7 Hz, 3H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**RMN<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 202,8 (C); 171,9 (C); 155,8 (C); 79,9 (C); 59,7 (CH); 49,6 (CH<sub>2</sub>); 30,9 (CH<sub>2</sub>); 28,3 (CH<sub>3</sub>); 27,3 (CH<sub>3</sub>); 19,2 (CH<sub>3</sub>); 17,6 (CH<sub>3</sub>).

**SM-HR** (ESI+) m/z calculée pour C<sub>13</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Na, 295,1628 [M + Na]<sup>+</sup>; trouvée 295,1637.

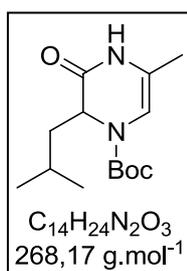


Synthèse du *N*<sup>2</sup>-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*-(1-méthyl-2-oxoéthyl)leucinamide **32**

Huile marron, rendement 77%.

**RMN<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 9,50 (s, 1H, CHO); 7,00 (m, 1H, NH); 5,11 (m, 1H, NH); 4,42 (m, 1H, NHC); 4,17 (m, 1H, NHC); 1,60 (m, 3H, CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH); 1,45 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1,35 (d, <sup>3</sup>J = 7 Hz, 3H, CHCH<sub>3</sub>); 0,90 (d, <sup>3</sup>J = 7 Hz, 3H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 0,89 (d, <sup>3</sup>J = 7 Hz, 3H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

Synthèse du *tert*-Butyl 2-isobutyl-5-méthyl-3-oxo-3,4-dihydropyrazine-1(2*H*)-carboxylate **34**

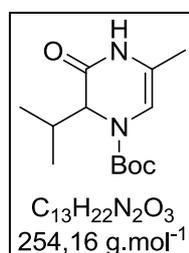


Huile marron, rendement 99%.

**RMN<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 8,10 (s, 1H, NH); 6,00 (s, 1H, C=CH); 4,80-4,58 (m, 1H, CHN); 1,85 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,48 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1,35 (m, 3H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>); 0,95 (t, <sup>3</sup>J = 7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**RMN<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 168,8 (C); 152,3 (C); 118,5 (CH); 103,7 (C); 80,9 (C); 54,9 (CH); 41,1 (CH<sub>2</sub>); 28,1 (CH<sub>3</sub>); 22,0 (CH); 21,0 (CH<sub>3</sub>); 17,0 (CH<sub>3</sub>).

Synthèse du *tert*-Butyl 2-isopropyl-5-méthyl-3-oxo-3,4-dihydropyrazine-1(2*H*)-carboxylate **35**

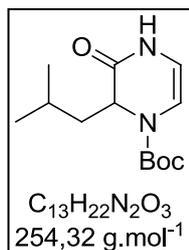


Huile marron, rendement 43%.

**RMN<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 8,55 (s, 1H, NH); 6,00 (s, 1H, C=CH); 4,36-4,20 (m, 1H, CHN); 1,76 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,47 (m, 1H, CH); 1,42 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 0,92 (d, <sup>3</sup>J = 7 Hz, 3H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 0,85 (d, <sup>3</sup>J = 7 Hz, 3H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**RMN<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 168,9 (C); 153,3 (C); 118,9 (CH); 102,7 (C); 79,9 (C); 55,6 (CH); 32,6 (CH); 28,3 (CH<sub>3</sub>); 21,7 (CH<sub>3</sub>); 19,3 (CH<sub>3</sub>).

### Synthèse du *tert*-Butyl 2-isobutyl-3-oxo-3,4-dihydropyrazine-1(2*H*)-carboxylate **39**

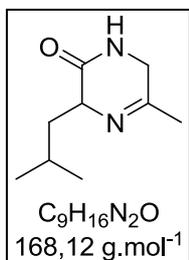


Huile marron, rendement 43%.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 8,03 (s, 1H, NH); 6,14 (d, <sup>3</sup>J = 5Hz, 1H, C=CH); 5,70 (d, <sup>3</sup>J = 5Hz, 1H, C=CH); 4,66 (t, 3J = 7Hz, 1H, CH); 1,66 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH); 1,42 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1,01 (d, <sup>3</sup>J = 7 Hz, 3H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 0,98 (d, <sup>3</sup>J = 7 Hz, 3H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 168,2 (C); 152,3 (C); 108,6 (CH); 108,2 (CH); 80,2 (C); 55,7 (CH); 38,7 (CH<sub>2</sub>); 28,2 (CH<sub>3</sub>); 24,4 (CH); 22,6 (CH<sub>3</sub>); 22,5 (CH<sub>3</sub>).

### Synthèse du 3-isobutyl-5-méthyl-3,6-dihydropyrazin-2(1*H*)-one **24**

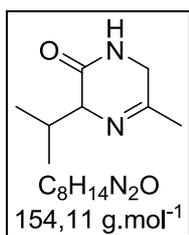


Diluer **22** (2 g; 6,9 mmol) dans du DCM (20 mL) et faire barboter du HCl<sub>g</sub> pendant 4h00 à température ambiante. Le solvant est éliminé sous pression réduite afin d'obtenir un résidu blanc placé immédiatement sous atmosphère inerte. Ajouter de l'éther diéthylique (30 mL), de l'Et<sub>3</sub>N fraîchement distillée (1,4g; 14 mmol) et du tamis moléculaire 4Å (1g). Agiter une nuit à température ambiante. Après filtration, le solvant est éliminé sous pression réduite afin d'obtenir une huile marron (1,15 g; 88%), de pureté suffisante pour être utilisé lors de la réaction.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 8,11 (br s, 1H, NH); 4,06 (m, 1H, CHCO); 3,95 (s, 2H, NHCH<sub>2</sub>); 2,08 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,91 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1,68 (m, 1H, CHCH<sub>2</sub>CH); 1,45 (m, 1H, CHCH<sub>2</sub>CH); 0,91 (2d, <sup>3</sup>J = 7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 171,6 (C), 161,4 (C); 59,1 (CH); 45,6 (CH<sub>2</sub>); 42,7 (CH<sub>2</sub>); 24,6 (CH<sub>3</sub>); 23,9 (CH); 23,1 (CH<sub>3</sub>); 22,0 (CH<sub>3</sub>).

### Synthèse du 3-isopropyl-5-méthyl-3,6-dihydropyrazin-2(1*H*)-one **25**

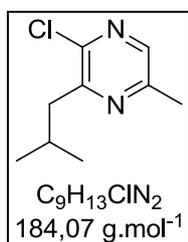


Huile marron, rendement 77%.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 7,53 (s, 1H, NH); 4,02 (s, 1H, COCHNH); 3,95 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,40 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 2,05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 0,81 (d, <sup>3</sup>J = 7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>),.

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 170,5 (C); 161,8 (C); 65,5 (CH); 46,9 (CH<sub>2</sub>); 32,6 (CH); 23,8 (CH<sub>3</sub>); 19,3 (CH<sub>3</sub>).

### Synthèse du 2-chloro-3-isobutyl-5-methyl-pyrazine 26

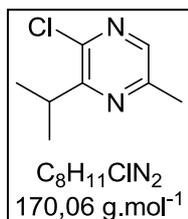


Une solution de **26** (3.78 g, 22.5 mmol), POCl<sub>3</sub> (6.7 g, 43.7 mmol), et PCl<sub>5</sub> (5 g, 24 mmol) sont agités à 100°C pendant 4h. L'excès de POCl<sub>3</sub> est éliminé par distillation sous pression réduite. Une solution saturée de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> est ajoutée au résidu jusqu'à un pH de 8-9. Le produit est extrait de la phase aqueuse avec du DCM (3x30 mL). Les phases organiques réunies sont lavées avec du brine (50 ml), séchées avec du MgSO<sub>4</sub> anhydre, filtrées, et évaporées sous pression réduite afin d'obtenir une huile marron (1.82 g; 44%), de pureté suffisante pour la suite des réactions. La même procédure que **26** est réalisée pour obtenir **27** et **35**.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 8,00 (s, 1H, CH); 2,74 (d, <sup>3</sup>J = 7 Hz, 2H, CCH<sub>2</sub>); 2,47 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2,26 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 0,92 (d, <sup>3</sup>J = 6 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 154,4 (C); 151,2 (C); 146,3 (C); 140,9 (CH); 43,3 (CH<sub>2</sub>); 28,2 (CH); 22,2 (CH<sub>3</sub>); 19,9 (CH<sub>3</sub>).

### Synthèse du 2-chloro-3-isopropyl-5-methylpyrazine 27

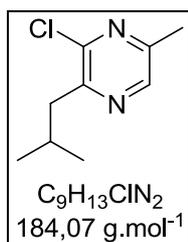


Huile marron, rendement 20%.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 8,02 (s, 1H, CH); 3,55-3,40 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 2,51 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,27 (d, <sup>3</sup>J = 6 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 158,8 (C); 151,5 (C); 145,0 (C); 140,4 (CH); 31,6 (CH); 20,8 (CH<sub>3</sub>); 20,7 (CH<sub>3</sub>).

### Synthèse du 3-chloro-2-isobutyl-5-methylpyrazine 35

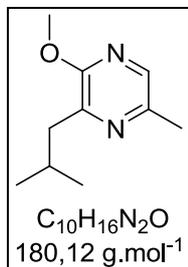


Huile marron, rendement 23%.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 8,29 (s, 1H, CH); 2,80 (d, <sup>3</sup>J = 6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,51 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2,18 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 0,95 (d, <sup>3</sup>J = 6 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 152,3 (C); 151,0 (C); 147,0 (C); 141,6 (CH); 43,1 (CH<sub>2</sub>); 28,0 (CH); 22,4 (CH<sub>3</sub>); 20,6 (CH<sub>3</sub>).

