

N° d'ordre : 2721

# THÈSE

présentée à

**L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

par **M. Michaël JOURDES**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR**

SPÉCIALITÉ : **CHIMIE ORGANIQUE**

\*\*\*\*\*

**REACTIVITE, SYNTHÈSE, COULEUR ET ACTIVITE BIOLOGIQUE  
D'ELLAGITANNINS C-GLYCOSIDIQUES ET FLAVANO-ELLAGITANNINS**

\*\*\*\*\*

Soutenue le : 24 octobre 2003

Après avis de :

**MM. M. MOUTOUNET,  
C. ROLANDO,**

Directeur de Recherche INRA Montpellier  
Directeur de Recherche CNRS

**Rapporteurs**

Devant la commission d'examen formée de :

**MM. Y. GLORIES,  
M. MOUTOUNET,  
C. ROLANDO,  
S. GRELIER,  
C. SAUCIER,  
S.QUIDEAU,**

Doyen de la Faculté d'Enologie de Bordeaux  
Directeur de Recherche INRA Montpellier  
Directeur de Recherche CNRS  
Professeur à l'Université Bordeaux 1  
Maître de Conférence à l'Université Bordeaux 2  
Professeur à l'Université Bordeaux 1

**Président  
Rapporteurs**

**Examineurs**



*à mes parents ;*

*à ma sœur ;*

*à mes amis ;*

*pour leur présence de tous les instants,  
pour le soutien qu'ils m'ont apporté,  
avec toute mon affection et ma reconnaissance*



## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé en collaboration entre le Laboratoire de Chimie des Substances Végétales (LCSV) à l'Université Bordeaux 1 et le Laboratoire de Chimie Appliquée de la Faculté d'Œnologie à l'Université Bordeaux 2.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Alain Castellan pour m'avoir accueilli dans son laboratoire (LCSV) ainsi que Monsieur Yves Glories, Doyen de la Faculté d'Œnologie pour m'avoir également accueilli dans son laboratoire et pour avoir accepté d'être dans mon jury.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur Stéphane Quideau pour m'avoir accueilli dans son équipe et Monsieur Cédric Saucier Maître de conférence dans l'équipe du Professeur Yves Glories pour m'avoir fait profiter de leurs connaissances et expériences en matière de composés phénoliques et pour leurs aides durant la réalisation de ce travail.

Monsieur Michel Moutounet, Directeur de Recherche à l'INRA de Montpellier, et Monsieur Christian Rolando, Directeur de Recherche au CNRS, ont bien voulu s'intéresser à ce travail et ont accepté d'en être rapporteur. Je suis très honoré de leur présence dans ce jury, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Je tiens aussi à remercier Monsieur Stéphane Grelier, Professeur à l'Université Bordeaux 1 pour l'intérêt qu'il a manifesté pour ce travail en acceptant de faire partie du jury.

Je remercie également Monsieur Laurent Pouységu et Monsieur Denis Deffieux Maître de conférence dans l'équipe du Professeur Stéphane Quideau, ainsi que Madame ANNE-Marie Lamiday, pour leurs conseils et leur disponibilité.

Mes remerciements s'adressent aussi à Monsieur Michel Pétraud et à Monsieur Jean-Claude Lartigue pour l'aide qu'ils m'ont apporté en Résonance Magnétique Nucléaire, ainsi qu'à Madame Christiane Vitry pour l'enregistrement de certains spectres de masse.

Un grand merci à tous mes amis et collègues qui animent ou ont animé le Laboratoire de Chimie des Substances Végétales ainsi que le Laboratoire de Chimie Appliquée de la Faculté d'Œnologie.

Je tiens aussi à remercier le Centre Interprofessionnel des Vins de Bordeaux (CIVB) qui a soutenu financièrement ces recherches.

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE .....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE 1. GÉNÉRALITÉS SUR LES PRINCIPAUX POLYPHÉNOLS DU VIN, LEURS PROVENANCES ET LEURS ÉVOLUTIONS PENDANT LE VIEILLISSEMENT</b>	
<b>I-Introduction.....</b>	<b>3</b>
<b>II-Les flavonoïdes du raisin et du vin .....</b>	<b>3</b>
II-1-Introduction.....	3
II-2- Les tannins condensés ou proanthocyanidines .....	3
II-3-Les anthocyanes .....	5
II-3-1-Présentation.....	5
II-3-2-Équilibre des anthocyanes en fonction du pH .....	6
II-4-Biosynthèse des flavonoïdes.....	8
II-5-Mécanisme d'évolution de ces flavonoïdes dans le vin .....	11
II-5-1-Complexation avec les composés non flavonoïdes.....	11
II-5-2-Polymérisation des flavonoïdes dans le vin.....	12
II-5-2-1-Polymérisation directe .....	12
II-5-2-1-1-Polymérisation directe entre flavan-3-ols .....	12
II-5-2-1-2-Polymérisation directe entre flavan-3-ols et anthocyanes .....	14
II-5-2-2-Polymérisation par l'intermédiaire d'acétaldéhyde .....	16
II-5-2-2-1-Polymérisation par l'intermédiaire d'acétaldéhyde des flavan-3-ols .....	16
II-5-2-2-2-Polymérisation par l'intermédiaire d'acétaldéhyde des anthocyanes .....	18
II-5-2-2-3-Polymérisation entre flavan-3-ols et anthocyanes par l'intermédiaire d'acétaldéhyde.....	18
II-6-Activité biologique des flavonoïdes.....	19

<b>III-Les tannins du bois de chêne</b> .....	<b>20</b>
III-1-Introduction .....	20
III-2-Composition chimique du bois de chêne .....	20
III-2-1-Les composés macromoléculaires .....	20
III-2-2-Les composés extractibles.....	21
<i>III-2-2-1-Les composés phénoliques de faible masse moléculaire</i> .....	21
<i>III-2-2-1-Les tannins du bois de chêne</i> .....	22
III-3-Structure et localisation des ellagitannins C-glycosidiques du bois de chêne .....	22
III-4-Biosynthèse des tannins hydrolysables et plus particulièrement des ellagitannins C-glycosidiques .....	24
III-5-Evolution des ellagitannins C-glycosidiques dans le vin.....	27
III-5-1-Hydrolyse des ellagitannins C-glycosidiques.....	27
III-5-2-Complexation avec les protéines du vin.....	28
III-5-3-Formation de dérivés oxydés.....	28
<b>IV-Les tannins complexes</b> .....	<b>29</b>
IV-1-Introduction .....	29
III-2-Structure des flavano-ellagitannins.....	29
III-3-Hypothèse de formation des flavano-ellagitannins dans le vin.....	30

## **CHAPITRE 2. HÉMISYNTHÈSE DES FLAVANO-ELLAGITANNINS**

<b>I-Introduction</b> .....	<b>33</b>
<b>II-Hémisynthèse des acutissimines et épiacutissimines A et B en milieu organique</b> .....	<b>33</b>
II-1-Conditions opératoires de l'hémisynthèse des acutissimines A et B .....	33
II-2-Analyse des chromatogrammes de l'hémisynthèse des acutissimines A et B.....	34
II-3-Analyse des chromatogrammes de l'hémisynthèse des épiacutissimines A et B.....	35
II-4-Analyses structurales des acutissimines et épiacutissimines A et B.....	36
II-4-1-Analyse par CLHP-ESI-MS à -30 eV .....	36
II-4-2-Analyse par CLHP-ESI-MS à -60 eV .....	37
II-4-3-Analyse par RMN de l'acutissimine A et de l'épiacutissimine A.....	39



<i>II-4-4-Analyse par RMN de l'acutissimine B et de l'épiacutissimine B</i> .....	42
<b>III-Hémisynthèse des flavano-ellagitannins en milieu aqueux</b> .....	<b>44</b>
III-1-Hémisynthèse en milieu aqueux acide.....	44
III-2-Hémisynthèse en milieu modèle du vin.....	45
<b>IV-Hémisynthèse de l'éthylvescalagine</b> .....	<b>46</b>
IV-1-Conditions opératoires de l'hémisynthèse de l'éthylvescalagine.....	46
IV-2-Analyse des chromatogrammes de l'hémisynthèse de l'éthylvescalagine .....	47
IV-3-Analyse structurale l'hémisynthèse de l'éthylvescalagine .....	48
<i>IV-3-1-Analyse par CLHP-ESI-MS à -30 eV et à -60 eV</i> .....	48
<i>IV-3-2-Analyse par RMN de l'éthylvescalagine</i> .....	49
<b>V-Mécanisme de formation des flavano-ellagitannins ainsi que de l'éthylvescalagine</b> ....	<b>50</b>
<b>VI-Hémisynthèse des acutissimines et épiacutissimines C et D en milieu organique</b> .....	<b>52</b>
VI-1-Introduction.....	52
VI-2-Hydrolyse acide de la vescalagine et de la castalagine.....	53
<i>VI-2-1-Conditions opératoires de l'hydrolyse acide de la vescalagine et de la castalagine</i> .....	53
<i>VI-2-2- Analyse des chromatogrammes de l'hydrolyse acide de la vescalagine</i> .....	53
<i>VI-2-3-Analyse des chromatogrammes de l'hydrolyse acide de la castalagine</i> .....	54
<i>VI-2-4-Identification par RMN de la castaline et de la vescaline obtenues par hydrolyse</i> .56	
<i>VI-2-5-Epimérisation de la castaline en vescaline</i> .....	57
<i>VI-2-5-1-Conditions opératoires de l'épimérisation de la castaline en vescaline avec formation du vescalène</i> .....	57
<i>VI-2-5-2-Caractérisation du vescalène</i> .....	58
<i>VI-2-5-3-Mécanisme de l'épimérisation de la castaline en vescaline avec formation du vescalène</i> .....	60
VI-3-Hémisynthèse des acutissimines et épiacutissimines C et D .....	61
<i>VI-3-1-Condition opératoire de l'hémisynthèse des acutssimines et épiacutissimines C et D</i> .....	61
<i>VI-3-2-Analyse des chromatogrammes de l'hémisynthèse des acutissimines et épiacutissimines C et D</i> .....	62

<i>VI-3-3-Analyse structurale par CLHP-ESI-MS</i> .....	64
<i>VI-3-3-1-Analyse à -30 eV</i> .....	64
<i>VI-3-3-2-Analyse à -60 eV</i> .....	65
VI-4-Hémisynthèse de l'éthylvescaline .....	67
<i>VI-4-1-Conditions opératoires de l'hémisynthèse de l'éthylvescaline</i> .....	67
<i>VI-4-2-Analyse des chromatogrammes de l'hémisynthèse de l'éthylvescaline</i> .....	67
<i>VI-4-3-Analyses structurales de l'hémisynthèse de l'éthylvescaline</i> .....	68
<i>VI-4-3-1-Analyse par CLHP-ESI-MS à -30 eV et à -60 eV</i> .....	68
<i>VI-4-3-2-Analyse par RMN de l'éthylvescaline</i> .....	69
<b>VII-Mécanisme de formation des acutissimines des séries C et D ainsi que de l'éthylvescaline</b> .....	<b>70</b>
<b>VIII-Etude de la stéréosélectivité de l'attaque nucléophile conduisant à formation des flavano-ellagitannins</b> .....	<b>71</b>
VIII-1-Introduction .....	71
VII-2-Modélisation du cabocation intermédiaire à partir de la vescalagine et de la vescaline	72
<b>IX-Essai d'hémisynthèse des flavano-ellagitannins à partir de la castalagine</b> .....	<b>75</b>
<b>X-Conclusion</b> .....	<b>77</b>
<b>CHAPITRE 3. HÉMISYNTHESE D'ANTHOCYANO-ELLAGITANNIN ET DE THIOETHERVESCALAGINE</b>	
<b>I-Introduction</b> .....	<b>79</b>
<b>II-Purification de la malvidine-3-O-glucoside</b> .....	<b>79</b>
II-1-Introduction.....	79
II-2-Purification de la malvidine-3-O-glucoside par CLHP .....	80
<i>II-2-1-Introduction</i> .....	80
<i>II-2-2-Extraction</i> .....	80

II-2-3-Pré-purification avant isolation de la malvidine-3-O-glucoside.....	80
II-2-4-Séparation de la malvidine-3-O-glucoside.....	81
II-3-Purification de la malvidine-3-O-glucoside par chromatographie de partage centrifuge (CPC).....	82
II-3-1-Introduction .....	82
II-3-2-Comparaison entre CLHP et CPC.....	82
II-3-3-Choix du système de solvant .....	84
II-3-4-Application de la CPC à la purification de la malvidine .....	85
II-3-4-1-Système ternaire AcOEt/Butanol/Eau .....	85
II-3-4-2-Purification de la malvidine par CPC.....	86
II-3-4-2-1-Pré-purification sur Amberlist XAD 7 HP .....	86
II-3-4-2-2-Isolation de la malvidine par CPC .....	86
II-4-Conclusion .....	87
<b>III-Hémisynthèse d'un anthocyano-ellagitannin.....</b>	<b>87</b>
III-1-Conditions opératoires de l'hémisynthèse de l'adduit vescalagine-malvidine .....	87
III-2-Analyse des chromatogrammes de l'hémisynthèse de l'adduit vescalagine-malvidine ..	88
III-3-Analyse structurale de l'adduit vescalagine-malvidine .....	89
III-3-1-Analyse par CLHP-ESI-MS à +30 eV et à -60 eV .....	89
III-3-2-Comparaison des spectres UV.....	90
III-3-3-Analyse par RMN de l'adduit vescalagine-malvidine .....	91
III-5-Conclusion.....	92
<b>IV-Hémisynthèse d'un thioether d'ellagitannin.....</b>	<b>92</b>
IV-1-Condition opératoire de l'hémisynthèse du 4'-butanethiol-1-thioéthervescalagine.....	92
IV-2-Analyse des chromatogrammes de l'hémisynthèse du 4'-butanethiol-1-thioéthervescalagine .....	93
IV-3-Analyse structurale du 4'-butanethiol-1-thioéthervescalagine.....	94
IV-3-1- Analyse par CLHP-ESI-MS à -30 eV et à -60 eV .....	94
IV-3-2-Analyse par RMN du 4'-butanethiol-1-thioéthervescalagine.....	95
IV-5-Conclusion.....	97
<b>V-Conclusion .....</b>	<b>97</b>

## **CHAPITRE 4. DOSAGE DES FLAVANO-ELLAGITANNINS ET DE L'ETHYLVESCALAGINE DANS UN VIN ROUGE ELEVE EN FUTS DE CHENE**

<b>I-Introduction</b> .....	<b>99</b>
<b>II-Identification des flavano-ellagitannins et de l'éthylvescalagine dans le vin</b> .....	<b>99</b>
II-1-Extraction sélective d'un vin rouge.....	99
II-1-1-1 <sup>er</sup> étape sur gel XAD 7 HP .....	99
II-1-2-2 <sup>emè</sup> étapes sur gel TSK HW 40 F.....	100
II-2-Identification par CLHP-ESI-MS des acutissimnes et épiacutissimines A et B .....	101
II-3-Identification par couplage CLHP-ESI-MS de l'éthylvescalagine.....	102
<b>III-Dosage des flavano-ellagitannins et de l'éthylvescalagine dans un vin élevé en fûts de chêne par étalonnage interne</b> .....	<b>104</b>
III-1-Principe du dosage par étalonnage interne.....	104
III-2-Droite d'étalonnage des flavano-ellagitannins .....	105
III-3-Dosage des flavano-ellagitannins et de l'éthylvescalagine dans un vin rouge élevé en fûts de chêne .....	107
<b>IV-Conclusion</b> .....	<b>110</b>

## **CHAPITRE 5. PARTIE EXPERIMENTALE**

<b>I-Conditions expérimentales générales</b> .....	<b>111</b>
<b>II-Techniques d'analyse</b> .....	<b>111</b>
II-1-Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) .....	111
II-2-Spectrométrie infrarouge (IR).....	111
II-3-Spectrométrie de masse (SM) .....	112
II-4-Mesure du pouvoir rotatoire .....	112
II-5-Analyse par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) .....	112

<b>III-Méthode de modélisation moléculaire .....</b>	<b>125</b>
III-1-Étude conformationnelle par la méthode Monte-Carlo.....	125
III-2-Modélisation orbitalaire du carbocation benzylique intermédiaire .....	125
<b>IV-Synthèse et caractérisation des différents composés .....</b>	<b>126</b>
IV-1-Protocoles expérimentaux .....	126
IV-2-Carractéristique spectrales .....	131
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>165</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>169</b>



## AVERTISSEMENTS

Les composés sont désignés par un chiffre arabe en caractère gras.

Les références bibliographiques sont désignées un chiffre arabe placé en exposant et sont regroupées en fin de mémoire.

Les abréviations et notation utilisées dans ce document sont explicitées ci-dessous :

$^{13}\text{C}$	carbone 13
$^1\text{H}$	proton
CLHP	<b>C</b> hromatographie <b>L</b> iquide <b>H</b> aute <b>P</b> ression
COSY	<b>C</b> orrélation <b>S</b> pectroscop <b>Y</b>
d	doublet
dd	doublet dédoublé
D <sub>2</sub> O	eau deutérié
DEPT	<b>D</b> istortionless <b>E</b> nhancement by <b>P</b> olarisation <b>T</b> ransfert
ESI	<b>E</b> lectrospray <b>S</b> ource <b>I</b> onisation
HF	<b>H</b> artree- <b>F</b> ock
HMBC	<b>H</b> eteronuclear <b>M</b> ultiple <b>B</b> onding <b>C</b> onnectivity
HMQC	<b>H</b> eteronuclear <b>M</b> ultiple <b>Q</b> uantum <b>C</b> orrelation
IR	Infrarouge
$J$ (Hz)	constante de couplage exprimée en hertz
CLHP-ESI-MS	CLHP couplée à un spectromètre de masse à ionisation electrospray
LUMO	<b>L</b> owest <b>U</b> noccupied <b>M</b> olecular <b>O</b> rbital
q	quadruplet
RMN	Résonance magnétique nucléaire
s	singulet
SM	<b>S</b> pectrométrie de <b>M</b> asse
SMBR	<b>S</b> pectrométrie de <b>M</b> asse <b>B</b> asse <b>R</b> ésolution
SMHR	<b>S</b> pectrométrie de <b>M</b> asse <b>H</b> aute <b>R</b> ésolution
t	triplet
tr	temps de rétention
TFA	acide trifluoroacétique
THF	tétrahydrofurane

TNCG

Truncated Newton Conjugate Gradient

Les unités couramment utilisées sont citées ci-dessous :

°C	température en degrés Celsius
Å	Angström
eV	electron Volt
g	gramme
Hz	Hertz
MHz	MegaHertz
mg	milligramme
min	minute
mL	millilitre
mL/min	millilitre par minute
mm	millimètre
mmol	millimole
$\delta$ (ppm)	Déplacement chimique en partie par million
$\mu$ L	microlitre
$\mu$ m	micromètre
$\mu$ mol	micromole



## **INTRODUCTION GENERALE**



Les composés phénoliques sont des substances qui jouent un rôle important en œnologie. Ils sont responsables de la couleur et de l'astringence des vins.<sup>1</sup> Les polyphénols présents dans le vin sont majoritairement des flavonoïdes qui proviennent du raisin. Ces flavonoïdes sont localisés dans les parties solides du raisin comme les pépins et la pellicule, et sont extraits durant la fermentation alcoolique et la macération post-fermentaire.<sup>2</sup> Dès lors, les tannins condensés et les anthocyanes qui sont les principaux flavonoïdes du raisin participent à de nombreuses réactions chimiques.<sup>3,4</sup> L'étude de ces réactions et leur influence sur les qualités organoleptiques des vins rouge ont fait l'objet de nombreuse étude.

Dans le cas des vins de qualité, l'élevage en fûts de chêne permet au vin de s'enrichir en composés extractibles du bois. Parmi ceux-ci, les ellagitannins *C*-glycosidiques sont les moins étudiés malgré leur réactivité chimique qui les rend susceptibles à diverses transformations pouvant contribuer à la qualité et propriétés du vin. Ces ellagitannins *C*-glycosidiques diffusent facilement dans le vin, solution hydroalcoolique légèrement acide et oxygénée.<sup>5</sup> Bien sûr, dans ces conditions, les composés polyphénoliques se transforment rapidement. De nombreuses hypothèses ont été formulées pour expliquer leurs faibles teneurs dans les vins élevés en fûts de chêne. Mais jusqu'à ce jour aucune ne propose des interactions entre les ellagitannins *C*-glycosidiques et les autres composés phénoliques.

Nous présentons dans ce mémoire la validation d'une hypothèse sur l'existence d'un mécanisme général de l'évolution des ellagitannins *C*-glycosidiques dans les vins élevés en fûts de chêne.

Dans le premier chapitre de ce mémoire sont exposées les caractéristiques des principaux composés phénoliques présents dans le vin ainsi que leur évolution au cours de l'élevage et du vieillissement en bouteille. La synthèse de toutes ces données bibliographiques nous a alors conduit à la formulation de notre hypothèse de travail concernant l'évolution des ellagitannins *C*-glycosidiques dans le vin.

Le second chapitre traite de l'hémisynthèse en milieu organique, ainsi qu'en milieu modèle du vin, des flavano-ellagitannins qui sont des produits de condensation entre une unité flavan-3-ol et une unité ellagique. Après avoir réalisé leur caractérisation structurale, les effets

stéréoélectroniques régissant leur mécanisme de formation ont été rationalisés par modélisation moléculaire.

Dans le troisième chapitre nous présentons l'hémisynthèse du premier membre d'une nouvelle famille de composés, les anthocyano-ellagitannins qui comportent une unité anthocyanique connectée à une unité ellagique. La formation de cet anthocyano-ellagitannin résulte d'un mécanisme identique à celui conduisant aux flavano-ellagitannins. L'addition d'un composé comportant une fonction thiol à l'unité ellagique a également été effectuée.

Le quatrième chapitre concerne l'identification et la quantification de certains flavano-ellagitannins dans un vin rouge élevé en fûts de chêne.

Dans le cinquième chapitre sont reportés les protocoles et les techniques d'analyses utilisés et toutes les caractéristiques spectrales des produits d'hémisynthèse.

**GÉNÉRALITÉS SUR LES PRINCIPAUX POLYPHÉNOLS DU VIN,  
LEURS PROVENANCES ET LEURS ÉVOLUTIONS PENDANT LE  
VIEILLISSEMENT**



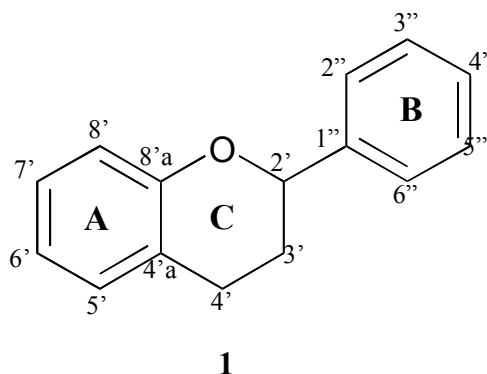
## I-Introduction

Ce chapitre présente les principaux composés phénoliques des vins rouges élevés en fûts de chêne ainsi que les différentes réactions qui interviennent sur ces molécules durant l'élevage et le vieillissement des vins. Ces polyphénols proviennent de deux sources majeures que sont les parties solides du raisin pour les flavonoïdes, et par l'intermédiaire de la barrique, les ellagitannins C-glycosidiques qui sont les principaux extractibles du chêne.

## II-Les flavonoïdes du raisin et du vin

### II-1-Introduction

Les flavonoïdes forment une grande famille de composés phénoliques ayant une structure commune en C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> de type phényl-2-benzopyrane (**1**) (Figure 1) qui se divisent en plusieurs sous familles se distinguant par le degré d'oxydation et la substitution en position 3 et 4 du cycle pyranique C. Les anthocyanes et les flavan-3-ols sont les principaux flavonoïdes présents dans les baies de raisin de type *Vitis vinifera* et donc dans les vins rouges.

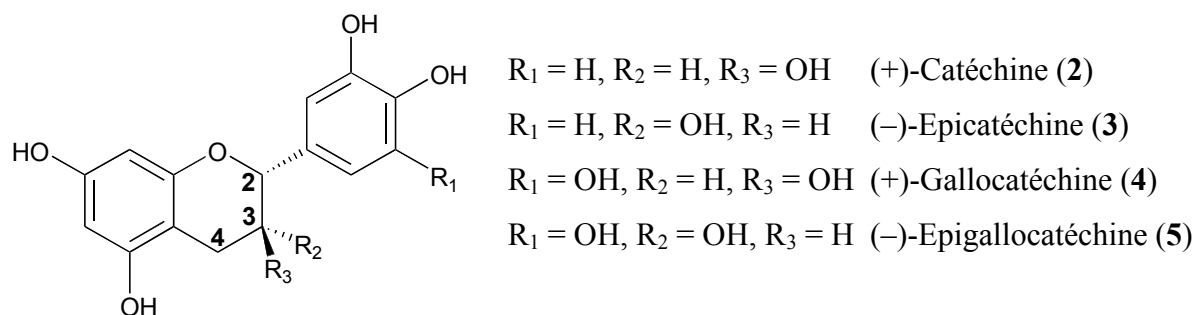


**Figure 1** : Structure générale des flavonoïdes

### II-2-Les tannins condensés ou proanthocyanidines

Les tannins du raisin sont responsables de nombreuses propriétés organoleptiques des vins, la principale étant l'astringence qui résulte de leur capacité à donner des combinaisons stables avec les protéines et notamment les protéines salivaires.<sup>6-8</sup> Les tannins condensés du raisin sont des polymères d'unités flavan-3-ols (Figure 2). Parmi ces tannins condensés, deux classes sont distinguées : les procyanidines qui sont des polymères d'unité (+)-catéchine (**2**) ou (-)-épicatéchine (**3**), et les prodelfinidines qui elles sont constituées d'unité (+)-

gallocatéchine (4) et (-)-épigallocatéchine (5). Dans chaque famille, le groupement hydroxyle en position 3 du cycle C peut être estérifié par l'acide gallique. La dénomination de ces deux familles provient de leur capacité à libérer en milieu acide à hautes températures les anthocyanidines correspondantes.<sup>9</sup>

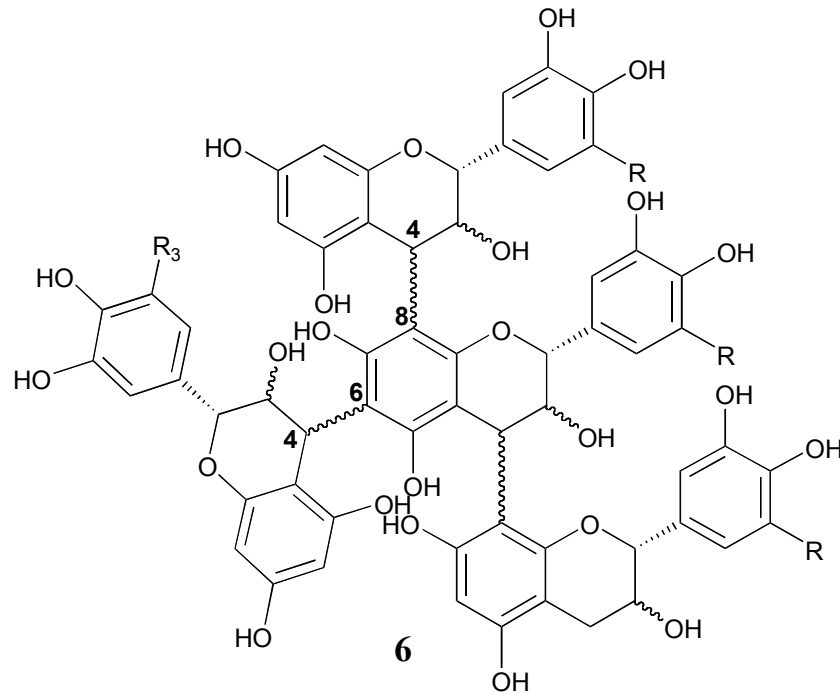


**Figure 2 :** Structure chimique des principaux monomères des tannins condensés du raisin

Au sein de la baie de raisin, les tannins condensés sont localisés principalement dans les pépins et dans les pellicules, bien que des traces aient été décelées dans la pulpe.<sup>10</sup> Dans les pépins, les tannins sont présents dans les enveloppes externes sous les cellules épidermiques, alors que dans les pellicules, les tannins se trouvent sous forme libre dans les vacuoles, mais aussi liés aux protéines et aux polysaccharides des membranes vacuolaires et des parois cellulaires.<sup>11,12</sup> Ils sont extraits pendant la fermentation alcoolique et la macération post-fermentaire. Leur teneur dans les vins rouges dépend du cépage et surtout des conditions de vinification ; elle est comprise entre 1 et 4 g/L.<sup>13</sup> Dans le cas des vins blancs sec, elle est comprise entre 100 et 300 mg/L.

Les pépins contiennent des quantités de tannins plus importantes que les pellicules avec un degré de polymérisation maximum plus faible (environ 20 pour les pépins et 30 pour pellicules).<sup>2,14</sup> A cela s'ajoute le grand nombre d'isomères possibles due à la diversité des unités monomères et des types de liaisons interflavanes liant les monomères entre eux en position C<sub>4</sub>/C<sub>8</sub> et C<sub>4</sub>/C<sub>6</sub> (Figure 3).<sup>15</sup> La complexité structurale des tannins rend difficile leur fractionnement et leur caractérisation.



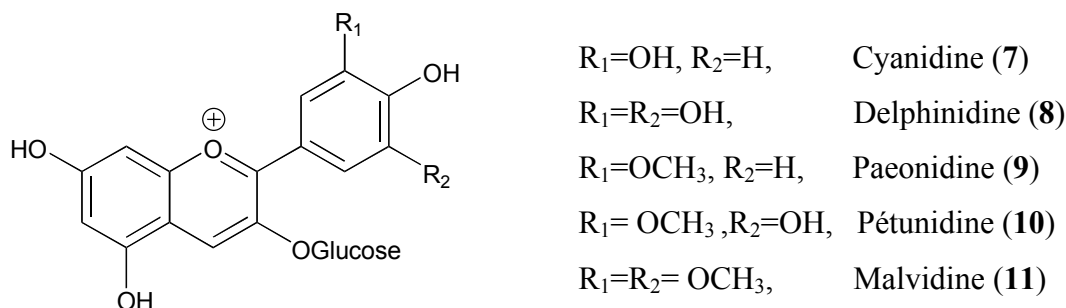


**Figure 3 :** Structure générale des proanthocyanidines du raisin (R= H : procyanidine, R= OH : prodelphinidines)

## II-3-Les anthocyanes

### II-3-1-Présentation

Les anthocyanes (du grec *anthos* = fleur et *kianos* = bleu) font partie de la famille des flavonoïdes et absorbent la lumière dans le visible. Leur présence dans les plantes est à l'origine de la couleur des fleurs, des fruits et des baies allant du rouge au bleu. Elles contribuent de façon prépondérante à la couleur des baies du raisin noir et sont localisées uniquement dans les vacuoles des cellules de l'épiderme de ces baies, sauf dans certains cépages dits "teinturiers" où elles sont également présentes dans la pulpe.<sup>16,17</sup> Elles sont extraites pendant la fermentation alcoolique et la macération post-fermentaire et sont responsables de la couleur des vins rouges jeunes. Leurs concentrations varient entre 350 et 1100 mg/L pour les vins rouges issus du raisin du genre *Vitis vinifera*.<sup>18</sup>



**Figure 4** : Structure des principales anthocyanes du raisin

Les anthocyanes du genre *Vitis vinifera*, qui est le genre couramment utilisé en Europe pour l'obtention des vins rouges de qualité, sont la cyanidine-3-*O*-glucoside (7), la delphinidine-3-*O*-glucoside (8), la paeonidine-3-*O*-glucoside (9), la pétunidine-3-*O*-glucoside (10), et la malvidine-3-*O*-glucoside (11) (Figure 4) qui est toujours majoritaire bien que la composition relative des anthocyanes varie selon les cépages. L'unité glucoside en position 3 peut être estérifiée par l'acide acétique<sup>19</sup> ou l'acide *p*-coumarique<sup>20</sup> conduisant à l'obtention des quinze anthocyanes généralement détectées dans les vins rouges. La présence d'anthocyanes ayant des unités glucosides en position 3 et 5 a été montrée pour des vins rouges obtenus à partir de raisin d'un genre différent de *Vitis vinifera*.

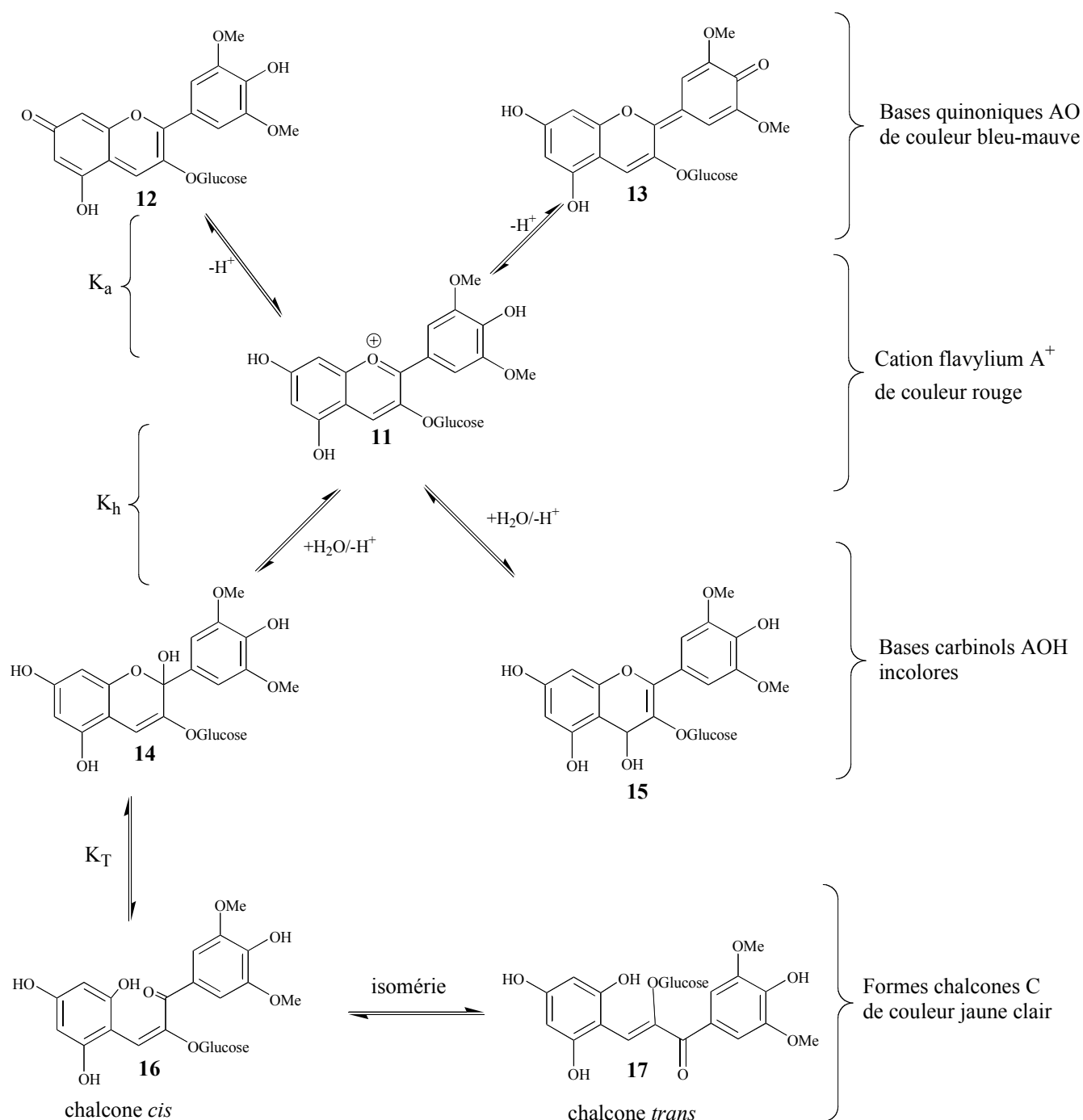
### II-3-2-Equilibre des anthocyanes en fonction du pH

La couleur des anthocyanes dépend de leur structure chimique mais également du milieu physico-chimique dans lequel elles se trouvent. Parmi les principaux facteurs de ce milieu influençant la couleur, on peut citer le pH, en fonction duquel quatre formes régies par un équilibre coexistent en milieu aqueux (Figure 5)<sup>21</sup> :

- le cation flavylium  $A^+$  **11**, de couleur rouge
- les bases quinoniques AO **12** et **13** de couleur bleu-mauve
- les pseudobases ou bases carbinols AOH **14** et **15** sont incolore
- les chalcones C *cis* **16** et *trans* **17**, de couleur jaune clair

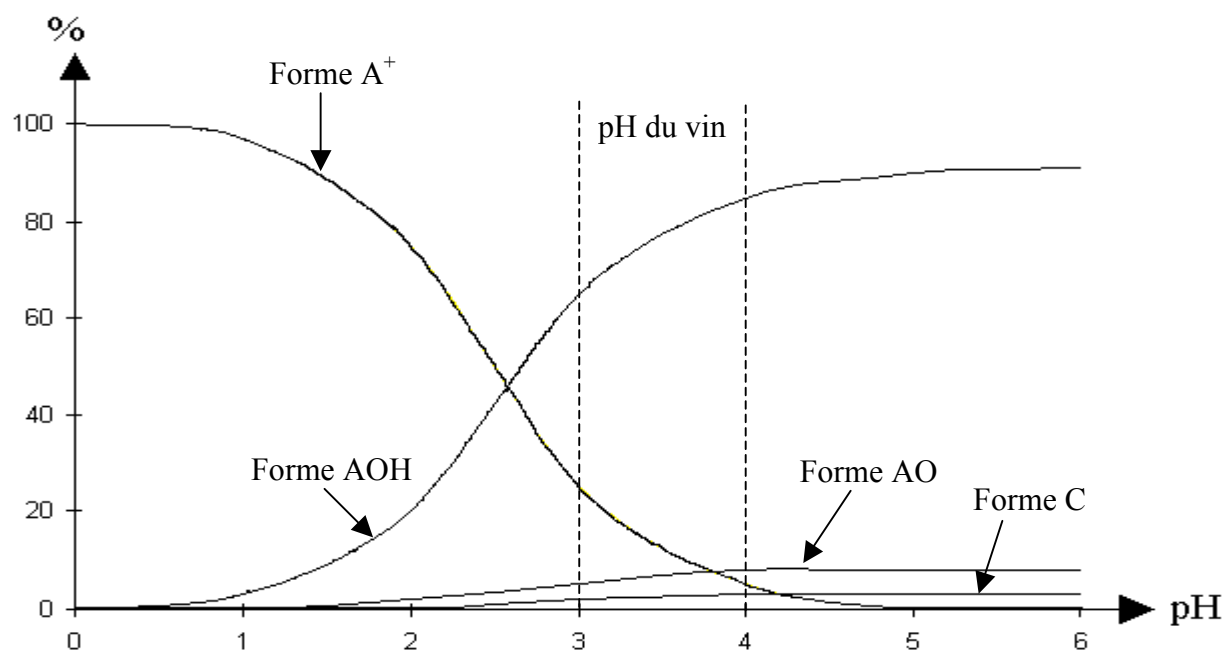
L'étude cinétique de ces équilibres a permis d'établir les vitesses des trois réactions régissant l'équilibre entre ces quatre formes ainsi que les constantes d'équilibre qui sont les suivantes  $K_a=([AO]/[A^+])aH^+$ ,  $K_b=([AOH]/[A^+])aH^+$ ,  $K_T=([C]/[AOH])aH^+$  où  $aH^+$  est

l'activité de l'ion hydronium (Figure 5). Dans le cas de la malvidine-3-*O*-glucoside (**11**) à 25° les constantes sont  $pK_a = 4,25$ ,  $pK_h = 2,70$  et  $K_T = 0,12$ .<sup>22,23</sup>