### Synthèse du 3-isobutyl-2-methoxy-6-methylpyrazine 28



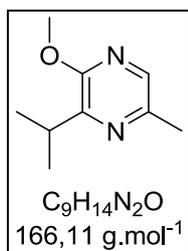
Une solution de **26** (1,35 g, 7,3 mmol) dans du méthanol anhydre (5 mL) est ajouté à une solution de sodium methoxide (fraîchement préparée par addition de sodium (0,84 g, 36,5 mmol) à du méthanol anhydre (10 mL)). Le mélange est agité 5h à reflux. Après élimination du méthanol par distillation, le produit brut est trituré avec de l'Et<sub>2</sub>O et filtré. Le filtrat est évaporé afin d'obtenir le produit sous forme d'huile marron (1,13 g, 87%).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 7,74 (s, 1H, CH); 3,90 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 2,63 (d, <sup>3</sup>J = 7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,41 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2,24 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 0,91 (d, <sup>3</sup>J = 6 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 157,0 (C); 146,1 (C); 143,6 (C); 136,4 (CH); 53,1 (CH<sub>3</sub>); 41,1 (CH<sub>2</sub>); 27,6 (CH); 22,2 (CH<sub>3</sub>); 20,1 (CH<sub>3</sub>).

**SM-HR** (ESI+) *m/z* calculée pour C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O, 181,1335 [M + H]<sup>+</sup>; trouvée, 181,1337.

### Synthèse du 3-isopropyl-2-methoxy-6-methylpyrazine 29

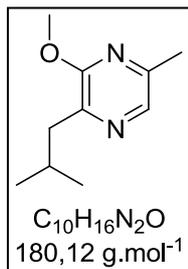


Huile marron, rendement 78%.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 7,70 (s, 1H, CH); 3,90 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,47 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 2,30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,20 (d, <sup>3</sup>J = 6 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 159,2 (C); 151,9 (C); 144,1 (C); 136,6 (CH); 53,7 (CH<sub>3</sub>); 32,0 (CH); 20,8 (CH<sub>3</sub>); 20,7 (CH<sub>3</sub>).

### Synthèse du 2-isobutyl-3-methoxy-5-methylpyrazine 36



Huile marron, rendement 80%.

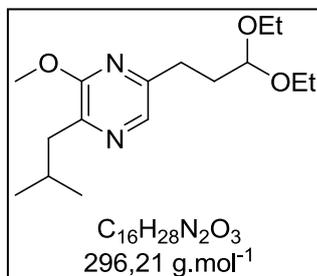
**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 7,90 (s, 1H, CH); 3,90 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 2,65 (d, <sup>3</sup>J = 6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2,18 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 0,95 (d, <sup>3</sup>J = 6 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 157,9 (C); 147,4 (C); 143,8 (C); 134,3 (CH); 53,2 (CH<sub>3</sub>); 40,8

(CH<sub>2</sub>); 27,5 (CH); 22,4 (CH<sub>3</sub>); 20,6 (CH<sub>3</sub>).

**SM-HR** (ESI+) *m/z* calculée pour C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O, 181,1335 [M + H]<sup>+</sup>; trouvée, 181,1337.

### Synthèse du 5-(3,3-diethoxy-propyl)-2-isobutyl-3-methoxy-pyrazine 41



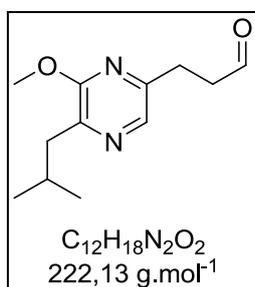
Dans une solution de *t*-BuOK (1,12 g, 10 mmol) dissout dans du THF anhydre (40 mL), l'*i*-Pr<sub>2</sub>NH (1,01 g, 10 mmol) est ajouté à l'aide d'une seringue pendant 15 minutes à température ambiante. *n*-butyllithium (2M/Hexane, 10 mmol, 5 mL) est ajouté à -50°C puis agité à -30°C pendant 30 min. Une solution de 2-isobutyl-3-methoxy-5-methylpyrazine (1,6 g, 8,9 mmol) dilué dans du THF (13 mL) est ajouté à -50 °C. Le mélange est agité à -30°C pendant 2h00, et le bromoacetaldehyde diethylacetal (2 g, 10 mmol) est ajouté. Le mélange est agité pendant 3h00 à -30°C et pendant une nuit à température ambiante ; puis, concentré sous pression réduite. Le résidu est hydrolysé avec une solution saturée en NH<sub>4</sub>Cl (30 mL) et extrait avec de l'Et<sub>2</sub>O (3 x 20 mL). Les phases organiques réunies sont lavées avec de l'eau distillée (2 x 10 mL), séchées avec du MgSO<sub>4</sub> anhydre et concentrées sous pression réduite afin d'obtenir le produit sous forme d'huile (1,7 g, 70%)

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 7,88 (s, 1H, C=CH); 4,54 (t, <sup>3</sup>J = 6 Hz, 1H, CH(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 3,91 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,67-3,64 (q, <sup>3</sup>J = 6 Hz, 4H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 3,51-3,48 (q, <sup>3</sup>J = 6 Hz, 4H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 2,72 (t, <sup>3</sup>J = 6 Hz, 2H, NCCCH<sub>2</sub>); 2,62 (s, 2H, NCCCH<sub>2</sub>); 2,18-1,98 (m 3H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1,18 (t, <sup>3</sup>J = 6 Hz, 6H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 0,89 (d, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 158,1 (C); 150,4 (C); 144,2 (C); 134,1 (CH); 102,3 (CH); 61,1 (CH<sub>2</sub>); 53,1 (CH<sub>3</sub>); 40,9 (CH<sub>2</sub>); 32,6 (CH<sub>2</sub>); 29,6 (CH<sub>2</sub>); 27,5 (CH); 22,5 (CH<sub>3</sub>); 15,3 (CH<sub>3</sub>).

**Analyse élémentaire** calculée pour C<sub>16</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> : C, 64,83; H, 9,52; N, 9,45; O, 16,19; Trouvée: C, 65,08; H, 9,37; N, 9,48; O, 16,07.

### Synthèse du 3-(5-isobutyl-6-methoxy-pyrazin-2-yl)-propionaldehyde 42



Une solution de 5-(3,3-diethoxy-propyl)-2-isobutyl-3-methoxy-pyrazine (1,04 g; 3,5 mmol) dans du chloroforme (3.2 mL) est additionné à température ambiante à une solution de trifluoroacetic acid (0,8 mL) dans de l'eau distillée (0,8 mL). Après 5h d'agitation à 50°C, la réaction

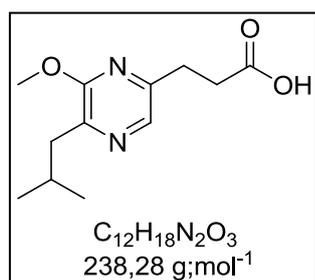
est arrêtée avec du NaHCO<sub>3</sub> en poudre jusqu'à un pH 7.5 et extraite avec du chloroforme (3x20 mL). Les phases organiques réunies sont lavées avec de l'eau distillée (2 x 10 mL), séchées avec du MgSO<sub>4</sub> anhydre et concentrées sous pression réduite afin d'obtenir le produit sous forme d'huile **342** (0,7 g ; 90%).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 9,90 (s, 1H, HCO); 7,92 (s, 1H, C=CH); 3,88 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,03 (t, <sup>3</sup>J = 6 Hz, 2H, OCCH<sub>2</sub>); 2,86 (t, <sup>3</sup>J = 6 Hz, 2H, NCCH<sub>2</sub>); 2,62 (d, <sup>3</sup>J = 6 Hz, 2H, NCCH<sub>2</sub>); 2,04-2,18 (m, <sup>3</sup>J = 6 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 0,90 (d, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 201,4 (C), 158,1 (C); 148,6 (C); 144,8 (C); 134,0 (CH); 53,3 (CH<sub>3</sub>); 42 (CH<sub>2</sub>); 40,9 (CH<sub>2</sub>); 27,5(CH<sub>2</sub>); 26,7,(CH); 22,5 (CH<sub>3</sub>).

**Analyse élémentaire** calculée pour C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 64,84; H, 8,16; N, 12,60; O, 14,40; trouvée: C, 65,12; H, 8,21; N, 12,52; O, 14,15.

### Synthèse du 3-(5-isobutyl-6-methoxy-pyrazin-2-yl)-propanoic acid **43**



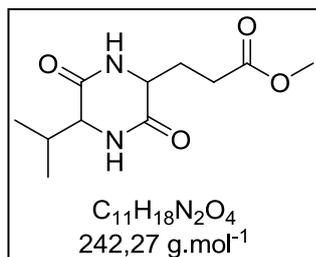
Une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,17 g ; 1,6 mmol) dans de l'eau (1,7 mL) est additonnée à **42** agité à température ambiante. Une solution de KMnO<sub>4</sub> (1,52 g; 0,96 mmol) dans de l'eau (30 mL) est ajoutée à la solution précédente agitée à 4°C. Après 4h d'agitation à 4°C et 24h à température ambiante, la solution est filtrée et le solvant est éliminé par évaporation. Le résidu est dissous dans de l'eau et acidifier jusqu'à pH 5 à l'aide d'acide citrique. Le produit est extrait avec du chloroforme (3x5 mL), Les phases organiques réunies sont lavées avec de l'eau distillée (2 x 10 mL), séchées avec du MgSO<sub>4</sub> anhydre et concentrées sous pression réduite afin d'obtenir le produit sous forme d'huile (1,2 g ; 66%).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 0.89 (br s, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.98-2.18 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.62 (br s, 2H, NCCH<sub>2</sub>), 2.78 (br s, 2H, NCCH<sub>2</sub>), 3.01 (br s, 2H, OCCH<sub>2</sub>), 3.87 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 7.91(s, 1H, C=CH).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 22.4 (CH<sub>3</sub>), 27.5 (CH), 29.3 (CH<sub>2</sub>), 29.6 (CH<sub>2</sub>), 40.5 (CH<sub>2</sub>), 53.2 (CH<sub>3</sub>), 133.4 (CH), 144.2 (C), 149.6 (C), 158.1 (C), 178.2 (C).

**Analyse élémentaire**. calculée pour C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: C, 60.48, H, 7.61, N, 11.75, O, 20.14. trouvée: C, 60.73, H, 7.58, N, 11.69, O, 19.98.

### Synthèse du methyl 3-(5-isopropyl-3,6-dioxopiperazin-2-yl)propanoate 45

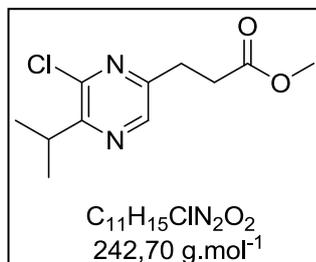


Une solution de 44 (15,8 g ; 110 mmol) dans du THF (130 mL) est ajoutée par un goutte à goutte à une solution de L-glutamic acid dimethyl ester hydrochloride (23,2 g ; 110 mmol) et de triéthylamine (24 g ; 240 mmol) dans du DCM (130 mL) agitée à -80°C. La solution est agitée pendant 3h à -70°C. Après retour à température ambiante, le précipité formé est éliminé et le solvant du filtrat est éliminé par évaporation. Le résidu solide est dissous dans du toluène (300 mL) et chauffé à reflux pendant 12h. Après avoir refroidi la solution, le précipité formé est évaporé afin d'obtenir une poudre blanche (10 g ; 36% ; mp 175°C).

**RMN <sup>1</sup>H** (DMSO, δ (ppm)): 8,57 (s, 1H, **NH**); 8,48 (s, 1H, **NH**); 4,26 (m, 1H, **CH**); 4,05 (m, 1H, **CH**); 3,97 (s, 3H, **OCH<sub>3</sub>**); 2,80 (m, 2H, **CH<sub>2</sub>**); 2,53 (m, 1H, **CH**); 2,35 (m, 2H, **CH<sub>2</sub>**); 1,33 (d, <sup>3</sup>J = 7 Hz, 3H, **CH<sub>3</sub>**); 1,22 (d, <sup>3</sup>J = 7 Hz, 3H, **CH<sub>3</sub>**).

**RMN <sup>13</sup>C** (DMSO, δ (ppm)): 174,1 (**C**); 168,9 (**C**); 168,4 (**C**); 60,6 (**CH**); 54,3 (**CH**); 52,6 (**CH<sub>3</sub>**); 32,3 (**CH**); 30,5 (**CH<sub>2</sub>**); 30,1 (**CH<sub>2</sub>**); 19,8 (**CH<sub>3</sub>**); 18,3 (**CH<sub>3</sub>**).

### Synthèse du methyl 3-(6-chloro-5-isopropylpirazin-2-yl)propanoate 48

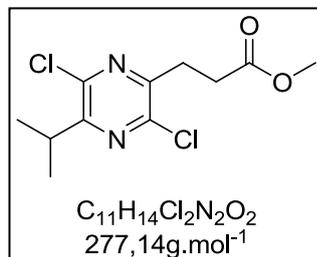


Le composé 45 (2 g ; 8,2 mmol) est ajouté à une solution de POCl<sub>3</sub> (5 mL ; 54 mmol) et de PCl<sub>5</sub> (1 g ; 4,8 mmol). Après 1h d'agitation à 100°C, l'excès de POCl<sub>3</sub> est éliminé par distillation sous pression réduite. Une solution saturée de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> est ajoutée au résidu jusqu'à un pH de 8-9. Le produit est extrait de la phase aqueuse avec du diéyle éther (3x30 mL). Les phases organiques réunies sont lavées avec du brine (50 mL), séchées avec du MgSO<sub>4</sub> anhydre, filtrées, et évaporées sous pression réduite afin d'obtenir un mélange des composés **46**, **47** et **48**. Le composé **46** est éliminé par colonne (pentane/diéyle éther : 60/40). Le mélange de composé **47** et **48** est séparé par HPLC (colonne : Varian Dynamax Microsorb 100-5 Si ; éluant : pentane/diéyle éther : 60/40 ; détection : 254 nm ; écoulement : 2mL/min pendant 5 min puis 0,6mL/min pendant 35 min ; temps de rétention : 26,72 min (**47**) et 31,83 (**48**)).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 8,34 (s, 1H, **H<sub>Ar</sub>**); 3,66 (s, 3H, **OCH<sub>3</sub>**); 3,47 (m, 1H, **CH**); 3,06 (t, <sup>3</sup>J = 6,8 Hz, 2H, **CH<sub>2</sub>**); 2,79 (t, <sup>3</sup>J = 6,8 Hz, 2H, **CH<sub>2</sub>**); 1,26 (d, <sup>3</sup>J = 5,7 Hz, 6H, **CH<sub>3</sub>**).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 173,1 (C); 159,9 (C); 150,5 (C); 145,8 (C); 141,6 (CH); 52,8 (CH<sub>3</sub>); 32,4 (CH); 29,9 (CH<sub>2</sub>); 28,9 (CH<sub>2</sub>); 20,9 (CH<sub>3</sub>).

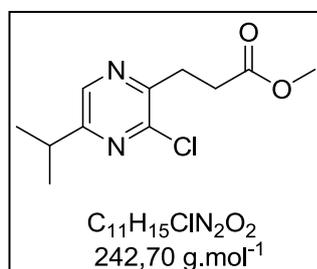
### Synthèse du 3-(3,6-dichloro-5-isopropylpyrazin-2-yl)propanoate 46



Huile, 25%.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 3,68 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,47 (m, 1H, CH); 3,18 (t, <sup>3</sup>J = 6,8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,80 (t, <sup>3</sup>J = 6,8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,25 (d, <sup>3</sup>J = 5,7 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>).

### Synthèse du du methyl 3-(3-chloro-5-isopropylpirazin-2-yl)propanoate 47

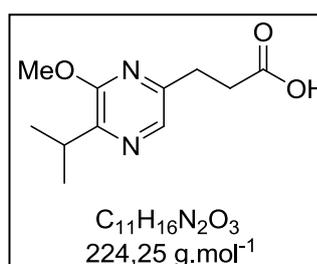


Huile marron, 10%.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 8,24 (s, 1H, H<sub>Ar</sub>); 3,66 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,18 (t, <sup>3</sup>J = 6,8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>); 3,01 (m, 1H, CH); 2,79 (t, <sup>3</sup>J = 6,8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,26 (d, <sup>3</sup>J = 5,7 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 172,8 (C); 157,6 (C); 150,4 (C); 144,6 (C); 144,6 (CH); 51,7 (CH<sub>3</sub>); 30,64 (CH); 29,9 (CH<sub>2</sub>); 28,5 (CH<sub>2</sub>); 20,6 (CH<sub>3</sub>).

### Synthèse du 3-(5-isopropyl-6-methoxy-pyrazin-2-yl) propanoïque acide 49



Une solution de **48** (1,6 g ; 6,6 mmol) dans du méthanol anhydre (5 mL) est ajoutée à une solution de méthoxyde de sodium fraîchement préparé (par addition de sodium (0,76 g ; 33 mmol) à du méthanol (10 mL)). Le mélange est agité pendant 5h à reflux.

Après élimination du méthanol par distillation, le produit brut est trituré avec de l'Et<sub>2</sub>O et filtré. Le filtrat est évaporé afin d'obtenir le 3-(5-isopropyl-6-methoxy-pyrazin-2-yl) propanoate. Le résidu solide est dissous dans de l'eau (5 mL), agité pendant 15 min à température ambiante et acidifié à l'aide d'acide citrique jusqu'à un pH de 3. Le produit est extrait de la phase aqueuse avec du diéthyle éther (3x30 mL). Les phases organiques réunies sont lavées avec du brine (50 mL), séchées avec du MgSO<sub>4</sub> anhydre, filtrées, et évaporées sous pression réduite afin d'obtenir une huile incolore (1,2 g ; 81%).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 7,95 (s, 1H, H<sub>Ar</sub>); 3,90 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,29 (m, 1H, CH); 3,01 (t, <sup>3</sup>J = 6,8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,27 (t, <sup>3</sup>J = 6,8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,21 (d, <sup>3</sup>J = 5,7 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 178,6 (C); 157,6 (C); 149,8 (C); 149,1 (C); 133,9 (CH); 53,7 (CH<sub>3</sub>); 32,8 (CH<sub>2</sub>); 29,6 (CH); 29,1 (CH<sub>2</sub>); 20,8 (CH<sub>3</sub>).

**SM-HR** (ESI+) *m/z* calculée pour C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 225,1233 [M + H]<sup>+</sup>; trouvée, 225,1236.

### III – Couplage

Tous les couplages présentés à la suite ont été réalisés à la BSA et à la Thyroglobuline. Seul ceux à la BSA sont décrits. Les modes opératoires sont identiques pour les couplages à la deuxième protéine porteuse. Cependant, les équivalences de réactifs diffèrent. Donc, lors de la description des couplages pour la Thyroglobuline, il sera présenté uniquement la quantité de matières introduites.

Tous les couplages ont été purifiés suivant le même procédé : une dialyse et une lyophilisation.

#### La dialyse

Une solution d'EDTA (une pointe de spatule) et de bicarbonate de sodium (une pointe de spatule) dans de l'eau (500 mL) contenant le boudin de dialyse est agitée à 100°C. Après 30 min d'agitation, la membrane est rincée avec de l'eau distillée. Le couplage réalisé est ensuite introduit dans le boudin. Ce dernier est placé dans un bain contenant dans un premier temps 1 L de tampon phosphate dilué. Après 12h00 d'agitation à +4°C, la solution de tampon est renouvelé deux fois, puis le bain est réalisé avec de l'eau distillée.

Tampon phosphate 0,1 M pH 7,3

Solution A : 0,1 M            NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O            3,9 g            250 mL

Solution B : 0,1 M            Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>            9,94 g            700 mL

Verser la solution A dans la solution B jusqu'à un pH de 7,3. Prendre 100 mL du mélange solution A et solution B y ajouter 9 g de NaCl et ajuster à 1 L.

#### La lyophilisation

Après une congélation du couplage lyophilisé, l'eau est éliminée par sublimation.