**Figure 5 :** Transformations structurales des anthocyanes en solution aqueuse acide représentées dans le cas de la malvidine-3-*O*-glucoside (**11**)

Dans les limites du pH du vin, entre 3,0 et 4,0, les formes prédominantes des anthocyanes sont les formes incolores AOH **14** et **15**, elles représentent entre 65 et 85 % de la totalité des anthocyanes. La forme flavylum  $A^+$  **11** rouge représente sur ce même intervalle de pH entre 4 et 28 % des anthocyanes. Les formes AO **12** et **13**, représentent également une part importante de l'intensité colorante globale, puisqu'elles représentent entre 2 et 5 % des anthocyanes totales. A pH 4, elles représentent le chromophore majoritaire, les formes chalcones **16** et **17**, étant faiblement colorées (Figure 6).<sup>24</sup>



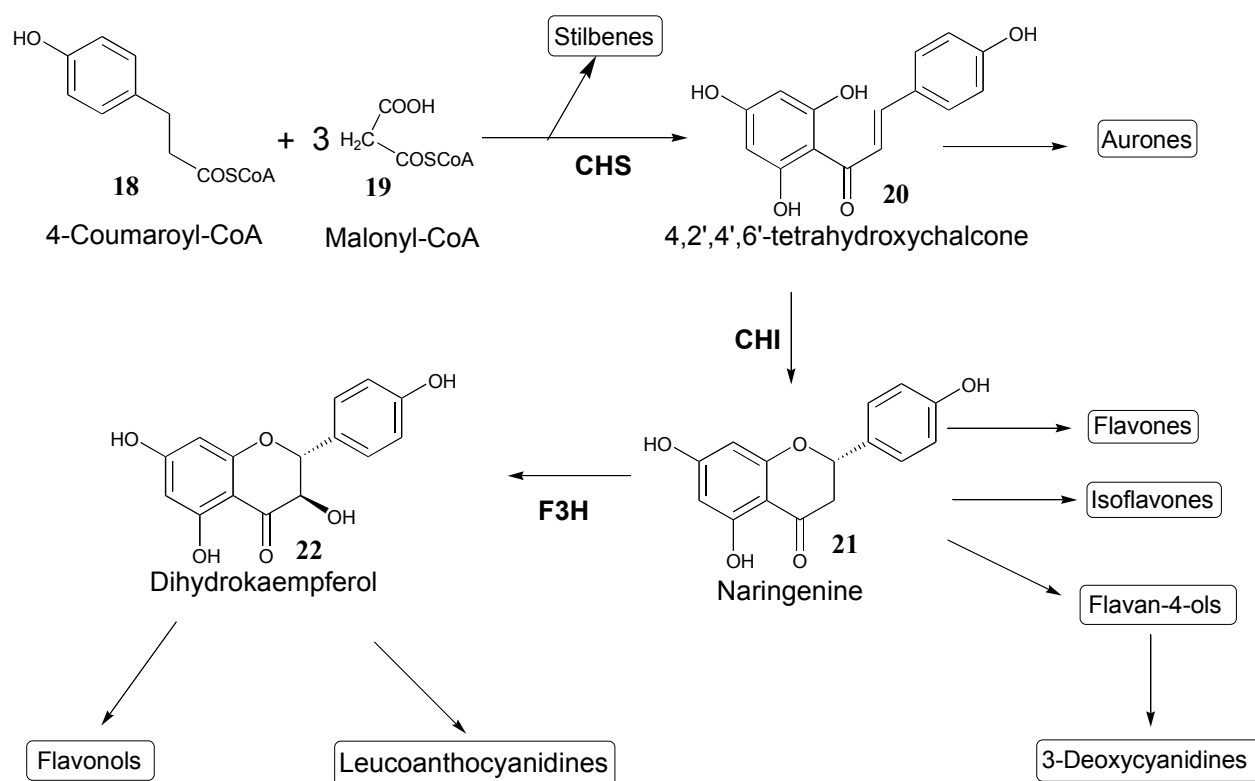
**Figure 6** : Évolution de la proportion des différentes formes des anthocyanes extraites des pellicules de cabernet sauvignon en fonction du pH

#### II-4-Biosynthèse des flavonoïdes

La voie de biosynthèse des flavonoïdes et plus particulièrement celle des anthocyanes a été extrêmement bien étudiée chez les fleurs, permettant la détermination des différentes étapes ainsi que des enzymes reliés à ces étapes.<sup>25-27</sup> La biosynthèse au niveau des baies de raisin de genre *Vitis vinifera* n'a été étudiée que plus récemment, et est identique à celle observée pour les fleurs.<sup>28</sup>

La première étape est la condensation entre le 4-coumaroyl-CoA (**18**) et trois unités malonyl-CoA (**19**) conduisant à la formation du squelette flavonoïde en  $C_{15}$ . Cette étape est catalysée par l'enzyme chalcone synthase (CHS) et conduit à la formation du 2',3',6',4-

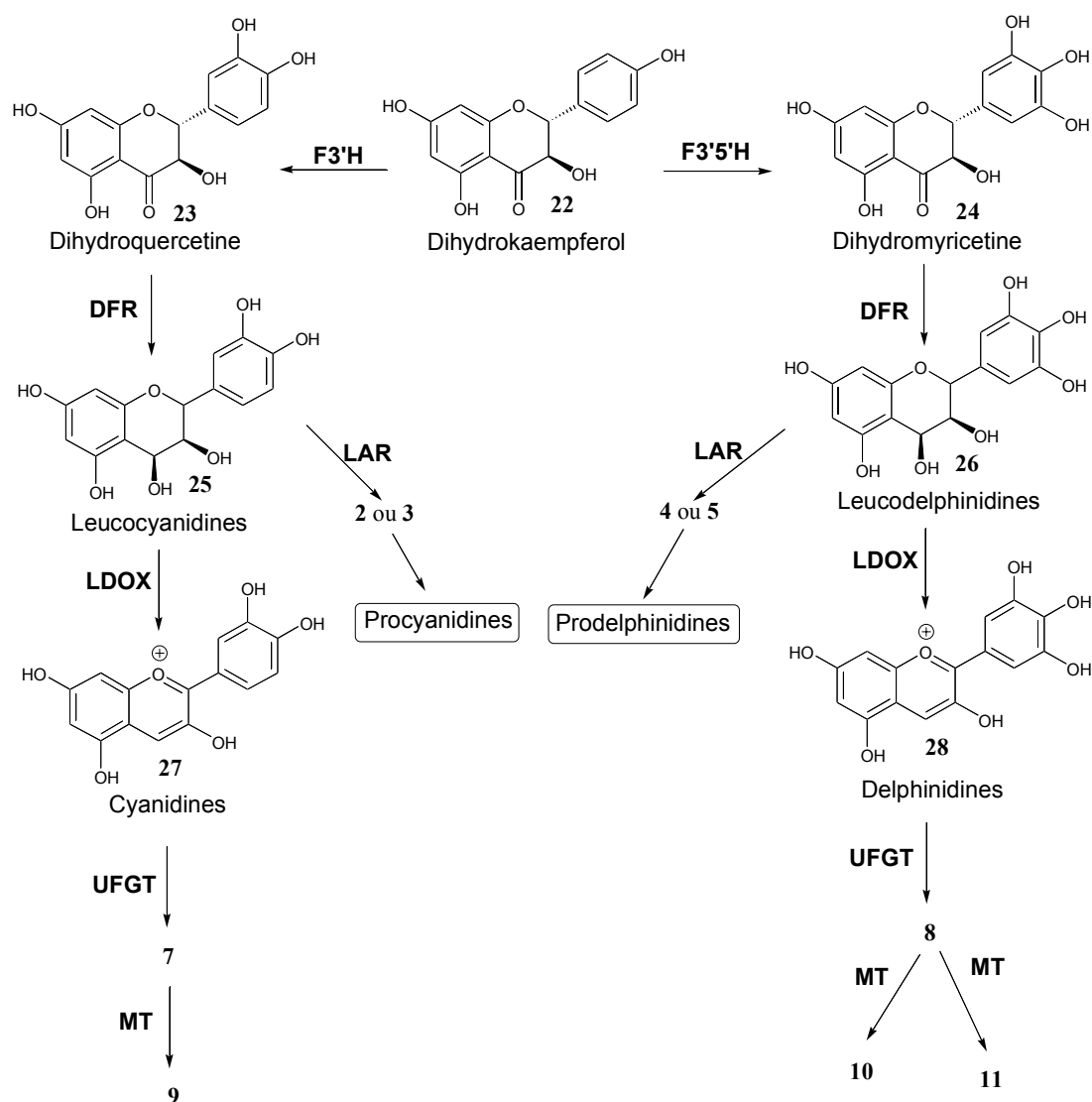
tétrahydrochalcone (**20**). La cyclisation stéréospécifique de cette chalcone conduit à la formation du cycle C du squelette flavonoïde. Cette cyclisation est catalysée par la chalcone isomérase (CHI) qui conduit à la formation de la naringénine (**21**), qui fait partie de la famille des flavanones. La chalcone **20** peut également conduire à la formation des aurones. La naringénine (**21**) obtenue par cyclisation est le précurseur de nombreuses sous familles de flavonoïdes comme les flavones, les isoflavones et les flavan-4-ols qui peuvent conduire aux 3-deoxycyanidines. La naringénine (**21**) peut également être hydroxylée en position 3 par la flavanone 3-hydroxylase (F3H) pour conduire au dihydrokaempferol (**22**), qui fait partie de la famille des flavanonols. Le dihydrokaempferol (**22**) peut aussi après déshydrogénation du cycle C et fonctionnalisation du cycle B former les flavonols (Figure 8).<sup>28,29</sup>



**Figure 8** : Mécanisme de biosynthèse général des flavonoïdes

Le dihydrokaempferol (**22**) est également l'intermédiaire à partir duquel le cycle B peut être fonctionnalisé de deux manières différentes, soit hydroxylé en position 3' par la flavonoïde-3'-hydroxylase (F3'H) pour former **23** ou en position 3' et 5' par la flavonoïde-3',5'-hydroxylase (F3'5'H) pour conduire à **24**. La réduction de la fonction cétone en position 4 de **23** et **24** par la dihydroflavanonol-4-réductase (DFR) conduit à la formation des leucoanthocyanidines **25** et **26**, qui sont les intermédiaires clés conduisant aux flavan-3-ols et

aux anthocyanes. Les flavan-3-ols **2**, **3**, **4**, et **5** sont obtenus par l'action de la leucoanthocyanidine 4-réductase (LAR) qui réduit la fonction alcool en position 4 des leucoanthocyanidines **25** et **26**. Les procyanidines et les prodelphinidines sont obtenus par polymérisation des flavan-3-ols correspondant. Les leucoanthocyanidines **25** et **26** peuvent également former sous l'action de la leucoanthocyanidine dioxygénase (LDOX) les anthocyanidines **27** et **28** qui conduisent aux anthocyanes **7** et **8** après glycosilation en position 3 par action de l'UDP glucose-flavonoïde-3-O-glucosyltransférase (UFGT). Les anthocyanes ainsi formées peuvent subir l'action de la méthyltransférase (MT) au niveau des fonctions hydroxy en position 3' et 5' ce qui conduit à la diversité de fonctionnalisation du cycle B pour obtenir les anthocyanes **9**, **10** et **11** (Figure 9).



**Figure 9** : Mécanisme de formation des différentes anthocyanes à partir de leur précurseur commun le dihydrokaempferol (**22**)

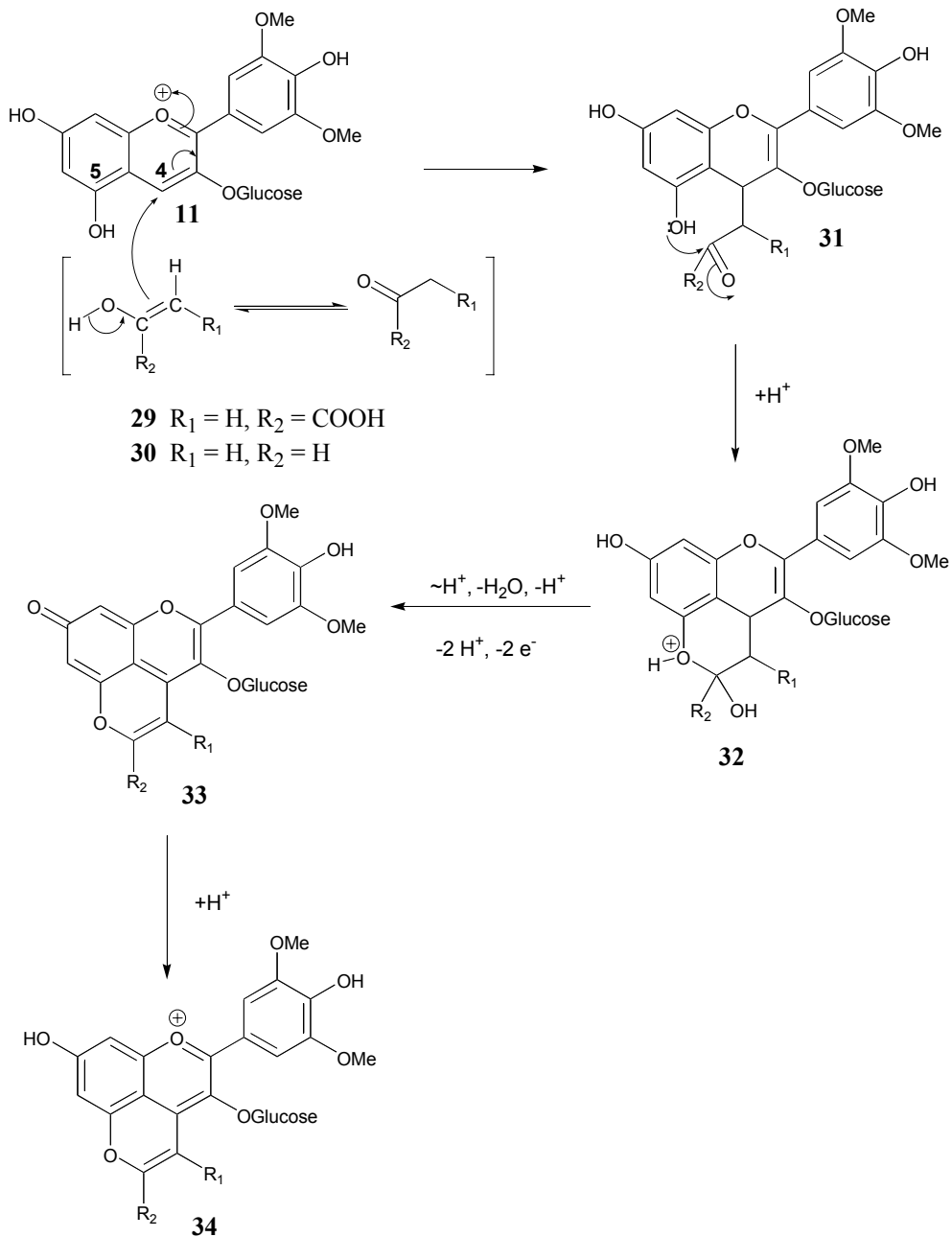
## II-5-Mécanisme d'évolution de ces flavonoïdes dans le vin

Les composés phénoliques, principalement les anthocyanes et les tannins condensés, subissent de nombreuses modifications à partir du moment où ils sont extraits du raisin. La teneur en anthocyanes chute de façon notable pendant les premiers mois d'élevage. Après quelques années, les anthocyanes présentes dans le raisin ont totalement disparu bien que le vin soit toujours rouge. Le vin, qui est une solution hydroalcoolique acide comportant de l'oxygène, est le siège de nombreuses réactions chimiques faisant intervenir les tannins, les anthocyanes ainsi que d'autres composés présents dans le vin. Ces transformations structurales modifient la couleur et l'astringence des vins au cours de leur vieillissement.<sup>30-32</sup>

### II-5-1-Réactions avec les composés non flavonoïdes

La présence de pigments orangés a récemment été observée dans les vins rouges et dans les vins de porto. Ces pigments résultent d'une addition sur les anthocyanes du raisin de la forme énol de l'acide pyruvique (**29**) ou de l'éthanal (**30**) (Figure 10).<sup>33,34</sup> L'addition sur les anthocyanes de différents métabolites de levure tel que le 4-vinylphénol, qui provient de la décarboxylation de l'acide *p*-coumarique par les décarboxylases des levures, conduit à la formation de produits de type **34** ( $R_1 = H$  et  $R_2 = para\text{-phénol}$ ).<sup>35-37</sup> Plus récemment, le produit d'addition de 8-vinylcatéchine (structure **34** avec  $R_1 = H$  et  $R_2 = 2$ ) a été détecté dans un vin de Porto.<sup>38-40</sup>

La formation de ces différents pigments résulte d'un même mécanisme de cyclisation d'une double liaison avec le carbone C<sub>4</sub> et le phénol en position-5 de l'anthocyane pour conduire à la formation d'un nouvel hétérocycle oxygéné. Les nouveaux pigments ainsi formés présentent alors un effet hypsochrome (diminution du maximum d'absorption dans le visible) par rapport aux anthocyanes natives.<sup>41</sup> Ils sont également plus stables et insensibles aux variations de pH ainsi que résistants à la décoloration par le dioxyde de soufre.<sup>35</sup>



**Figure 10** : Mécanisme d'addition des doubles liaisons sur la malvidine-3-O-glucoside (**11**)

## II-5-2-Polymérisation des flavonoïdes dans le vin

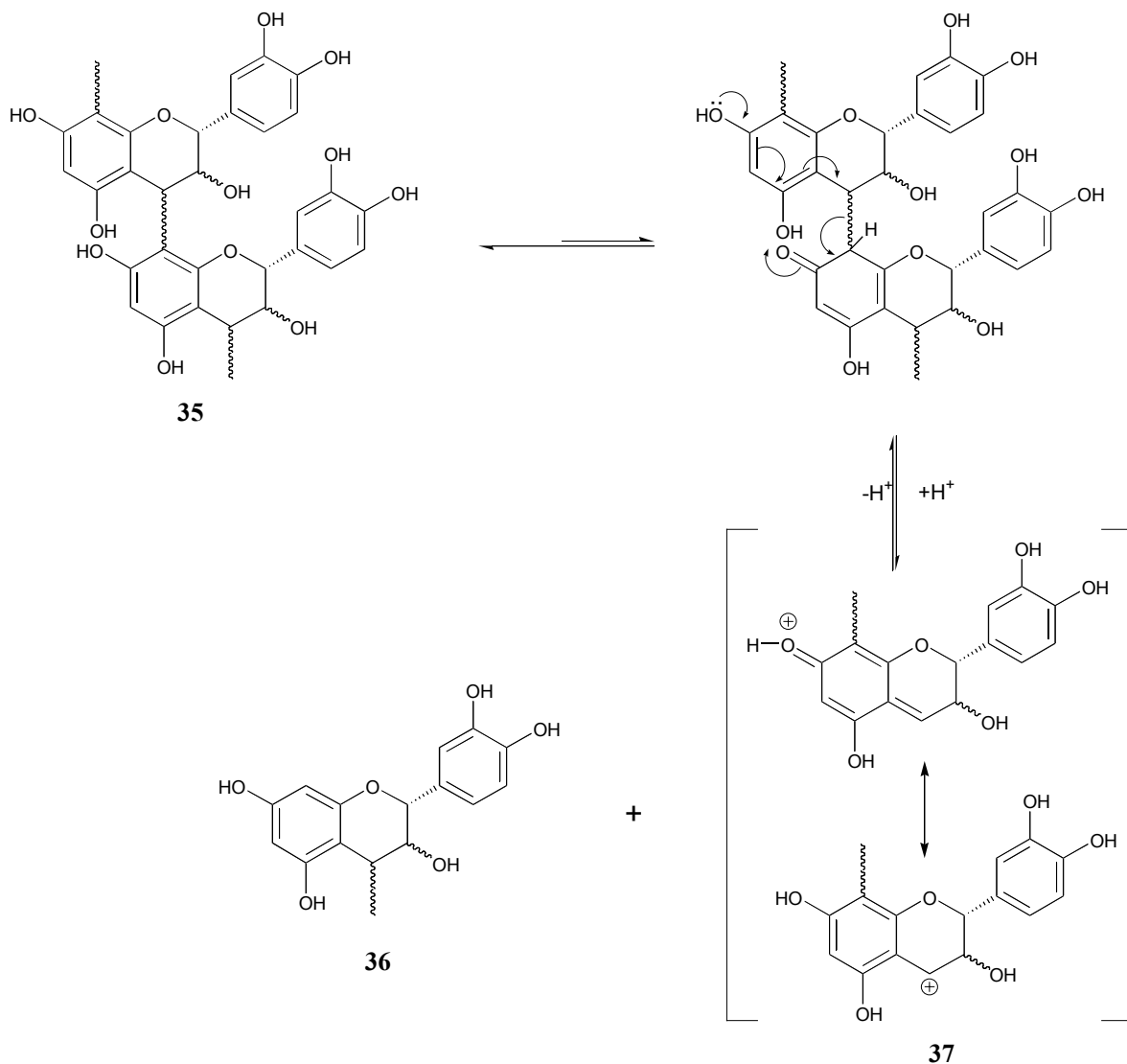
### II-5-2-1-Polymérisation directe

#### II-5-2-1-1-Polymérisation directe entre flavan-3-ols

Une solution d'oligomères de flavan-3-ols (degrés de polymérisation entre 2 et 5) en l'absence d'oxygène et de lumière en milieu acide d'un pH proche de celui du vin. Elle jaunit, brunit, puis un précipité se forme. L'apparition de ce précipité résulte de la polymérisation des



flavan-3-ols, dont les formes très polymérisées ne sont pas solubles dans l'eau. Cette polymérisation résulte d'une rupture, catalysée par l'acide, d'une liaison inter-flavane libérant l'unité flavan-3-ol **36** pour la partie inférieure et le cation **37**, pour la partie supérieure (Figure 11).<sup>42</sup> Le cation **37** peut subir l'attaque nucléophile des sommets 6 ou 8 d'un autre oligomère plus polymérisé que celui libéré par l'acide et ainsi augmenter le degré de polymérisation.<sup>43,44</sup> Ce type de réaction participe à la diminution et à l'assouplissement de l'astringence des vins au cours de leur vieillissement.



**Figure 11** : Hypothèse de polymérisation des procyanidines du vin

Si la rupture de la liaison inter-flavane est réalisée dans des conditions plus fortes (pH proche de 1, chauffage à 100°C pendant 30 min), on a alors libération de cyanidine de couleur

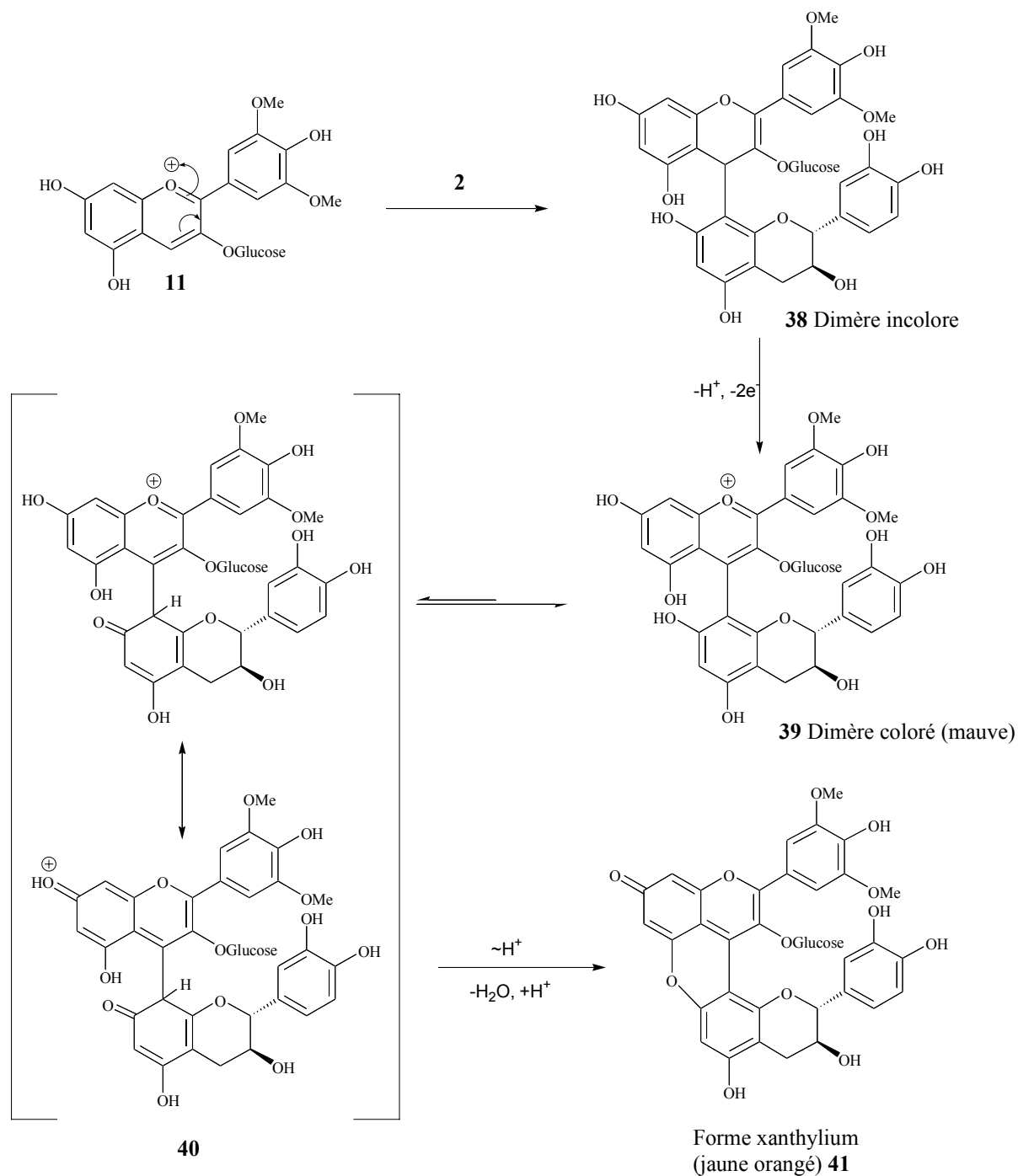
rouge, ce qui permet le dosage global des flavan-3-ols par colorimétrie.<sup>45</sup> Il est également possible de rompre la liaison inter-flavane en présence de thiols qui sont de bons nucléophiles, conduisant ainsi à la formation de thioéthers par piégeage du cation de type **37** par le thiol.<sup>46</sup> Cette méthode permet de connaître la stéréochimie des unités flavan-3-ols présentes ainsi que le degré de polymérisation moyen.<sup>2,14</sup>

#### *II-5-2-1-2-Polymérisation directe entre flavan-3-ols et anthocyanes*

Dans les pellicules du raisin, aucune interaction entre les anthocyanes et les flavan-3-ols n'a été observée compte tenu de leur compartimentation. Dans le vin, toutefois, les réactions entre ces deux familles de molécules existent et participent à la stabilisation de la couleur. Il existe principalement deux types de réaction selon le rôle électrophile ou nucléophile joué par les anthocyanes et les flavan-3-ols.

##### *Les anthocyanes en tant qu'électrophiles*

Cette réaction est initiée en raison du caractère électrophile du carbone C<sub>4</sub> des anthocyanes en milieu acide. Les anthocyanes subissent alors l'attaque nucléophile des sommets 8 ou 6 d'une unité flavan-3-ol pour former un dimère **38** dans lequel l'anthocyane est sous la forme flavène. La réaromatisation du cycle C de l'anthocyane conduit au produit **39** de couleur mauve.<sup>47-49</sup> Ce dimère coloré peut évoluer pour former une structure de type xanthylum **41** qui est de couleur jaune orangée ; cette évolution se faisant en passant par l'intermédiaire méthylène quinone **40**.<sup>50,51</sup>

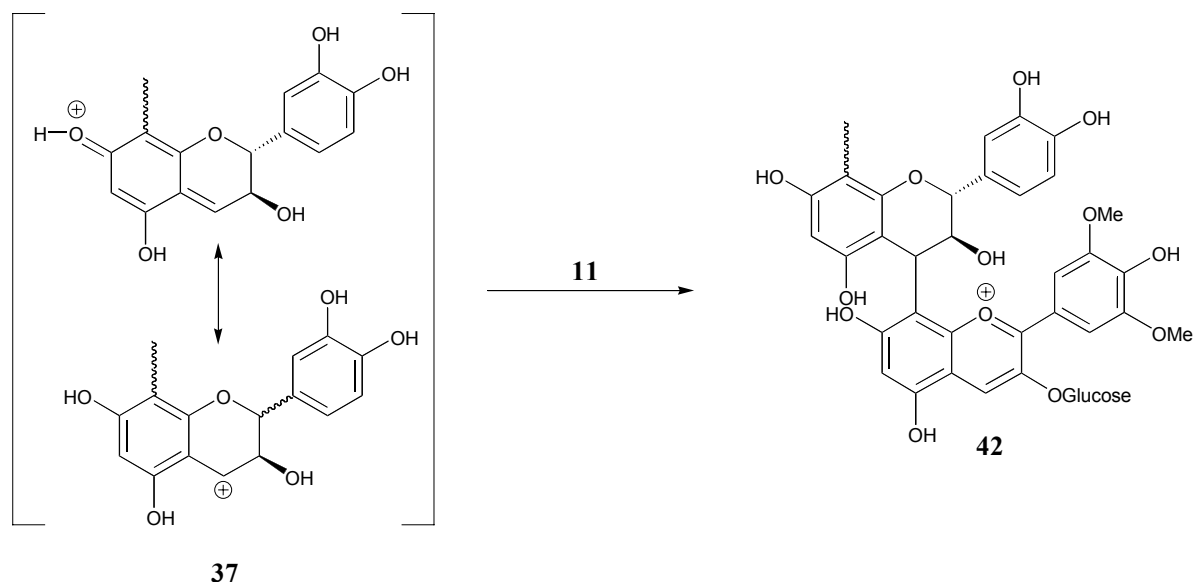


**Figure 12 :** Mécanisme de la condensation directe entre anthocyanes et flavan-3-ols. Exemple de la malvidine-3-O-glucoside (11) et de la (+)-cathéchine (2)

*Les flavan-3-ols en tant qu'électrophiles*

En absence d'oxygène et en milieu acide, la liaison inter-flavane peut se rompre pour conduire à la formation d'un cation de type 37, comme dans le cas de la polymérisation des

flavan-3-ols (Figure 11). Le cation **37** ainsi formé peut subir l'attaque nucléophile des sommets 6 ou 8 d'une anthocyane pour conduire à la formation d'un dérivé de couleur rouge orangé de type **42**.<sup>52,53</sup> Ces réactions intervenant en absence d'oxygène et de lumière, sont favorisées lorsque le vin est élevé en cuve étanche.<sup>53</sup>



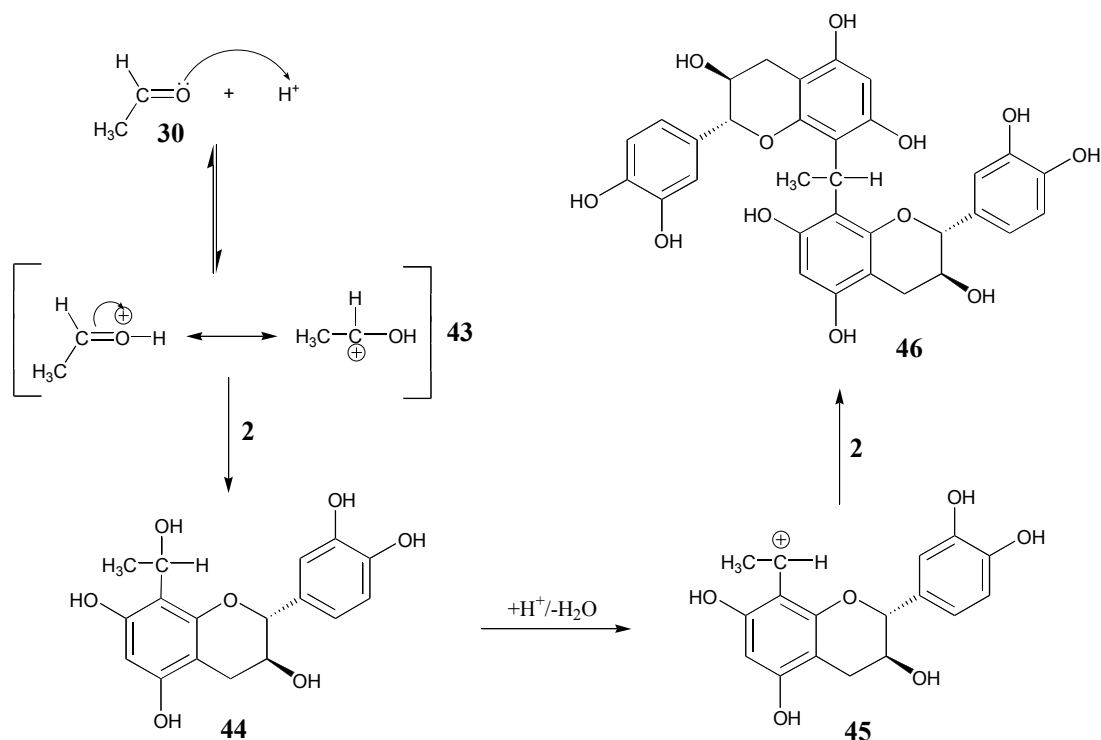
**Figure 13** : Autre type de condensation directe anthocyane-flavan-3-ol. Exemple de la malvidine-3-*O*-glucoside (**11**) et de la (+)-cathéchine (**2**)

#### II-5-2-2-Polymérisation par l'intermédiaire d'acétaldéhyde

##### II-5-2-2-1-Polymérisation par l'intermédiaire d'acétaldéhyde des flavan-3-ols

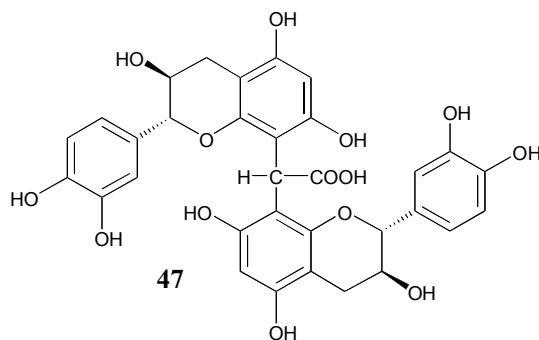
L'acétaldéhyde (**30**), présent dans le vin mais absent dans le raisin, est produit après la fermentation alcoolique durant l'élevage et le vieillissement du vin par oxydation chimique de l'éthanol<sup>54</sup> ou de manière biochimique par les levures.<sup>55</sup> Le vin étant une solution hydroalcolique acide, l'acétaldéhyde (**30**) présent peut être protoné pour former le cation intermédiaire **42**, qui peut subir l'attaque nucléophile des sommets 8 ou 6 d'un flavan-3-ol pour conduire à la formation de l'alcool benzylique **44**. Cet alcool **44** peut être déshydraté pour générer le cation benzylique **45** qui peut subir de nouveau l'attaque nucléophile d'une nouvelle unité flavan-3-ol pour conduire à la formation d'un pont éthyl entre les deux unités flavan-3-ols. Ce schéma réactionnel a été dans un premier temps confirmé en milieu modèle de vin par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse avec les flavan-3-ols

monomères.<sup>56,57</sup> Leur identification dans les vins rouges n'a été réalisée que plus récemment.<sup>58</sup>



**Figure 14** : Mécanisme de polymérisation entre deux (+)-catéchines (2) par l'intermédiaire d'éthanal (30)

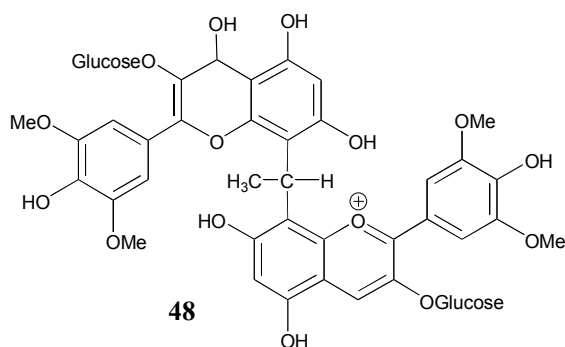
Un autre type de polymérisation indirecte entre deux unités flavan-3-ols a été mis en évidence en utilisant l'acide glyoxalique en remplacement de l'éthanal. L'acide glyoxalique peut provenir de l'oxydation de l'acide tartrique des vins en présence de fer. Les dimères ainsi formés sont incolores, mais évoluent rapidement vers des pigments jaunes au pH du vin.<sup>59</sup>



**Figure 15** : Structure d'un produit de condensation entre la (+)-catéchine (2) et l'acide glyoxalique

### II-5-2-2-2-Polymérisation par l'intermédiaire d'acétaldéhyde des anthocyanes

Récemment la dimérisation entre deux malvidine-3-*O*-glucosides (**11**) par l'intermédiaire d'un pont éthyle a été observée en milieu modèle du vin.<sup>60</sup> Le dimère ainsi obtenu présente plusieurs formes suivant le pH de la solution, chaque unité malvidine-3-*O*-glucoside (**11**) pouvant être sous leurs trois formes. Au pH du vin, la forme majoritaire comprend une unité malvidine-3-*O*-glucosides (**11**) sous la forme flavylum colorée A<sup>+</sup>(**11**) et l'autre sous la forme hydratée incolore AOH. Le dimère **48** entre deux malvidine-3-*O*-glucosides (**11**) séparées par un pont éthyl a été détecté dans le vin à forte teneur en éthanal (**30**), des trimères ont également été détectés.<sup>60</sup>

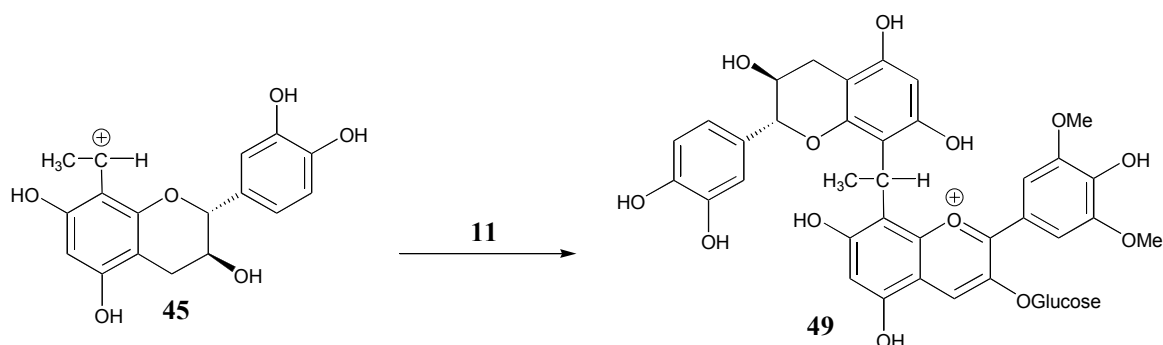


**Figure 16** : Structure du produit de condensation entre deux malvidine-3-*O*-glucosides (**11**) par intermédiaire d'un pont éthyl

### II-5-2-2-3-Polymérisation entre flavan-3-ols et anthocyanes par l'intermédiaire d'acétaldéhyde

Le mécanisme de formation de ces composés est similaire à celui présenté pour la polymérisation de deux unités flavan-3-ols par pont éthyle. Dans le cas présent, le carbocation benzylique (**45**) subit l'attaque nucléophile des sommets 8 et 6 d'une anthocyanine. Le composé **49** ainsi obtenu présente une couleur rouge-violette qui résulte d'un effet bathochrome (déplacement positif du maximum d'absorption dans le visible) par rapport aux anthocyanes natives.<sup>61,62</sup> De telles structures ont dans un premier temps été supposées et étudiées en milieu modèle puis des structures très diverses comprenant de une à plusieurs unités flavan-3-ols reliées par un pont éthyl à des anthocyanes ont été détectées par spectrométrie de masse dans les vins rouges.<sup>63-66</sup> La formation de ces composés est indispensable pour l'obtention d'un vin

rouge de qualité car ce sont de tels complexes qui remplacent les anthocyanes natives et sont responsables de la couleur des vins rouges après quelques années de vieillissement.