## Couplage de l'H<sub>1</sub>P3SH

### Couplage à la BSA

Une solution de bis(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl) octanedioate (linker homobifonctionnel : 150 µmol ; 56 mg) dilué dans du DMF (1 mL) est ajoutée à l'aide d'une seringue à une solution de BSA (0,75 µmol ; 50 mg), de P3SH (150 µmol ; 40 mg) dans du tampon carbonate (10 mL) agitée à 0°C. Après une agitation d'une journée à +4°C, une dialyse et une lyophilisation sont réalisées.

### Couplage à la BSA (1 : 5)

Linker homobifonctionnel (5 µmol ; 1,8 mg), P3SH (2,5 µmol ; 0,6 mg), BSA (0,5 µmol ; 33,5 mg), tampon carbonate (10 mL), DMF (1 mL)

### Couplage à la Thy

Linker homobifonctionnel (1 µmol ; 0,37 mg), P3SH (1 µmol ; 0,26 mg), Thy (0,05 µmol ; 33,5 mg), tampon carbonate (10 mL), DMF (1 mL)

### Couplage à la Thy (1 : 5)

Linker homobifonctionnel (0,5 µmol ; 0,37 mg), P3SH (0,25 µmol ; 0,26 mg), Thy (0,05 µmol ; 33,5 mg), tampon carbonate (10 mL), DMF (1 mL)

Tampon carbonate 0,05 M pH 9,6

Solution A : 0,05 M      Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>                      1,325 g              250 mL

Solution B : 0,05 M      NaHCO<sub>3</sub>                      2,94 g              700 mL

Verser la solution A dans la solution B jusqu'à un pH de 9,6.

## Couplage de l'H<sub>3</sub>P3SH

### Couplage à la BSA

L'anhydride succinique (82,5 µmol ; 8,2 mg) est ajouté à une solution de BSA (1,5 µmol ; 100 mg) dans du tampon borate/borique (5 mL) agitée à 0°C. Après 2h00 d'agitation, une solution de la molécule **10** (75 µmol ; 13,2 mg) dans du tampon borate/borique (1 mL),

puis une solution de EDAC (82,5  $\mu\text{mol}$  ; 15,8 mg) dans du DMF (1 mL) et une solution de NHS (82,5  $\mu\text{mol}$  ; 9,4 mg) sont ajoutés à la solution à 0°C. Après une agitation d'une journée à +4°C, une dialyse et une lyophilisation sont réalisées.

#### Couplage à la Thyr

Anhydride succinique (1,2  $\mu\text{mol}$  ; 0,23 mg), molécule **10** (1  $\mu\text{mol}$  ; 0,17 mg), Thyr (0,05  $\mu\text{mol}$  ; 33,5 mg), tampon borate/borique (5+1 mL), DMF (1+1 mL)

#### Tampon borate/borique

Solution A : 0,2 M       $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$       15,25 g      200 mL

Solution B : 0,2 M      Acide borique      2,47 g      200 mL

Verser la solution B dans la solution A jusqu'à un pH de 8,7 puis un pointe de spatule de  $\text{NaN}_3$  est ajoutée.

#### **Couplage de l'H<sub>4</sub>P3SH**

#### Couplage à la BSA

Une solution de la molécule **13** (25  $\mu\text{mol}$  ; 5,8 mg), de NHS (27,5  $\mu\text{mol}$  ; 3,1 mg) et d'EDAC (27,5  $\mu\text{mol}$  ; 5,2 mg) dans du DMF (2 mL), préalablement préparée et agitée à température ambiante pendant 45 min, est ajoutée à une solution de BSA (0,5  $\mu\text{mol}$  ; 33,5 mg) dans du tampon borate/borique (2 mL) agitée à 0°C. Lors de l'ajout, si un précipité apparait, additionner 1 à 2 gouttes de tampon borate/borique et 1 à 2 gouttes de DMF. Après une journée d'agitation à +4°C, une dialyse et une lyophilisation sont réalisées.

$\text{NaBH}_4$  (0,3 mmol ; 12,7 mg) est ajouté lentement à une solution du couplage précédent (14,7 mg) dans du PEG<sub>400</sub> (5 mL). Après une journée d'agitation à +4°C, une dialyse et une lyophilisation sont réalisées.

#### Couplage à la Thyr

Thyr (0,05  $\mu\text{mol}$  ; 33,5 mg), NHS (1,25  $\mu\text{mol}$  ; 0,15 mg), EDAC (1,25  $\mu\text{mol}$  ; 0,23 mg), **13** (1  $\mu\text{mol}$  ; 0,23 mg), DMF (2 mL), tampon borate/borique (2 mL)

Couplage (15 mg),  $\text{NaBH}_4$  (40  $\mu\text{mol}$  ; 1,5 mg), PEG<sub>400</sub> (5 mL)

## **Couplage de l'H<sub>1</sub>P4MSP**

### Activation in situ de la fonction acide : couplage à la BSA

Une solution de EDAC (125  $\mu\text{mol}$  ; 23,9 mg) dans du tampon borate/borique (1 mL) est ajouté à une solution de BSA (0,5  $\mu\text{mol}$  ; 33,5 mg), d'haptène (100  $\mu\text{mol}$  ; 15,2 mg) et de NHS (125  $\mu\text{mol}$  ; 14,3 mg) dans du tampon borate/borique (4 mL) agité à 0°C. Après 12h00 d'agitation à +4°C, une dialyse et une lyophilisation sont réalisées.

### Activation préalable de la fonction acide : couplage à la BSA

Une solution d'haptène (50  $\mu\text{mol}$  ; 15,2 mg) de NHS (75  $\mu\text{mol}$  ; 8,6 mg) et d'EDAC (75  $\mu\text{mol}$  ; 14,3 mg) dans du DMF, préalablement agité pendant 30 ou 60 ou 120 min à 0°C, est ajoutée à une solution de BSA (0,5  $\mu\text{mol}$  ; 33,5 mg) dans du tampon borate/borique (2 mL). Lors de l'ajout, si un précipité apparaît, additionner 1 à 2 gouttes de tampon borate/borique et/ou 1 à 2 gouttes de DMF. Après une journée d'agitation à +4°C, une dialyse et une lyophilisation sont réalisées. Après 12h00 d'agitation à +4°C, une dialyse et une lyophilisation sont réalisées.

## **Couplage de l'H<sub>1</sub>IBMP**

### Couplage à la BSA

Une solution d'haptène (72  $\mu\text{mol}$  ; 17,1 mg), de tributylamine (144  $\mu\text{mol}$  ; 34,6  $\mu\text{L}$ ), d'isobutyl chloroformiate (72  $\mu\text{mol}$  ; 9,4  $\mu\text{L}$ ) dans du DMF (2 mL), préalablement agité pendant 30 min à 0°C, est ajouté à une solution de BSA (1,44  $\mu\text{mol}$  ; 96,5 mg) dans du tampon borate/borique (10 mL). Après 6h00 d'agitation à température ambiante, une dialyse et une lyophilisation sont réalisées.

### Couplage à la Thy<sub>r</sub> (Thy<sub>r1</sub> H<sub>1</sub>IBMP)

Thy<sub>r</sub> (0,144  $\mu\text{mol}$  ; 96,5 mg), haptène (2,88  $\mu\text{mol}$  ; 0,7 mg), tributylamine (5,76  $\mu\text{mol}$  ; 1,38  $\mu\text{L}$ ), isobutyl chloroformiate (2,88  $\mu\text{mol}$  ; 0,4  $\mu\text{L}$ ), DMF (2 mL) tampon borate/borique (10 mL)

### Couplage à la Thy<sub>r</sub> (Thy<sub>r2</sub> H<sub>1</sub>IBMP)

Une solution d'haptène (1  $\mu\text{mol}$  ; 0,24 mg), de NHS (1,1  $\mu\text{mol}$  ; 0,13 mg), et d'EDAC (1,1  $\mu\text{mol}$  ; 0, mg) dans du DMF (1 mL), préalablement agité pendant 1h00 à 0°C, est ajouté par un goutte à goutte à une solution de Thyr (0,05  $\mu\text{mol}$  ; 33,5 mg) dans du tampon borate/borique (2 mL). Lors de l'ajout, si un précipité apparaît, additionner 1 à 2 gouttes de tampon borate/borique et 1 à 2 gouttes de DMF. Après une journée d'agitation à +4°C, une dialyse et une lyophilisation sont réalisées.

## **Couplage de l'H<sub>1</sub>IPMP**

### Couplage à la BSA

Une solution d'haptène (72  $\mu\text{mol}$  ; 16,1 mg), de tributylamine (144  $\mu\text{mol}$  ; 34,6  $\mu\text{L}$ ), d'isobutyl chloroformiate (72  $\mu\text{mol}$  ; 9,4  $\mu\text{L}$ ) dans du DMF (2 mL), préalablement agité pendant 30 min à 0°C, est ajouté à une solution de BSA (1,44  $\mu\text{mol}$  ; 96,5 mg) dans du tampon borate/borique (10 mL). Après 6h00 d'agitation à température ambiante, une dialyse et une lyophilisation sont réalisées.

### Couplage à la Thy<sub>r</sub> (Thy<sub>r</sub><sub>1</sub> H<sub>1</sub>IPMP)

Thyr (0,144  $\mu\text{mol}$  ; 96,5 mg), haptène (2,88  $\mu\text{mol}$  ; 0,6 mg), tributylamine (5,76  $\mu\text{mol}$  ; 1,38  $\mu\text{L}$ ), isobutyl chloroformiate (2,88  $\mu\text{mol}$  ; 0,4  $\mu\text{L}$ ), DMF (2 mL) tampon borate/borique (10 mL)

### Couplage à la Thy<sub>r</sub> (Thy<sub>r</sub><sub>2</sub> H<sub>1</sub>IBMP)

Une solution d'haptène (1  $\mu\text{mol}$  ; 0,22 mg), de NHS (1,1  $\mu\text{mol}$  ; 0,13 mg), et d'EDAC (1,1  $\mu\text{mol}$  ; 0, mg) dans du DMF (1 mL), préalablement agité pendant 1h00 à 0°C, est ajouté par un goutte à goutte à une solution de Thyr (0,05  $\mu\text{mol}$  ; 33,5 mg) dans du tampon borate/borique (2 mL). Lors de l'ajout, si un précipité apparaît, additionner 1 à 2 gouttes de tampon borate/borique et 1 à 2 gouttes de DMF. Après une journée d'agitation à +4°C, une dialyse et une lyophilisation sont réalisées.

## **IV – Immunisation des lapins**

La vaccination a été effectuée sur germinales et exempts de pathogènes lapins néo-zélandais de Protéogénix (Oberhausbergen, France). Au cours de la procédure de vaccination

sous-cutanée réalisée en plusieurs points, 500 mg de conjugués haptène-BSA ont été injectés à chaque injection. Les trois premières injections ont été effectuées à des intervalles d'une semaine. Deux injections supplémentaires alors suivie après un intervalle de trois semaines sont réalisées. L'adjuvant complet de Freund a été utilisé pour la première injection. L'adjuvant de Freund incomplet a été utilisé par la suite. 50 mL de sérum ont été prélevés une semaine après la dernière injection. Après la coagulation du sang à +4°C pendant 24 heures, le sérum a été centrifugé à 3000 G pendant 10 minutes à +4°C. Les sérums ont été conservés à -20°C dans de petits aliquots soit pure ou dilué au 1 :2 dans du glycérol. Pour chaque haptène conjugué BSA, deux lapins ont été injectés et les deux sérums ont été testés lors des tests croisés (liaison directe de l'anticorps conjugué sur le revêtement). La sensibilité est vérifiée lors des tests de gamme.

## **V – Test ELISA**

Les modes opératoires entre les tests croisés et les tests de gamme ne diffèrent qu'au niveau de la compétition. Lors des premiers tests, aucune molécule à doser n'est introduite.

### **Le coating**

Il correspond à la fixation des molécules à doser (P3SH, P4MSP, IBMP, IPMP) au fond des puits de la plaque. Ces dernières sont couplées à une protéine de fort poids moléculaire, BSA ou thyroglobuline. Le complexe protéine porteuse – haptène est dilué dans un tampon carbonate (0,05 M, pH 9,6). 200 µL de cette solution sont ajoutés dans chaque puits pour une nuit complète. Les plaques sont placées à +4°C. A un tel pH, les protéines acquièrent des propriétés basiques et se chargent négativement. Elles peuvent ainsi se fixer aux parois des puits, chargées elles positivement.

Le coating d'une partie des colonnes 2 et 8 est particulier dans la mesure où les puits des contrôles négatifs ne sont pas coatés avec le complexe protéine porteuse haptène. Dans ce cas, ainsi que dans les colonnes 1, 6, 7 et 12, 200 µL de tampon carbonate sont ajoutés.

### **La saturation**

Une fois les puits vidés, 200 µL de PBS Tween DMSO BSA sont ajoutés dans chaque puits pendant 30 min à 37°C. La BSA va s'immiscer dans les espaces laissés vacant

par le complexe protéine porteuse haptène. Le DMSO permet de favoriser la solubilité des molécules à doser.

### **La compétition**

Les puits des plaques sont rincés 3 fois avec du tampon PBS Tween DMSO. La contribution dans la plaque est différente selon les colonnes. Dans les colonnes 1, 2, 6, 7, 8 et 12, 100  $\mu\text{L}$  de tampon PBS Tween DMSO BSA sont ajoutés. Des colonnes 3 à 5 et 9 à 11, 100  $\mu\text{L}$  par puits d'une gamme de molécules à doser sont distribués. Pour tous les composés, le pas successif des gammes est de 2. Douze points de gamme sont réalisés. Chaque point de gamme est réalisé en duplicat sur la plaque.

Les solutions d'anticorps primaire sont préparées extemporanément dans du tampon PBS Tween DMSO BSA et 100  $\mu\text{L}$  d'une solution d'anticorps sont distribués sur toute la plaque. Les plaques sont placées à 37°C pendant 2h00. Les anticorps reconnaissent à la fois les molécules à doser et le complexe protéine porteuse haptène : il ya donc une compétition. Dans les puits B, il n'y a ni de complexes protéines porteuses haptènes ni de molécules à doser libres. Les anticorps ne peuvent donc pas se lier. En revanche, dans les puits B<sub>0</sub>, les anticorps reconnaissent les seuls couples protéines porteuses haptènes : les liaisons sont maximales.

### **L'anticorps secondaire**

Les puits sont rincés 3 fois avec du tampon PBS Tween DMSO. Tous les anticorps liés aux molécules à doser libres sont éliminés. Seuls subsistent les complexes anticorps haptènes couplés aux protéines porteuses.

Une solution d'anticorps secondaire anti-Ig G de lapin couplé à la peroxydase est préparée dans du tampon PBS Tween DMSO BSA et 200  $\mu\text{L}$  sont distribués dans tous les puits, puis la plaque est incubée à 37°C pendant 30 min.

### **La révélation**

Les puits sont rincés 3 fois avec du tampon PBS Tween DMSO. Une solution d'orthophénylène diamine (OPD) (0,0005 M) est préparée extemporanément dans un tampon citrate-phosphate (pH 5 ; 0,15 M), auquel 0,025% d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont ajoutés. La réaction d'oxydation de l'OPD dure 30 min dans l'obscurité. Pour arrêter la réaction, 50  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

(4 M) sont ajoutés dans chaque puits. Le produit formé est de couleur orange. L'absorbance de chaque puits est lue à 490 nm avec spectrophotomètre Dynex MRX-II.

### **Les tampons utilisés au cours des dosages ELISA**

#### Tampon carbonate 0,05 M pH 9,6

Solution A : 0,05 M       $\text{Na}_2\text{CO}_3$                       1,325 g              250 mL

Solution B : 0,05 M       $\text{NaHCO}_3$               2,94 g              700 mL

Verser la solution A dans la solution B jusqu'à un pH de 9,6.

#### Tampon phosphate 0,1 M pH 7,3

Solution A : 0,1 M       $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$                       3,9 g              250 mL

Solution B : 0,1 M       $\text{Na}_2\text{HPO}_4$                       9,94 g              700 mL

Verser la solution A dans la solution B jusqu'à un pH de 7,3.

#### Tampon citrate phosphate 0,15M pH 5

Solution A : 0,2 M       $\text{Na}_2\text{HPO}_4$                       14,2 g              500 mL

Solution B : 0,1 M      Acide citrique. $\text{H}_2\text{O}$               5,25 g              250 mL

Verser la solution A dans la solution B jusqu'à un pH de 5.

#### Tampon PBS Tween DMSO

100 mL tampon phosphate à 0,1 M + 9 g NaCl + 10 mL DMSO + 500  $\mu\text{L}$  Tween 20 + Qsp 1L  
 $\text{H}_2\text{O}$

#### Tampon PBS Tween DMSO BSA

200 mL PBS Tween DMSO + 0,2 g BSA

# Bibliographie

1. Moisseeff, M.; Casamayor, P., *Arômes du vin*. Hachette ed.; **2002**; p 6.
2. Navarre, C.; Langlade, F., *L'œnologie*. Edition TEC & DOC 6ème édition ed.; **2006**; p 1-3.
3. Navarre, C.; Langlade, F., *L'œnologie*. Edition TEC & DOC 6ème édition ed.; **2006**; p 4.
4. Moisseeff, M.; Casamayor, P., *Arômes du vin*. Hachette ed.; **2002**; p 20-21.
5. Moisseeff, M.; Casamayor, P., *Arômes du vin*. Hachette ed.; **2002**; p 22-23.
6. Moisseeff, M.; Casamayor, P., *Arômes du vin*. Hachette ed.; **2002**; p 24-25.
7. Moisseeff, M.; Casamayor, P., *Arômes du vin*. Hachette ed.; **2002**; p 26-29.
8. Casamayor, P., *Le vin en 80 questions*. Hachette ed.; Les livres du vin: 2004; p 14-19.
9. Casamayor, P., *Le vin en 80 questions*. Hachette ed.; Les livres du vin: 2004; p 20.
10. Galet, P., *Grands Cépages*. Hachette ed.; Les livres du vin: 2006; p 42-45.
11. Ambrosi, H.; Dettweiler-Münch, E.; Rühl, E. H.; Schmid, J.; Schumann, F., *Guide des cépages*. Ulmer ed.; 1997; p 86-87.
12. Clarke, O.; Rand, M., *Guide des Cépages*. **2008**; p 48-52.
13. Galet, P., *Grands Cépages*. Hachette ed.; Les livres du vin: 2006; p 92-95.
14. Galet, P., *Grands Cépages*. Hachette ed.; Les livres du vin: 2006; p 38-41.
15. Casamayor, P., *Le vin en 80 questions*. Hachette ed.; Les livres du vin: 2004; p 24.
16. Galet, P., *Grands Cépages*. Hachette ed.; Les livres du vin: 2006; p 132-135.
17. Clarke, O.; Rand, M., *Guide des Cépages*. **2008**; p 219-224.
18. Galet, P., *Grands Cépages*. Hachette ed.; Les livres du vin: 2006; p 136-139.
19. Galet, P., *Grands Cépages*. Hachette ed.; Les livres du vin: 2006; p 102-103.
20. Darriet, P., L'arôme et les précurseurs d'arôme du Sauvignon. **1993**.
21. Darriet, P.; Takatoshi, T.; Demole, E.; Dubourdiou, D., Mise en évidence dans le raisin de *Vitis vinifera* vr. sauvignon d'un précurseur de la 4-mercapto-4-méthylpentan-2-one. *C. R. Acad. Sci.* **1993**, 316, 1332-1335.
22. Darriet, P.; Tominaga, T.; Lavigne, V.; Boidron, J.-N.; Dubourdiou, D., Identification of a powerful aromatic component of *Vitis vinifera* L. var. sauvignon wines: 4-mercapto-4-méthylpentan-2-one. *Flavour Fragrance J.* **1995**, 10, (6), 385-392.
23. Tominaga, T.; Darriet, P.; Dubourdiou, D., Identification de l'acétate de 3-mercaptohexanol, composé à forte odeur de buis, intervenant dans l'arôme des vins de Sauvignon. *Vitis* **1996**, 35, (4), 207-210.
24. Tominaga, T.; Murat, M.-L.; Dubourdiou, D., Development of a Method for Analyzing the Volatile Thiols Involved in the Characteristic Aroma of Wines Made from *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon Blanc. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, (3), 1044-1048.
25. Tominaga, T.; Furrer, A.; Henry, R.; Dubourdiou, D., Identification of new volatile thiols in the aroma of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon blanc wines. *Flavour Fragrance J.* **1998**, 13, (3), 159-162.
26. Tominaga, T.; Peyrot des Gachons, C.; Dubourdiou, D., A New Type of Flavor Precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc: S-Cysteine Conjugates. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, (12), 5215-5219.
27. Bouchilloux, P.; Darriet, P.; Henry, R.; Lavigne-Cruege, V.; Dubourdiou, D., Identification of Volatile and Powerful Odorous Thiols in Bordeaux Red Wine Varieties. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, (8), 3095-3099.
28. Sarrazin, E.; Shinkaruk, S.; Tominaga, T.; Bennetau, B.; Frérot, E.; Dubourdiou, D., Odorous Impact of Volatile Thiols on the Aroma of Young Botrytized Sweet Wines: Identification and Quantification of New Sulfanyl Alcohols. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, (4), 1437-1444.