**Figure 17 :** Condensation entre flavanol-anthocyanes par intermédiaire de pont éthyl. Exemple de la (+)-catéchine (2) et de la malvidine-3-O-glucoside (11)

## II-6-Activité biologique des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires des plantes dont la principale raison de leur biosynthèse est de lutter contre les agressions de son environnement extérieur. Les plantes utilisent la capacité d'adsorption entre 280 et 315 nm de tous les flavonoïdes comme un filtre de protection contre les dommages pouvant être causés par les radiations UV-B sur leur ARN.<sup>67</sup> Les propriétés antibactériennes et antifongiques de nombreux flavonoïdes sont également utilisées par les plantes pour lutter contre toute invasion par des microorganismes. Les flavonoïdes jouent également un rôle dans la protection des plantes contre les insectes et les animaux herbivores. Dans ce cas, ce sont surtout les tannins qui sont mis à contribution pour leur capacité de complexation avec les protéines salivaires ou digestives en influençant le goût et la valeur nutritionnelle de la partie de la plante ingérée. C'est pour cette raison que de nombreux herbivores consomment préférentiellement les feuilles les plus jeunes, moins riches en tannins.<sup>67</sup>

Les flavonoïdes sont également utilisés dans une autre interaction entre le règne végétal et animal, cette fois pour attirer les insectes afin de réaliser la pollinisation des fleurs. L'adsorption dans le visible ou dans l'ultraviolet proche du visible attire alors certains insectes telle que les abeilles qui distinguent ces longueurs d'ondes. La couleur des fruits généralement due aux anthocyanes attire certains animaux et participe ainsi à la dispersion des

futures graines et à la propagation de l'espèce. La nécessité des flavonoïdes pour les plantes explique leurs présences dans toutes les parties constitutives de la plante que ce soit les feuilles, la tige ou les fleurs.<sup>25,67</sup>

### **III-Les tannins du bois de chêne**

#### **III-1-Introduction**

Simple contenant à l'origine, le fût de chêne s'est affirmé au fil des siècles comme le partenaire indispensable à la maturation des boissons alcoolisées et particulièrement des vins. Il est imperméable aux liquides mais perméable aux gaz et notamment à l'oxygène qui diffuse dans le vin et participe aux phénomènes de vieillissement oxydatif.<sup>68</sup>

Les trois espèces botaniques de chêne couramment utilisées en tonnellerie pour la construction des barriques sont le chêne pédonculé *Quercus robur* L., le chêne rouvre (ou sessile) *Quercus petraea* L. et le chêne blanc d'Amérique *Quercus alba* L.. Les deux premières espèces sont présentes en Europe depuis le nord de l'Espagne jusqu'en Russie. Leur bois est utilisé aussi bien pour l'élevage des vins que pour le vieillissement des eaux de vie. Le chêne blanc d'Amérique *Quercus alba* est largement répandu aux Etats-Unis, notamment au centre et sur la côte Est.<sup>69</sup> Il est principalement destiné au vieillissement des whiskies et des rhums.<sup>70,71</sup>

Le rôle du bois de chêne dans la maturation des vins et des eaux de vie est reconnu depuis longtemps.<sup>68,72,73</sup> L'une des principales caractéristiques de cette maturation est la dissolution d'extractibles constitutifs du bois qui amplifie la complexité aromatique et gustative des vins.<sup>74</sup> Ces extractibles sont soit présents initialement dans le bois de chêne soit issus de la dégradation thermique de la structure macromoléculaire du bois lors des chauffes réalisées au cours de la fabrication du fût.<sup>75,76</sup>

#### **III-2-Composition chimique du bois de chêne**

##### **III-2-1-Les composés macromoléculaires**

La composition chimique du bois de chêne au niveau macromoléculaire diffère peu de celle des autres types de bois et comporte trois types de structures : la cellulose qui représente

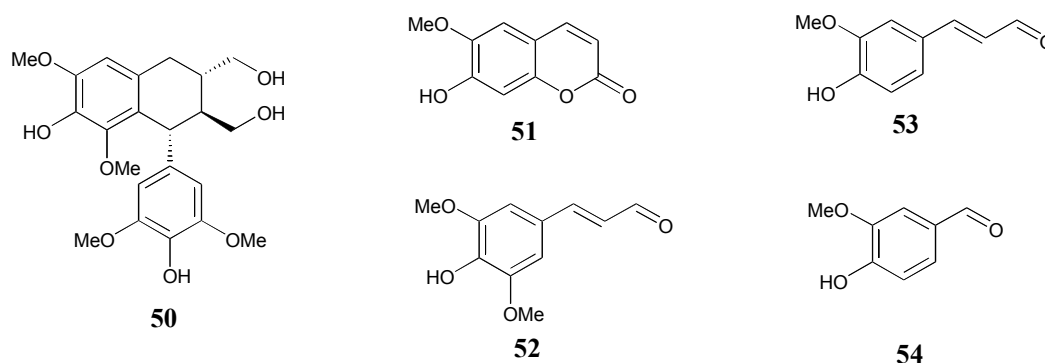


entre 40 et 45 pour cent de la masse de bois sec, les hémicelluloses qui représente entre 20 et 25 pour cent et la lignine qui représente entre 25 et 30 pour cent. Ces structures macromoléculaires dans leurs états natifs sont insolubles dans le vin.<sup>77,78</sup>

### III-2-2-Les composés extractibles

Le bois de chêne est particulièrement riche en extractibles, leurs proportions varient entre 2 et 10 pour cent de la masse de bois sec. Les extractibles du bois de chêne peuvent être divisés en trois groupes : les composés phénoliques de faible masse moléculaire (les lignanes, coumarines et les phénols simples), les composés phénoliques de forte masse moléculaire (les tannins hydrolysables et condensés) et les composés aliphatiques.<sup>79,80</sup>

#### III-2-2-1-Les composés phénoliques de faible masse moléculaire



**Figure 18 :** Exemples de structures des principaux composés phénoliques de faible masse moléculaire

Les composés phénoliques de faible masse moléculaire comportent trois grandes familles de composés que sont les lignanes, les coumarines et les phénols simples. Les lignanes sont très nombreux dans le bois de chêne, le premier et le plus abondant à avoir été isolé est le lyonirésinol (**50**) dont les teneurs dans le bois sont d'environ 40 µg/g.<sup>81,82</sup> Le lyonirésinol (**50**) est utilisé comme marqueur d'élevage en fûts de chêne pour les eaux de vie.

Les coumarines sont des benzo-pyrones substituées formées à partir d'acides hydroxycinnamiques. La scopolétine (**51**) est la plus abondante des coumarines identifiées

dans le bois de chêne. Elle est utilisée comme marqueur de la conservation des vins et des eaux de vie en fûts de chêne, sa concentration dans les vins étant d'environ 100 µg/l.<sup>83,84</sup>

Les phénols simples regroupent les acides phénols et les aldéhydes phénols des séries benzoïque et cinnamique. Les aldéhydes phénols telle que le sinapaldéhyde (**52**), le coniféraldéhyde (**53**) et la vanilline (**54**) qui sont des produits de thermodégradation de la lignine, ils participent au caractère aromatique boisé des vins et des eaux de vie élevés en fûts de chêne.<sup>80,85,86</sup>

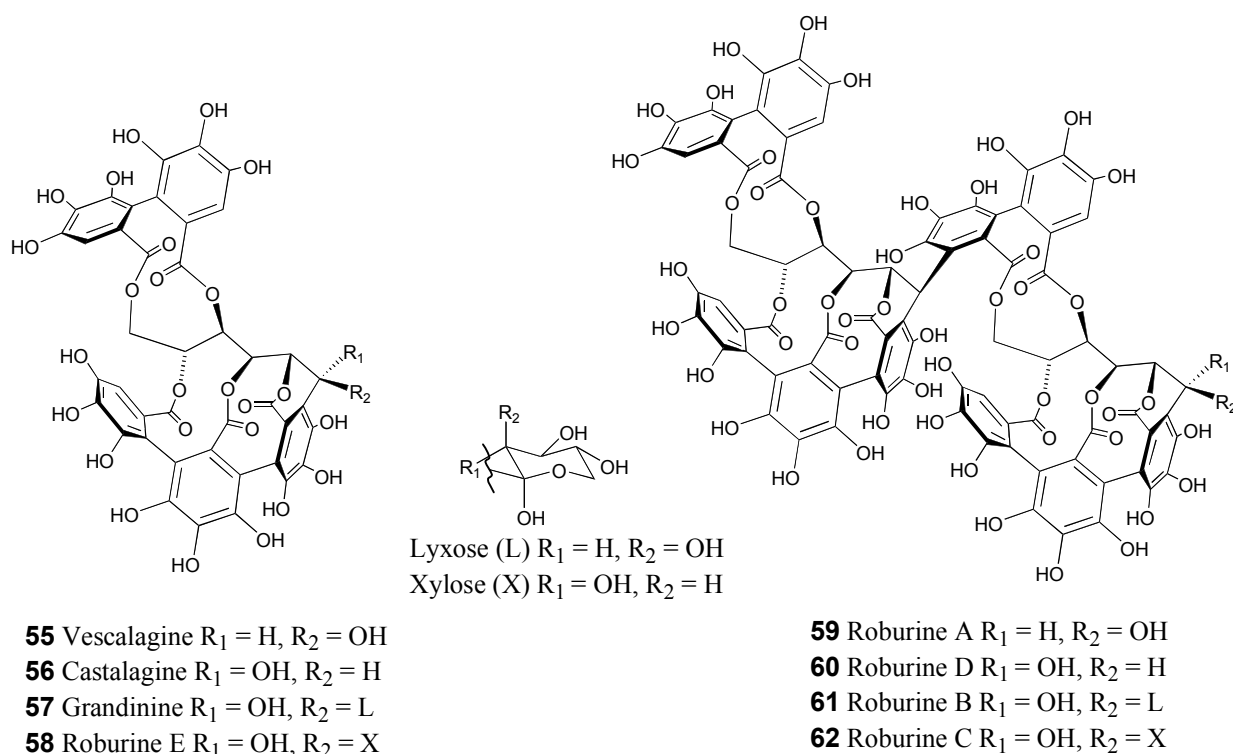
### III-2-2-1-Les tannins du bois de chêne

Les tannins du bois de chêne sont divisés en deux familles : les tannins condensés uniquement situés dans l'écorce et les feuilles en faibles quantités, et les tannins hydrolysables.<sup>87</sup> Les deux sous familles de tannins hydrolysables sont présentes dans le bois de cœur de chêne : les gallotannins présents en très faibles quantités ainsi que les ellagitannins et plus particulièrement les ellagitannins C-glycosidiques qui sont les extractibles majoritaires du bois de cœur des chênes *Quercus robur* et *Quercus petraea*.<sup>88</sup>

### III-3-Structure et localisation des ellagitannins C-glycosidiques du bois de chêne

Les ellagitannins C-glycosidiques sont des métabolites secondaires très présents chez les angiospermes dicotylédones et particulièrement dans le genre *Quercus*. Ils comportent une chaîne glucose ouverte estérifiée par au moins une unité 6,6'-dicarbonyl-2,2',3,3',4,4'-hexahydroxydiphénoyle trivialement appelé hexahydroxydiphénoyle (HHDP).<sup>89,90</sup>

La vescalagine (**55**) et la castalagine (**56**) sont les deux premiers ellagitannins C-glycosidiques à avoir été isolés et caractérisés dans le bois de cœur de chêne du genre *Quercus robur* et *Quercus petraea*.<sup>91,92</sup> Elles ont pour structure une chaîne glucose ouverte estérifiée en position 4 et 6 par une unité hexahydroxydiphénoyle (HHDP) et une unité nonahydroxyterphénoyle (NHTP) estérifiée en position 2, 3, et 5 avec une liaison C-glycosidique entre le carbone du glucose et la position 2 de l'unité trihydroxyphénoyle. Six autres ellagitannins C-glycosidiques sont connus dans bois de cœur de chêne la grandinine (**57**)<sup>93</sup> et les roburine A-E (**58-62**)<sup>94,95</sup> (Figure 19).



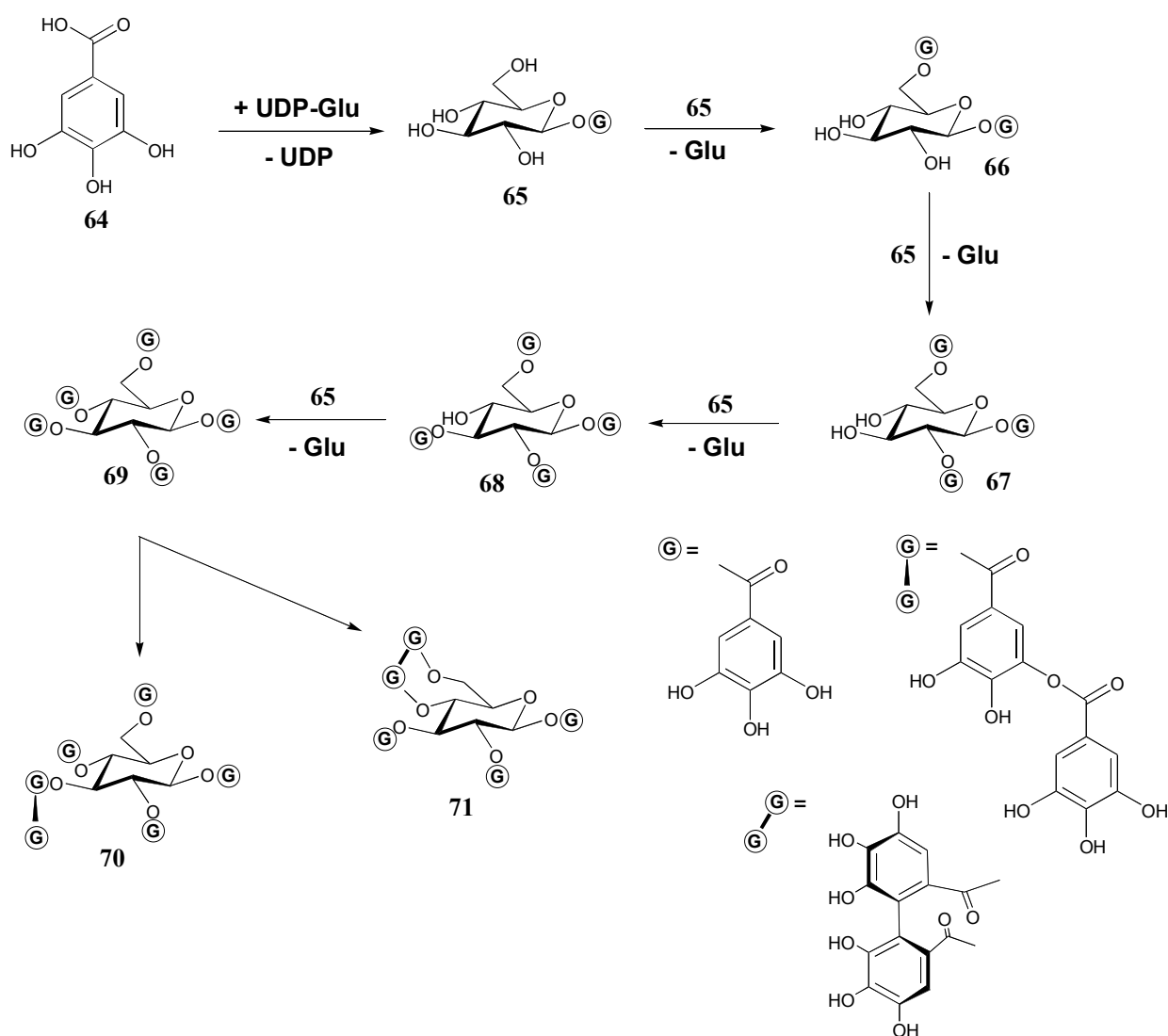
**Figure 19** : Structure des huit ellagitannins identifiés dans le bois de chêne

Les ellagitannins C-glycosidiques sont principalement localisés dans les rayons ligneux et les vacuoles des parenchymes.<sup>96</sup> Leurs teneurs sont plus fortes dans les zones périphériques du bois de cœur (duramen) qu'en son centre. Cependant, l'aubier qui est la partie vivante du bois, ne renferme que de faibles quantités de ellagitannins C-glycosidiques. Les teneurs en ellagitannins C-glycosidiques ne sont pas caractéristiques d'une espèce. En effet, la variabilité inter-individuelle est supérieure à la variabilité inter-espèce entre les chênes *Quercus robur* et *Quercus petraea*. Cependant, les chênes pédonculés *Quercus robur* L. ont généralement des teneurs en ellagitannins supérieures aux chênes rouvres *Quercus petraea*.<sup>97,98</sup>

La quantité moyenne des ellagitannins C-glycosidiques est d'environ 20 à 80 mg/g de bois de cœur sec. Ces teneurs varient énormément suivant les auteurs et les techniques d'analyses utilisées pour la quantification. Les deux principales techniques sont la quantification par CLHP des huit différents ellagitannins C-glycosidiques séparément, et le

dosage de l'acide ellagique (**63**) libéré par hydrolyse acide (Figure 23). Cette dernière technique fournit toujours des résultats supérieurs à la quantification par identification.<sup>99,100</sup>

### III-4-Biosynthèse des tannins hydrolysables et plus particulièrement des ellagitannins C-glycosidiques

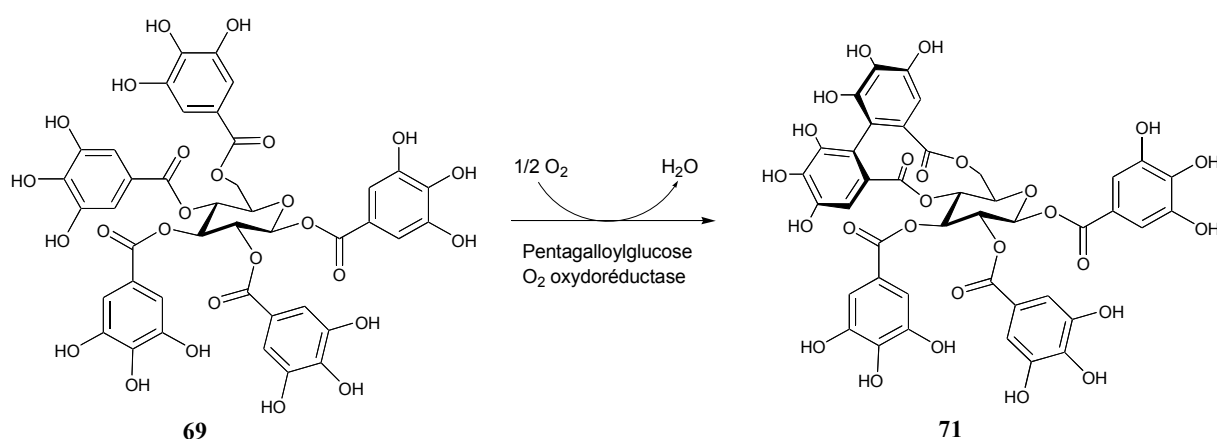


**Figure 20** : Séquence enzymatique catalysant la biosynthèse de **69**

La voie de biosynthèse des ellagitannins peut être divisée en deux parties. Premièrement la galloylation enzymatique du D-glucopyranose par de l'acide gallique (**64**) libre aboutit à la formation du 1-O-galloyl-D-glucopyranose (**65**). Cette première espèce galloylée conduit par transgalloylation enzymatique successive au 1,6-O-digalloyl-D-glucopyranose (**66**), 1,2,6-O-trigalloyl-D-glucopyranose (**67**), 1,2,3,6-O-tetragalloyl-D-glucopyranose (**68**) et finalement au 1,2,3,4,6-O-pentagalloyl-D-glucopyranose (**69**) (Figure 20). Le 1,2,3,4,6-O-

pentagalloyl- $\beta$ -D-glucopyranose (**69**) est considéré comme le précurseur des gallotannins et des ellagitannins.<sup>90,101,102</sup>

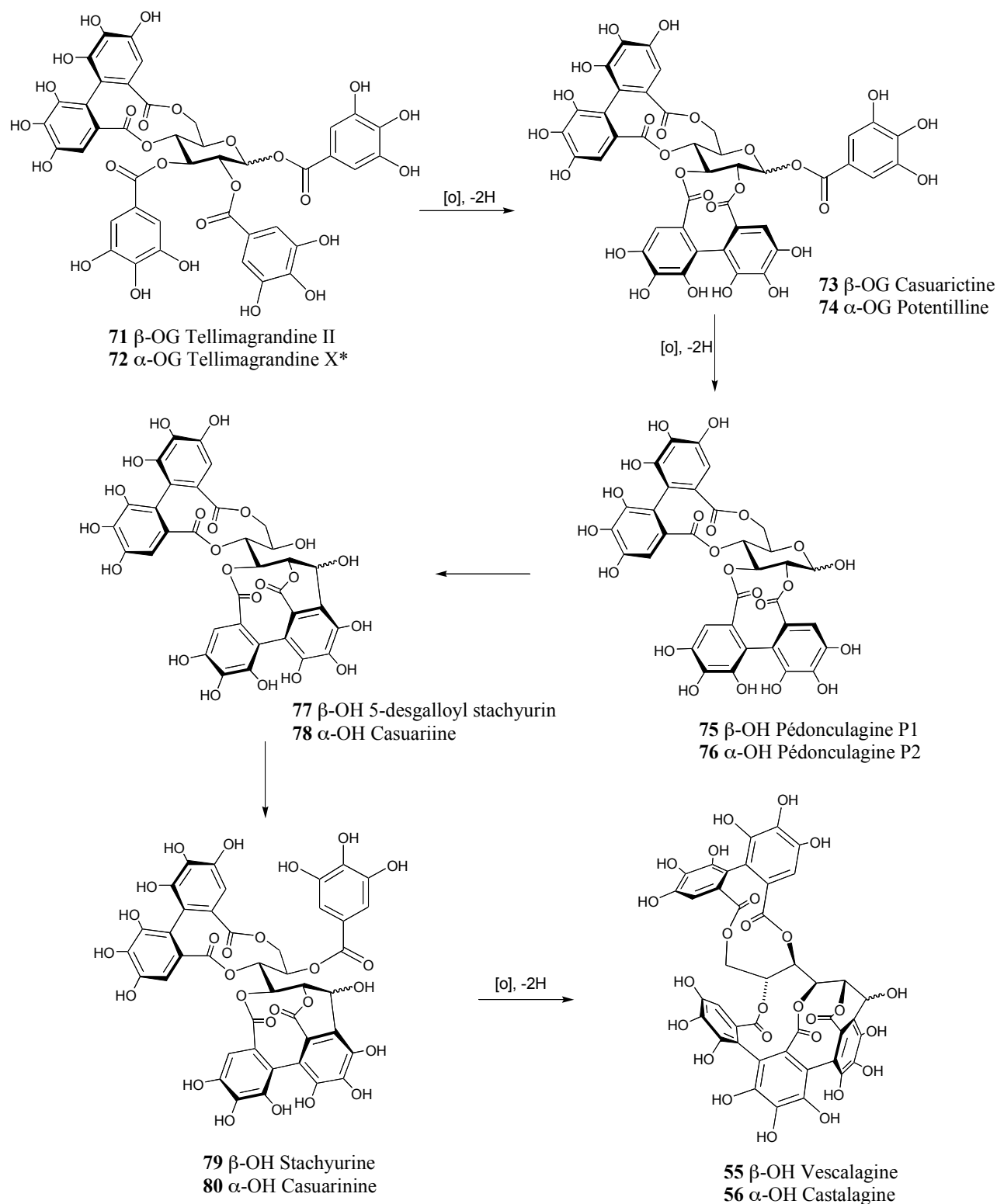
Les gallotannins sont obtenus par l'action d'une galloyltransférase qui estérifie l'un des phénols des groupements galloyles par l'acide gallique (**64**) libre, conduisant à la formation de structure de type **70**. Le 1,2,3,4,6-*O*-pentagalloyl- $\beta$ -D-glucopyranose (**69**) conduit également aux ellagitannins par déhydrogénation (oxydative) et couplage entre deux unités galloyles proches et ainsi conduire à la formation de la tellimagrandine II (**71**), premier de tous les ellagitannins. De nombreuses hypothèses de couplage oxydatif chimique ont été postulées pour expliquer la formation de la liaison carbone-carbone biarylique entre deux unités galloyles voisines,<sup>90</sup> et récemment, l'enzyme responsable de ce couplage a été isolée (Figure 21).<sup>103</sup>



**Figure 21** : Transformation enzymatique du 1,2,3,4,6-*O*-pentagalloyl- $\beta$ -D-glucopyranose (**69**) en tellimagrandine II (**71**)

La vescalagine (**55**) et la castalagine (**56**) sont formées à partir de la tellimagrandine II (**71**) par formation d'une nouvelle liaison biarylique entre deux unités galloyl voisines pour conduire à la casuarictine (**73**) et à la potentilline (**74**), qui par hydrolyse de l'unité galloyl en C<sub>1</sub> conduit aux pédonculagines P1 (**75**) et P2 (**76**). L'ouverture du cycle D-glucopyranose de **75** et **76** conduisent à la formation de la 5-désgalloylstachyurine (**77**) et à celle de la casuariine (**78**). La galloylation de l'alcool secondaire, formé par ouverture du cycle D-glucopyranose, mène à la formation de la stachyurine (**79**) et de la casuarinine (**80**) qui en

formant une nouvelle liaison biarylique entre l'unité galloyl libre et l'HHDP inférieur permet la formation de la vescalagine (**55**) et la castalagine (**56**) (Figure 22).<sup>104</sup>



**Figure 22 :** Évolution de la tellimagrandine II (**71**) vers la vescalagine (**55**) (\*composé n'ayant pas encore été isolé)

Une telle évolution de la tellimagrandine II (**71**) vers la vescalagine (**55**) et la castalagine (**56**) en passant par les pédonculagines **75** et **76** n'a pas été montrée dans le bois de cœur de chêne. Cependant, une évolution identique a été observée dans les feuilles de différents chênes et notamment chez *Quercus robur*,<sup>102</sup> où des feuilles récoltées en avril comportaient majoritairement de la tellimagrandine II (**71**), alors que celles récoltées en mai comportaient majoritairement les pédonculagines **75** et **76**, et enfin celles récoltées entre juillet et septembre comportaient majoritairement de la casuarinine (**80**), précurseur direct de la castalagine (**56**).<sup>105</sup> L'hypothèse d'un tel schéma d'évolution de la tellimagrandine II (**71**) vers la vescalagine (**55**) et la castalagine (**56**) est donc réaliste sachant que les pédonculagines **75** et **76** ont également été isolées dans le bois de cœur de ces chênes *Quercus robur* et *Quercus petraea*.

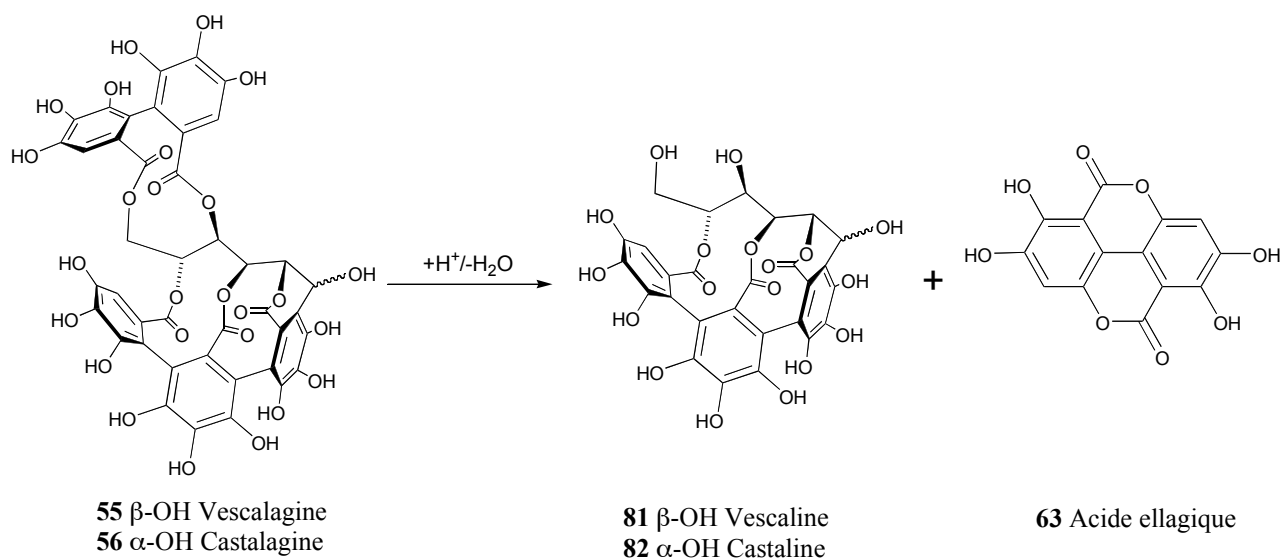
### III-5-Evolution des ellagitannins C-glycosidiques dans le vin

Les ellagitannins C-glycosidiques diffusent facilement dans les solutions hydroalcooliques (solution aqueuse à 12% d'éthanol). Toutefois leur présence dans les vins élevés en fûts de chêne n'est pas systématique et est difficilement décelable. La comparaison des teneurs en vescalagine (**55**) et en castalagine (**56**) d'un vin logé en fûts de chêne pendant douze mois, et une solution hydroalcoolique placée dans les mêmes conditions montrent une très grande différence (46,5 mg/l pour la solution modèle et 5 mg/l dans le vin).<sup>5,106</sup> De nombreuses hypothèses ont été formulées pour expliquer cette différence.

#### III-5-1-Hydrolyse des ellagitannins C-glycosidiques

La concentration en ellagitannins C-glycosidiques augmente au cours des premiers mois d'élevage des vins en fûts de chêne, puis elle diminue régulièrement, alors que dans un même temps la concentration en acide ellagique (**63**) libre augmente constamment. Cette constante augmentation de la production d'acide ellagique (**63**) peut être expliquée par l'hydrolyse de l'unité 4,6-hexahydroxydiphenyle (HHDP) des ellagitannins C-glycosidiques conduisant à la formation d'acide ellagique (**63**), de vescaline (**81**) et de castaline (**82**) (Figure 23). Cependant, même en l'absence des huit ellagitannins couramment identifiés, la production de l'acide ellagique (**63**) continue. De plus, la présence de vescaline (**81**) et de castaline (**82**) ne peut pas être corrélée avec la disparition de la vescalagine (**55**) et de la

castalagine (**56**) et avec la formation de l'acide ellagique (**63**). Cette production d'acide ellagique (**63**) s'expliquerait par l'hydrolyse de composés inconnus ayant une unité HHDP.<sup>107</sup>



**Figure 23 :** Mécanisme de l'hydrolyse de **55** et **56** conduisant à la formation de l'acide ellagique (**63**) ainsi que de la vescaline (**81**) et de la castaline (**82**)

### III-5-2-Complexation avec les protéines du vin

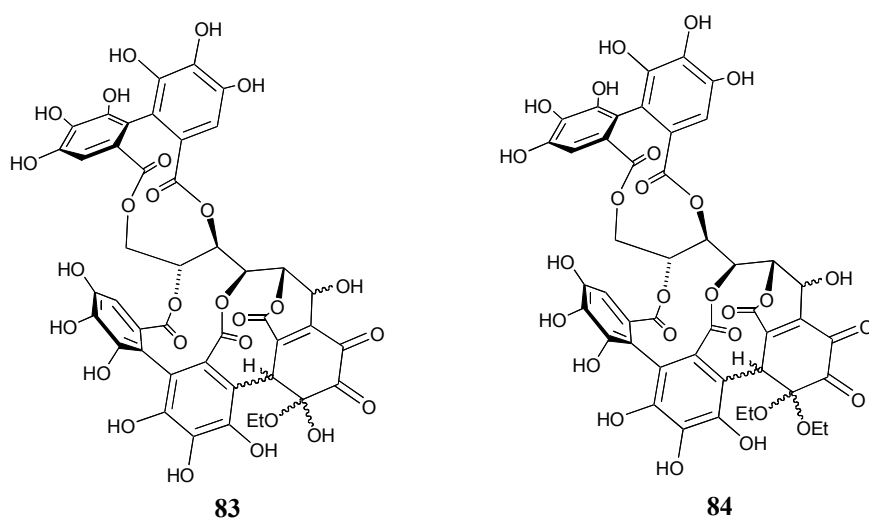
Dans le cas des vins élevés sur lies, pratique très utilisée dans le cas des vins blancs, les teneurs en ellagitannins de ces vins sont très faibles alors que pour un vin identique élevé en absence de lies ces mêmes teneurs sont plus importantes. Cette différence est expliquée par la formation de combinaisons entre les ellagitannins et les parois des levures présentes dans les lies. Les manoprotéines libérées au cours de l'élevage sur lies possèdent également une forte capacité de combinaison et de fixation des composés polyphénoliques.<sup>99</sup>

### III-5-3-Formation de dérivés oxydés

En milieu hydroalcoolique oxygéné (12 % d'éthanol), le cycle I de la vescalagine (**55**) et la castalagine (**56**) peut s'oxyder et conduire à la formation de quinones qui subissent l'attaque nucléophile de l'éthanol présent pour former des dérivés hémiacétals de type **83**. Ces dérivés hémiacétals peuvent, après déshydratation, puis nouvelle attaque de l'éthanol,



conduire à la formation de dérivés acétals de type **84**. Ces dérivés de type **83** et **84** ont été détectés par spectrométrie de masse dans des vins élevés en fûts de chêne.<sup>108</sup>



**Figure 24 :** Structures des dérivés oxydés de le vescalagine (**55**,  $_{-OH}$ ) et de la catalagine (**56**,  $_{-OH}$ )

#### IV-Les tannins complexes

##### IV-1-Introduction

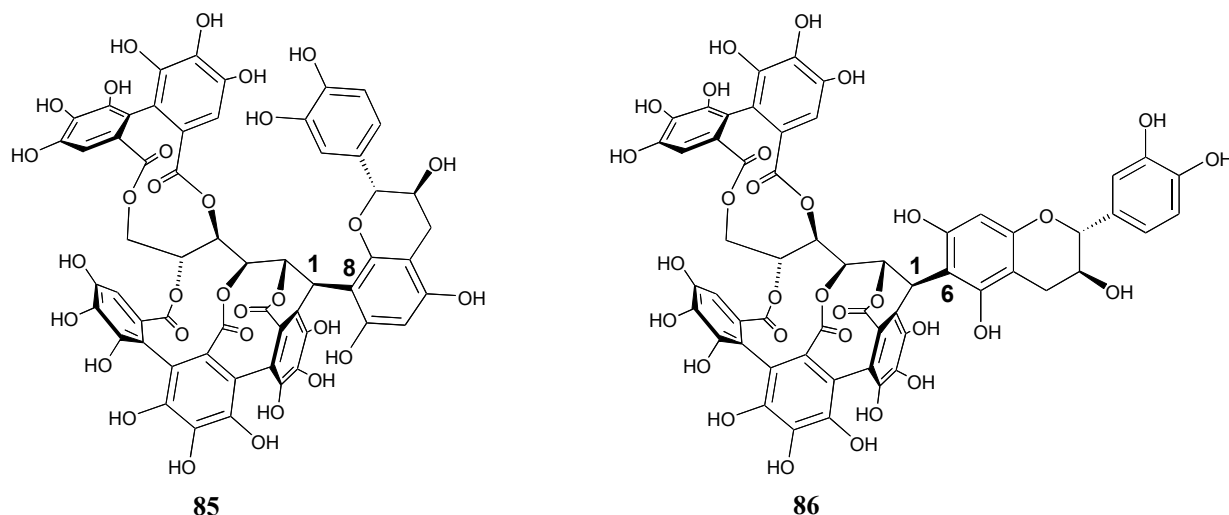
Les tannins complexes, avec les tannins condensés et les tannins hydrolysables présenté représentent la troisième grande famille de tannins du règne végétal. Leur nom de tannins complexes provient de leur capacité à réagir positivement au test colorimétrique caractéristique des tannins hydrolysables et également à celui des tannins condensés. Ces tannins complexes de part leur structure sont également appelés flavano-ellagitannins.<sup>89</sup>

##### I-2-Structure des flavano-ellagitannins

Les flavano-ellagitannins sont constitués d'une unité tannin hydrolysable, généralement une unité ellagitannin C-glycosidique connectée à une unité flavan-3-ols par une liaison carbone-carbone entre le carbone C<sub>1</sub> de la chaîne glucose ouverte et les carbones 6 ou 8 du cycle A de unité flavan-3-ol.<sup>109-112</sup>

Leurs structures reflètent la diversité des structures des ellagitannins C-glycosidiques et des flavan-3-ols présents. Par exemple, les écorces des chênes asiatiques, *Quercus*

*acutissima* et *Quercus miyagii* renferment de la vescalagine (55) et de la catéchine (2). Les acutissimines A (85) et B (86) qui sont les tannins complexes présents dans l'écorce de ces chênes ont pour structure une unité ellagitannin C-glycosidiques identique à la vescalagine (55) connectée à une unité flavan-3-ol, la catéchine (2) (Figure 25).<sup>113,114</sup> Les acutissimines A (85) et B (86) ont également été isolées dans l'écorce de chêne *Quercus petraea* dont le bois de cœur est utilisé en tonnellerie pour la fabrication des fûts de chêne.<sup>115,116</sup>



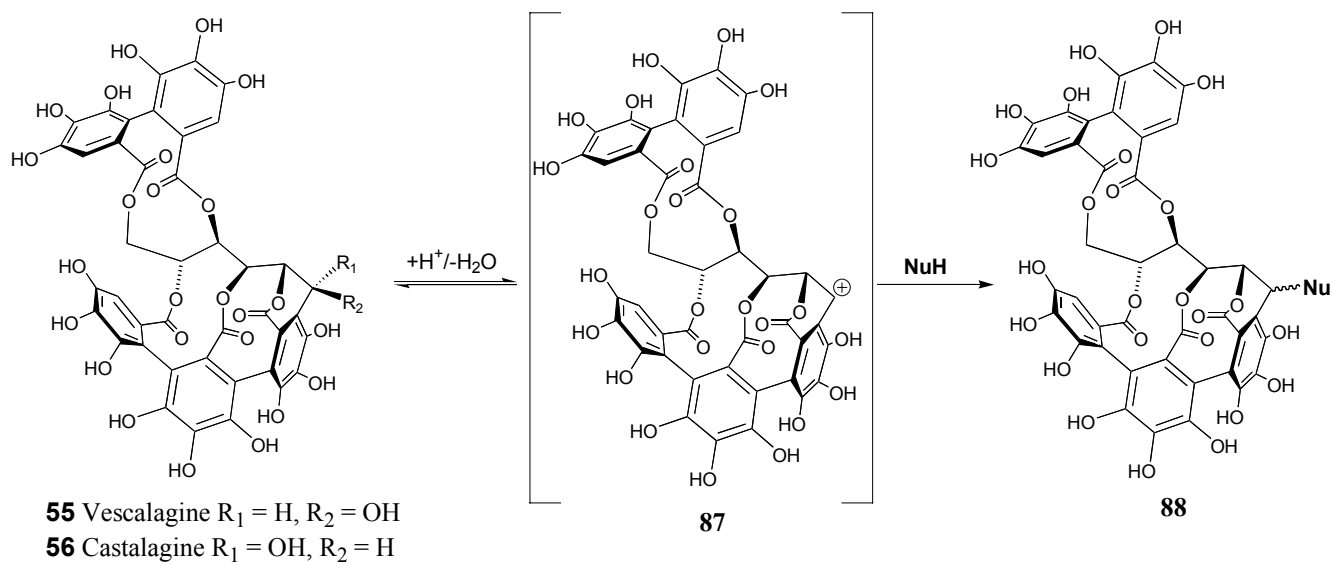
**Figure 25 :** Structures des acutissimines A (85) et B (86)

Les flavano-ellagitannins sont présents uniquement dans les feuilles et dans l'écorce qui sont de surcroît les seules parties de l'arbre où les ellagitannins C-glycosidiques et les flavan-3-ols sont présents à l'état libre.<sup>112</sup> En revanche les flavano-ellagitannins n'ont jamais été isolés dans le bois de cœur qui ne contient pas de flavan-3-ols. La présence simultanée des deux unités à l'état libre a conduit à la formation de l'hypothèse de biosynthèse suivante.<sup>117,118</sup> Premièrement, la déshydroxylation de l'alcool benzylique de l'unité ellagique C-glycosidique conduit à la formation d'un carbocation benzylique qui, dans un deuxième temps, peut subir l'attaque nucléophile des carbones 6 ou 8 de l'unité flavan-3-ol.

### III-3-Hypothèse de formation des flavano-ellagitannins dans le vin

Pour observer la présence de flavano-ellagitannins, il est indispensable d'avoir simultanément dans le même milieu les ellagitannins C-glycosidiques et les flavan-3-ols. Or les vins élevés en fûts de chêne comportent évidemment des flavan-3-ols apportés par le

raisin. Ces vins contiennent également des ellagitannins *C*-glycosidiques extraits du bois de chêne. Donc les vins élevés en fûts de chêne contiennent à la fois des flavan-3-ols en grande quantité et des ellagitannins *C*-glycosidiques.



**Figure 26 :** Hypothèse d'évolution des ellagitannins *C*-glycosidiques dans le vin

Cette présence simultanée des ellagitannins *C*-glycosidiques et des flavan-3-ols dans le vin, solution hydroalcoolique acide (pH compris entre 3,2 et 4), nous a conduit à postuler l'hypothèse suivante (Figure 26). La vescalagine (**55**) et la castalagine (**56**) pourraient subir une déshydroxylation de leur alcool benzylique pour conduire à la formation du carbocation benzylique **87**. Cet intermédiaire **87** pourrait alors subir l'attaque nucléophile des flavan-3-ols présents dans le vin, ainsi que celle d'autres nucléophiles présents comme l'éthanol, les anthocyanes ou les procyanidines pour conduire à la formation de structures de type **88**.



**HÉMISYNTHÈSE DES FLAVANO-ELLAGITANNINS**



## **I-Introduction**

Dans le but de valider notre hypothèse de formation d'adduits entre les monomères des ellagitannins C-glycosidiques du bois de chêne et les différents nucléophiles du vin, l'hémisynthèse des flavano-ellagitannins présentés précédemment a été envisagée. Les flavano-ellagitannins résulteraient de la condensation entre la vescalagine (**55**) ou la castalagine (**56**) et une unité flavan-3-ol pouvant être la catéchine (**2**) dans le cas des acutissimines A (**85**) et B (**86**). Mais il est également possible d'envisager cette condensation avec l'épicatéchine (**3**).

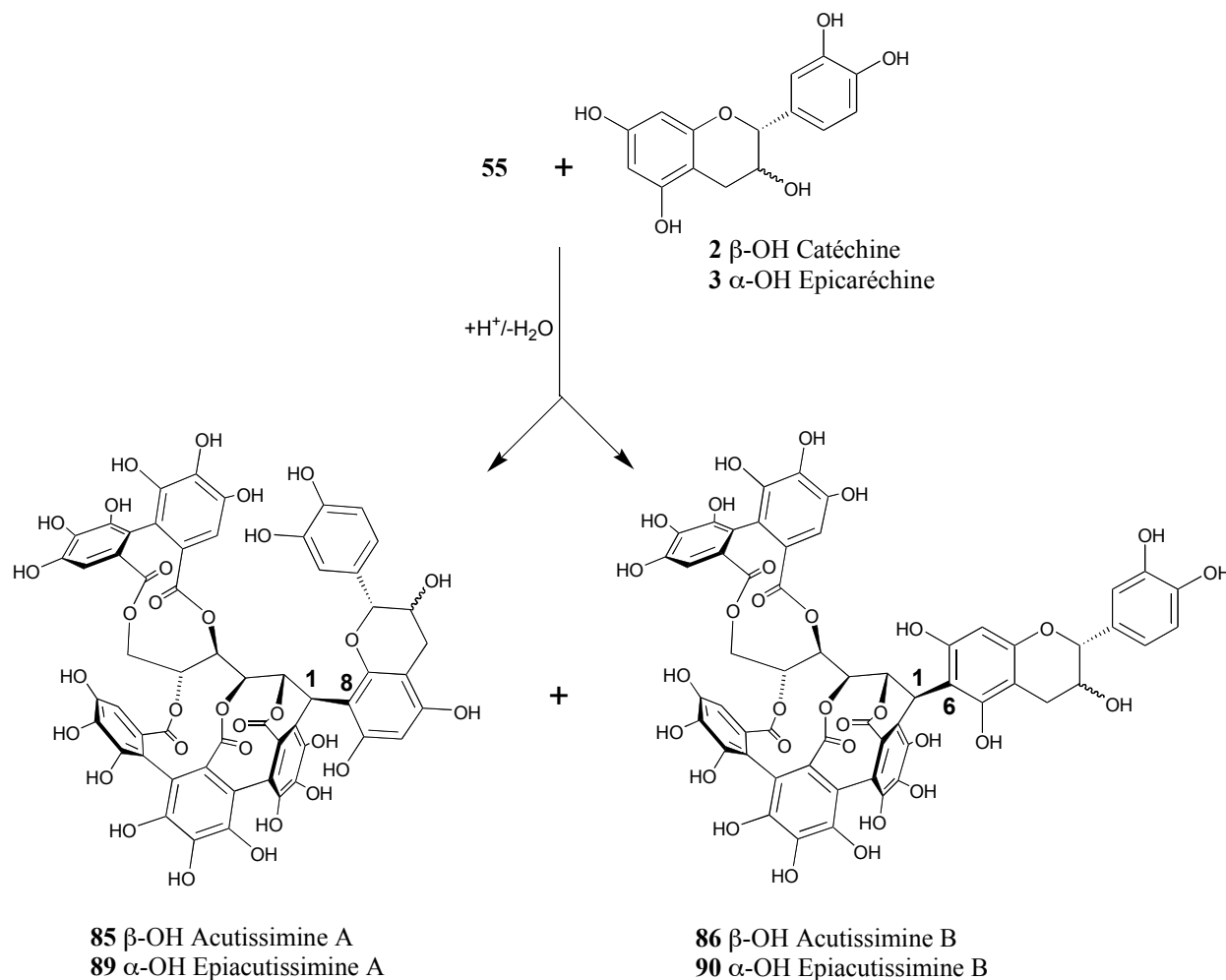
Notre étude a débuté par l'hémisynthèse des acutissimines A (**85**) et B (**86**) qui ont été isolées dans les écorces des chênes asiatiques, *Quercus acutissima*, *Quercus miyagii* et *Quercus mongolica*<sup>113,114</sup> ainsi que dans l'écorce de chêne *Quercus petraea*,<sup>115,116</sup> dont le bois de cœur est utilisé en tonnellerie pour la fabrication des fûts de chêne. Ces acutissimines dérivent de la condensation de la catéchine (**2**) sur la vescalagine (**55**). L'hémisynthèse de nouvelles acutissimines dérivant de la condensation de l'épicatéchine (**3**) sur la vescalagine (**55**) ou la vescaline (**81**) a également été réalisée.

L'hémisynthèse de ces acutissimines a, dans un premier temps, été réalisée en milieu organique pour pouvoir appréhender et comprendre leur mécanisme de formation en s'affranchissant de toute autre réaction pouvant se produire dans un milieu complexe tel que le vin. L'hémisynthèse de ces acutissimines en milieu organique a également permis l'obtention de produit pur en quantité suffisante pour la caractérisation structurale par RMN et pour son utilisation comme référence chromatographique. La formation des acutissimines a ensuite été démontrée en milieu aqueux acide et en milieu modèle du vin, validant ainsi notre hypothèse de travail.

## **II-Hémisynthèse des acutissimines et épiacutissimines A et B en milieu organique**

### **II-1-Conditions opératoires de l'hémisynthèse des acutissimines A et B**

La vescalagine (**55**) et l'unité flavan-3-ol (**2** ou **3**) sont solubilisées dans une solution de THF fraîchement distillé contenant 0,15 % en volume d'acide trifluoroacétique. Le milieu réactionnel est alors porté à une température de 60°C, et l'évolution de la réaction est suivie par CLHP analytique (méthode 1).



NuH	Série A	Série B	Rapport A:B
<b>2</b>	<b>85</b> (65 %)	<b>86</b> (20 %)	80:20
<b>3</b>	<b>89</b> (51 %)	<b>90</b> (26 %)	66:33

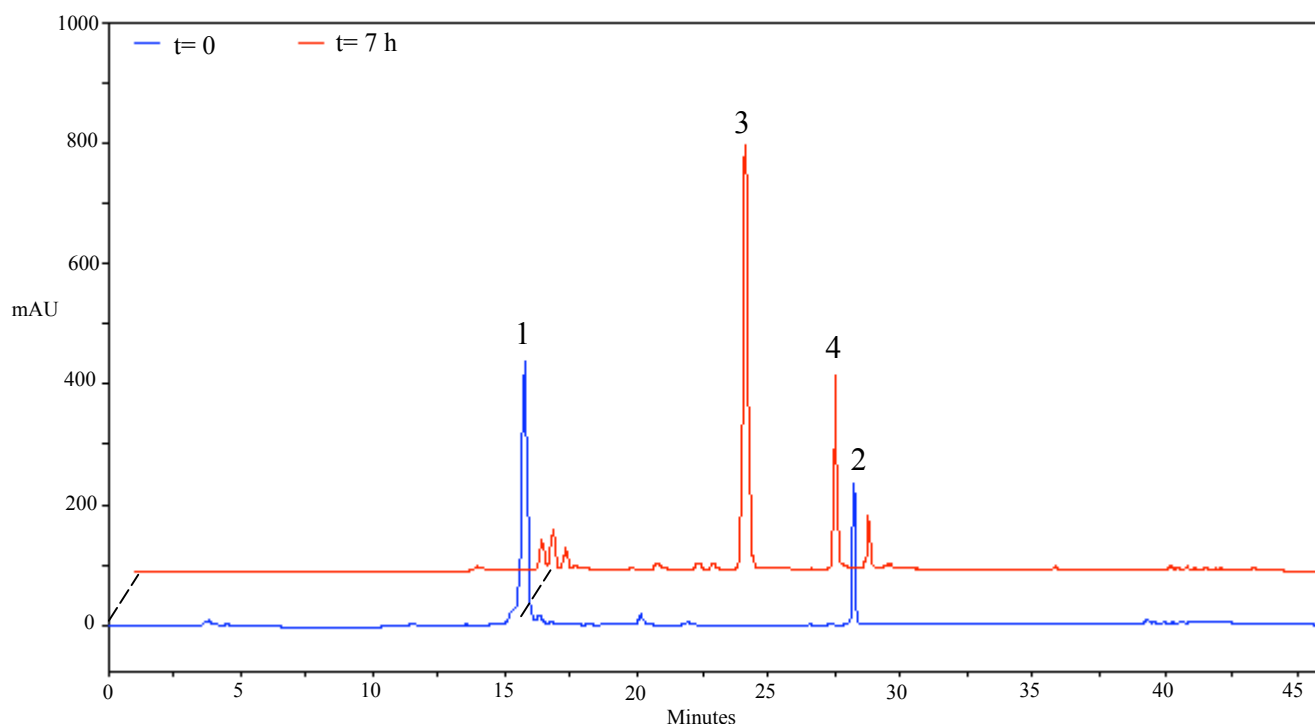
**Figure 27** : Réaction de formation des acutissimines A (**85**) et B (**86**)

## II-2-Analyse des chromatogrammes de l'hémisynthèse des acutissimines A et B

Après quatre heures de réaction, les quantités de vescalagine (**55**) et de catéchine (**2**) ont fortement diminuées ; deux nouveaux produits ayant comme temps de rétention 23,1 et 26,5 min apparaissent dans un rapport **85** : **86** de 80 : 20. La disparition de la vescalagine (**55**) est totale après 7 heures de réaction (Figure 27). Le THF est alors évaporé sous pression réduite, et le résidu brut ainsi obtenu est solubilisé dans l'eau, puis congelé avant lyophilisation. Les deux produits principaux sont ensuite purifiés et séparés, puis caractérisés indépendamment par RMN.



La séparation des deux acutissimines **85** et **86** est effectuée par CLHP semi-préparative (méthode 5). Des fractions de 10 mg du mélange sont solubilisées dans 500  $\mu\text{L}$  d'eau avant leur injection. Les acutissimines **85** et **86** sont alors collectées séparément. Après injection complète du mélange, les fractions sont évaporées et lyophilisées pour donner 35 mg d'acutissimine A (**85**) sous forme d'une poudre blanche, soit un rendement de 65 % et 12 mg d'acutissimine B (**86**) également sous forme d'une poudre blanche correspondant à un rendement de 20 %. Le rendement global en acutissimines purifiées est de 85 %.

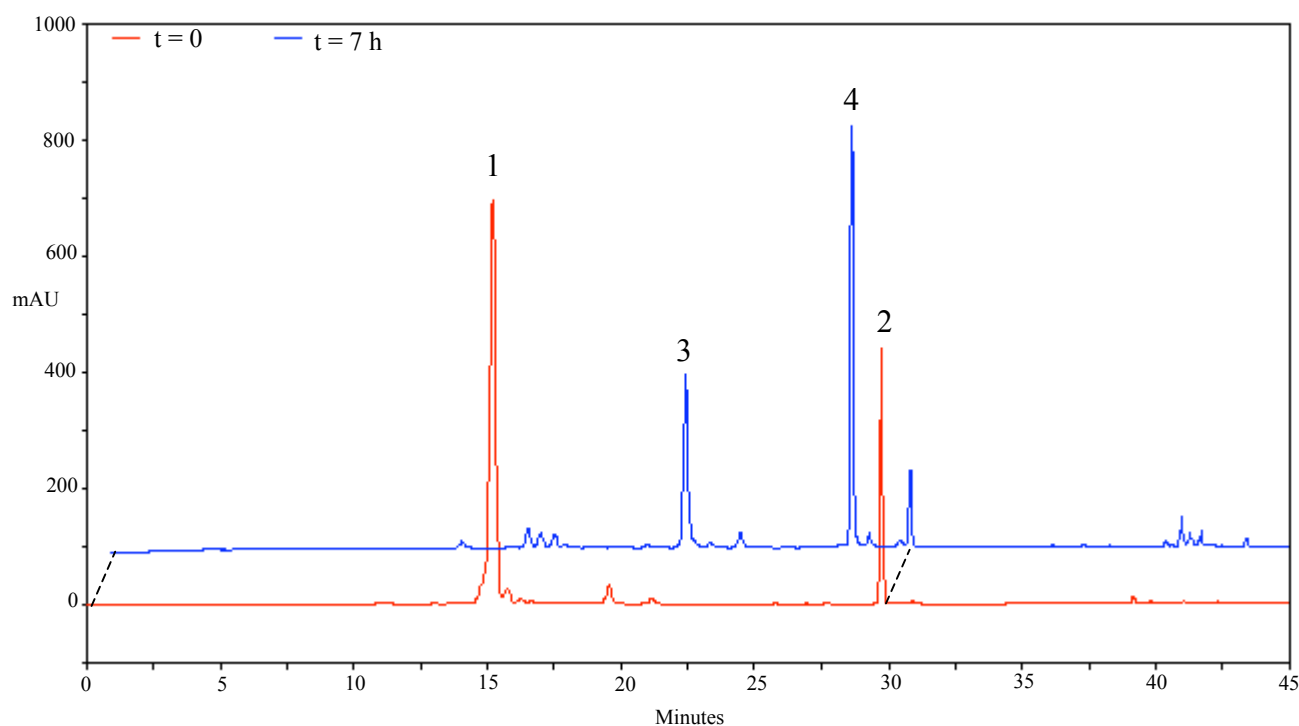


**Figure 28** : Suivi du milieu réactionnel de l'hémisynthèse des acutissimines en milieu organique (1: vescalagine (**55**), 2: catéchine (**2**), 3 : acutissimine A (**85**) et 4 : acutissimine B (**86**))

### II-3-Analyse des chromatogrammes de l'hémisynthèse des épiacutissimines A et B

Après quatre heures de réaction, les quantités de vescalagine (**55**) et d'épicatéchine (**3**) ont fortement diminué et deux nouveaux produits éluant à 21,4 et 27,1 min se forment avec un rapport **89:90** de 66:33. La consommation de la vescalagine (**55**) et de l'épicatéchine (**3**) est totale après 9 heures de réaction (Figure 29). Le THF est ensuite évaporé sous pression réduite, puis le produit brut ainsi obtenu est solubilisé dans l'eau, puis congelé avant lyophilisation.

L'étape de purification et de séparation des deux produits est réalisée par CLHP semi-préparative (méthode 5) en utilisant des conditions identiques à celles utilisées pour la purification des acutissimines A (**85**) et B (**86**). Après purification complète du mélange des deux produits et lyophilisation des fractions collectées, 28 mg d'épiacutissimine A (**89**) sont obtenus sous forme d'une poudre blanche, soit un rendement de 51 % et 14 mg d'épiacutissimine B (**90**) également sous forme d'une poudre blanche, soit un rendement de 26 %. Le rendement global en épiacutissimines purifiées est de 77 %.



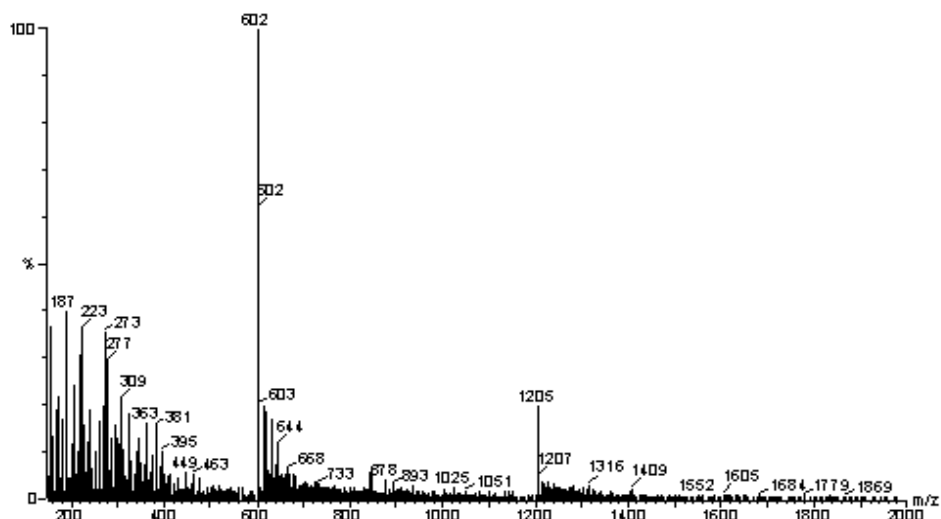
**Figure 29** : Suivi du milieu réactionnel de l'hémisynthèse des épiacutissimines en milieu organique (1: vescalagine (**55**), 2: épicatéchine (**3**), 3 : épiacutissimine B (**90**), 4 : épiacutissimine A (**89**))

#### II-4-Analyses structurales des acutissimines et épiacutissimines A et B

##### II-4-1-Analyse par CLHP-ESI-MS à $-30$ eV

L'étude structurale des acutissimines **85** et **86** et des épiacutissimines **89** et **90** débute par une analyse en CLHP-ESI-MS (méthode 10) en mode négatif avec une intensité de voltage de cône de  $-30$  eV.<sup>119,120</sup> Ces conditions d'analyse permettent de déterminer la masse moléculaire des composés observés en CLHP analytique. Cette analyse montre que les quatre produits supposés être les acutissimines **85** et **86** et les épiacutissimines **89** et **90** ont

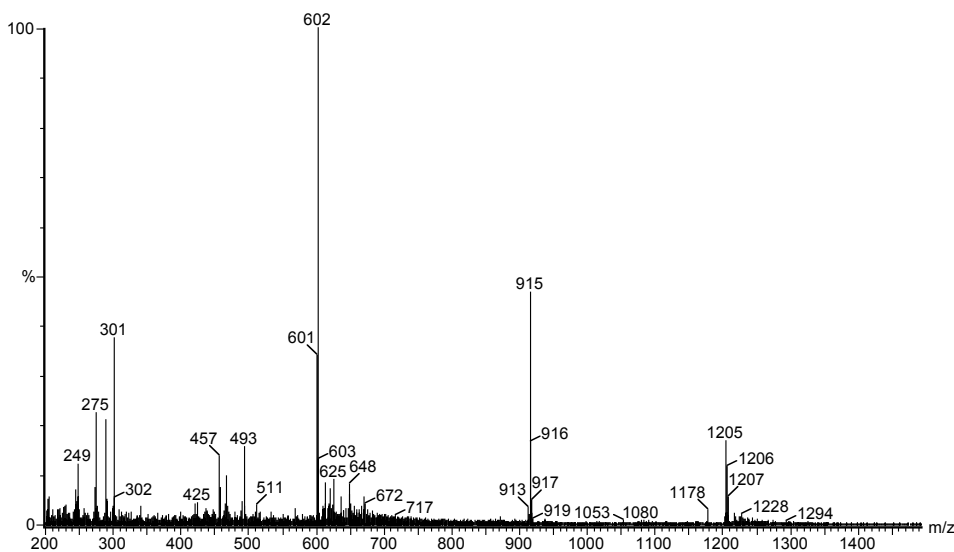
effectivement une masse moléculaire identique de 1206 ( $[M-H]^- = 1205$ ). Cette masse correspond bien à la perte de 18 unités de masse ( $H_2O$ ), suite à la condensation entre la vescalagine (**55**) ( $m = 934$ ) et la catéchine (**2**) ou l'épicatéchine (**3**) ( $m = 290$ ), soit  $1206 = 934 + 290 - 18$  (Figure 30).



**Figure 30** : Spectre de masse à  $-30$  eV de l'acutissimine A (**85**)

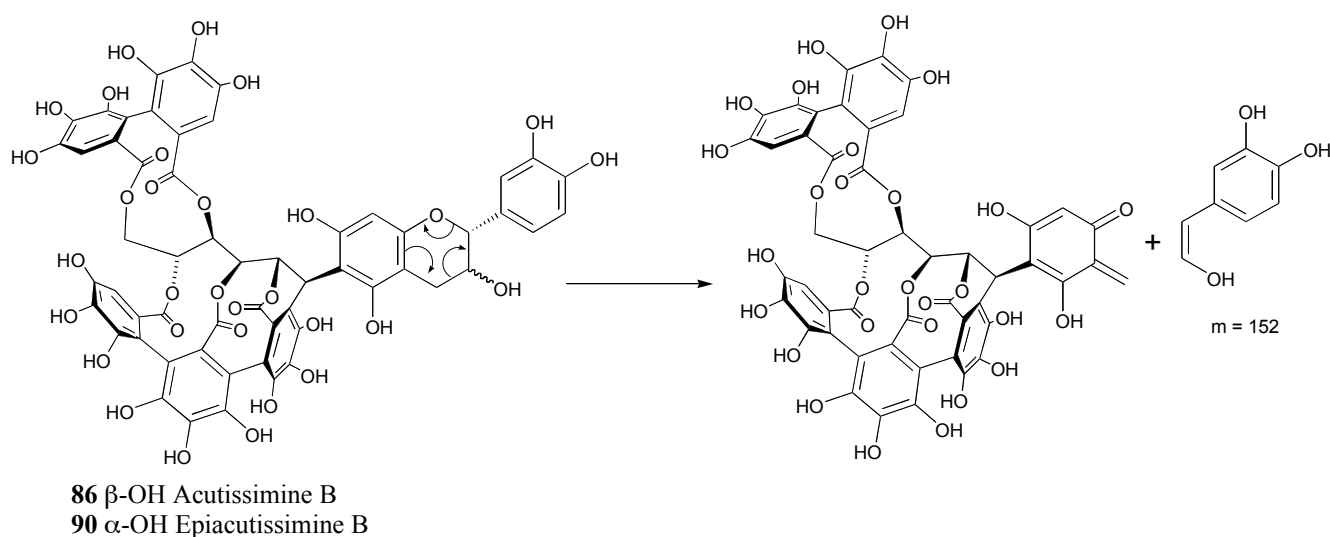
#### II-4-2-Analyse par CLHP-ESI-MS à $-60$ eV

L'utilisation d'une intensité de voltage de cône de  $-60$  eV a permis de fragmenter les produits et d'obtenir des informations structurales supplémentaires. L'ionisation des flavano-ellagitannins **85**, **86**, **89** et **90** a ainsi montré la formation de plusieurs fragments caractéristiques d'une unité ellagique (Figure 31).<sup>121-123</sup> On note notamment la présence d'un ion moléculaire bichargé  $[M-2H]^{2-} = 602$ , ainsi que du fragment 915 qui résulte de la perte de 290 unités de masse par rapport au pic moléculaire  $[M-H]^- = 1205$ , cette diminution de 290 unités de masse correspond à la perte de l'unité flavan-3-ol. Le fragment de masse 301 correspond à l'acide ellagique.



**Figure 31** : Spectre de masse à  $-60$  eV de l'acutissimine A (**85**)

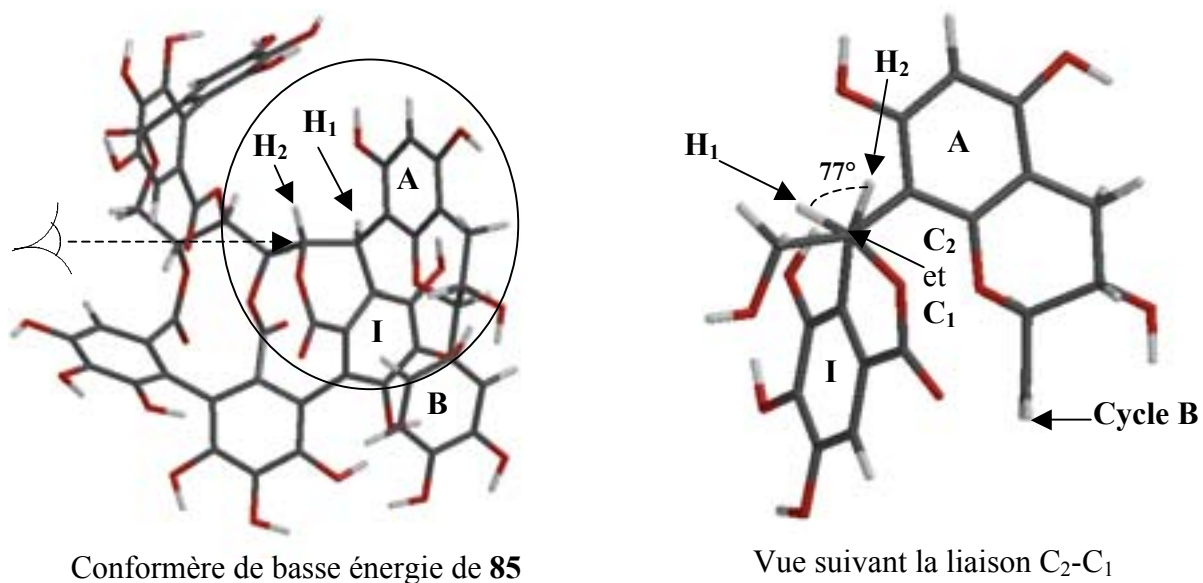
Des fragments d'intensités plus faibles sont également présents comme le fragment 613 qui correspond à une perte de 302 unités de masse par rapport au fragment 915. Cette diminution de 302 unités de masse peut correspondre à la fragmentation de l'unité HHDP du fragment 915. La formation du fragment 1053 est une perte caractéristique de 152 unités de masse due à une réaction de rétro Diels-Alder du cycle C de l'unité flavan-3-ol (Figure 32).<sup>124-126</sup>



**Figure 32** : Fragmentation du cycle C de l'unité flavan-3-ol due à une réaction de rétro Diels Alder représentée dans le cas de l'acutissimine B (**86**) et de l'épiacutissimine B (**90**)

## II-4-3-Analyse par RMN de l'acutissimine A et de l'épiacutissimine A

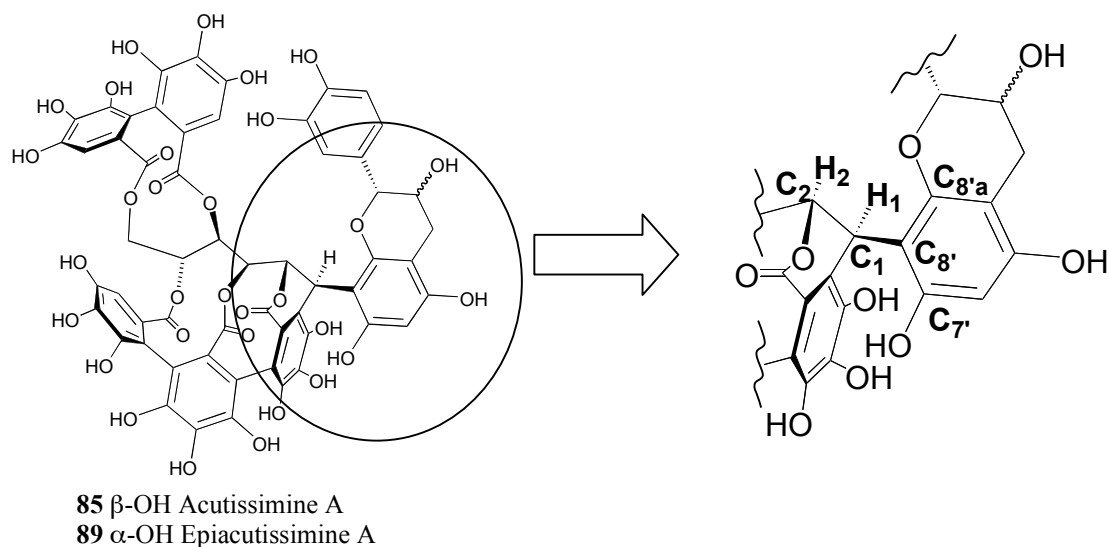
La comparaison des spectres RMN du proton et du carbone du produit d'hémisynthèse **85** avec les données de la littérature montre une très grande similitude.<sup>113</sup> Une analyse plus fine des signaux de la chaîne glucosidique, notamment de la constante de couplage entre les protons H<sub>1</sub> et H<sub>2</sub> observée sur le signal du proton à 4,80 ppm, permet de déterminer la configuration du carbone C<sub>1</sub>. Cette constante de couplage est inférieure à 1 hertz comme celle de l'acutissimine A (**85**) isolée de l'écorce de chêne *Quercus acutissima*,<sup>113</sup> et confirme l'orientation-β de la catéchine reliée au carbone C<sub>1</sub>. En effet, la constante de couplage entre les protons H<sub>1</sub> et H<sub>2</sub> est liée à la configuration du carbone C<sub>1</sub>. Une faible constante de couplage proche de zéro indique que l'angle dièdre correspondant est compris entre 60° et 90°.<sup>127,128</sup> Un tel angle dièdre H<sub>1</sub>-C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-H<sub>2</sub> n'est possible que dans le cas de l'acutissimine A (**85**) dont l'unité catéchine a une orientation-β sur le carbone C<sub>1</sub>. Cet angle a effectivement une valeur de 77° sur la conformation de plus basse énergie de l'acutissimine A (**85**) que nous avons modélisée (Figure 33).



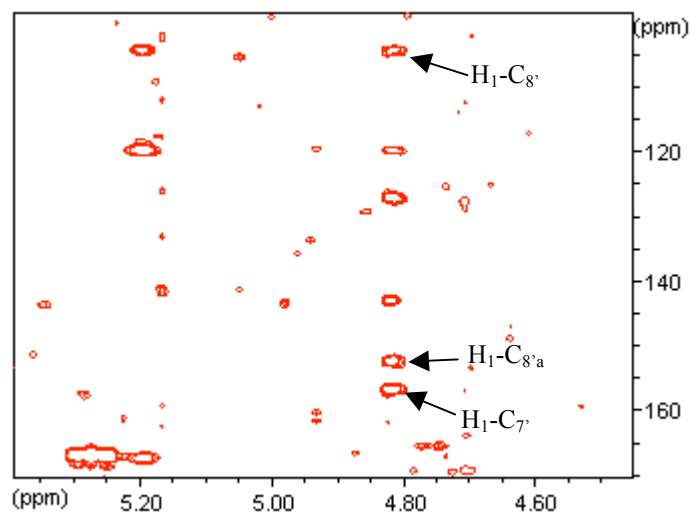
**Figure 33** : Angle dièdre H<sub>1</sub>-C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-H<sub>2</sub> vu suivant la liaison C<sub>2</sub>-C<sub>1</sub> du conformère de plus basse énergie de l'acutissimine A (**85**) minimisé par la méthode Monte-Carlo/MM3\*

La détermination des sommets de connexion entre la vescalagine (**55**) et la catéchine (**2**) est réalisée par l'observation des corrélations proton-carbone à longue distance (HMBC) entre le proton H<sub>1</sub> de la vescalagine (**55**) et les carbones C<sub>8'</sub>, C<sub>7'</sub> et C<sub>8'a</sub> de la catéchine (**2**).

Une telle analyse est régulièrement utilisée pour la détermination structurale des procyanidines.<sup>129-131</sup> Il découle alors de ces corrélations que la catéchine (**2**) est bien reliée au carbone C<sub>1</sub> de la vescalagine (**55**) par son sommet 8 (Figure 34 et Figure 35).