29. Engel, K. H.; Tressl, R., Identification of new sulfur-containing volatiles in yellow passionfruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *J. Agric. Food Chem.* **1991**, 39, (12), 2249-2252.
30. Tominaga, T.; Dubourdieu, D., Identification of Cysteinylated Aroma Precursors of Certain Volatile Thiols in Passion Fruit Juice. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, (7), 2874-2876.
31. Tominaga, T.; Niclass, Y.; Frérot, E.; Dubourdieu, D., Stereoisomeric Distribution of 3-Mercaptohexan-1-ol and 3-Mercaptohexyl Acetate in Dry and Sweet White Wines Made from *Vitis vinifera* (Var. Sauvignon Blanc and Semillon). *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, (19), 7251-7255.
32. Fretz, C.; Känel, S.; Luisier, J.-L.; Amadò, R., Analysis of volatile components of Petite Arvine wine. *E. Food Res. Tech.* **2005**, 221, (3), 504-510.
33. Fretz, C. B.; Luisier, J.-L.; Tominaga, T.; Amado, R., 3-Mercaptohexanol: An Aroma Impact Compound of Petite Arvine Wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **2005**, 56, (4), 407-410.
34. Tominaga, T.; Baltenweck-Guyot, R.; Gachons, C. P. D.; Dubourdieu, D., Contribution of Volatile Thiols to the Aromas of White Wines Made From Several *Vitis vinifera* Grape Varieties. *Am. J. Enol. Vitic.* **2000**, 51, (2), 178-181.
35. Tominaga, T.; Guimbertau, G.; Dubourdieu, D., Role of Certain Volatile Thiols in the Bouquet of Aged Champagne Wines. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, (4), 1016-1020.
36. Cullere, L.; Escudero, A.; Cacho, J.; Ferreira, V., Gas Chromatography and Olfactometry and Chemical Quantitative Study of the Aroma of Six Premium Quality Spanish Aged Red Wines. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, (6), 1653-1660.
37. Murat, M.-L.; Tominaga, T.; Dubourdieu, D., Impact of some components on bordeaux roses and clairet aroma. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **2001**, 35, 99-105.
38. Tominaga, T.; Masneuf, I.; Dubourdieu, D., Mise en évidence d'un S-conjugué de la cystéine, précurseur d'arôme du Sauvignon. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **1995**, 4, (29), 227-232.
39. Escudero, A.; Gogorza, B.; Melus, M. A.; Ortin, N.; Cacho, J.; Ferreira, V., Characterization of the Aroma of a Wine from Maccabeo. Key Role Played by Compounds with Low Odor Activity Values. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, (11), 3516-3524.
40. Ferreira, V.; Ortan, N.; Escudero, A.; Lopez, R.; Cacho, J., Chemical Characterization of the Aroma of Grenache Rosé Wines: Aroma Extract Dilution Analysis, Quantitative Determination, and Sensory Reconstitution Studies. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, (14), 4048-4054.
41. Guth, H., Quantitation and Sensory Studies of Character Impact Odorants of Different White Wine Varieties. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, (8), 3027-3032.
42. Jocelyn, P. C., *In the occurrence, chemical properties, metabolism and biological function of thiols and disulfites*. Biochemistry of SH groups. ed.; 1972; p 404.
43. Sarrazin, E.; Shinkaruk, S.; Pons, M.; Thibon, C.; Bennetau, B.; Darriet, P., Elucidation of the 1,3-Sulfanylalcohol Oxidation Mechanism: An Unusual Identification of the Disulfide of 3-Sulfanylhexanol in Sauternes Botrytized Wines. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, (19), 10606-10613.
44. Rauhut, D.; Kuerbel, H., The production of H<sub>2</sub>S from elemental sulfur residues during fermentation and its influence on the formation of sulfur metabolites causing off flavours in wine. *Wein-Wissenschaft* **1994**, 49, 27-36.
45. Singleton, V. L.; Zaya, T. E. K.; Salgues, M. J., Caftaric acid in grapes and the conversion to a reaction product during processing. *Vitis* **1984**, 23, 113-120.
46. Cheynier, V. F.; Trousdale, E. K.; Singleton, V. L.; Salgues, M. J.; Wylde, R., Characterization of 2-S-glutathionyl caftaric acid and its hydrolysis in relation to grape wines. *J. Agric. Food Chem.* **1986**, 34, (2), 217-221.
47. Quideau, S.; Feldman, K. S.; Appel, H. M., Chemistry of Gallotannin-Derived o-Quinones: Reactivity toward Nucleophiles. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, (16), 4982-4983.

48. Ribéreau-Gayon, P.; Dubourdieu, D.; Donèche, B.; Lonvaud, A., *Traité d'œnologie : les vins blancs liquoreux de pourriture noble*. Dunod/La vigne ed.; 1998; p 598-611.
49. Blouin, J.; Cruège, J., *Analyse et Composition des vins*. La Vigne ed.; **2008**; p 118.
50. Wakabayashi, H.; Wakabayashi, M.; Eisenreich, W.; Engel, K.-H., Stereoselectivity of the  $\beta$ -lyase-catalyzed cleavage of S-cysteine conjugates of pulegone. *E. Food Res. Tech.* **2002**, 215, (4), 287-292.
51. Wakabayashi, H.; Wakabayashi, M.; Eisenreich, W.; Engel, K.-H., Stereochemical Course of the Generation of 3-Mercaptohexanal and 3-Mercaptohexanol by  $\beta$ -Lyase-Catalyzed Cleavage of Cysteine Conjugates. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 52, (1), 110-116.
52. Tominaga, T.; Masneuf, I.; Dubourdieu, D., *J. Int. Sci. Vigne Vin* **1995**, 29, 227.
53. Peyrot des Gachons, C.; Tominaga, T.; Dubourdieu, D., Measuring the Aromatic Potential of *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon Blanc Grapes by Assaying S-Cysteine Conjugates, Precursors of the Volatile Thiols Responsible for Their Varietal Aroma. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, (8), 3387-3391.
54. Thibon, C.; Shinkaruk, S.; Tominaga, T.; Bennetau, B.; Dubourdieu, D., Analysis of the diastereoisomers of the cysteinylated aroma precursor of 3-sulfanylhexanol in *Vitis vinifera* grape must by gas chromatography coupled with ion trap tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2008**, 1183, (1-2), 150-157.
55. Bayonove, C.; Cordonnier, R. A.; Dubois, P., *C. R. Acad. Sci.* **1975**, 281, 75.
56. Keith, E. M.; Frank, B. W., The occurrence of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in raw vegetables. *J. Sc. Food Agric.* **1975**, 26, (7), 973-986.
57. Lacey, M. J.; Allen, M. S.; Harris, R. L. N.; Brown, W. V., Methoxypyrazines in Sauvignon blanc Grapes and Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1991**, 42, (2), 103-108.
58. Roujou de Boubee, D.; Van Leeuwen, C.; Dubourdieu, D., Organoleptic Impact of 2-Methoxy-3-isobutylpyrazine on Red Bordeaux and Loire Wines. Effect of Environmental Conditions on Concentrations in Grapes during Ripening. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, (10), 4830-4834.
59. Sala, C.; Mestres, M.; Martí, M. P.; Busto, O.; Guasch, J., Headspace solid-phase microextraction analysis of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wines. *J. Chromatogr. A* **2002**, 953, (1-2), 1-6.
60. Maga, J. A.; Sizer, C. E., Pyrazines in foods. Review. *J. Agric. Food Chem.* **1973**, 21, (1), 22-30.
61. Blouin, J.; Cruège, J., *Analyse et Composition des vins*. La Vigne ed.; **2008**; p 120-122.
62. Buttery, R. G.; Seifert, R. M.; Guadagni, D. G.; Ling, L., Characterization of some volatile constituents of bell peppers. *J. Agric. Food Chem.* **1969**, 17, (6), 1322-1327.
63. Kotseridis, Y.; Beloqui, A. A.; Bertrand, A.; Doazan, J. P., An Analytical Method for Studying the Volatile Compounds of Merlot noir Clone Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1998**, 49, (1), 44-48.
64. Augustyn, O. P. H.; Rapp, A.; Wyck, C. J. V., Some volatile aroma components of *vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. *S. Afr. J. Enol. Vitic* **1982**, 3, 53-60.
65. Roujou de Boubee, D.; Cumsille, A. M.; Pons, M.; Dubourdieu, D., Location of 2-Methoxy-3-isobutylpyrazine in Cabernet Sauvignon Grape Bunches and Its Extractability during Vinification. *Am. J. Enol. Vitic.* **2002**, 53, (1), 1-5.
66. Allen, M. S.; Lacey, M. J.; Boyd, S., Determination of Methoxypyrazines in Red Wines by Stable Isotope Dilution Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, 42, (8), 1734-1738.
67. Dagan, L. Potentiel aromatique des raisins de *Vitis Vinefera* L. cv Petit Manseng et Gros Manseng. Contribution à l'arôme des vins de pays de Côtes de Gascogne. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, 2006.

68. Luisier, J.-L.; Buettner, H.; Voßlker, S.; Rausis, T.; Frey, U., Quantification of Cysteine S-Conjugate of 3-Sulfanylhexasan-1-ol in Must and Wine of Petite Arvine Vine by Stable Isotope Dilution Analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, (9), 2883-2887.
69. Harris, R. L. N.; Lacey, M. J.; Brown, W. V.; Allen, M. S., *Vitis* **1987**, *26*, 201.
70. Alberts, P.; Stander, M. A.; Paul, S. O.; de Villiers, A., Survey of 3-Alkyl-2-methoxypyrazine Content of South African Sauvignon Blanc Wines Using a Novel LC-APCI-MS/MS Method. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, (20), 9347-9355.
71. Brun, E. M.; Garcés-García, M.; Puchades, R.; Maquieira, Á., Enzyme-linked immunosorbent assay for the organophosphorus insecticide fenthion. Influence of hapten structure. *J. Immunol. Methods* **2004**, *295*, (1-2), 21-35.
72. Cuisset, B.; Pradelles, P.; Kime, D. E.; Kühn, E. R.; Babin, P.; Davail, S.; Le Menn, F., Enzyme immunoassay for 11-ketotestosterone using acetylcholinesterase as label: application to the measurement of 11-ketotestosterone in plasma of Siberian sturgeon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* **1994**, *108*, (2), 229-241.
73. Montagnier Human immunodeficiency viruses associated with AIDS, a diagnostic method for AIDS and pre-AIDS, and a kit therefor. 4708818, November 24, 1987.
74. Yu, F.-y.; Chi, T.-f.; Liu, B.-h.; Su, C.-c., Development of a Sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Determination of Ochratoxin A. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, (17), 6947-6953.
75. Cho, Y.-J.; Lee, D.-H.; Kim, D.-O.; Min, W.-K.; Bong, K.-T.; Lee, G.-G.; Seo, J.-H., Production of a Monoclonal Antibody against Ochratoxin A and Its Application to Immunochemical Assay. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, (22), 8447-8451.
76. Rosso, I.; Giraudi, G.; Gamberini, R.; Baggiani, C.; Vanni, A., Application of an ELISA to the Determination of Benalaxyl in Red Wines. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, (1), 33-36.
77. Yalow, R. S.; Berson, S. A., Assay of Plasma Insulin in Human Subjects by Immunological Methods. *Nature* **1959**, *184*, (4699), 1648-1649.
78. Janeway, C. A.; Travers, P.; Walport, M.; Shlomchik, M. J., *Immunologie*. De Boeck ed.; 2003; p 684.
79. Sherry, J. P.; Clement, R. E., Environmental Chemistry: The Immunoassay Option. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **1992**, *23*, (4), 217 - 300.
80. Bouzige, M.; Pichon, V., Immunoextraction of pesticides at the trace level in environmental matrices. *Analisis* **1998**, *26*, (6), 112-117.
81. Shinkaruk, S.; Lamothe, V.; Schmitter, J.-M.; Fructus, A.; Sauvant, P.; Vergne, S.; Degueil, M.; Babin, P.; Bennetau, B.; Bennetau-Pelissero, C., Synthesis of Haptens and Conjugates for ELISA of Glycitein: Development and Validation of an Immunological Test. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, (16), 6809-6817.
82. Shinkaruk, S.; Bennetau, B.; Babin, P.; Schmitter, J.-M.; Lamothe, V.; Bennetau-Pelissero, C.; Urdaci, M. C., Original preparation of conjugates for antibody production against Amicoumacin-related anti-microbial agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, (20), 9383-9391.
83. Lee, D. Y.; Chiang, V. L., Synthesis of (E)-4-(3-hydroxy-1-propenyl)-2-methoxyphenol-bovine serum albumin conjugate: a novel hapten-protein conjugate. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, (39), 5255-5258.
84. Szurdoki, F.; Bekheit, H. K. M.; Marco, M.; Goodrow, M.; Hammock, B. D., Important factors in hapten design and enzyme-linked immunosorbent assay development. In *New Frontier in Agrochemical Immunoassay*, David A. Kurtz, J. H. S., Larry Stankers, Editors, Ed. 1995; pp 39-63.

85. Kobayashi, N.; Hisada, A.; Shimada, K., Syntheses of novel 25-hydroxyvitamin D3 haptens having chemical bridges at the C-11 $\alpha$  position. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1993**, (1), 31-37.
86. Mäkelä, T.; Matikainen, J.; Wähälä, K.; Hase, T., Development of a Novel Hapten for Radioimmunoassay of the Lignan, Enterolactone in Plasma (Serum). Total Synthesis of ( $\pm$ )-trans-5-Carboxymethoxyenterolactone and Several Analogues. *Tetrahedron* **2000**, 56, (13), 1873-1882.
87. Bennetau-Pelissero, C.; Le Houerou, C.; Lamothe, V.; Le Menn, F.; Babin, P.; Bennetau, B., Synthesis of Haptens and Conjugates for ELISAs of Phytoestrogens. Development of the Immunological Tests. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, (2), 305-311.
88. Le Houérou, C.; Bennetau-Pelissero, C.; Lamothe, V.; Le Menn, F.; Babin, P.; Bennetau, B., Syntheses of Novel Hapten-Protein Conjugates for Production of Highly Specific Antibodies to Formononetin, Daidzein and Genistein. *Tetrahedron* **2000**, 56, (2), 295-301.
89. Brown, J. R., *Structure of Bovine serum albumin*. Fed. Proc. ed.; 1975; p 591.
90. Singh, K. V.; Kaur, J.; Varshney, G. C.; Raje, M.; Suri, C. R., Synthesis and Characterization of Hapten-Protein Conjugates for Antibody Production against Small Molecules. *Bioconjugate Chem.* **2004**, 15, (1), 168-173.
91. Janeway, C. A.; Travers, P.; Walport, M.; Shlomchik, M. J., *Immunologie*. De Boeck ed.; 2003; p 632.
92. Borel, J. P.; Randoux, A.; Maquart, F. X.; Gillery, P.; Le Peuch, C.; Bellon, G.; Monboisse, J.-C., *Biochimie Dynamique*. De Boeck Université ed.; 1997; p 836.
93. Leconturier, P., *Immunologie générale*. Elsevier Masson ed.; 2007.
94. Janeway, C. A.; Travers, P.; Walport, M.; Shlomchik, M. J., *Immunologie*. De Boeck ed.; 2003.
95. Douglas, F., *Introduction to medical microbiology*. Immunology ed.; 2010.
96. Keck, G. E.; Park, M.; Krishnamurthy, D., Synthetic studies on the rhizoxins. 1. Two stereoselective routes to a functionalized C(1)-C(9) subunit. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, (15), 3787-3788.
97. Thibon, C.; Shinkaruk, S.; Jourdes, M.; Bennetau, B.; Dubourdiou, D.; Tominaga, T., Aromatic potential of botrytized white wine grapes: Identification and quantification of new cysteine-S-conjugate flavor precursors. *Anal. Chim Acta* **2010**, 660, (1-2), 190-196.
98. Shinkaruk, S.; Thibon, C.; Schmitter, J.-M.; Babin, P.; Tominaga, T.; Degueil, M.; Desbat, B.; Jussier, C.; Bennetau, B.; Dubourdiou, D.; Bennetau-Pelissero, C., Surprising Structural Lability of a Cysteine-S-Conjugate Precursor of 4-Methyl-4-sulfanylpentan-2-one, a Varietal Aroma in Wine of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc. *Chem. Biodivers.* **2008**, 5, (5), 793-810.
99. Weller, M. G.; Diemer, M.; Wersching, C.; Niessner, R.; Sochor, H., Development of Antibodies for the Detection of N-Acetyl-glufosinate. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, (23), 6668-6675.
100. Izumi, M.; Okumura, S.; Yuasa, H.; Hashimoto, H., Mannose-BSA Conjugates: Comparison Between Commercially Available Linkers in Reactivity and Bioactivity. *J. Carbohydr. Chem.* **2003**, 22, (5), 317 - 329.
101. Lahmann, M.; Bülow, L.; Teodorovic, P.; Gybäck, H.; Oscarson, S., Synthesis of the Lewis b hexasaccharide and HSA-conjugates thereof. *Glycoconj. J.* **2004**, 21, (5), 251-256.
102. Kazuhisa, F.; Masaoki, K.; Masahiko, I., Development of a Series of Cross-Linking Agents that Effectively Stabilize alpha-Helical Structures in Various Short Peptides. *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, (3), 857-863.
103. Hill, M.; Bechet, J.-J.; d'Albis, A., Disuccinimidyl esters as bifunctional crosslinking reagents for proteins: Assays with myosin. *FEBS Letters* **1979**, 102, (2), 282-286.