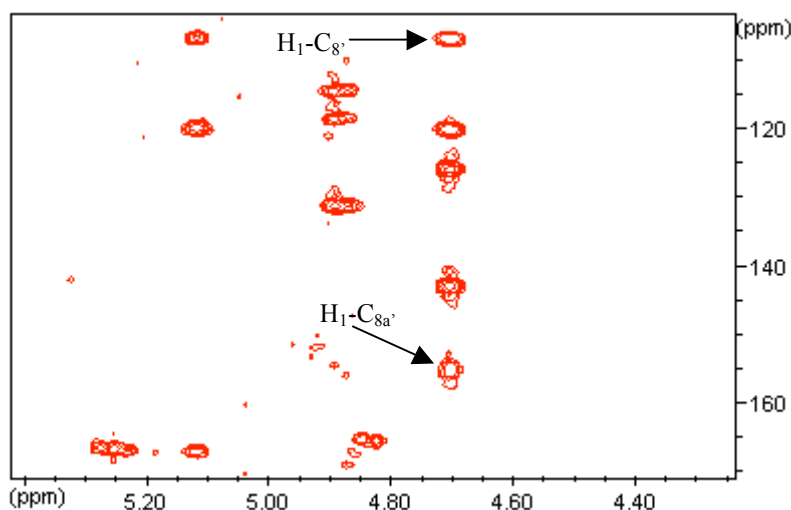
**Figure 34 :** Agrandissement de l'environnement autour du carbone C<sub>1</sub> dans le cas de l'acutissimine A (**85**) ou de l'épiacutissimine A (**89**)



**Figure 35 :** Portion de la carte HMBC de l'acutissimine A (**85**)

Pour l'épiacutissimine A (**89**), les spectres RMN du proton et du carbone sont très proches de ceux de **85** et ont également été comparés avec les données RMN de la

vescalagine (**55**) et de l'épicatéchine (**3**) de la littérature,<sup>92,94,95,132</sup> aucune donnée n'existant pour **89** puisque cette molécule n'a jamais été isolée et caractérisée. La constante de couplage entre le proton H<sub>1</sub> et le proton H<sub>2</sub> est également inférieure à 1 Hz, ce qui implique que l'orientation de l'unité flavan-3-ol du carbone C<sub>1</sub> de **89** est β,<sup>127,128</sup> comme celle de l'acutissimine A (**85**).<sup>113</sup> Les sommets de connexion entre la vescalagine (**55**) et l'épicatéchine (**3**) sont, comme précédemment, déterminés par les corrélations proton-carbone à longue distance (HMBC) entre le proton H<sub>1</sub> de la vescalagine (**55**) et les carbones C<sub>8'</sub>, C<sub>7'</sub> et surtout C<sub>8'a</sub> de l'épicatéchine (**3**) (Figure 36). Ces corrélations montrent de façon inambigüe que l'épicatéchine (**3**) est reliée au carbone C<sub>1</sub> de la vescalagine (**55**) par son sommet 8.

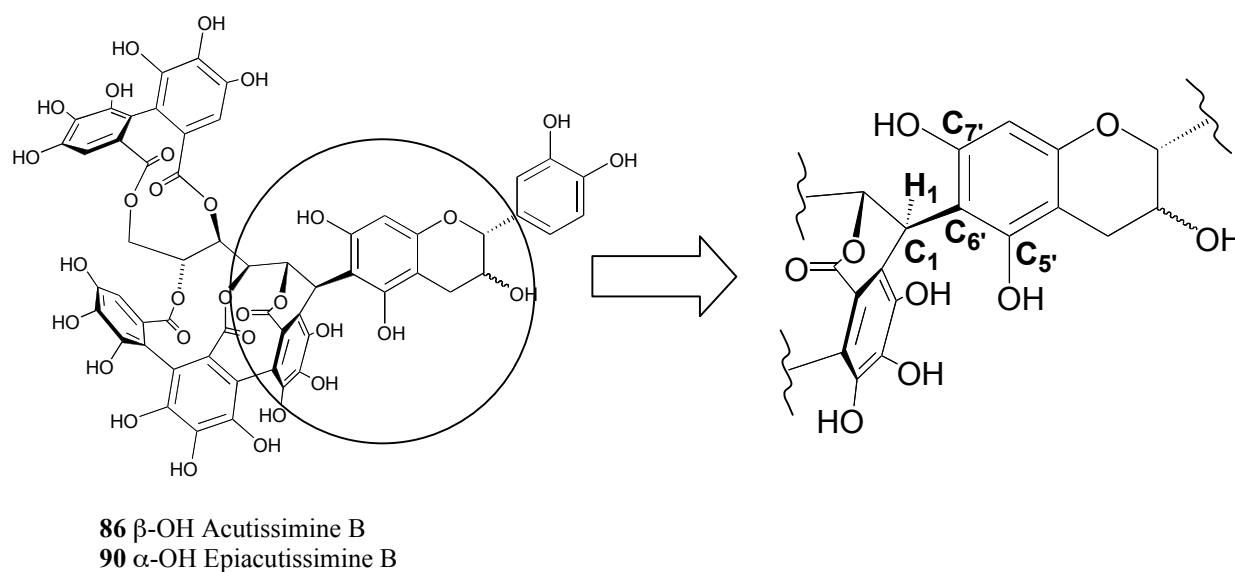


**Figure 36** : Portion de la carte HMBC de l'épiacutissimine A (**86**)

Finalement, la comparaison de toutes ces analyses RMN montre que le produit formé dans notre milieu réactionnel est bien l'acutissimine A (**85**), déjà isolée dans certaines écorces de chênes. Dans notre milieu réactionnel, sa formation résulte d'une condensation de la catéchine (**2**) sur le carbone C<sub>1</sub> de la vescalagine (**55**) avec rétention de configuration. L'épiacutissimine A (**89**) n'a jamais été isolée. Sa formation résulte également d'une condensation de l'épicatéchine (**3**) sur le carbone C<sub>1</sub> de la vescalagine (**55**) avec une rétention de configuration en C<sub>1</sub>.

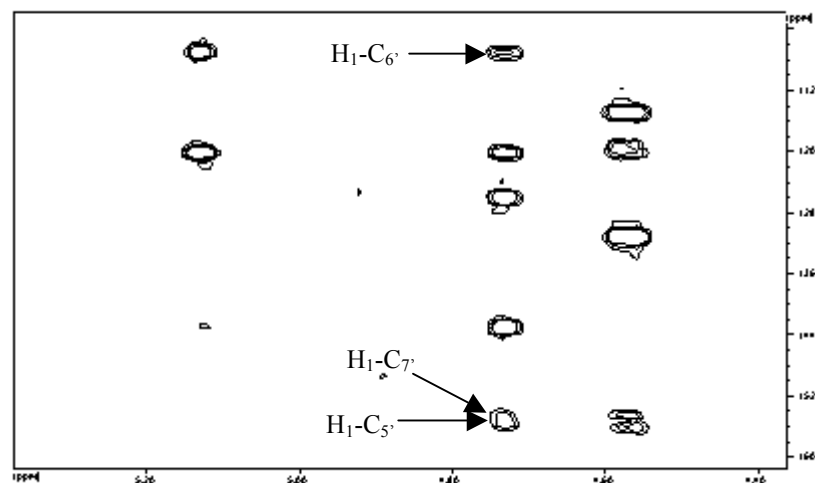
## II-4-4-Analyse par RMN de l'acutissimine B et de l'épiacutissimine B

La comparaison des spectres RMN du proton et du carbone du composé **86** avec les données RMN de l'acutissimine B (**86**) isolée montre une très grande similitude. Dans ce cas, également la constante de couplage entre le proton H<sub>1</sub> et le proton H<sub>2</sub> est inférieure à 1 Hz. L'orientation de l'unité flavan-3-ol du carbone C<sub>1</sub> de l'acutissimine B (**86**), obtenue par hémisynthèse, est donc identique à celle de l'acutissimine A (**85**), soit une orientation-β (l'angle dièdre H<sub>1</sub>-C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-H<sub>2</sub> de l'acutissimine B (**86**) est de 80°).<sup>113,127,128</sup> Les sommets de connexion entre l'unité ellagitannins C-glycosidiques et l'unité flavan-3-ol sont déterminés par l'observation des corrélations proton-carbone à longue distance (HMBC) entre le proton H<sub>1</sub> de la vescalagine (**55**) et les carbones C<sub>6'</sub>, C<sub>7'</sub> et C<sub>5'</sub> de la catéchine (**2**). Ces corrélations démontrent avec certitude que la catéchine (**2**) est reliée au carbone C<sub>1</sub> de la vescalagine (**55**) par son sommet 6 (Figure 37 et Figure 38).



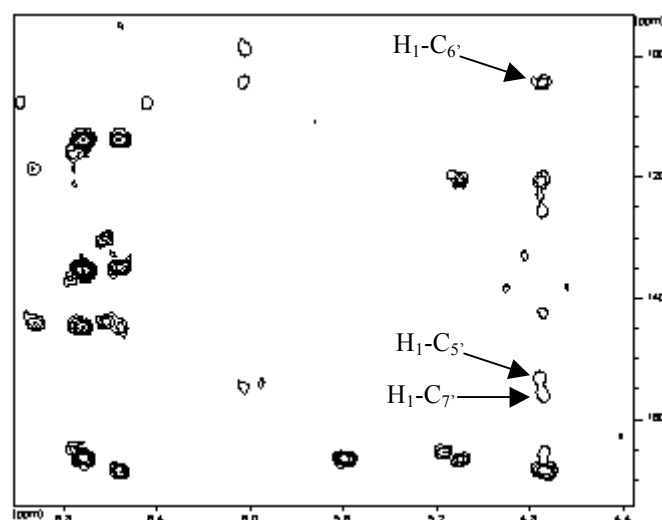
**Figure 37** : Agrandissement de l'environnement autour du carbone C<sub>1</sub> dans le cas de l'acutissimine B (**86**) ou de l'épiacutissimine B (**90**)





**Figure 38** : Portion de la carte HMBC de l'acutissimine B (**86**)

L'épiacutissimine B (**90**) n'a jamais été isolée. La constante de couplage entre ces protons  $H_1$  et  $H_2$  est aussi inférieure à 1 Hz établissant ainsi, comme précédemment, que l'orientation de l'unité flavan-3-ol du carbone  $C_1$  est  $\beta$ .<sup>127,128</sup> Les corrélations proton-carbone à longue distance (HMBC) entre le proton  $H_1$  de l'unité ellagique et les carbones  $C_{6'}$ ,  $C_{7'}$  et  $C_{5'}$  de l'unité flavan-3-ol montrent de façon inambigüe que l'épicatéchine (**3**) est reliée au carbone  $C_1$  de la vescalagine (**55**) par son sommet 6 (Figure 39).



**Figure 39** : Portion de la carte HMBC de l'épiacutissimine B (**86**)

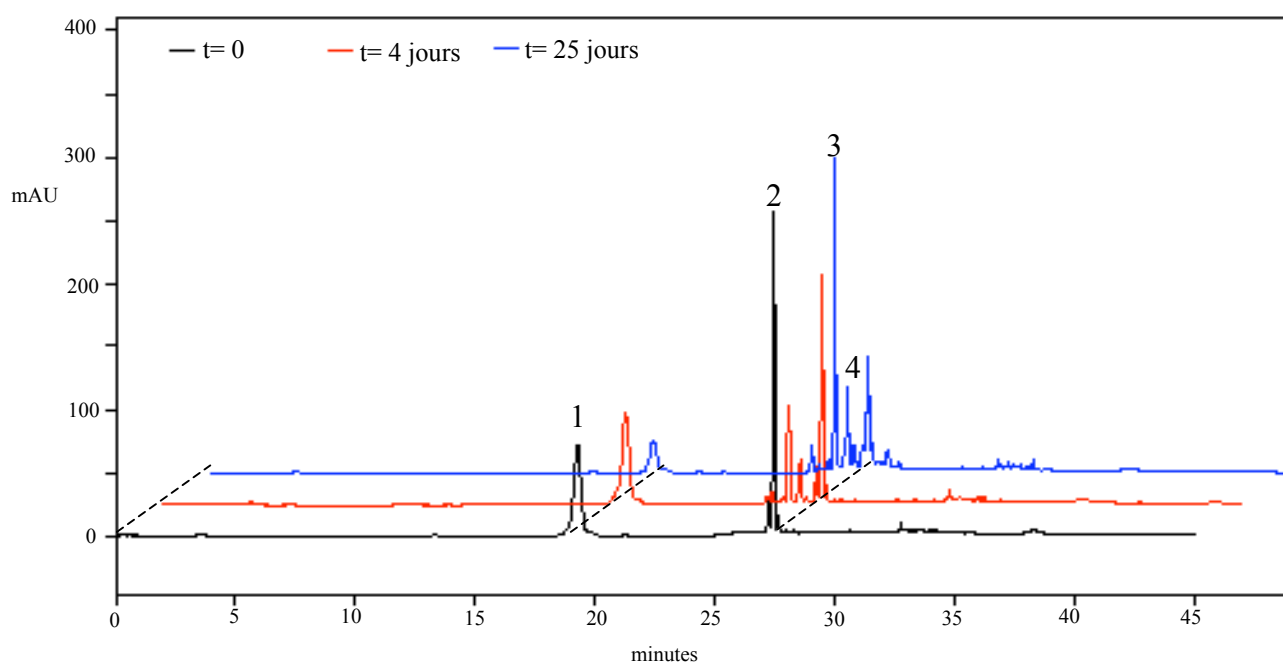
En conclusion, la comparaison des données RMN obtenues avec celle de la littérature montre que le produit obtenu par hémisynthèse est bien l'acutissimine B (**86**), déjà isolée dans

l'écorce de certains chênes. Sa formation résulte d'une condensation du sommet 6 de la catéchine (**2**) sur le carbone C<sub>1</sub> de la vescalagine (**55**) avec une rétention de configuration. La formation de l'épiacutissimine B (**90**) résulte d'une condensation identique de l'épicatéchine (**3**) sur la vescalagine (**55**), cette fois encore avec une rétention de configuration en C<sub>1</sub>.

### III-Hémisynthèse des flavano-ellagitannins en milieu aqueux

#### III-1-Hémisynthèse en milieu aqueux acide

L'étude de la formation des acutissimines A (**85**) et B (**86**) en milieu modèle du vin est réalisée en deux étapes : premièrement, en milieu aqueux acidifié avec un acide fort, puis en milieu modèle du vin (solution aqueuse à 12 % d'éthanol, acidifiée avec 5 g/L d'acide tartrique et ajusté à un pH de 3,2). La vescalagine (**55**) et la catéchine (**2**) sont solubilisées dans de l'eau acidifiée avec 0,15 % en volume d'acide trifluoroacétique. Le milieu réactionnel est maintenu à température ambiante et l'évolution de la réaction est suivie par CLHP analytique (méthode 2).

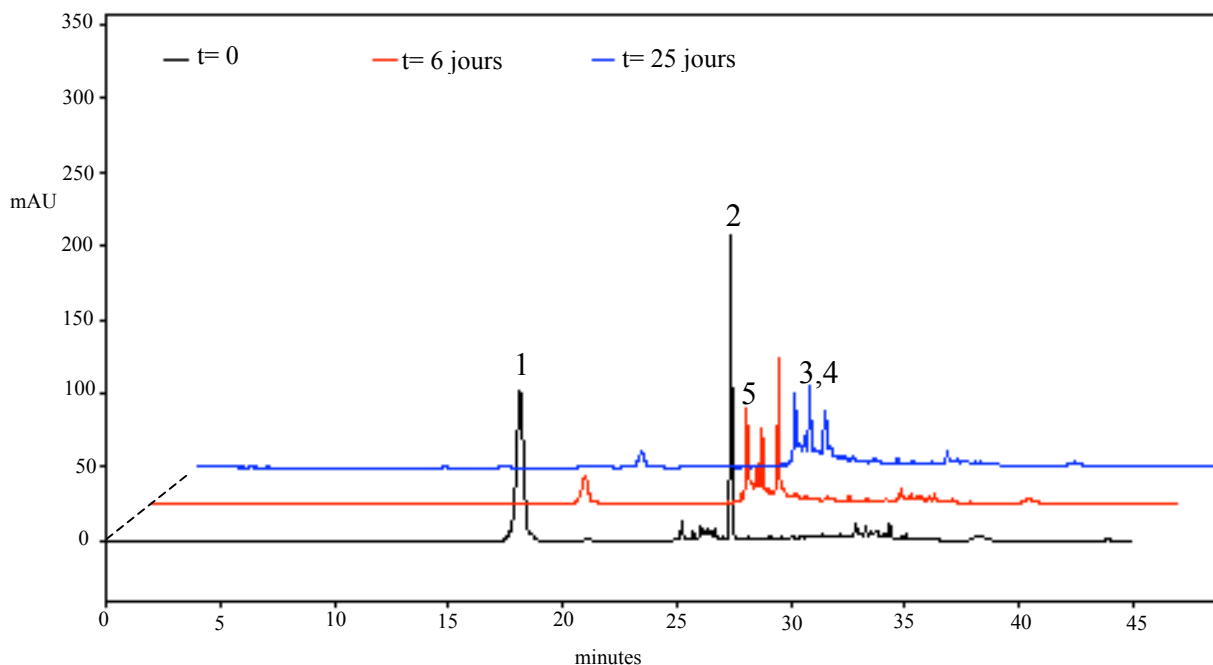


**Figure 40** : Suivi du milieu réactionnel de l'hémisynthèse des acutissimines A et B en milieu aqueux acide (1: vescalagine (**55**), 2: catéchine (**2**), 3 : acutissimine A (**85**) et 4 : acutissimine B (**86**))

Après 4 jours de réaction (Figure 40), il est déjà possible de voir l'apparition des deux acutissimines A (**85**) et B (**86**). Malgré une cinétique de formation plus lente que dans le cas de l'hémisynthèse en milieu organique, en raison de la compétition engendrée par l'attaque nucléophile réversible de l'eau sur le carbocation benzylique intermédiaire **87**, la réaction est totale après vingt cinq jours. Une analyse en CLHP-ESI-MS (méthode 10) confirme que les produits formés sont bien les acutissimines A (**85**) et B (**86**). Les acutissimines A (**85**) et B (**86**) se forment donc bien aussi en milieu aqueux à partir de la vescalagine (**55**) et de la catéchine (**2**).

### III-2-Hémisynthèse en milieu modèle du vin

La formation des acutissimines A (**85**) et B (**86**) en milieu aqueux ayant été démontrée, l'étude de leur formation en milieu modèle du vin a été réalisée. Le milieu utilisé est une solution aqueuse à 12 % en éthanol et acidifiée avec 5 g/L d'acide tartrique. Le pH de la solution est ensuite ajusté à 3,2 par l'addition de soude (1M). La vescalagine (**55**) et la catéchine (**2**) sont solubilisées dans ce milieu modèle. Le milieu réactionnel est maintenu à température ambiante et l'évolution de la réaction est suivie par CLHP (méthode 2).



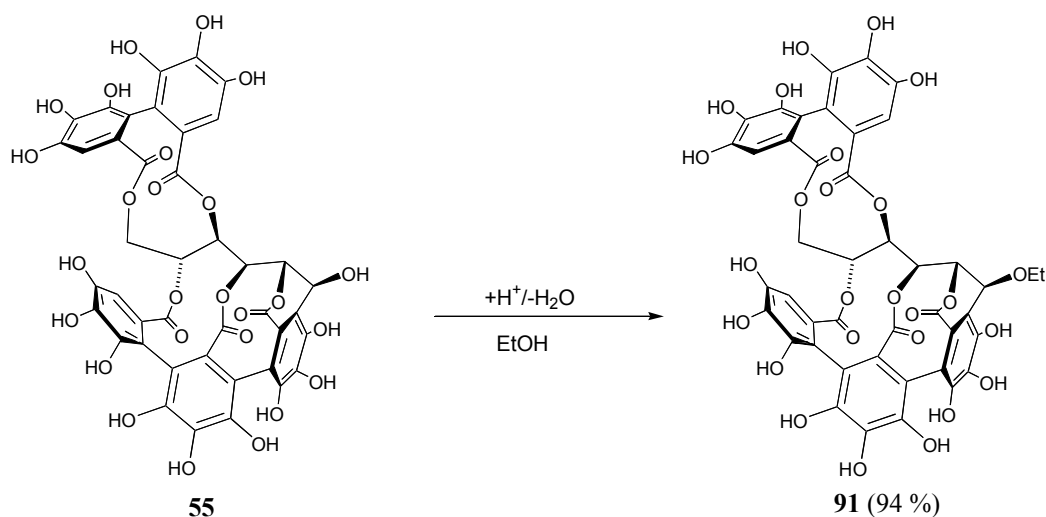
**Figure 41** : Suivi du milieu réactionnel de l'hémisynthèse des acutissimines A et B milieu modèle de vin (1: vescalagine (**55**), 2: catéchine (**2**), 3 : acutissimine A (**85**) et 4 : acutissimine B (**86**) et 5 : l'éthylvescalagine (**91**))

Après six jours de réaction (Figure 41), trois produits apparaissent dont deux avec des temps de rétention identiques à ceux des acutissimines A (**85**) et B (**86**). Le troisième est dû à l'éthylvescalagine (**91**) qui provient de l'addition d'éthanol sur le carbocation **87**. L'analyse en CLHP-ESI-MS (méthode 10) a confirmé l'identification de ces trois produits. La formation des acutissimines A (**85**) et B (**86**) ainsi que de l'éthylvescalagine (**91**) se produit donc également en milieu modèle du vin. Leur formation pendant l'élevage du vin en fûts de chêne est possible. L'hémisynthèse des épiacutissimines A (**89**) et B (**90**) n'a pas été étudiée en milieu modèle du vin, cependant leur formation est aussi fort probable au cours de l'élevage des vins en fûts de chêne.

#### IV-Hémisynthèse de l'éthylvescalagine

##### IV-1-Conditions opératoires de l'hémisynthèse de l'éthylvescalagine

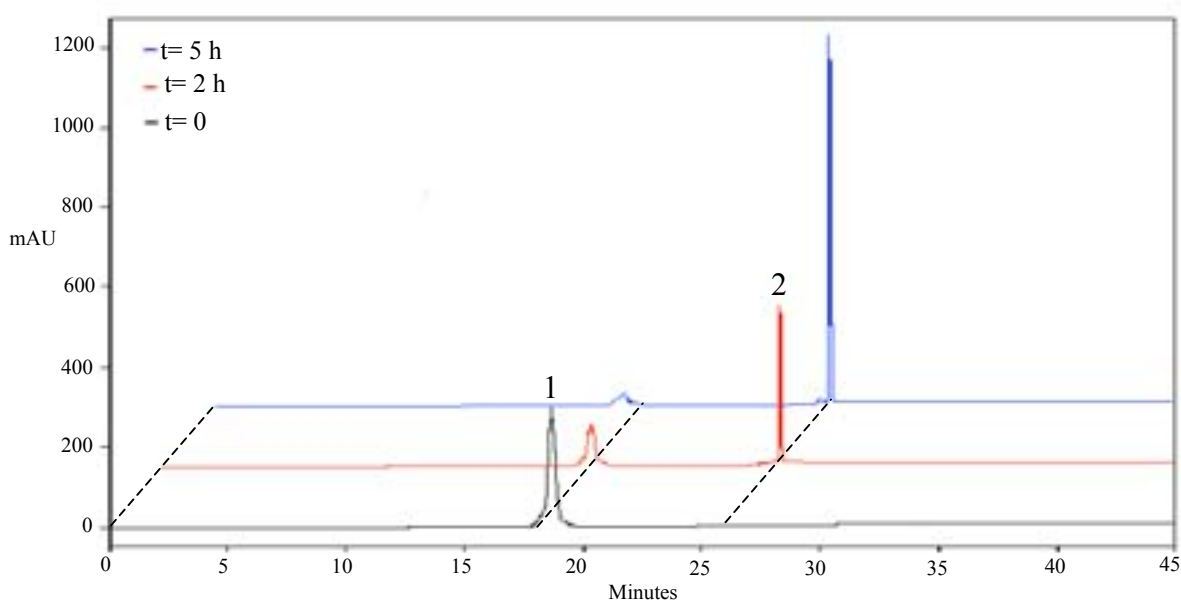
Le protocole mis en œuvre pour l'hémisynthèse de l'éthylvescalagine (**91**) est identique à celui utilisé pour l'hémisynthèse des acutissimines **85**, **86**, **89** et **90**. La vescalagine (**55**) est solubilisée dans du THF fraîchement distillé contenant 0,15 % en volume d'acide trifluoroacétique et 12 % en volume d'éthanol. Le milieu réactionnel est alors porté à une température de 60°C et son évolution est suivie par CLHP (méthode 2).



**Figure 42** : Réaction de formation de l'éthylvescalagine (**91**)

## IV-2-Analyse des chromatogrammes de l'hémisynthèse de l'éthylvescalagine

Après deux heures de réaction, la quantité de vescalagine (**55**) a diminué de moitié alors qu'un nouveau produit éluant à 26,2 min se forme (Figure 43). La disparition de la vescalagine (**55**) est totale après 5 heures de réaction. Le produit formé est moins polaire que la vescalagine (**55**). Cette modification du comportement chromatographique de ce nouveau produit est attendu s'il s'agit bien du remplacement de l'alcool benzylique de **55** par un groupe éthoxy. Ce produit a ensuite été purifié pour éliminer les impuretés apportées par l'échantillon de vescalagine (**55**) utilisé, dont la pureté n'était que de 84 %.



**Figure 43** : Suivi du milieu réactionnel de l'hémisynthèse de l'éthylvescalagine en milieu organique (1: vescalagine (**55**), 2: éthylvescalagine (**91**))

Cette purification s'effectue sur cartouche C<sub>18</sub> (Supelco). Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite puis resolubilisé dans l'eau. La solution ainsi obtenue est déposée sur la cartouche préalablement activée par un passage de 50 mL d'éthanol et de 50 mL d'eau. Les impuretés sont éluées avec une solution H<sub>2</sub>O/EtOH (98/2, v/v). L'éthylvescalagine (**91**) est éluée avec une solution d'éthanol absolu. Après évaporation sous pression réduite de l'éthanol et lyophilisation, 16 mg d'éthylvescalagine (**91**) sont obtenus sous forme d'une poudre blanche, soit un rendement de 94 %.

## IV-3-Analyse structurale l'hémisynthèse de l'éthylvescalagine

IV-3-1-Analyse par CLHP-ESI-MS à  $-30$  eV et à  $-60$  eV

L'étude structurale de l'éthylvescalagine (**91**) débute comme précédemment par une analyse CLHP-ESI-MS (méthode 10) avec une intensité de voltage de cône à  $-30$  eV. Cette analyse montre que l'éthylvescalagine (**91**) a une masse moléculaire de 962. Cette masse correspond bien à la perte de 18 unités de masse ( $H_2O$ ) suite à la condensation de l'éthanol ( $m = 46$ ) sur la vescalagine (**55**) ( $m = 934$ ) soit  $962 = 934 + 46 - 18$ .

L'utilisation d'une intensité de voltage de cône de  $-60$  eV permet de fragmenter l'éthylvescalagine (**91**) et ainsi d'observer les fragments caractéristiques de l'unité ellagique, comme dans le cas des flavano-ellagitannins. On note alors la présence d'un ion moléculaire bichargé  $[M-2H]^{2-} = 480$ , ainsi que des fragments 915, qui résulte d'une perte de 46 unités de masse (éthanol) par rapport au pic moléculaire  $[M-H]^- = 961$ , et 301, qui est l'acide ellagique (Figure 44). Des fragments d'intensité plus faible sont également présents comme le fragment 871 qui résulte d'une perte de 44 unités de masse ( $CO_2$ ) par rapport au fragment 915, ainsi que le fragment 613, qui correspond à une perte de 302 unités de masse (HHDP) de ce même fragment.

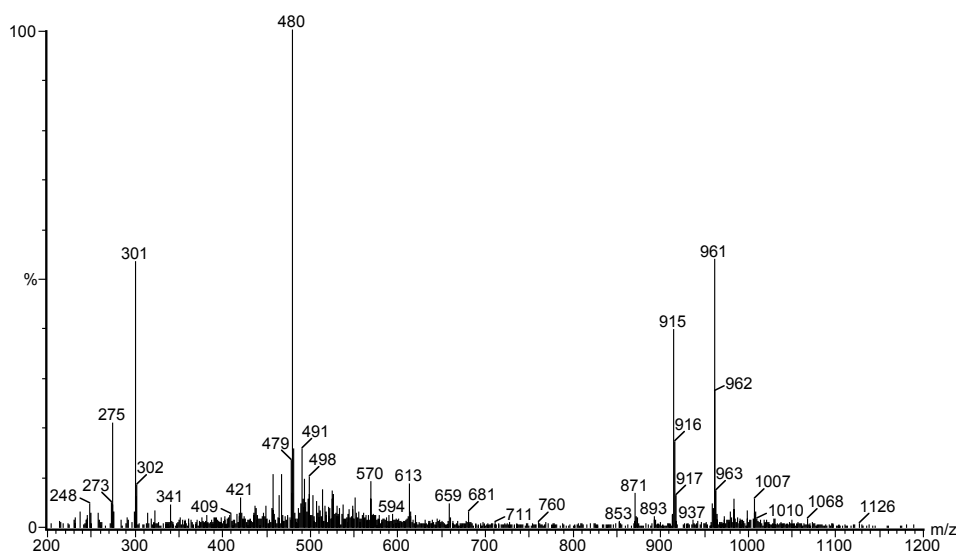
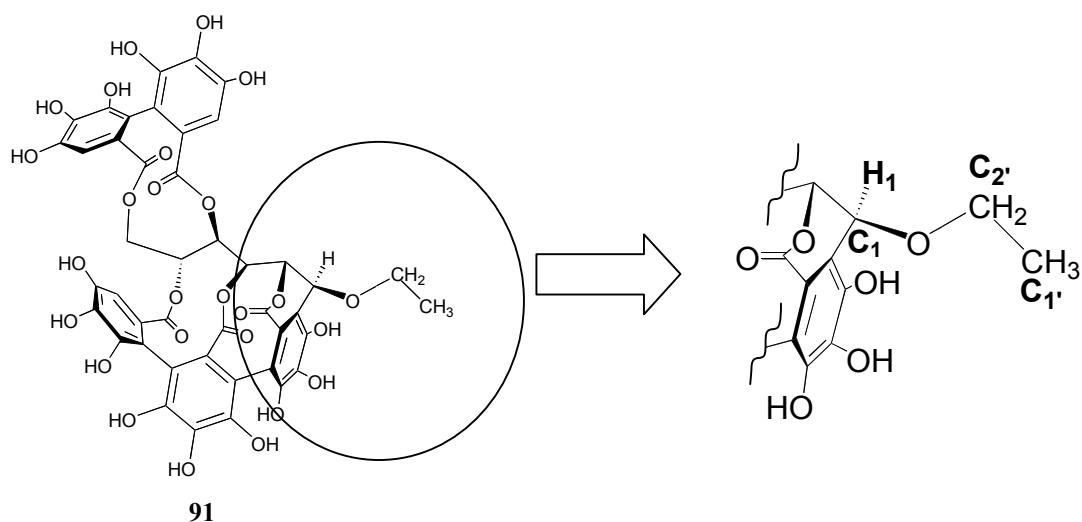


Figure 44 : Spectre de masse à  $-60$  eV de l'éthylvescalagine (**91**)

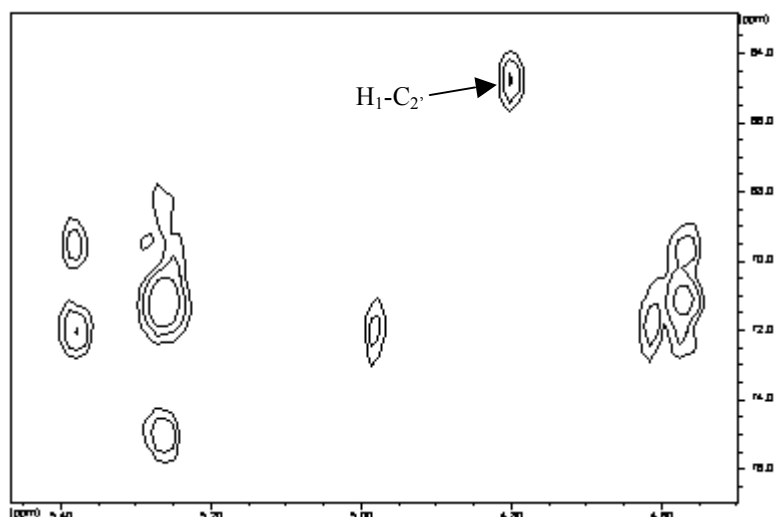
## IV-3-2-Analyse par RMN de l'éthylvescalagine

La comparaison du spectre de la RMN du proton de l'éthylvescalagine (**91**) avec celui de la vescalagine (**55**) montre une très grande similitude.<sup>92,94,95</sup> La différence la plus significative est la présence d'un triplet à 1,3 ppm, intégrant pour trois protons, et de deux quadruplets à 3,85 ppm et 4,02 ppm, intégrant chacun pour un proton. Ces trois signaux sont caractéristiques d'un groupement éthoxy porté par un carbone asymétrique, les deux protons du CH<sub>2</sub> étant diastéréotopiques. Ici aussi l'orientation de la fonction éthoxy portée par le carbone C<sub>1</sub> est déterminée par la constante de couplage entre le proton H<sub>1</sub> et le proton H<sub>2</sub>. Cette constante de couplage étant faible, l'orientation de la fonction éthoxy de l'éthylvescalagine (**91**) est β.<sup>127,128</sup>

L'analyse des corrélations proton-carbone à longue distance (HMBC) montre une corrélation entre le carbone C<sub>2'</sub> et le proton H<sub>1</sub>. Cette corrélation prouve que la fonction éthoxy est bien connectée au carbone C<sub>1</sub> de la chaîne glucosidique de la vescalagine (**55**) (Figure 45 et Figure 46). En conclusion, toutes ces analyses RMN ont permis de déterminer précisément la structure de l'éthylvescalagine (**91**), qui résulte de l'addition de l'éthanol sur le carbone C<sub>1</sub> de la vescalagine (**55**) avec rétention de configuration.



**Figure 45** : Agrandissement de l'environnement autour du carbone C<sub>1</sub> de l'éthylvescalagine (**91**)

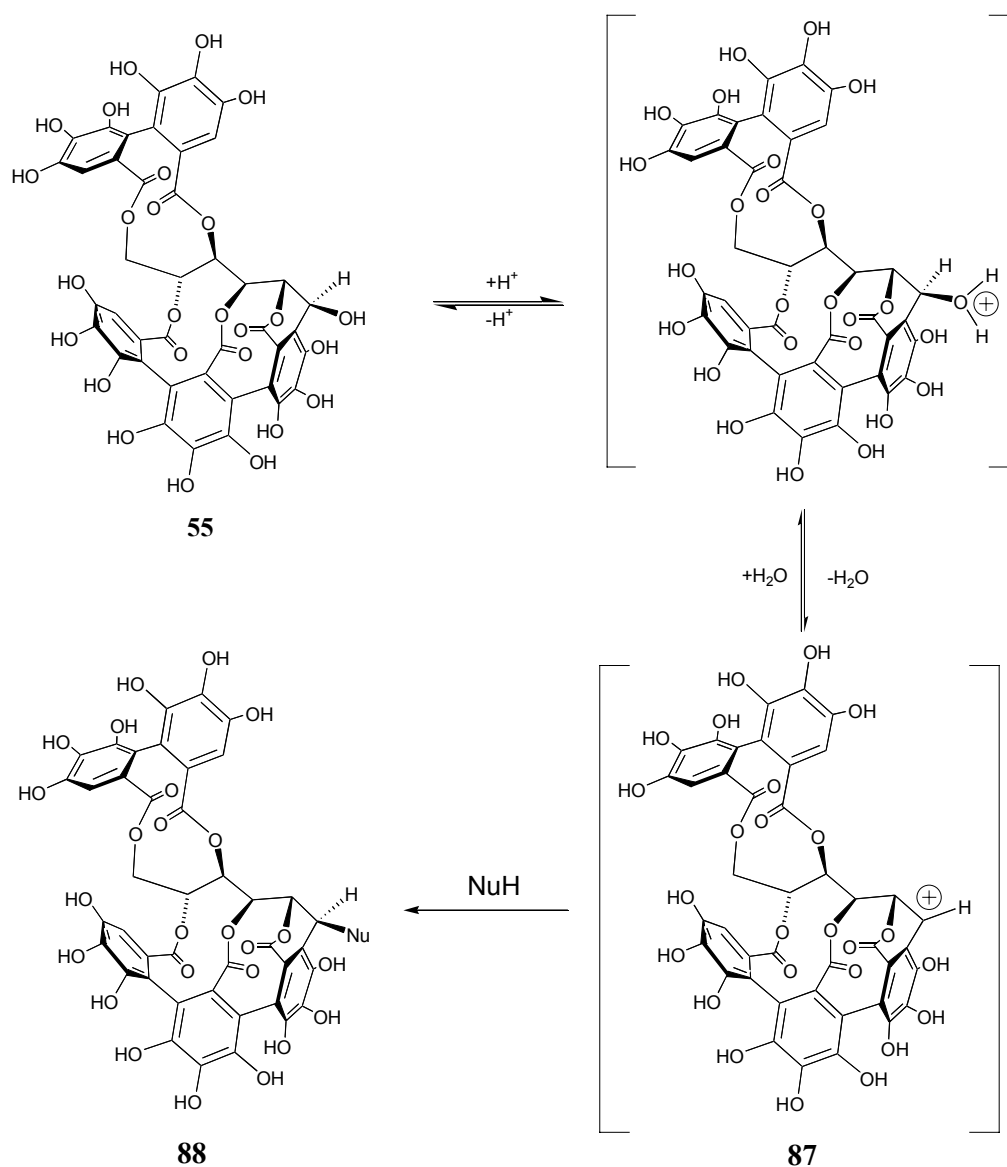


**Figure 46** : Portion de la carte HMBC de l'éthylvescalagine (**91**)

### V-Mécanisme de formation des flavano-ellagitannins ainsi que de l'éthylvescalagine

La formation des flavano-ellagitannins **85**, **86**, **89**, et **90**, ainsi que celle de l'éthylvescalagine (**91**), découlent d'un mécanisme général en milieu acide. Il s'agit d'une simple substitution nucléophile unimoléculaire (type  $S_N1$ ) avec rétention de configuration qui comprend deux étapes (Figure 47). Premièrement il y a protonation en milieu acide de l'alcool benzylique porté par le carbone  $C_1$  conduisant à la formation du carbocation benzylique **87**. Ce carbocation benzylique **87** peut alors subir l'attaque d'un nucléophile pour conduire à la formation de nos produits avec une structure commune de type **88** qui varie suivant le nucléophile utilisé (Tableau 1). L'attaque nucléophile sur le carbocation **87** se fait par la face  $\beta$  ; tous les flavano-ellagitannins présentent une orientation- $\beta$  du carbone  $C_1$  identique à celle de la vescalagine.