104. Conlon, K. A.; Berrios, M., A method for direct cross-linking of DNA bases containing aromatic amino groups to proteins. *J. Biochem. Biophys. Methods* **1999**, 38, (3), 181-189.
105. Hung, D. T.; Benner, S. A.; Williams, C. M., Preparation of an ecdysone immunogen for radioimmunoassay work. *J. Biol. Chem.* **1980**, 255, (13), 6047-6048.
106. Morpurgo, M.; Bayer, E. A.; Wilchek, M., N-hydroxysuccinimide carbonates and carbamates are useful reactive reagents for coupling ligands to lysines on proteins. *J. Biochem. Biophys. Methods* **1999**, 38, (1), 17-28.
107. Brown, H. C.; Narasimhan, S.; Choi, Y. M., Selective reductions. 30. Effect of cation and solvent on the reactivity of saline borohydrides for reduction of carboxylic esters. Improved procedures for the conversion of esters to alcohols by metal borohydrides. *J. Org. Chem.* **1982**, 47, (24), 4702-4708.
108. Utaka, M.; Watabu, H.; Takeda, A., Asymmetric reduction of aliphatic  $\delta$ -keto acids with sodium borohydride in the presence of bovine serum albumin. *J. Org. Chem.* **1986**, 51, (26), 5423-5425.
109. Bennetau-Pelissero, C.; Arnal-Schnebelen, B.; Lamothe, V.; Sauvant, P.; Sagne, J. L.; Verbruggen, M. A.; Mathey, J.; Laviaille, O., ELISA as a new method to measure genistein and daidzein in food and human fluids. *Food Chemistry* **2003**, 82, (4), 645-658.
110. Kim, Y. J.; Cho, Y. A.; Lee, H.-S.; Lee, Y. T.; Gee, S. J.; Hammock, B. D., Synthesis of haptens for immunoassay of organophosphorus pesticides and effect of heterology in hapten spacer arm length on immunoassay sensitivity. *Analytica Chimica Acta* **2003**, 475, (1-2), 85-96.
111. Neokosmidi, A.; Ragoussis, V.; Zikos, C.; Paravatou-Petsotas, M.; Livaniou, E.; Ragoussis, N.; Evangelatos, G., Synthesis of Haptens and Development of an Immunoassay for the Olive Fruit Fly Pheromone. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, (14), 4368-4374.
112. Schaefer, O.; Bohlmann, R.; Schleuning, W.-D.; Schulze-Forster, K.; Humpel, M., Development of a Radioimmunoassay for the Quantitative Determination of 8-Prenylnaringenin in Biological Matrices. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, (8), 2881-2889.
113. Zhang, Q.; Wang, L.; Ahn, K. C.; Sun, Q.; Hu, B.; Wang, J.; Liu, F., Hapten heterology for a specific and sensitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay for organophosphorus insecticide fenthion. *Analytica Chimica Acta* **2007**, 596, (2), 303-311.
114. Howell, K. S.; Swiegers, J. H.; Elsey, G. M.; Siebert, T. E.; Bartowsky, E. J.; Fleet, G. H.; Pretorius, I. S.; de Barros Lopes, M. A., Variation in 4-mercapto-4-methyl-pentan-2-one release by *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **2004**, 240, (2), 125-129.
115. Daniels, D. L.; Richert, C., One-pot synthesis of L-felinine. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, (24), 4463-4465.
116. Natsch, A.; Schmid, J.; Flachsmann, F., Identification of Odoriferous Sulfanylalkanols in Human Axilla Secretions and Their Formation through Cleavage of Cysteine Precursors by a CS Lyase Isolated from Axilla bacteria. *Chem. Biodivers.* **2004**, 1, (7), 1058-1072.
117. Starckenmann, C.; Niclass, Y.; Troccaz, M.; Clark, A., Identification of the Precursor of (S)-3-Methyl-3-sulfanylhexan-1-ol, the Sulfury Malodour of Human Axilla Sweat. *Chem. Biodivers.* **2005**, 2, (6), 705-716.
118. Ribéreau-Gayon, P.; Dubourdiou, D.; Glories, Y.; Maujean, A., *Traité d'œnologie*. Dunod/La vigne ed.; 2004; p 584.
119. Jones, R. G., Pyrazines and Related Compounds. I. A New Synthesis of Hydroxypyrazines. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, 71, (1), 78-81.
120. Seifert, R. M.; Buttery, R. G.; Guadagni, D. G.; Black, D. R.; Harris, J. G., Synthesis of some 2-methoxy-3-alkylpyrazines with strong bell pepper-like odors. *J. Agric. Food Chem.* **1970**, 18, (2), 246-249.

121. Seifert, R. M.; Buttery, R. G.; Guadagni, D. G.; Black, D. R.; Harris, J. G., Synthesis and odor properties of some additional compounds related to 2-isobutyl-3-methoxypyrazine. *J. Agric. Food Chem.* **1972**, 20, (1), 135-137.
122. Ohta, A.; Aoyagi, Y.; Kurihara, Y.; Kojima, A.; Yusa, K.; Shimazaki, K., *Heterocycles* **1988**, 27, 437-444.
123. Ohta, A.; Aoyagi, Y.; Kurihara, Y.; Yusa, K.; Shimazaki, K.; Kurihara, T.; Miyamae, H., *Heterocycles* **1987**, 26, 437-444.
124. Masuda, H.; Mihara, S., Synthesis of alkoxy-, (alkylthio)-, phenoxy-, and (phenylthio)pyrazines and their olfactive properties. *J. Agric. Food Chem.* **1986**, 34, (2), 377-381.
125. Bramwell, A. F.; Payne, I. M.; Riezebos, G.; Ward, P.; Wells, R. D., Nuclear chlorination of alkylpyrazines. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1972**, 2004-2007.
126. Schulz, S.; Fuhlendorff, J.; Reichenbach, H., Identification and synthesis of volatiles released by the myxobacterium *Chondromyces crocatus*. *Tetrahedron* **2004**, 60, (17), 3863-3872.
127. Dickschat, J. S.; Reichenbach, H.; Wagner-Döbler, I.; Schulz, S., Novel Pyrazines from the Myxobacterium *Chondromyces crocatus* and Marine Bacteria. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 2005, (19), 4141-4153.
128. Candelon, N.; Shinkaruk, S.; Bennetau, B.; Bennetau-Pelissero, C.; Dumartin, M.-L.; Degueil, M.; Babin, P., New approach to asymmetrically substituted methoxypyrazines, derivatives of wine flavors. *Tetrahedron* **2010**, 66, (13), 2463-2469.
129. Adam, W.; Saha-Moller, C. R.; Ganeshpure, P. A., Synthetic Applications of Nonmetal Catalysts for Homogeneous Oxidations. *Chem. Rev.* **2001**, 101, (11), 3499-3548.
130. Sheldon, R. A., E factors, green chemistry and catalysis: an odyssey. *Chem. Commun.* **2008**, (29), 3352-3365.
131. Schlosser, M., *In Modern Synthetic Methods*. Scheffold, R Ed ed.; 1992; Vol. 6, p 227-271.
132. Lochmann, L., *Eur. J. Inorg. Chem.* **2000**, 6, 1115-1126.
133. Ellison, R. A.; Lukenbach, E. R.; Chiu, C.-w., Cyclopentenone synthesis via aldol condensation. Synthesis of a key prostaglandin intermediate. *Tetrahedron Lett.* **1975**, 16, (8), 499-502.
134. Thomas, N. R.; Gani, D., Synthesis of (2R)- and (2S)- [1-<sup>13</sup>C]-2-amino-2-methylmalonic acid: Chiral substrates for serine hydroxymethyltransferase. *Tetrahedron* **1991**, 47, (3), 497-506.
135. Weigl, M.; Wünsch, B., Synthesis of chiral non-racemic 3-(dioxopiperazin-2-yl)propionic acid derivatives. *Tetrahedron* **2002**, 58, (6), 1173-1183.
136. Zhou, M.; Diwu, Z.; Panchuk-Voloshina, N.; Haugland, R. P., A Stable Nonfluorescent Derivative of Resorufin for the Fluorometric Determination of Trace Hydrogen Peroxide: Applications in Detecting the Activity of Phagocyte NADPH Oxidase and Other Oxidases. *Anal. Biochem.* **1997**, 253, (2), 162-168.
137. Towne, V.; Will, M.; Oswald, B.; Zhao, Q., Complexities in horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of dihydroxyphenoxazine derivatives: appropriate ranges for pH values and hydrogen peroxide concentrations in quantitative analysis. *Anal. Biochem.* **2004**, 334, (2), 290-296.
138. Shinkaruk, S.; Lamothe, V.; Schmitter, J.-M.; Manach, C.; Morand, C.; Berard, A.; Bennetau, B.; Bennetau-Pelissero, C., Development and validation of two new sensitive ELISAs for Hesperetin and Naringenin in biological fluids. *Food Chem.* **2010**, 118, (2), 472-481.

## **Conception et développement d'une nouvelle méthode d'analyse de précurseurs d'arômes et d'indicateurs de maturité**

### **Résumé :**

Les analyses physico-chimiques des arômes du vin prennent aujourd'hui un essor considérable pour faciliter la prise de décision des professionnels de la vigne et du vin. Des analyses performantes, pour un certain nombre de molécules parmi les plus pertinentes, ont été développées (GC-MS, LC-MS). Cependant les techniques utilisées ne sont pas facilement transposables au sein des exploitations. L'objectif de cette thèse est donc de proposer un nouveau type de dosage peu onéreux et simple à mettre en œuvre. La technique envisagée est le dosage immunologique (tests ELISA) qui permet, pour quelques Euros, de doser directement sur le terrain les molécules pertinentes sans préparation préalable des échantillons. Les molécules visées (alkylméthoxypyrazines et précurseurs cystéinylés de thiols volatils) sont présentes dans les vins de Cabernet Sauvignon et de Sauvignon blanc.

**Mots clés :** précurseurs d'arômes (P3SH, P4MSP), thiols volatils, méthoxypyrazines (IBMP, IPMP), dosage immunologique, haptène.

### **Abstract :**

Physicochemical analyses of aromas are now expanded considerably to facilitate decision making professionals the vine and wine. Performance analyses for a number of the most relevant molecules have been developed (GC-MS, LC-MS). However the techniques used are not easily transferable to the holdings. The objective of this thesis is to propose a new type of assay inexpensive and simple to implement. The technique is considered the immunoassay (ELISA) that allows for a few Euros to assay directly in the field relevant molecules without prior preparation of the samples. The molecules in question (cysteinyllated precursors and alkylméthoxypyrazines) are present in the wines of Cabernet Sauvignon and Sauvignon Blanc.

**Key words :** aroma precursors (P3SH, P4MSP), volatile thiols, methoxypyrazines (IBMP, IPMP), immunoassay, haptén.