**Figure 47** : Mécanisme général de formation des structures de type 88

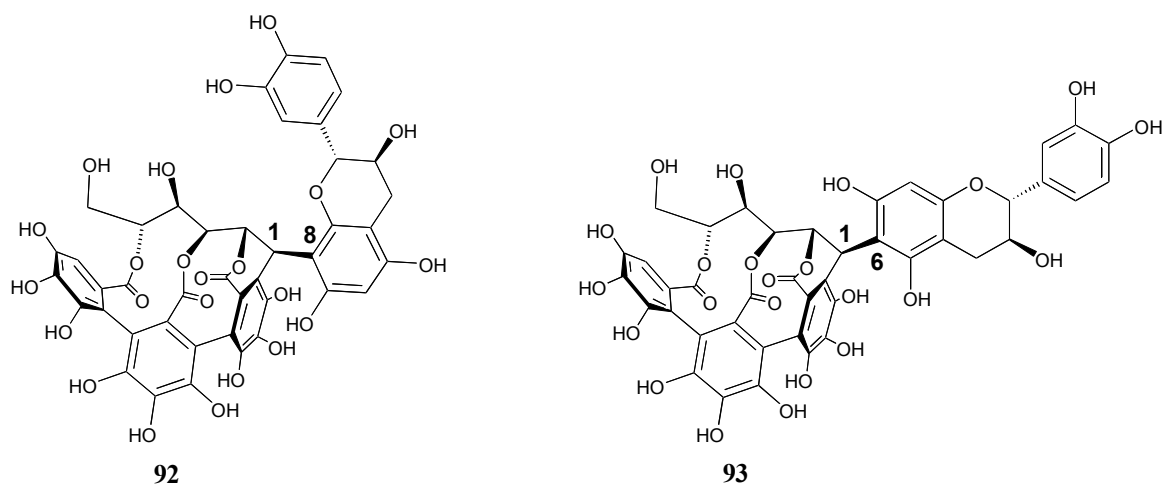
<b>NuH</b>	<b>Produit obtenu</b>
sommet 8 de 2	acutissimine A ( <b>85</b> )
sommet 6 de 2	acutissimine B ( <b>86</b> )
sommet 8 de 3	épicutissimine A ( <b>89</b> )
sommet 6 de 3	épiacutissimine B ( <b>90</b> )
oxygène de l'éthanol	éthylvescalagine ( <b>91</b> )

**Tableau 1** : Composés obtenus après attaque du nucléophile sur le carbocation 87

## VI-Hémisynthèse des acutissimines et épiacutissimines C et D en milieu organique

## VI-1-Introduction

Les acutissimines C (**92**) et D (**93**) appartiennent à la même famille de tannins complexes et elles se différencient des séries A et B par le fait que la partie ellagique a subi la perte de l'unité 4,6-hexahydroxydiphényle (HHDP). A ce jour, seul l'acutissimine C (**92**) a été observée dans l'écorce du chêne asiatique "*Quercus mongolica var grosseserrata*".<sup>114,133</sup> La formation de ces acutissimines peut être réalisée de deux manières différentes, soit par hydrolyse de l'ester 4,6-hexahydroxydiphényle (HHDP) des acutissimines A et B, soit par l'attaque nucléophile de la catéchine (**2**) sur la vescaline (**81**) ou la castaline (**82**) dans des conditions proches de l'hémisynthèse des acutissimine A (**85**) et B (**86**). La vescaline (**81**) et la castaline (**82**) sont présentes dans le bois de chêne et sont également extraites par le vin au cours de l'élevage en barrique. La vescaline (**81**) et la castaline (**82**) peuvent également être générées dans le vin au cours de l'élevage et du vieillissement du vin en bouteille, par hydrolyse de cette même unité 4,6-hexahydroxydiphényle (HHDP) de la vescalagine (**55**) et de la castalagine (**56**).

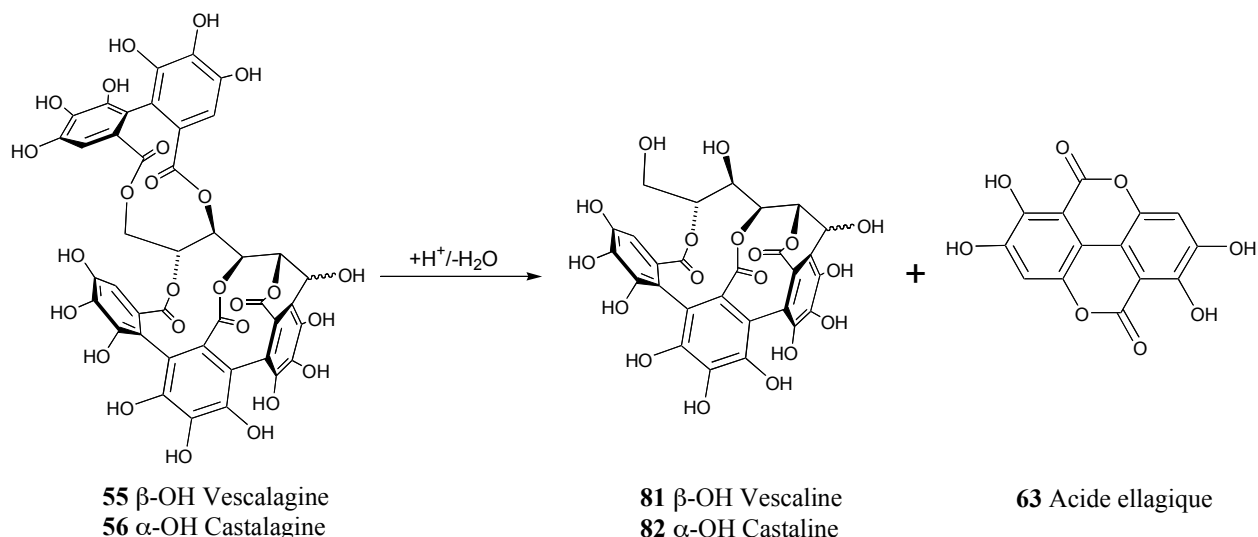


**Figure 48** : Rappel des structures de l'acutissimine C (**92**) et de l'acutissimine D (**93**)

## VI-2-Hydrolyse acide de la vescalagine et de la castalagine

## VI-2-1-Conditions opératoires de l'hydrolyse acide de la vescalagine et de la castalagine

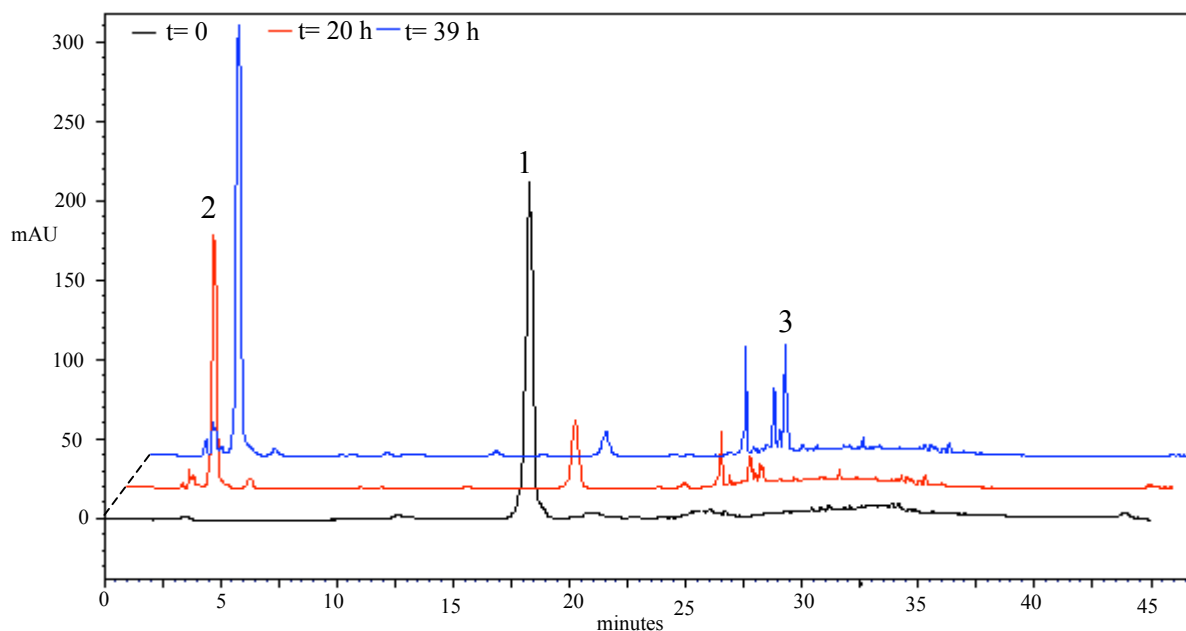
La vescalagine (**55**) ou la castalagine (**56**) sont solubilisée dans une solution aqueuse contenant 10 % en volume d'acide chlorhydrique. Le milieu réactionnel est alors porté à une température de 60°C. L'évolution de la réaction est suivie par CLHP (méthode 1).



**Figure 49** : Réaction d'hydrolyse de la vescalagine (**55**) et de la castalagine (**56**)

## VI-2-2- Analyse des chromatogrammes de l'hydrolyse acide de la vescalagine

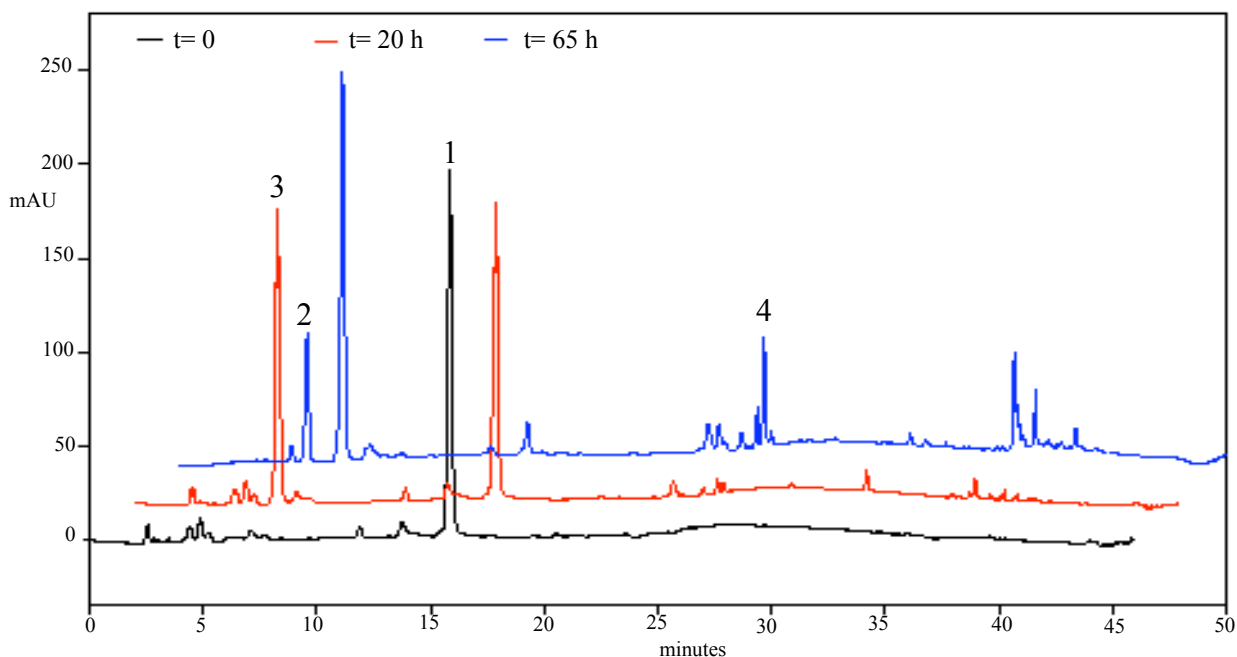
Après 20 heures de réaction, la quantité de vescalagine (**55**) a fortement diminuée et un nouveau produit majoritaire éluant à 4,2 min se forme. La formation d'un précipité blanc est observée, probablement due à précipitation de l'acide ellagique (**63**) insoluble dans l'eau. Après 39 heures, l'hydrolyse de la vescalagine (**55**) est complète, mais d'autres produits apparaissent entre 25 et 30 min (Figure 50). Une analyse par CLHP-ESI-MS (méthode 10) a permis de déterminer la masse moléculaire du produit éluant à 4,2 min. Cette masse est de 632 et correspond à celle de la vescaline (**81**).



**Figure 50** : Suivi du milieu réactionnel de l'hydrolyse de la vescalagine (**55**) (1 : vescalagine (**55**), 2 : vescaline (**81**), 3 : produit inconnu (cf. paragraphe VI-2-5))

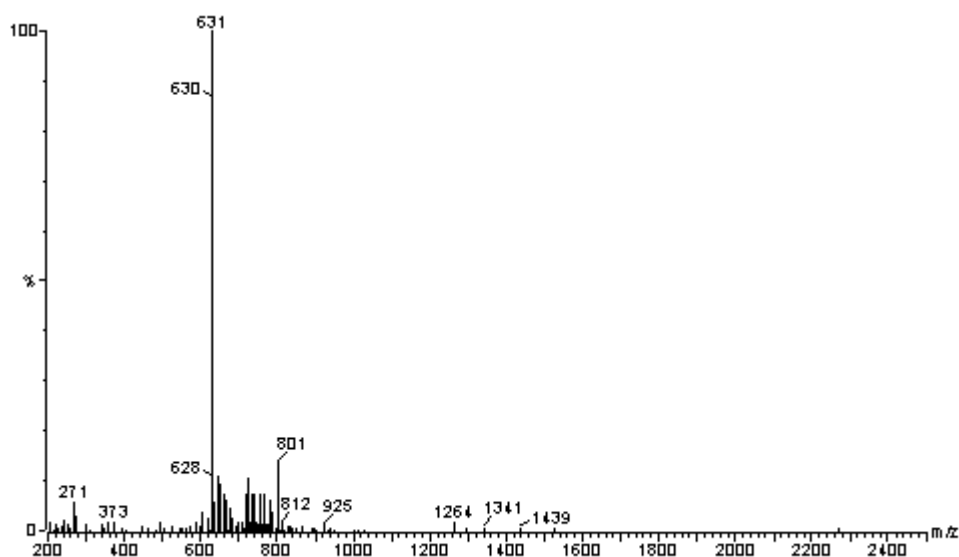
#### VI-2-3-Analyse des chromatogrammes de l'hydrolyse acide de la castalagine

Après 20 heures de réaction (Figure 51), 50 % de la castalagine (**56**) a été hydrolysée en castaline (**82**) (pic 2 à 5,5 min) avec formation d'acide ellagique (**63**) sous forme d'un précipité blanc comme pour l'hydrolyse de la vescalagine. La disparition de la castalagine (**56**) est totale après 69 heures. On note alors l'augmentation de la castaline (**82**) (pic 2 à 5,5 min) ainsi que la présence d'un pic 3 à 4,2 min avec un temps de rétention identique à celui de la vescaline (**81**). Une analyse par CLHP-ESI-MS a permis de confirmer la masse moléculaire des deux produits éluant à 4,2 et 5,5 min. Il s'agit d'une masse de 632 dans les deux cas, correspondant bien à la masse moléculaire des deux épimères vescaline (**81**), pic 3 et castaline (**82**), pic 2 (Figure 51).



**Figure 51 :** Suivi du milieu réactionnel de l'hydrolyse de la castalagine (**56**) (1 : castalagine (**56**), 2 : vescaline (**81**), 3 : castaline (**82**), 4 : produit inconnu (cf. paragraphe VI-2-5))

Il y aurait donc une épimérisation de la castaline (**82**) en vescaline (**81**) au cours de l'hydrolyse acide de la castalagine (**56**) en castaline (**82**) (Figure 51). L'absence de formation de vescalagine (**55**) indique que seule la castaline (**82**) s'épimérise en vescaline (**81**), et qu'il n'y a pas épimérisation de la castalagine (**56**) en vescalagine (**55**) qui s'hydrolyserait pour former de la vescaline (**81**).



**Figure 52 :** Spectre de masse à  $-30$  eV de la castaline (**82**) qui est identique à celui de la vescaline (**81**)

Dans le but de vérifier que le produit éluant à 4,2 min est bien la vescaline (**81**), cette réaction d'hydrolyse a été répétée sur 50 mg de castalagine (**56**) dans les conditions précédentes afin d'obtenir, après purification, une quantité suffisante du produit pour effectuer sa caractérisation par RMN. Après 65 heures de réaction, le milieu réactionnel a été filtré pour éliminer l'acide ellagique (**51**) formé. La purification du mélange castaline (**82**)/vescaline (**81**) est réalisée sur cartouche C<sub>18</sub> (Supelco), le mélange est déposé sur la cartouche préalablement activée par l'éluion de 50 mL de méthanol et de 50 mL d'eau. Le mélange castaline (**82**)/vescaline (**81**) est éluée avec 50 mL d'une solution H<sub>2</sub>O/MeOH (95/5 v/v). Après évaporation et lyophilisation, 24,7 mg d'un mélange castaline (**82**)/vescaline (**81**) est obtenu dans un rapport 63:37 sous forme d'une poudre grise, soit un rendement de 85 %.

La séparation de la castaline (**82**) et de la vescaline (**81**) est ensuite réalisée par CLHP semi-préparative (méthode 8). Des fractions de 10 mg du mélange solubilisé dans 500 µL d'eau sont injectées en CLHP semi-préparative. La vescaline (**81**) et la castaline (**82**) sont collectées séparément. Après injection complète du mélange, 9,2 mg de vescaline (**81**) sont obtenues sous forme d'une poudre grise, soit un rendement de 31 % et 15,5 mg de castaline (**82**), également sous forme d'une poudre grise, soit un rendement de 53 %.

#### VI-2-4-Identification par RMN de la castaline et de la vescaline obtenues par hydrolyse

La comparaison du spectre de RMN du proton de la castaline (**82**), obtenue par hydrolyse de la castalagine (**56**), avec celui de la castalagine (**56**) pure montre que les signaux des chaînes glucosidiques sont similaires.<sup>91,94</sup> L'unique différence est la disparition de deux protons aromatiques, consécutive à l'hydrolyse de l'unité 4,6-hexahydroxydiphényle (HHDP). Une analyse plus fine des signaux de la chaîne glucosidique montre que la constante de couplage du proton H<sub>1</sub> est égale à 3,5 Hz, impliquant que la configuration du carbone C<sub>1</sub> de la castaline (**82**) est identique à celle de la castalagine (**56**). Le groupement hydroxyle a une orientation α.

Les données RMN du proton de la vescaline (**81**) sont aussi très semblables à celles de la vescalagine (**55**) pure,<sup>92,94</sup> et la principale différence est ici encore la disparition des deux protons aromatiques de l'unité HHDP hydrolysée. La constante de couplage entre le proton

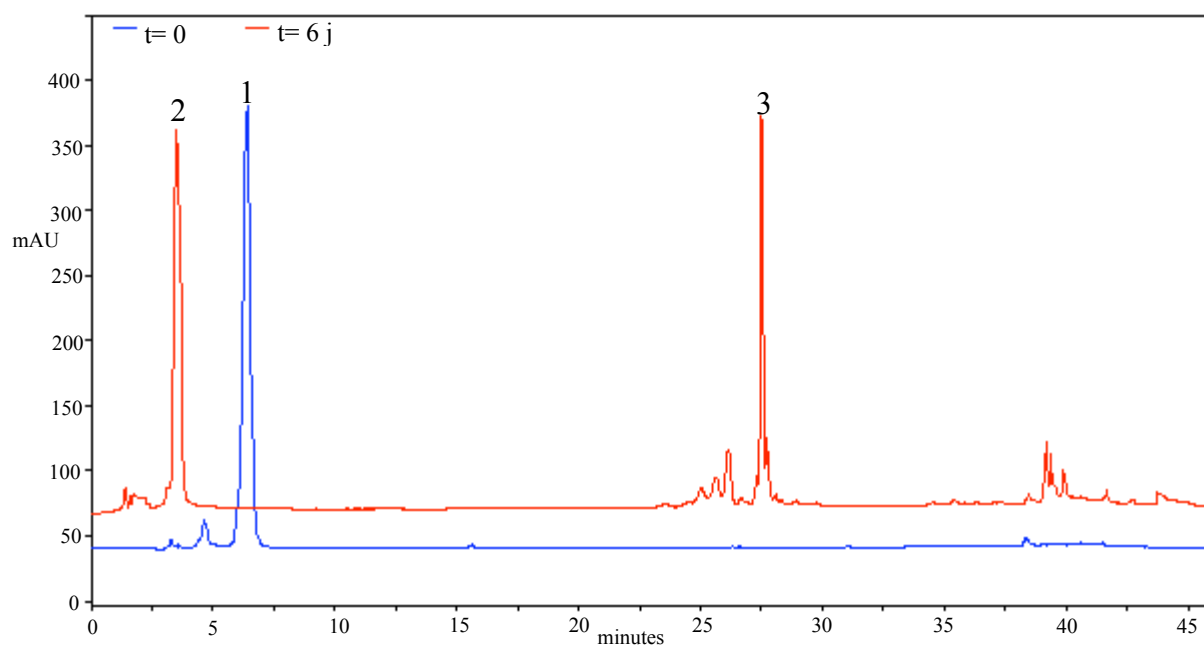
H<sub>1</sub> et le proton H<sub>2</sub> proche de zéro est caractéristique d'une orientation-β de la fonction alcool benzylique du carbone C<sub>1</sub>, comme dans le cas de la vescalagine (**55**).

En conclusion, les réaction d'hydrolyse effectuées et les caractérisations par RMN des produits purifiés nous indiquent qu'il y a donc eu une épimérisation de la castaline (**82**) en vescaline (**81**) au cours de l'hydrolyse de la castalagine (**56**) en castaline (**82**).

#### VI-2-5-Epimérisation de la castaline en vescaline

##### VI-2-5-1-Conditions opératoires de l'épimérisation de la castaline en vescaline avec formation du vescalène

L'épimérisation de la castaline (**82**) en vescaline (**81**) ayant été observée comme réaction secondaire de l'hydrolyse acide de la castalagine (**56**), cette réaction a été réalisée à partir de castaline (**82**) purifiée précédemment. La castaline (**82**) purifiée est solubilisée dans une solution aqueuse contenant 10 % en volume d'acide chlorhydrique. Le milieu est porté à une température de 60°C et l'évolution de la réaction est suivie par CLHP (méthode 1).



**Figure 53** : Suivi du milieu réactionnel de l'épimérisation de la castaline (**82**) en vescaline (**81**) (1 : castaline (**82**), 2 : vescaline (**81**), 3 : vescalène (**94**))

Après 24 heures de réaction, la quantité de castaline (**82**) a diminuée, et le pic à 4,2 min correspondant à la vescaline (**81**) est apparu comme précédemment. Après 6 jours de réaction, il semble que toute la castaline (**82**) a été épimérisée en vescaline (**81**), mais d'autres produits moins polaires sont apparus, dont un produit majoritaire (pic 3) éluant à 27,9 min (Figure 53). Ce produit était déjà présent en faible quantité lors de l'hydrolyse de **55** et **56** appelé pic inconnu (voir pic 3 et 4, Figure 50 et 51, respectivement).

Des fractions de 5 mL du milieu réactionnel sont déposées sur une cartouche C<sub>18</sub> (Supelco). La vescaline (**81**) est éluée avec 50 mL d'eau non acidifiée puis la cartouche est lavée avec 50 ml de méthanol, permettant à la fois l'élution des autres produits. Ces étapes sont reproduites jusqu'à séparation complète du mélange réactionnel. Les fractions contenant la vescaline (**81**) sont regroupées et lyophilisées pour donner 6,5 mg de vescaline (**81**) sous forme d'une poudre grise, soit un rendement de 65 %. Les fractions contenant les autres produits sont également regroupées et lyophilisées pour fournir un échantillon de 3 mg. Le produit majoritaire de ces fractions est purifié par CLHP semi-préparative (méthode 9) pour conduire, après évaporation et lyophilisation, à 2 mg de vescalène (**94**) sous forme d'une poudre jaune, soit un rendement de 21 %.

#### *VI-2-5-2-Characterisation du vescalène*

L'analyse par CLHP-ESI-MS (méthode 10) du produit **94** nous a tout d'abord permis d'en déterminer sa masse moléculaire, 614, soit une perte de 18 par rapport à la masse de la vescaline (**81**) ou de la castaline (**82**). Cette perte de 18 unités de masse peut être due à une déshydratation de la chaîne glucosidique.

La comparaison entre le spectre RMN du proton du vescalène (**94**) et ceux de la vescaline (**81**) et de la castaline (**82**) montre la disparition de deux protons aliphatiques de la chaîne glucosidique et l'apparition d'un proton éthylénique. La RMN du carbone confirme également cela, avec la disparition de deux carbones de la chaîne glucosidique et l'apparition d'un carbone éthylénique tertiaire et d'un carbone éthylénique quaternaire. La molécule n'a donc pas perdu de carbone mais une liaison éthylénique s'est formée sur la chaîne glucosidique. Cette liaison éthylénique sur la chaîne glucosidique provient de la déshydratation de l'un de ces trois alcools, ce qui concorde avec une perte de 18 unités de masse.



La détermination de la position de la double liaison formée par déshydratation est réalisée par corrélation proton-proton (COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ). Les deux protons  $\text{H}_6$  sont facilement assignables puisqu'ils sont portés par l'unique carbone méthylénique de la molécule. A partir des protons  $\text{H}_6$ , les corrélations proton-proton montrent l'enchaînement de la chaîne glucosidique  $\text{H}_6$ ,  $\text{H}_5$ ,  $\text{H}_4$ ,  $\text{H}_3$  (Figure 54, Figure 55). Le proton  $\text{H}_3$  ne corrèle qu'avec le proton  $\text{H}_4$ , alors que le proton  $\text{H}_2$  a disparu. De plus, le proton éthylénique  $\text{H}_1$  ne montre aucune corrélation proton-proton adjacente, prouvant qu'il est entouré de deux carbones quaternaires. Les corrélations proton-carbone à longue distance (HMBC) montrent également que le proton éthylénique  $\text{H}_1$  corrèle avec les carbones 2' et 3' d'un cycle aromatique, et seul un proton en position 1 peut présenter de telles corrélations. En conclusion, la liaison éthylénique formée par déshydratation d'un alcool de la chaîne glucosidique se situe entre les carbones 1 et 2. La formation de cette double liaison est consécutive à la déshydratation de l'alcool benzylique en position 1 de la vescaline (**81**) ou de la castaline (**82**) (Figure 55 et Figure 56).

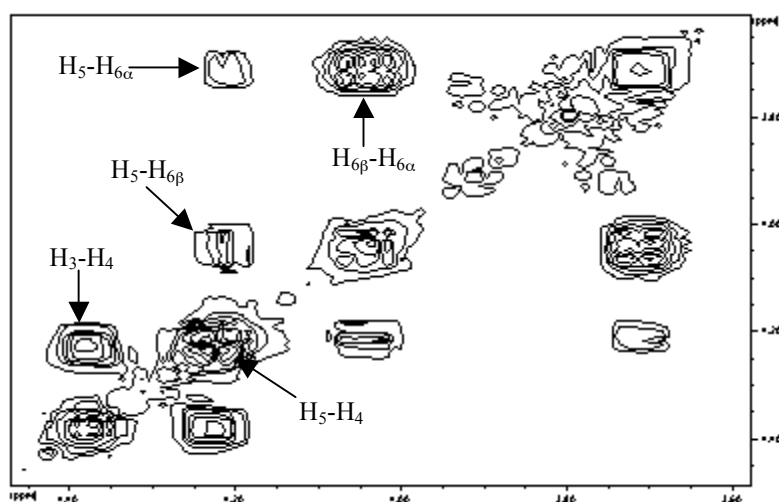


Figure 54 : Portion de la carte COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  du vescalène (**94**)

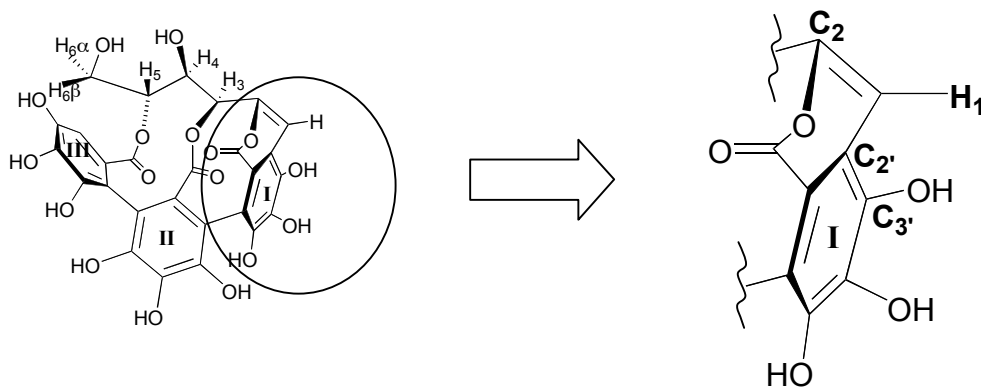
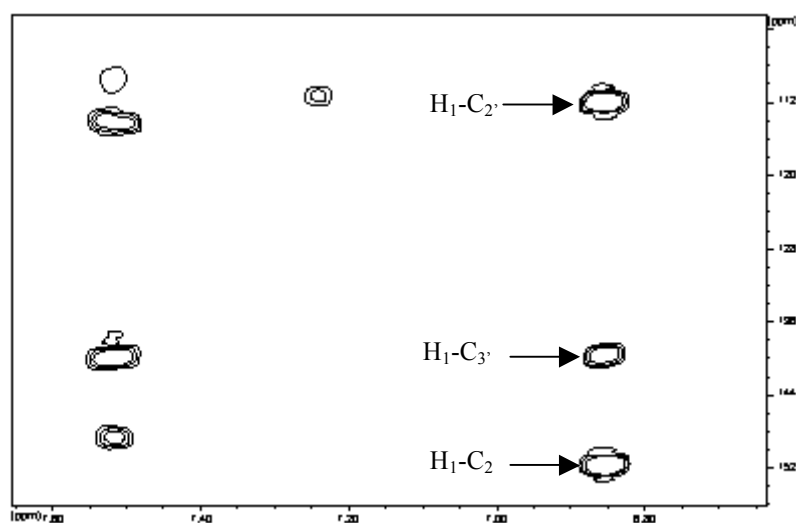


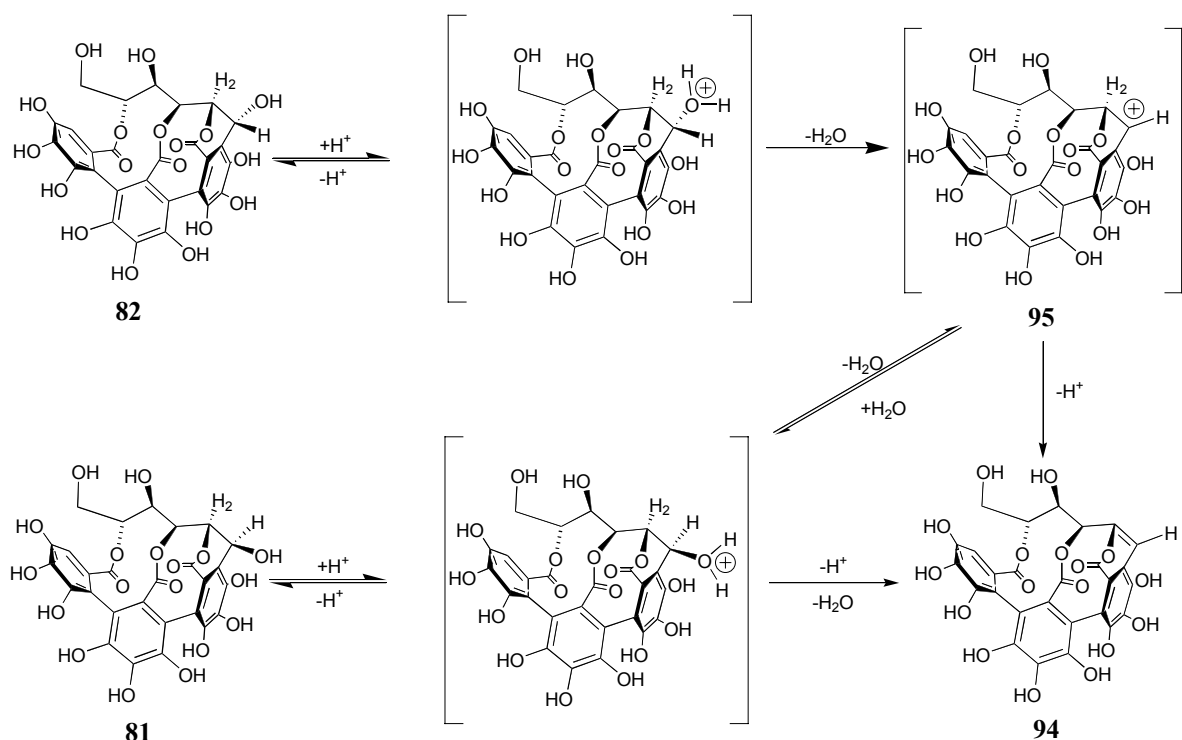
Figure 55 : Agrandissement de l'environnement autour du carbone  $\text{C}_1$  du vescalène (**94**)



**Figure 56 :** Portion de la carte HMBC du vescalène (**94**)

#### VI-2-5-3-Mécanisme de l'épimérisation de la castaline en vescaline avec formation du vescalène

L'épimérisation de la castaline (**82**) en vescaline (**81**) en milieu acide découle d'un mécanisme identique à celui de la formation des flavano-ellagitannins, malgré l'absence de l'unité 4,6 hexahydroxydiphényle (HHDP). Ce mécanisme débute par la protonation de l'alcool benzylique du carbone C<sub>1</sub> de la castaline (**82**), suivie du départ d'une molécule d'eau pour conduire à la formation du carbocation benzylique **95**. L'addition d'une molécule d'eau sur ce carbocation conduit à la formation de la vescaline (**81**). L'attaque nucléophile de l'eau se produisant uniquement sur la face β, elle permet l'épimérisation totale de la castaline (**82**) en vescaline (**81**). Cependant l'élimination du proton H<sub>2</sub> conduit à la formation du vescalène (**94**) (Figure 57).

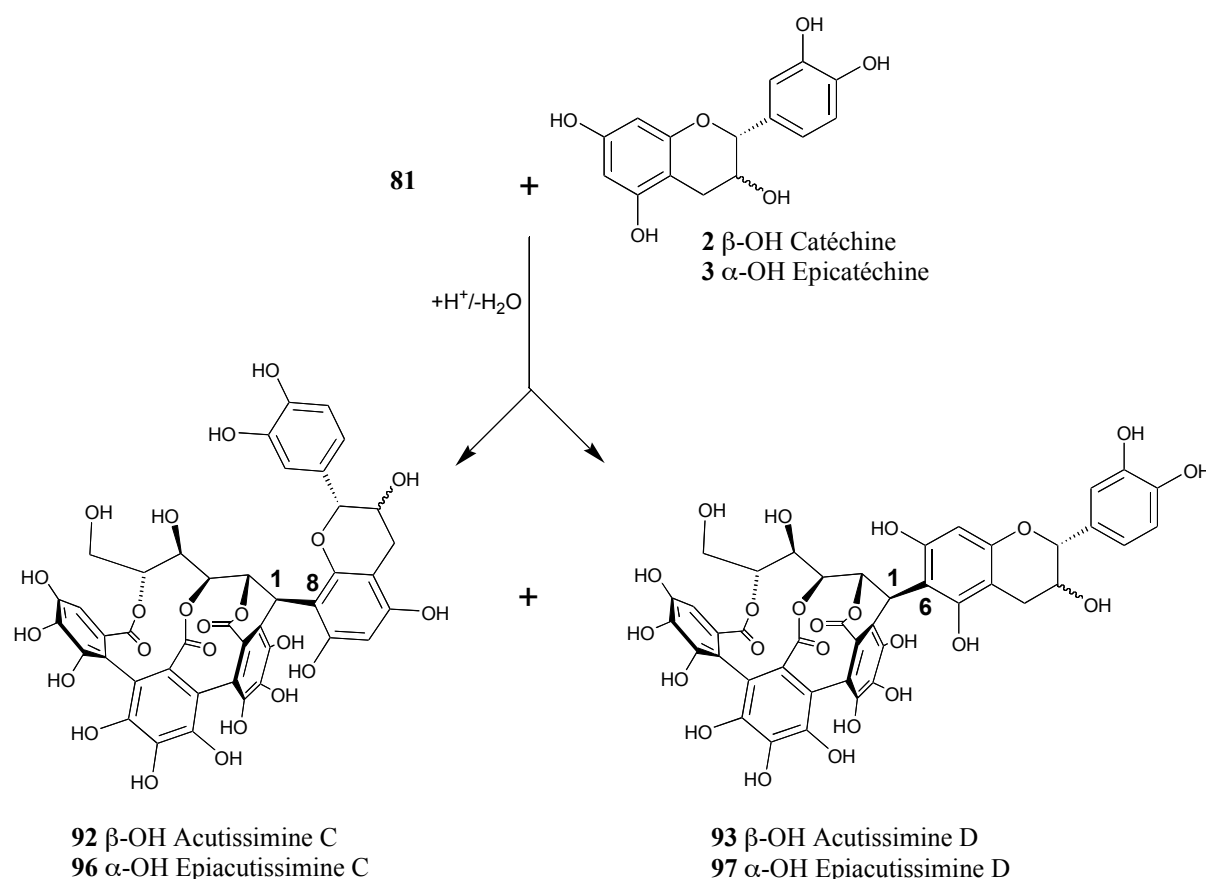


**Figure 57 :** Mécanisme de l'épimérisation de la castaline (**82**) en vescaline (**81**) avec formation du vescalène (**94**)

### VI-3-Hémisynthèse des acutissimines et épiacutissimines C et D

#### VI-3-1-Condition opératoire de l'hémisynthèse des acutissimines et épiacutissimines C et D

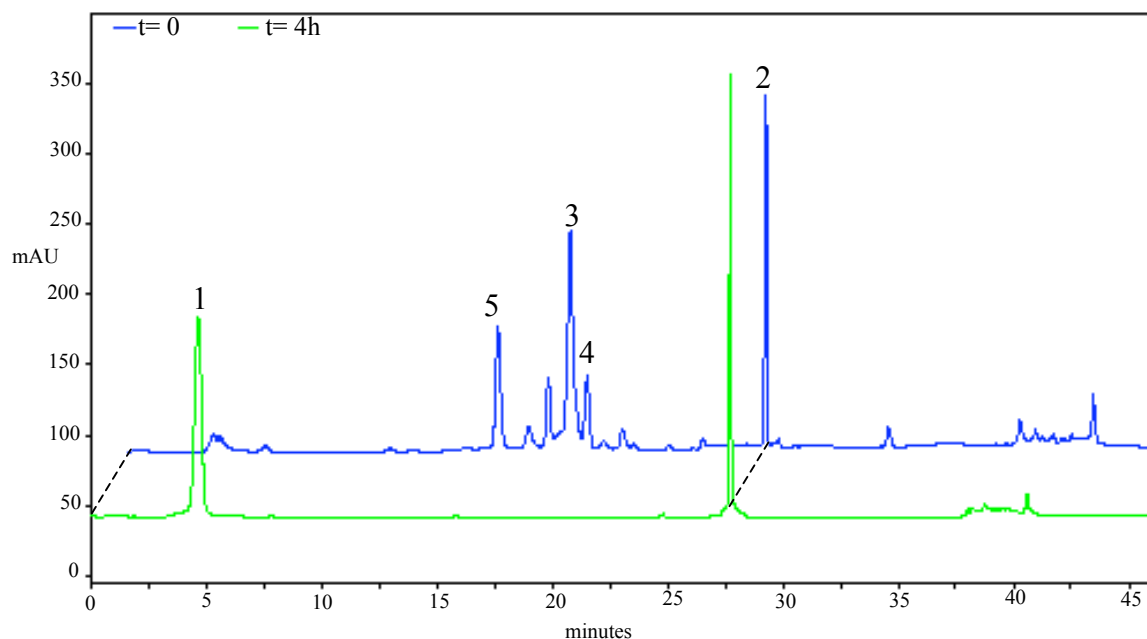
Le protocole utilisé pour l'hémisynthèse des acutissimines C (**92**) et D (**93**) est identique à celui établi précédemment pour l'hémisynthèse des acutissimines A (**85**) et B (**86**). La vescaline (**81**), purifiée précédemment, est solubilisée avec de la catéchine (**2**) dans une solution de THF fraîchement distillé et acidifiée avec 0,15 % en volume d'acide trifluoroacétique. Le milieu réactionnel est alors porté à une température de 60°C et l'évolution de la réaction est suivie par CLHP (méthode 1).



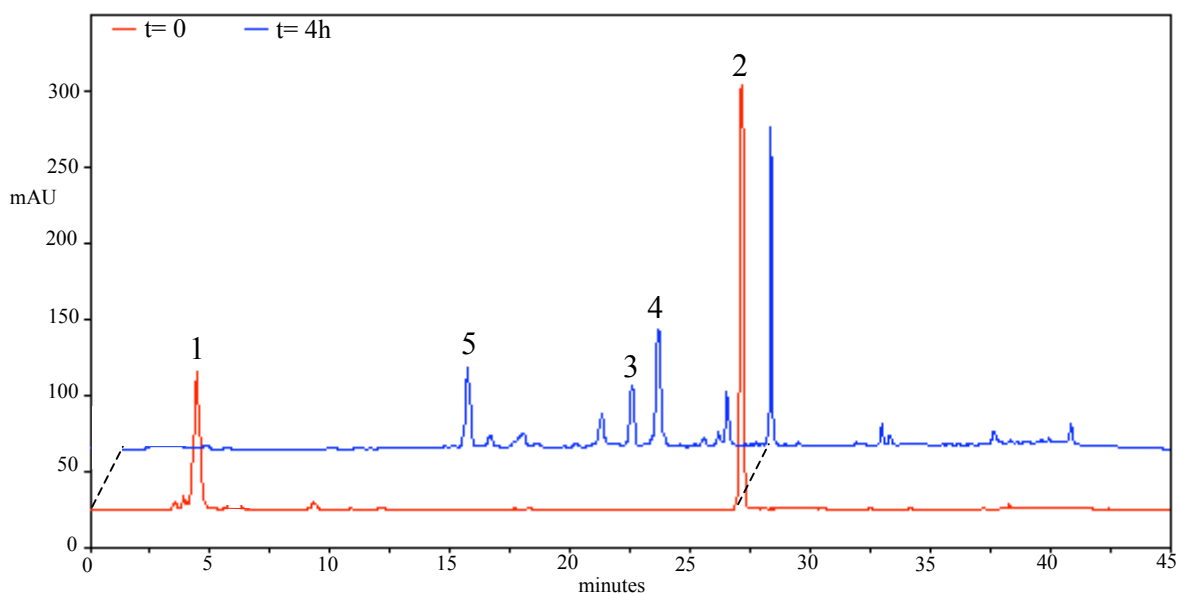
**Figure 58** : Réaction de formation des acutissimines C (**92**) et D (**93**) et des épiacutissimines C (**96**) et D (**97**)

### VI-3-2-Analyse des chromatogrammes de l'hémisynthèse des acutissimines et épiacutissimines C et D

Après 4 heures de réaction, la vescaline (**81**) a totalement disparu alors qu'il reste de la catéchine (**2**) qui n'a pas réagi, bien que le rapport de départ vescaline (**81**) : catéchine (**2**) soit de 1 : 1. La formation de trois nouveaux produits à 11,5 min, 19,8 min, 20,5 min est observée (Figure 59). Le remplacement de la catéchine par l'épicatéchine (**3**) pour réaliser la formation des épiacutissimines C (**96**) et D (**97**) conduit à une évolution identique du milieu réactionnel. La formation de trois nouveaux produits est également observée après 4 heures de réaction.



**Figure 59a** : Suivi du milieu réactionnel de l'hémisynthèse des acutissimines C et D (1 : vescaline (**81**), 2 : catéchine (**2**), 3 : acutissimine C (**92**), 4 : acutissimine D (**93**), 5 : complexe vescaline-catéchine-vescaline (**98**))



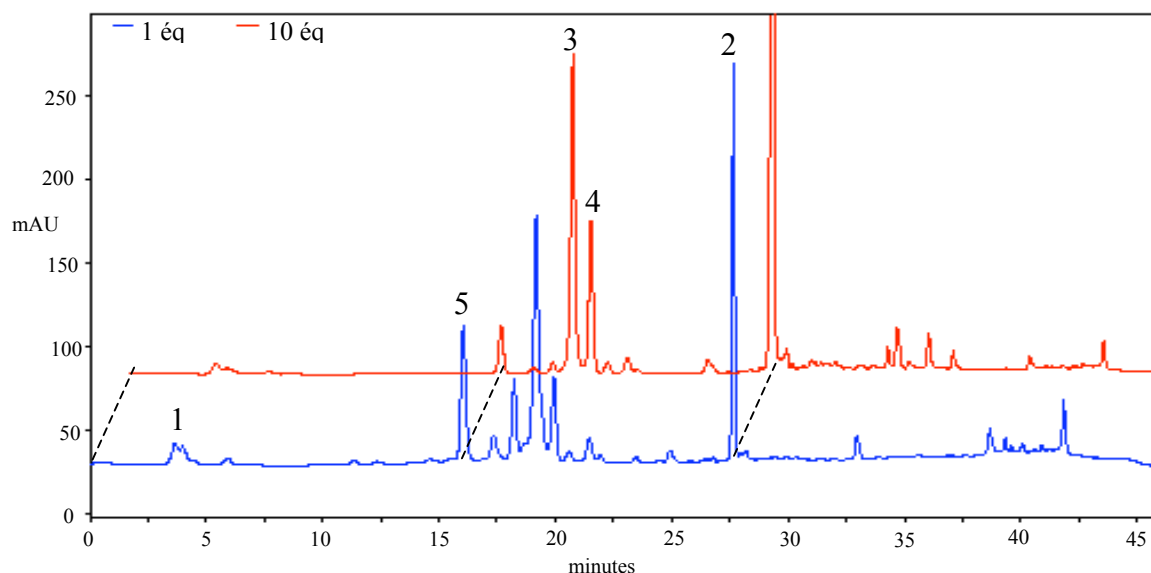
**Figure 59b** : Suivi du milieu réactionnel de l'hémisynthèse des épicutissimines C et D (1 : vescaline (**81**), 2 : épicatechine (**3**), 3 : épicutissimine D (**97**), 4 : épicutissimine C (**96**), 5 : complexe vescaline-épicatechine-vescaline (**99**))

## VI-3-3-Analyse structurale par CLHP-ESI-MS

VI-3-3-1-Analyse à  $-30$  eV

L'analyse CLHP-ESI-MS (méthode 10) en mode négatif avec une intensité de voltage de cône de  $-30$  eV permet de déterminer la masse moléculaire des composés observés en CLHP analytique. Les deux produits à 19,8 min (pic 3) et à 20,5 min (pic 4) ont des masses identiques de 904 correspondant à la masse des acutissimines C et D. En effet, une masse de 904 peut correspondre à la perte de 18 unités de masse ( $\text{H}_2\text{O}$ ), suite à la condensation entre la vescaline (**81**) ( $m = 632$ ) et la catéchine (**2**) ou l'épicatéchine (**3**) ( $m = 290$ ) soit  $904 = 632 + 290 - 18$ . Le produit à 15,1 min (pic 5) a une masse moléculaire de 1518. Cette masse pouvant résulter de la formation d'un complexe vescaline-flavan-3-ol-vescaline obtenu par la perte de 18 unités de masse ( $\text{H}_2\text{O}$ ) suite à la condensation entre la vescaline (**81**) ( $m = 632$ ) et l'une des acutissimines **92**, **93** ou **96** et **97**, soit  $1518 = 632 + 904 - 18$ .

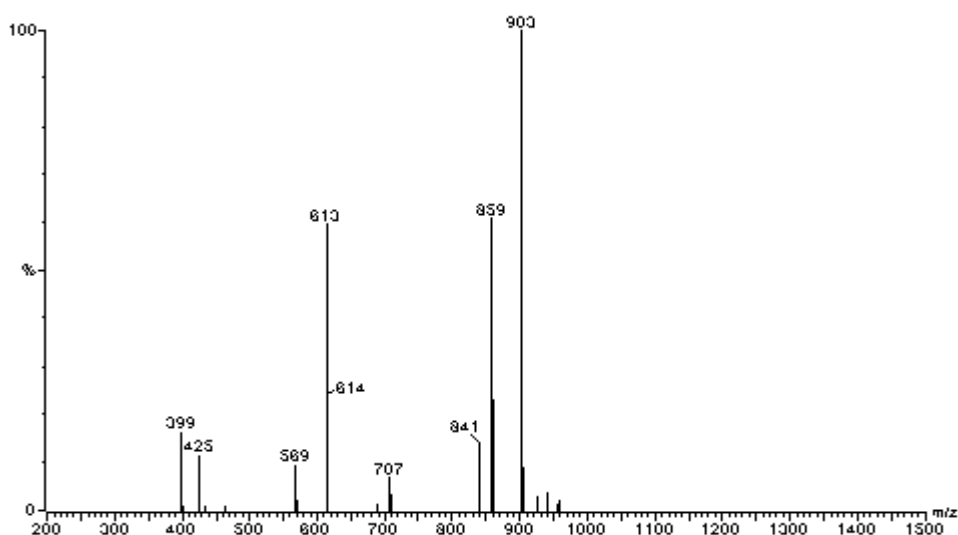
La réaction d'hémisynthèse des acutissimines C (**92**) et D (**93**) a alors été réalisée en utilisant un excès de catéchine (**2**) (10 équivalents) dans des conditions identiques à celles utilisées précédemment. La comparaison des deux milieux réactionnels (Figure 60) en fin de réaction montre que l'intensité du pic 5, correspondant au complexe **98**, est beaucoup plus faible cette fois-ci.



**Figure 60** : Comparaison entre les deux milieux réactionnels après 4 heures, utilisant 1 et 10 équivalents de catéchine (**2**) par rapport à la vescaline (**81**) (1 : vescaline (**81**), 2 : catéchine (**2**), 3 : acutissimine C (**92**), 4 : acutissimine D (**93**), 5 : complexe vescaline-catéchine-vescaline (**98**))

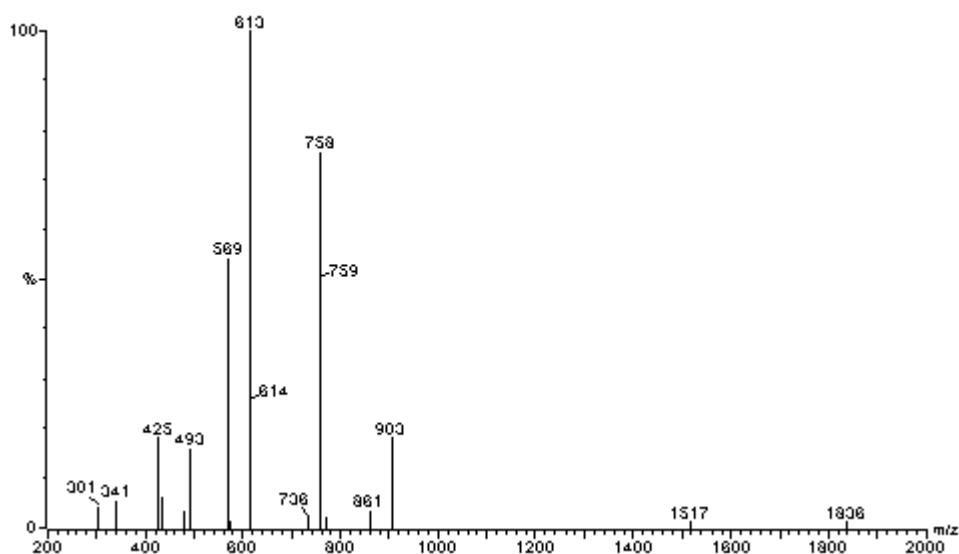
VI-3-3-2-Analyse à  $-60$  eV

L'utilisation d'une intensité de cône de voltage de  $-60$  eV en CLHP-ESI-MS (méthode 10) permet de fragmenter les produits et ainsi d'obtenir des informations sur leur structure. L'analyse des produits 3 et 4 de masse moléculaire 904, correspondant à la formation des acutissimines C (**92**) et D (**93**) ou des épiacutissimines C (**96**) et D (**97**) montrent des fragments caractéristiques comme 613, qui correspondent à une perte de 290 unités de masse (catéchine (**2**) ou épicatechine (**3**)) par rapport au pic moléculaire  $[M-H]^- = 903$  (Figure 61). Le fragment 859 est une perte de 44 unités de masse ( $CO_2$ ) par rapport à 903, et le fragment 707 qui est une perte caractéristique de 152 unités de masse par rapport au fragment 859, causée par la réaction de rétro Diels-Alder du cycle C<sup>123-126</sup> de l'unité flavan-3-ol, comme dans le cas des acutissimines **85**, **86**, **89** et **90**.



**Figure 61** : Spectre de masse des acutissimines et des épiacutissimines C et D à  $-60$  eV

L'analyse du pic 5 avec une intensité de cône de voltage de  $-60$  eV montre la formation d'un fragment de masse 903, qui correspond à une perte de 614 unités de masse par rapport à l'ion moléculaire  $[M-H]^- = 1517$  pouvant être attribuée à la perte d'une unité vescaline (**81**). A partir de cette masse de 903, les mêmes profils de fragmentation que ceux observés pour les acutissimines C (**92**) et D (**93**) sont observés montrant que le pic 5 est formé de deux unités vescaline (**81**) et d'une unité flavan-3-ol (**2** ou **3**). Nous supposons que les deux unités vescaline (**81**) sont reliées à l'unité flavan-3-ol par le sommet 6 et par le sommet 8. La masse de 758 est l'ion moléculaire bichargé  $[M-2H]^{2-}$  (Figure 62).



**Figure 62** : Spectre de masse des complexes vescaline-flavan-3-ol-vescaline **98** et **99** à  $-60$  eV

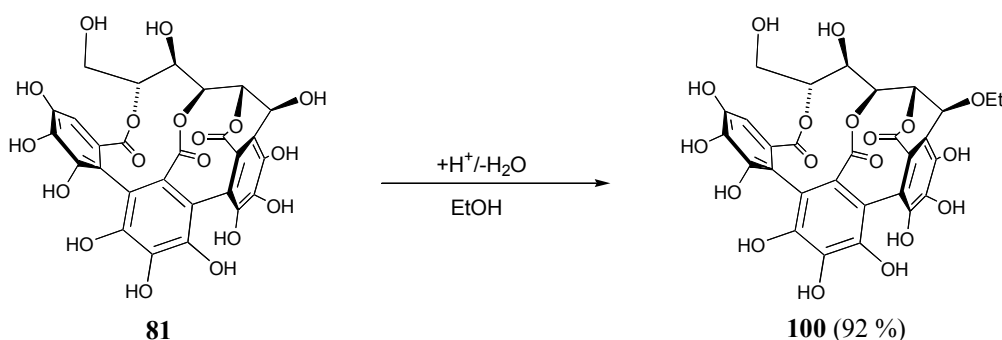
En conclusion, la formation des acutissimines C (**92**) et D (**93**) a été observée ainsi que celle d'un flavano-ellagitannin plus complexe de type vescaline-catéchine-vescaline **98**, qui résulte de la condensation entre la vescaline (**81**) et les acutissimines C (**92**) et D (**93**) déjà formées (Figure 67). Le remplacement de la catéchine (**2**) par l'épicatéchine (**3**) conduit à la formation des épiacutissimines C (**96**) et D (**97**) ainsi qu'à celle d'un complexe vescaline-épicatéchine-vescaline **99**, dont les spectres de masse sont identiques à ceux des produits obtenus à partir de la catéchine (**2**). Par contre l'échelle à laquelle ces réactions ont été réalisées ne nous a pas permis d'obtenir ni ces acutissimines de la série C et D, ni les complexes vescaline-flavan-3-ol-vescaline en quantités suffisantes pour les caractériser par RMN.



## VI-4-Hémisynthèse de l'éthylvescaline

## VI-4-1-Conditions opératoires de l'hémisynthèse de l'éthylvescaline

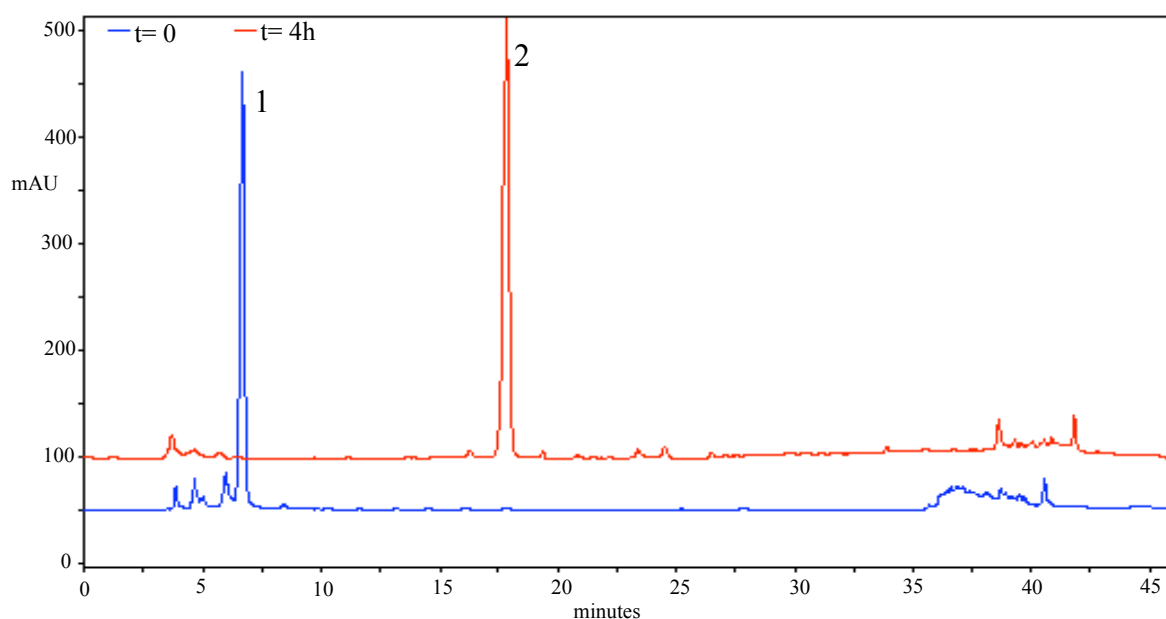
Le protocole utilisé pour l'hémisynthèse de l'éthylvescaline (**100**) est proche de celui établi précédemment pour l'hémisynthèse de l'éthylvescalagine (**91**). La vescaline (**81**) purifiée est solubilisée dans du THF fraîchement distillé contenant 0,15 % en volume d'acide trifluoroacétique et 12 % en volume d'éthanol. Le milieu réactionnel est alors porté à une température de 60°C et l'évolution de la réaction est suivie par CLHP (méthode 1).



**Figure 63** : Réaction de formation de l'éthylvescaline (**100**)

## VI-4-2-Analyse des chromatogrammes de l'hémisynthèse de l'éthylvescaline

Après 4 heures de réaction, la vescaline (**81**) a totalement disparu et un nouveau produit éluant à 17,8 min s'est formé comme prévu (Figure 64). Le produit formé est moins polaire que la vescaline (**81**). Une telle diminution de la polarité avait déjà été observée au cours de l'hémisynthèse de l'éthylvescalagine (**91**). Une étape de purification identique à celle utilisée pour l'éthylvescalagine (**91**) fournit 10 mg d'éthylvescaline (**100**), sous forme d'une poudre blanche, soit un rendement de 92 %.



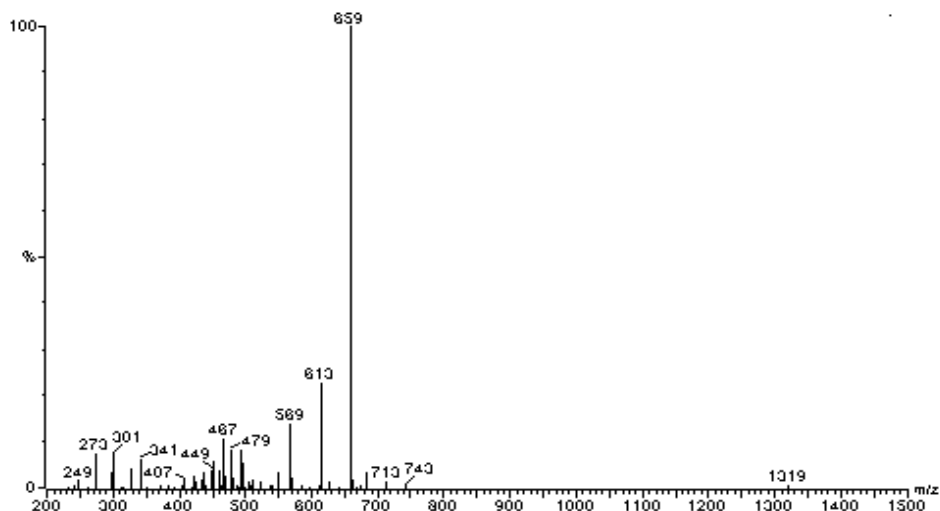
**Figure 64** : Suivi du milieu réactionnel de l'hémisynthèse de l'éthylvescaline (1 : vescaline (**81**), 2 : éthylvescaline (**100**))

#### VI-4-3-Analyses structurales de l'hémisynthèse de l'éthylvescaline

##### VI-4-3-1-Analyse par CLHP-ESI-MS à $-30$ eV et à $-60$ eV

L'analyse de l'éthylvescaline (**100**) en CLHP-ESI-MS (méthode 10) en mode négatif avec une intensité de voltage de cône à  $-30$  eV montre que sa masse moléculaire est de 660. Cette masse pouvant correspondre comme dans le cas de l'éthylvescalagine (**91**) à la perte de 18 unités de masse ( $\text{H}_2\text{O}$ ), suite à la condensation entre l'éthanol ( $m = 46$ ) et la vescaline (**81**) ( $m = 632$ ) soit  $660 = 632 - 18 + 46$ .

L'utilisation d'une tension de cône de  $-60$  eV permet d'obtenir les fragments 613 et 569, caractéristiques de la vescaline (**81**), observés précédemment pour l'analyse des acutissimines **92**, **93**, **96** et **97**. Le fragment 613 résulte de la perte de 46 unités de masse (éthanol) par rapport à l'ion moléculaire  $[\text{M}-\text{H}]^- = 659$ . Le fragment 569 est une perte de 44 unités de masse ( $\text{CO}_2$ ) par rapport au fragment 613 (Figure 65).



**Figure 65** : Spectre de masse de l'éthylvescaline (**100**) à -60 eV

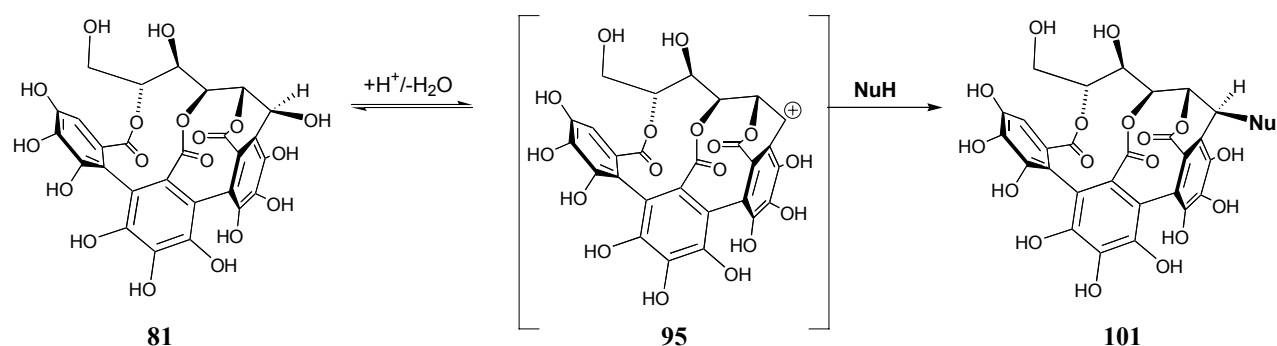
#### VI-4-3-2-Analyse par RMN de l'éthylvescaline

La comparaison des spectres RMN de l'éthylvescaline (**100**) avec ceux de la vescaline (**81**), obtenue par hydrolyse de la vescalagine (**55**), montre une très grande similitude. Comme dans le cas de l'éthylvescalagine (**91**), les protons et les carbones responsables du groupement éthyloxy sont observés. Une analyse plus fine des signaux de la chaîne glucosidique montre que la constante de couplage entre le proton H<sub>1</sub> et le proton H<sub>2</sub> est faible et identique à celle de l'éthylvescalagine (**91**). L'orientation de la fonction éthyloxy de l'éthylvescaline (**100**) est donc β comme celle de l'éthylvescalagine (**91**).

Dans ce cas également, la connexion entre le groupement éthyloxy et le carbone C<sub>1</sub> est déterminée par les corrélations proton-carbone à longue distance (HMBC). L'éthylvescaline (**100**) présente une corrélation entre le carbone C<sub>2'</sub> et le proton H<sub>1</sub>. Cette corrélation prouve avec certitude que le groupement éthyloxy est bien connecté au carbone C<sub>1</sub> de la chaîne glucosidique de la vescaline (**81**). En conclusion, ces analyses RMN montrent que l'éthylvescaline (**100**) résulte de l'addition d'éthanol sur le carbone C<sub>1</sub> de la vescaline (**81**), avec rétention de configuration.

## VII-Mécanisme de formation des acutissimines des séries C et D ainsi que de l'éthylvescaline

Ce mécanisme général est similaire à celui de l'épimérisation de la castaline (**82**) en vescaline (**81**) en milieu acide et conduit à la formation du carbocation benzylique **95**. Le carbocation **95** alors obtenu comme intermédiaire peut subir l'attaque d'un nucléophile pour former une série de produits analogues à ceux précédemment présentés avec des structures de type **101** (Tableau 2).

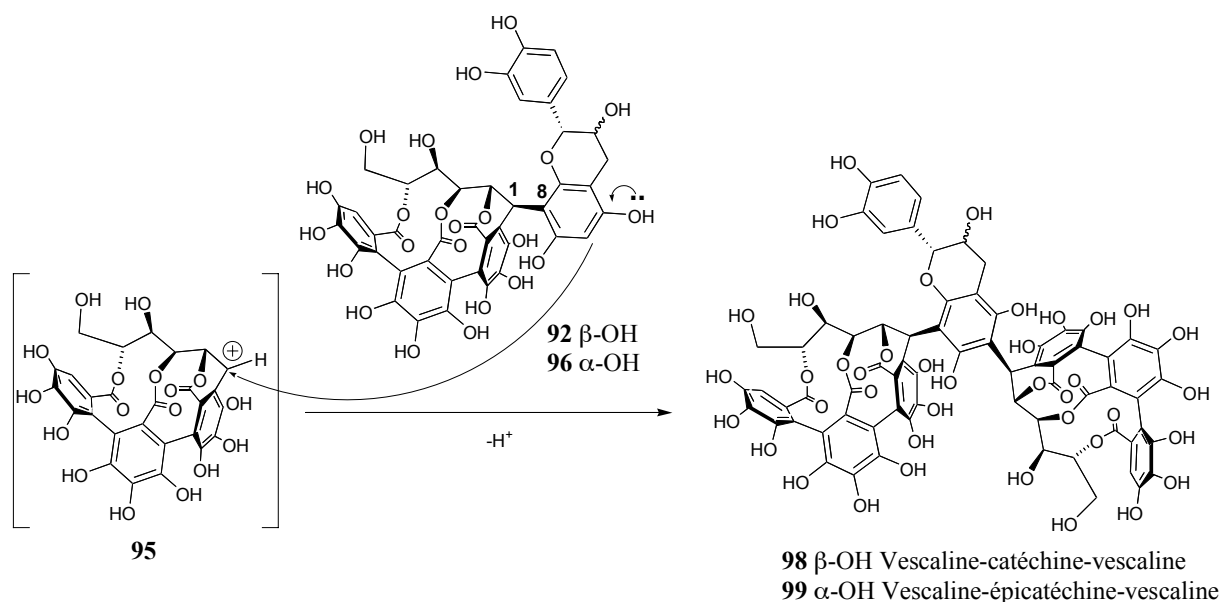


**Figure 66** : Mécanisme général de formation des structures de type **101**

NuH	Produit obtenu
sommet 8 de <b>2</b>	acutissimine C ( <b>92</b> )
sommet 6 de <b>2</b>	acutissimine D ( <b>93</b> )
sommet 8 de <b>3</b>	épicutissimine C ( <b>96</b> )
sommet 6 de <b>3</b>	épiacutissimine D ( <b>97</b> )
oxygène de l'éthanol	éthylvescaline ( <b>100</b> )

**Tableau 2** : Composés obtenus après attaque du nucléophile sur le carbocation **95**

La formation des complexes vescaline-flavan-3-ol-vescaline **98** et **99** découle du même mécanisme que celui présenté ci-dessus, au cours duquel les acutissimines **92** et **93** ou **96** et **97** réagissent avec le carbocation benzylique **95** via le sommet 6 ou 8 du cycle aromatique A (Figure 67).



**Figure 67** : mécanisme de la formation de **98** et **99** à partir de l'acutissimine C (**92**) et de l'épiacutissimine C (**96**)

## VIII-Etude de la stéréosélectivité de l'attaque nucléophile conduisant à formation des flavano-ellagitannins

### VIII-1-Introduction

Les flavano-ellagitannins que nous avons obtenus par hémisynthèse présentent une configuration de leur carbone  $C_1$  identique à celle de la vescalagine (**55**) ou de la vescaline (**81**) de départ. Le groupe hydroxyle du carbone  $C_1$  de **55** ou de **81** est effectivement substitué par une unité flavan-3-ol avec rétention de configuration. Or, une attaque nucléophile sur un carbocation conduit généralement à la racémisation du centre sur lequel s'opère la substitution. Si les carbocations benzyliques **87** et **95** proposés ici comme intermédiaires sont effectivement formés, des critères stériques, voire stéréoélectroniques, doivent être à l'origine de la rétention de configuration observée.

Une orientation  $\beta$  de la liaison entre l'unité flavan-3-ol et l'unité ellagitannin C-glycosidique est également présente chez tous les tannins complexes naturels isolés et caractérisés à ce jour. La grandinine (**57**) et les roburines **58**, **61**, **62**, par exemple, présentent toutes une orientation  $\beta$  entre leur unité ellagique et leur pentose connecté sur le carbone  $C_1$ .<sup>93-95</sup> Les roburines **59**, **60**, **61** et **62** présentent également une orientation- $\beta$  de la liaison entre les deux unités ellagiques qui les composent.<sup>93-95</sup>

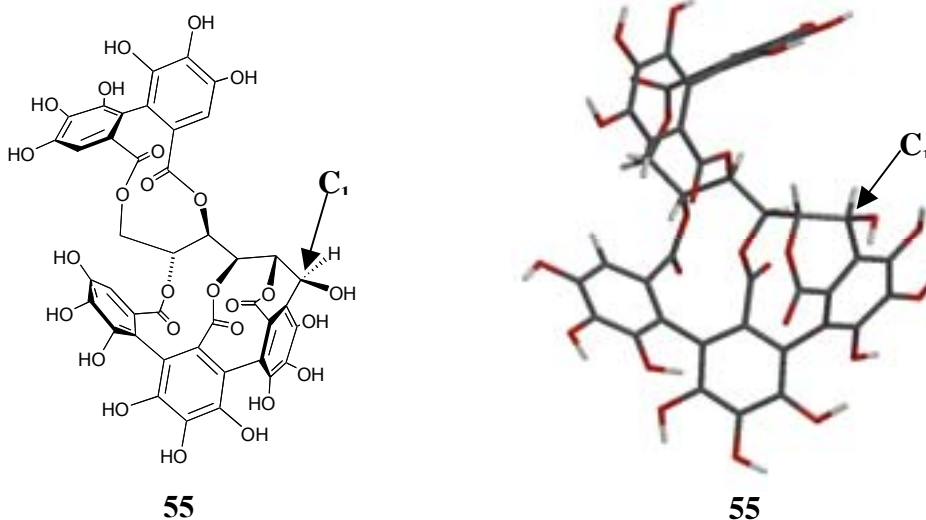
Pour mieux comprendre et rationaliser les causes de ce contrôle stéréochimique des attaques nucléophiles sur ce type de carbocation ellagique, nous avons modélisé les carbocations intermédiaires **87** et **95** dérivant respectivement de la vescalagine (**55**) et de la vescaline (**81**).

## VII-2-Modélisation du carbocation intermédiaire à partir de la vescalagine et de la vescaline

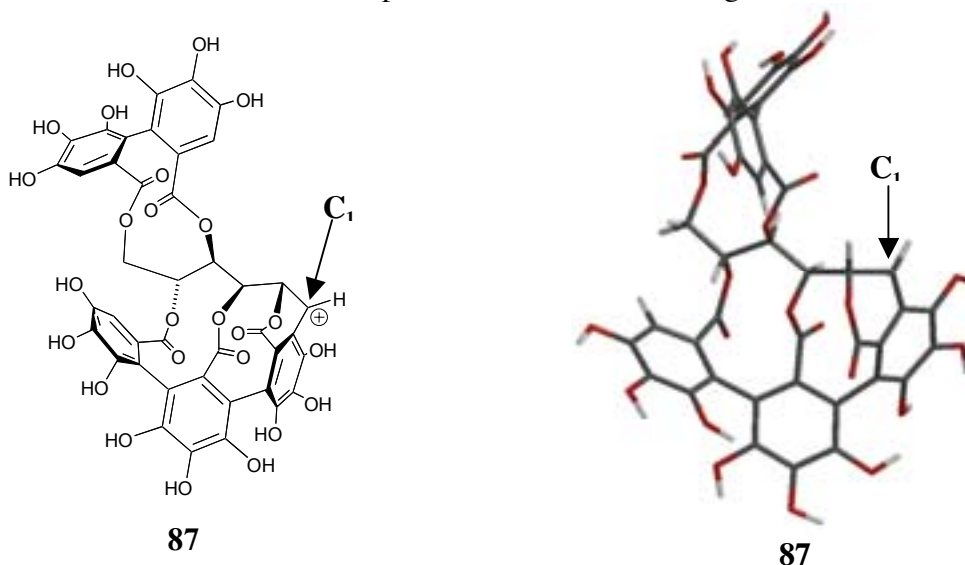
Le but de cette modélisation était de visualiser la LUMO des carbocations intermédiaires **87** et **95**, et de mettre en évidence d'éventuels encombrements stériques. Une étude conformationnelle préliminaire a été réalisée à l'aide du logiciel Macromodel (7.0).<sup>134,135</sup> Les calculs et les représentations graphiques de la LUMO des carbocations sont effectués à l'aide du logiciel Spartan (5.0).<sup>136</sup>

L'étude conformationnelle du carbocation **87** est effectuée en deux étapes. La recherche conformationnelle de la vescalagine (**55**) est réalisée par la méthode Monte-Carlo avec le champ de force MM3\*.<sup>134,135</sup> Le conformère ainsi obtenu présente une énergie de 504,5 kcal/mol, qui est en accord avec le résultat d'une étude précédente effectuée dans des conditions identiques aux nôtres (Figure 68).<sup>137,138</sup> A partir de ce conformère de plus basse énergie, l'alcool benzylique en position C<sub>1</sub> est supprimé et une hybridation sp<sup>2</sup> est imposée au carbone C<sub>1</sub> ainsi qu'une charge positive à la molécule générant ainsi le carbocation **87**. Celui-ci est de nouveau minimisé par la méthode Monte-Carlo/MM3\* comme précédemment pour conduire au conformère de plus basse énergie de **87** (Figure 69).

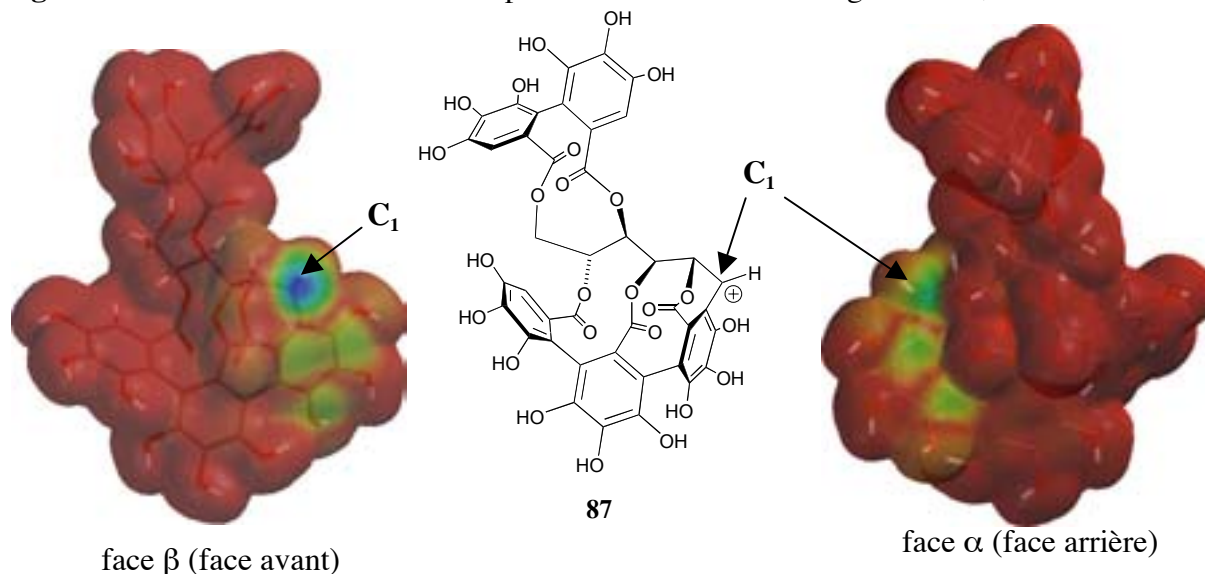
Dans un second temps, les données géométriques du conformère **87** sont transférées sous Spartan (5.0) pour réaliser les modélisations orbitales souhaitées par un calcul *ab initio* de type Hartree-Fock (HF) effectué avec la base de calcul STO-3G (Figure 70).<sup>139</sup> La représentation graphique de la LUMO projetée sur la carte de densité électronique à 0,02 électron/au<sup>3</sup> aide à visualiser les différences entre les faces  $\alpha$  et  $\beta$ .<sup>136</sup> Les zones en bleu représentent les sites les plus électrophiles et donc susceptibles de subir une attaque nucléophile.



**Figure 68** : Structure de **55** minimisée par Macromodel avec énergie de 504,5 kcal/mol



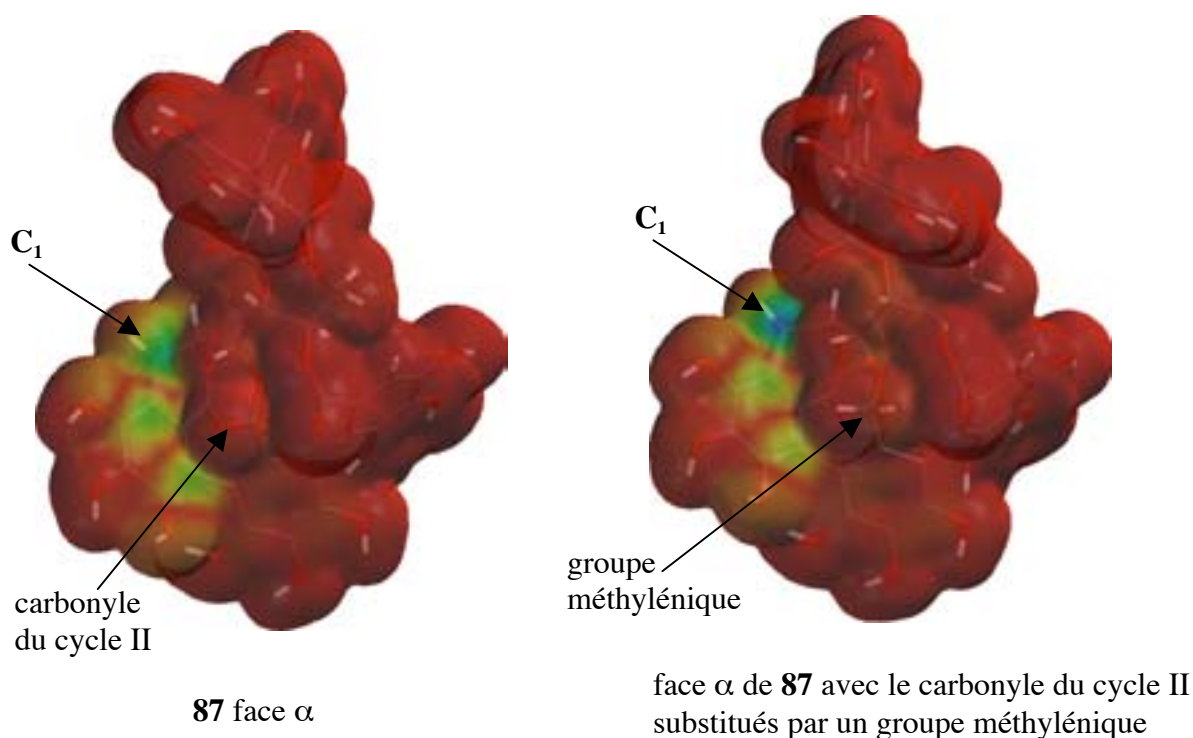
**Figure 69** : Structure de **87** minimisée par Macromodel avec énergie de 784,3 kcal/mol



**Figure 70** : Représentation graphique de la LUMO<sup>136</sup> projetée sur la carte de densité électronique à 0,02 électron/au<sup>3</sup> du carbocation **87**

Il apparaît clairement que le carbocation **87** est plus susceptible de subir une attaque nucléophile sur sa face  $\beta$  que sur sa face  $\alpha$ , plus difficile d'accès. Un encombrement stérique important semble être causé par le cycle III de l'unité nonahydroxytriphenoyl (NHTP), replié vers l'arrière de la molécule (Figure 70).

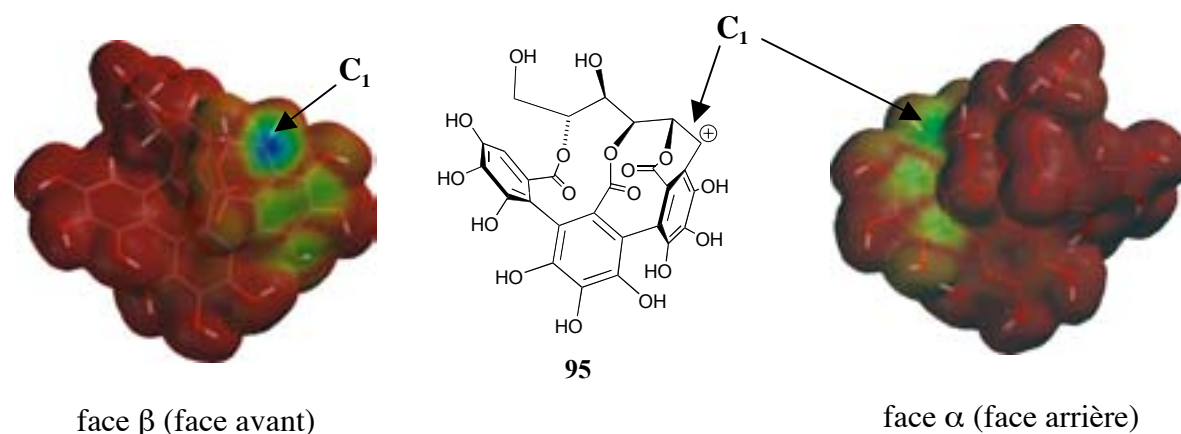
Cette différence de réactivité peut aussi s'expliquer par des critères de répartition électronique. En effet, il n'est pas impossible que la richesse électronique du carbonyle du cycle II de l'unité nonahydroxytriphenoyl (NHTP) contribue à la diminution de l'électrophilie de la face  $\alpha$  du carbocation **87**. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons remplacé le carbonyle en question par un groupe méthylénique. Le résultat de ce nouveau calcul est probant puisqu'il apparaît alors que la face  $\alpha$  du carbocation **87** devient plus électrophile. Cet accroissement du caractère électrophile est visualisée par l'augmentation de l'intensité de la couleur bleu (Figure 71).



**Figure 71** : Représentation graphique de la LUMO<sup>136</sup> projetée sur la carte de densité électronique à 0,02 électron/au<sup>3</sup> de la face  $\alpha$  du carbocation **87** et de ce même carbocation avec le carbonyle du cycle II substitué par un groupe méthylénique



Dans le but de montrer que la différence stéréoélectronique du caractère électrophile des faces  $\alpha$  et  $\beta$  est aussi présente dans le cas du carbocation **95**, des calculs identiques à ceux effectués sur **87** ont été réalisés. La représentation graphique de la modélisation orbitale de la LUMO du carbocation **95** montre que, malgré l'absence de l'unité hexahydroxydiphényl (HHDP), la face  $\beta$  est plus électrophile que la face  $\alpha$ , expliquant l'orientation de l'attaque nucléophile sur **95** comme dans le cas de **87** (Figure 72). L'unité hexahydroxydiphényl (HHDP) n'a donc pas ou peu d'influence sur l'orientation sélective de l'attaque nucléophile sur le carbocation benzylique **87** dérivant de la vescalagine (**55**).



**Figure 72** : Représentation graphique de la LUMO<sup>136</sup> projetée sur la carte de densité électronique à 0,02 électron/au<sup>3</sup> du carbocation **95**

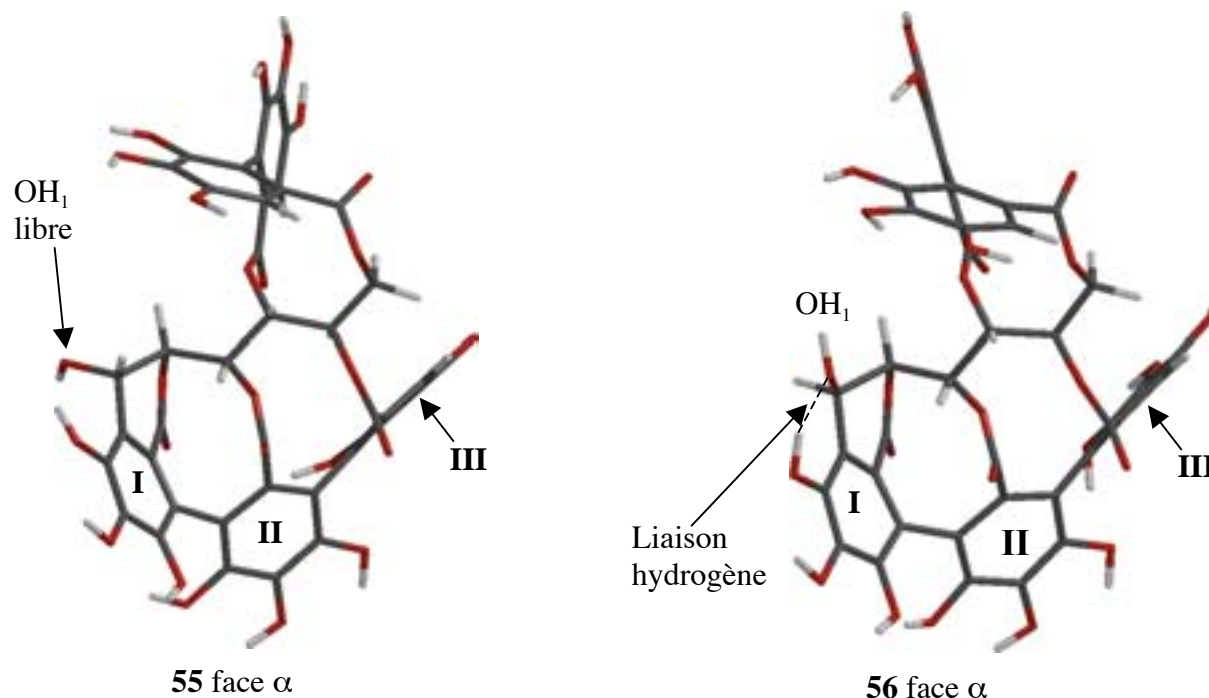
Cette différence stéréoélectronique du caractère électrophile des faces  $\alpha$  et  $\beta$  explique l'orientation sélective de toutes les attaques nucléophiles sur les carbocations **87** et **95** observées lors des hémisynthèses des flavano-ellagitannins. Cette différence stéréoélectronique des faces  $\alpha$  et  $\beta$  est probablement à l'origine de l'exclusivité de l'orientation- $\beta$  observée pour tous les tannins complexes isolés à ce jour.

### IX-Essai d'hémisynthèse des flavano-ellagitannins à partir de la castalagine

La déshydroxylation de l'alcool benzylique de la castalagine (**56**) devrait aussi conduire à la formation du carbocation benzylique **87**, intermédiaire clé de la formation des flavano-ellagitannins. Il serait alors possible de réaliser l'hémisynthèse des flavano-ellagitannins à partir de la castalagine (**56**).

La castalagine (**56**) et la catéchine (**2**) ont donc été solubilisées dans du THF en présence de 0,15 % en volume d'acide trifluoroacétique suivant un protocole identique à celui de l'hémisynthèse de **85** et **86** à partir de la vescalagine (**55**). Le suivi du milieu réactionnel par CLHP analytique (méthode 1) ne montre aucune réaction après 24 heures. Ni l'augmentation de l'acidité du milieu réactionnel ni celle de la température de réaction en utilisant du dioxane comme solvant n'a permis l'hémisynthèse de **85** et **86** à partir de la castalagine (**56**). L'addition d'éthanol a également été tentée sur la castalagine (**56**) dans ces mêmes conditions et aucune réaction n'a été observée. Cette absence de réactivité de la castalagine (**56**) en milieu acide vis-à-vis de l'addition d'un alcool a déjà été observée pour le méthanol.<sup>140</sup>

Après ces nombreux essais, il est apparu que la déshydroxylation de l'alcool benzylique de la castalagine (**56**) n'est pas possible. Pour comprendre cette absence de réactivité de la castalagine (**56**), nous avons repris une étude réalisée sur la comparaison des conformères de plus basse énergie de la castalagine (**56**) et de la vescalagine (**55**).<sup>137,138</sup> La recherche du conformère de plus basse énergie de la castalagine (**56**) a été effectuée dans des conditions identiques à celle utilisées pour la modélisation de la vescalagine (**55**).



**Figure 73** : Conformère de plus basse énergie de **55** et **56**

La comparaison entre ce conformère et celui de la vescalagine (**55**) montre que l'alcool benzylique en position C<sub>1</sub> de la castalagine (**56**) est emprisonné par sa participation à une liaison hydrogène intramoléculaire alors que, dans le cas de la vescalagine (**55**), cet alcool benzylique est libre. Cette liaison hydrogène entre l'oxygène de l'alcool benzylique et le proton du premier hydroxyle phénolique du cycle I qui est à une distance de 2,21 Å (Figure 73), diminuerait le caractère basique de l'oxygène benzylique et "empêcherait" la protonation de l'alcool de la castalagine (**56**).

## **X-Conclusion**

L'hémisynthèse des acutissimines A (**85**) et B (**86**), ainsi que celles des épiacutissimines A (**89**) et B (**90**), a été réalisée en milieu organique à partir de la vescalagine (**55**) et de l'unité flavan-3-ol correspondante (**2** ou **3**). Leur formation a également été démontrée en milieu hydroalcoolique modèle du vin. La présence des acutissimines (**85**) et (**86**) et des épiacutissimines (**89**) et (**90**) est alors probable dans les vins élevés en fûts de chêne.

Leur caractérisation structurale a permis de confirmer que leur formation résulte bien du mécanisme général que nous avons formulé comme hypothèse de travail. Ce mécanisme est une substitution nucléophile unimoléculaire comprenant une attaque nucléophile stéréosélective (attaque par la face β) sur le carbone C<sub>1</sub> d'un intermédiaire carbocationique commun. Cet intermédiaire provient exclusivement de la fonction alcool benzylique de la vescalagine (**55**). La castalagine (**56**) pourrait également conduire à cet intermédiaire, mais cet épimère de la vescalagine (**55**) s'est avéré inerte dans les conditions utilisées. Cette absence de réactivité de la castalagine (**56**) et la sélectivité de l'attaque nucléophile ont été rationalisées par des critères stéréoélectroniques mise en évidence par la modélisation moléculaire du système.

L'absence de réactivité de la castalagine (**56**) vis-à-vis de la substitution nucléophile en C<sub>1</sub> pourrait expliquer le fait que les teneurs en castalagine (**56**) dans le bois de chêne sont supérieures à celles de la vescalagine (**55**).<sup>5,97</sup> La vescalagine (**55**) serait effectivement le seul épimère à réagir pour conduire à la formation des dimères que sont les roburines **59**, **60**, **61** et

62. Par exemple, la roburine D (**60**) proviendrait uniquement de l'addition nucléophile de la castalagine (**56**) sur le carbocation **87** dérivé de la vescalagine (**55**).<sup>118</sup>

L'hydrolyse de la vescalagine (**55**) et de la castalagine (**56**) a également été réalisée en milieu aqueux acide. La vescaline (**81**) et la castaline (**82**) produites ont été purifiées et caractérisées, ainsi qu'un nouveau produit le vescalène (**95**). L'épimérisation complète de la castaline (**82**) en vescaline (**81**) en milieu aqueux acide a également été montrée pour la première fois. Au cours de cette épimérisation, il y a donc déshydroxylation de l'alcool benzylique de la castaline (**82**), bien que celui-ci est une orientation- $\alpha$  comme celui de la castalagine (**56**). Cette différence de réactivité entre la castaline (**82**) et la castalagine (**56**) vis-à-vis de la déshydroxylation de leur alcool benzylique peut s'expliquer par l'acidité très importante (3 molaire en HCl) du milieu réactionnel de l'épimérisation de la castaline (**82**) en vescaline (**81**).

A partir de la vescaline (**81**) obtenue, l'hémisynthèse des acutissimines C (**91**) et D (**92**) ainsi que des épiacutissimines C (**93**) et D (**94**) a été effectuée en milieu organique. Leur formation en milieu aqueux acide est possible puisque le carbocation benzylique **98** peut se former dans ces conditions. De plus l'hémisynthèse de ces acutissimines et l'épimérisation de la castaline (**82**) en vescaline (**81**) montrent que l'unité 4,6-hexahydroxydiphényle (HHDP) n'a pas d'influence sur l'orientation  $\alpha$  ou  $\beta$  de l'attaque nucléophile sur le carbocation en C<sub>1</sub> ; cette attaque étant toujours  $\beta$ .

Ce mécanisme général diastéréosélectif et non enzymatique régit probablement la biosynthèse de tous les flavano-ellagitannins d'origine végétale. Le rapport **85** : **86** obtenu par hémisynthèse est quasi identique à celui observé dans l'écorce de *Quercus acutissima*. De plus l'orientation- $\beta$  de l'unité flavan-3-ol sur le carbone C<sub>1</sub> de l'unité ellagique des flavano-ellagitannins s'explique par des effets stéréoélectroniques sans qu'aucune intervention enzymatique soit nécessaire.

**HÉMISYNTHÈSE D'ANTHOCYANO-ELLAGITANNIN ET DE  
THIOETHERVESCALAGINE**



## **I-Introduction**

La formation des acutissimines **85**, **86**, **89** et **90** résulte d'un mécanisme général en milieu acide se traduisant par l'attaque stéréosélective d'un nucléophile en position C<sub>1</sub> sur le carbocation **87**. Dans le cas des acutissimines **85**, **86**, **89** et **90**, les espèces nucléophiles sont les sommets 8 et 6 de la catéchine (**2**) ou de l'épicatéchine (**3**). Cependant, le vin contient de nombreux autres nucléophiles pouvant potentiellement attaquer le carbocation **87** et conduire ainsi à la formation d'autres composés non encore mis en évidence.

Parmi ces nucléophiles, le remplacement de l'unité flavan-3-ol par une anthocyane pourrait conduire à la formation d'un adduit comportant une unité ellagique C-glycosidique connectée avec une unité anthocyanique également nucléophile par ses sommets 8 et/ou 6. Ce nouveau type de composé serait alors coloré, mais probablement avec une teinte légèrement différente de celle de l'anthocyane seule. Pour réaliser l'hémisynthèse de ce type d'anthocyano-ellagitannins, la purification de la malvidine-3-O-glucoside (**11**), anthocyane majoritaire du raisin, a été effectuée en utilisant deux techniques chromatographiques différentes à partir de baies de raisin noir. En parallèle à cette purification, l'hémisynthèse d'un anthocyano-ellagitannin entre la vescalagine (**55**) et la malvidine (**102**) a aussi été effectuée.

Des espèces comportant une fonction thiol peuvent également être envisagées comme nucléophiles car les vins contiennent de nombreux thiols. Par exemple, certains composés aromatiques sont des mercaptants et les peptides et protéines provenant des levures de fermentation et du raisin comportent des résidus cystéine.<sup>141-143</sup> L'hémisynthèse d'un thioéther d'ellagitannin a aussi été réalisée en tant que réaction modèle dans des conditions identiques à celles utilisées pour la préparation des acutissimines.

## **II-Purification de la malvidine-3-O-glucoside**

### **II-1-Introduction**

La purification des substances naturelles fait appel à de nombreuses techniques chromatographiques utilisant une phase mobile liquide et une phase stationnaire solide. C'est le cas de la CLHP analytique ou semipréparative.<sup>144,145</sup> Parallèlement à ces techniques, se sont

développées depuis plusieurs années des techniques de chromatographie liquide-liquide dites de contre-courant et notamment la chromatographie de partage centrifuge (CPC).<sup>146-149</sup> Au cours de nos travaux de purification de la malvidine-3-O-glucoside (**11**) à partir de baies de raisin, nous avons utilisé et comparé ces techniques de purification de substances naturelles.

## II-2-Purification de la malvidine-3-O-glucoside par CLHP

### *II-2-1-Introduction*

L'isolation de la malvidine-3-O-glucoside (**11**) a été effectuée à partir de baies de merlot récolté à Saint-Emillion le 26 septembre 2000. Cette isolation est réalisée en trois étapes. Premièrement, les anthocyanes des baies de raisin sont extraites par une solution méthanolique acidifiée, puis une étape de pré-purification de la solution brute d'extraction liquide-solide permet d'obtenir les cinq anthocyanes majoritaires en mélange. La purification de la malvidine-3-O-glucoside (**11**) est alors réalisée par CLHP semi-préparative.

### *II-2-2-Extraction*

L'extraction des anthocyanes est réalisée par macération des baies de raisin fraîches dans du méthanol acidifié.<sup>150,151</sup> Une masse de 2,5 kg de baies de merlot est mise en agitation dans 2 litres de méthanol acidifié avec 0,1 % en volume d'acide chlorhydrique. Après seize heures d'agitation vigoureuse à température ambiante, la solution est filtrée puis évaporée sous pression réduite pour donner une solution concentrée visqueuse de 300 mL.

### *II-2-3-Pré-purification avant isolation de la malvidine-3-O-glucoside*

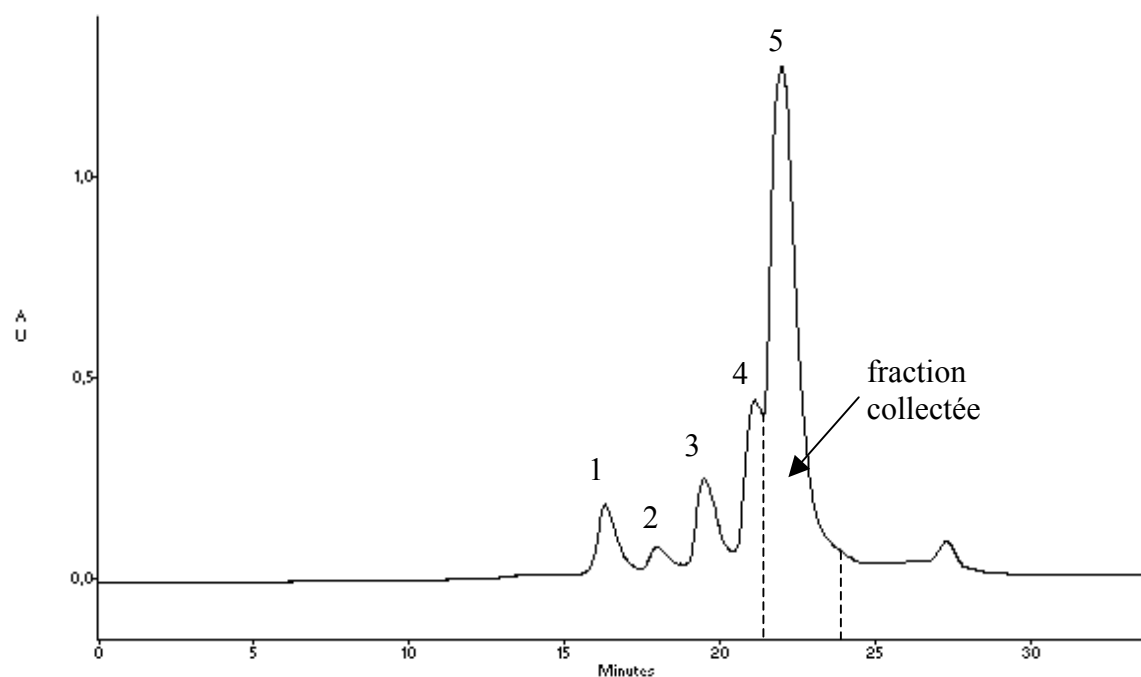
Une première étape de pré-purification est indispensable avant l'isolation par CLHP semi-préparative car la solution visqueuse obtenue après extraction est très complexe.<sup>152</sup> De nombreux gels ont été testés pour cette étape et le meilleur compromis entre rapidité d'exécution et pureté des anthocyanes est obtenu avec l'utilisation de cartouche C<sub>18</sub>.<sup>153,154</sup> La solution d'extraction est déposée sur la cartouche préalablement activée par passage de 50 mL de méthanol et de 50 mL d'eau. Dans un premier temps, le dépôt est lavé avec 50 mL, puis les anthocyanes majoritaires du mélange sont éluées avec une solution H<sub>2</sub>O/MeOH/AcFormique (75/20/5, v/v/v). La cartouche est alors régénérée par lavage successif au méthanol et à l'eau.



Cette méthode permet une bonne purification, mais aussi un préfractionnement qui permet de réduire le gradient d'élution de l'étape de chromatographie semi-préparative. Cette réduction permet un gain de temps et de productivité de la malvidine-3-*O*-glucoside (**14**).

#### *II-2-4-Séparation de la malvidine-3-*O*-glucoside*

La séparation de la malvidine-3-*O*-glucoside (**11**) s'effectue ensuite par CLHP semi-préparative (méthode 6).<sup>155</sup> Des fractions de 5 mg du mélange, obtenu par passage sur cartouche C<sub>18</sub>, sont solubilisées dans 100 µL d'eau acidifiée. Malgré un recouvrement inévitable avec la paeonidine-3-*O*-glucoside (**9**), une fraction contenant majoritairement de la malvidine-3-*O*-glucoside (**11**) est collectée, évaporée et lyophilisée pour donner **11** sous forme d'une poudre noire (Figure 74). La malvidine-3-*O*-glucoside (**11**) ainsi obtenue n'est pas totalement pure mais contient moins de 5 % de paeonidine-3-*O*-glucoside (**9**). Cette pureté est déterminée par CLHP analytique (méthode 3).



**Figure 74** : Chromatogramme CLHP semi-préparative de la séparation de la malvidine-3-*O*-glucoside (**11**) (1: delphinidine-3-*O*-glucoside (**8**), 2: la cyanidine-3-*O*-glucoside (**7**), 3 : la pétunidine-3-*O*-glucoside (**10**), 4 : la paeonidine-3-*O*-glucoside (**9**), et 5 : la malvidine-3-*O*-glucoside (**11**))

Cette étape de purification par CLHP semi-préparative est l'étape limitante dans le protocole de purification de la malvidine-3-*O*-glucoside (**11**). Elle ne permet d'obtenir que 3 mg de **11** par jour. Une série d'injection a cependant permis de collecter 98 mg de malvidine-3-*O*-glucoside (**11**) sous la forme d'un sel de formiate avec une pureté de 95%.

## II-3-Purification de la malvidine-3-*O*-glucoside par chromatographie de partage centrifuge (CPC)

### *II-3-1-Introduction*

La chromatographie de contre-courant moderne a pris son véritable essor grâce aux travaux de Ito, pionnier de l'utilisation de cette technique.<sup>156</sup> Sa technique est basée sur l'enroulement d'un tube capillaire autour d'un axe,<sup>157</sup> le rotor ainsi formé étant soumis à la force centrifuge. Parallèlement, Numogaki au Japon, a mis au point un rotor constitué d'un empilement de plaques d'acier supportant des micros cellules de partition.<sup>158</sup> Cet appareillage est alors appelé chromatographie de partage centrifuge (CPC).

La CPC est basée sur le partage des solutés entre deux phases liquides non miscibles. L'une de ces phases est maintenue stationnaire grâce à la force centrifuge, la seconde phase appelée phase mobile est percolée au travers de la première. Cette percolation permet ainsi des échanges de solutés entre les deux phases conduisant à la séparation des différents composés.

### *II-3-2-Comparaison entre CLHP et CPC*

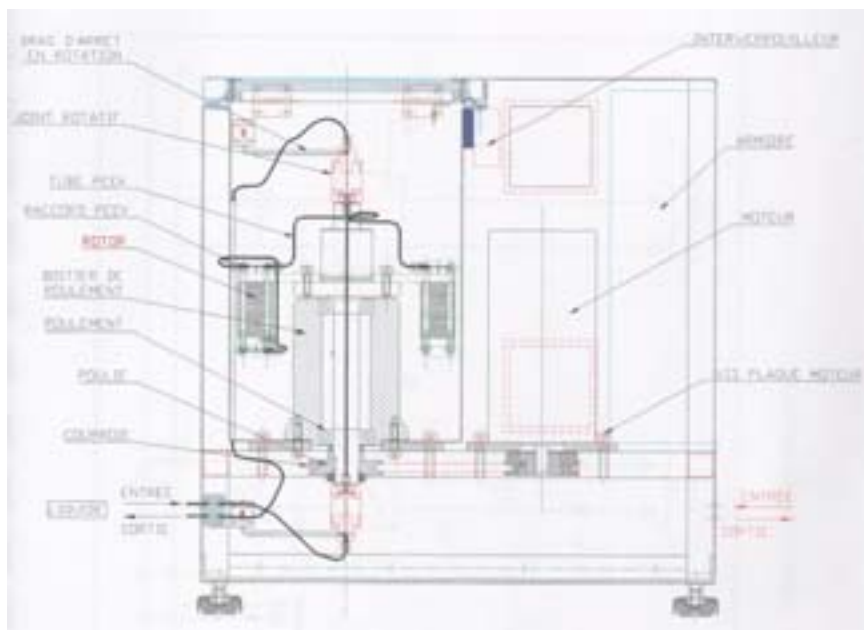
Dans leur mise en œuvre, ces deux techniques sont très proches. Elles nécessitent un appareillage identique, des pompes pour les solvants, un injecteur, un détecteur et une colonne. Elles sont aussi toutes les deux basées sur le principe de partage entre deux phases (stationnaire et mobile). La différence fondamentale entre ces deux techniques réside dans la composition de la colonne.

En CLHP la colonne est remplie par la phase stationnaire qui est solide. En phase dite inverse, elle est généralement constituée de silice greffée. Ce greffage n'occupe que 5 % du

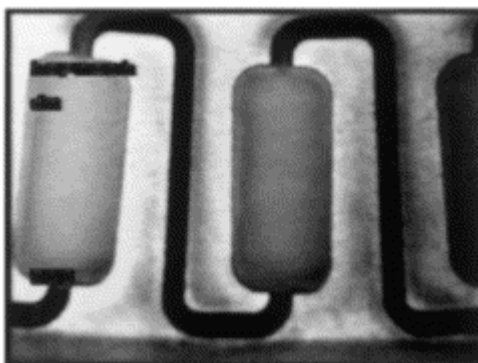
volume de la colonne et le support silicieux occupe 20 % de ce volume. La phase mobile est généralement un solvant hydroalcoolique occupant les 75 % du volume restant.

En CPC, la colonne est un rotor qui est formé par un empilement de disques d'acier téflonisé de 5 mm d'épaisseur (Figure 75). Sur chacun de ces disques sont gravées des cellules de partition reliées entre elles par de fins canaux (Figure 76).<sup>159-161</sup> La géométrie particulière de ces cellules et canaux permet la rétention de la phase stationnaire lorsque le système est soumis à une force centrifuge par rotation de la colonne. La colonne est alors reliée à l'injecteur et au détecteur par deux joints rotatifs à haute pression. La percolation permettant la séparation des composés s'effectue à l'intérieur des cellules entre les phases mobile et stationnaire. Le pourcentage relatif entre les deux phases stationnaire et mobile est inversé par rapport à la CLHP. La phase stationnaire retenue par la force centrifuge représente 75 % du volume de la colonne et la phase mobile occupe les 25 % restant ce qui a pour conséquence les points suivants :

- l'échantillon à purifier peut être de plusieurs grammes
- une absence de saturation de la phase stationnaire
- le volume injecté peut atteindre 10 % du volume de la colonne
- l'échantillon peut être dissout dans la phase mobile ou dans la phase stationnaire



**Figure 75 :** Représentation schématique de la CPC



**Figure 76 :** Photo d'une cellule de partition gravée sur les disques d'acier téflonisé

### *II-3-3-Choix du système de solvant*

Le choix du système de solvant qui constitue la phase stationnaire et la phase mobile est le point clé de cette technique. Ce choix peut être comparé à celui rencontré en CLHP entre les différents types de colonnes et de solvants. Les critères importants pour le choix du système biphasique sont la polarité et la solubilité de l'échantillon.<sup>158</sup>

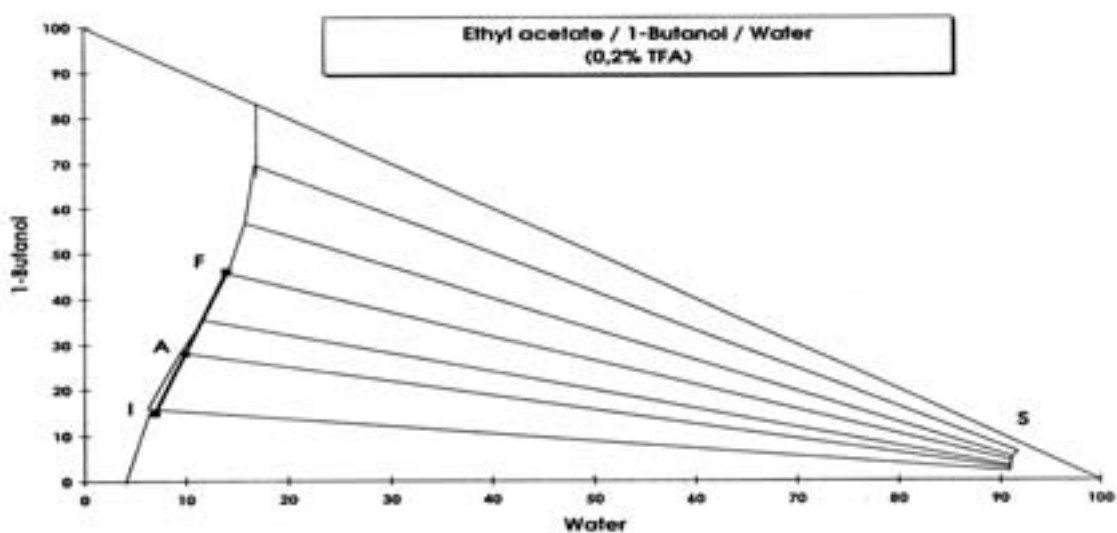
Chacune des deux phases a une composition différente mais le coefficient de partage des solutés dans l'échantillon injecté doit être voisin de 1. Le système biphasique doit également avoir des propriétés physico-chimiques (viscosité, masse volumique) bien définies. Ce sont toutes ces propriétés qui vont induire à la fois un bon transfert de matière entre les deux phases et une rétention suffisante de la phase stationnaire (environ 75 % du volume de la colonne).<sup>162</sup>

Les systèmes biphasiques peuvent être constitués de deux, trois, quatre solvants ou plus. Les systèmes ternaires sont les plus fréquemment utilisés. Tout d'abord, il s'agit de sélectionner un solvant dans lequel l'échantillon à purifier est bien soluble « bon solvant » (dans notre cas pour les anthocyanes, c'est le butanol). L'obtention du système biphasique est alors réalisée par adjonction de deux autres solvants, l'un plus polaire (l'eau) et l'autre moins polaire que le bon solvant (l'acétate d'éthyle). La proportion de ce dernier est ensuite ajustée, en ce référant au diagramme ternaire correspondant.

## II-3-4-Application de la CPC à la purification de la malvidine

## II-3-4-1-Système ternaire AcOEt/Butanol/Eau

La particularité du diagramme ternaire AcOEt/Butanol/Eau, couramment utilisé pour la purification des anthocyanes,<sup>158,163</sup> est la convergence des lignes de conjugaison en un même point S qui correspond à la composition de la phase aqueuse utilisée comme phase stationnaire. Cette convergence est indispensable pour effectuer une élution par gradient de polarité. En effet, cette technique consiste à faire varier la composition (donc la polarité) de la phase mobile sans affecter les propriétés physicochimiques de la phase stationnaire en équilibre.



**Figure 77** : Diagramme ternaire AcOEt/Butanol/Eau en représentation orthogonale

Comme le montre le diagramme ternaire AcOEt/Butanol/Eau (Figure 77), quelle que soit la composition de la phase organique supérieure (point I et F), la phase aqueuse inférieure a une composition quasi identique. Cette propriété nous a permis d'effectuer un gradient d'élution entre les points I et F, sans aucune perturbation de l'équilibre entre la phase mobile (composition I et F) et la phase stationnaire (composition S).

La composition des différentes phases AcOEt/Butanol/Eau est la suivante (chaque phase est acidifiée avec 0,2% en volume d'acide trifluoroacétique).

- phase mobile initiale, point I (77/15/8)
- phase mobile finale, point F (40/46/14)
- phase stationnaire, point S (5/5/90)

La préparation de chaque phase est identique. Les trois solvants sont mélangés dans une ampoule à décanter et agités vigoureusement. Une décantation de 1 % de la phase minoritaire est observée, ce qui assure une saturation complète de la phase majoritaire par les deux autres solvants. La phase majoritaire est alors acidifiée avec 0,2% en volume d'acide trifluoroacétique.

#### *II-3-4-2-Purification de la malvidine par CPC*

##### *II-3-4-2-1-Pré-purification sur Amberlist XAD 7 HP*

Une étape de pré-purification de la solution d'extraction d'anthocyanes obtenue par macération des baies de raisin fraîches est indispensable avant l'injection en CPC. Cette étape est réalisée sur un nouveau type de support que sont les polymères adsorbants Amberlist. Les résines Amberlist (XAD) sont des billes dures et insolubles de polymère poreux.<sup>164</sup>

Les billes de résine XAD 7 HP sont placées dans du méthanol pendant 24 heures pour assurer un gonflement total et uniforme avant remplissage de la colonne. Une fraction de 100 mL de la solution obtenue après extraction directe sur les baies est déposée en tête de colonne puis l'élution d'un litre d'eau acidifiée avec 0,1 % en volume d'acide chlorhydrique permet l'élimination de tous les sucres ainsi que des molécules très polaires.<sup>153,164,165</sup> L'élution des anthocyanes s'effectue avec 800 mL d'une solution H<sub>2</sub>O/MeOH (35/65, v/v) également acidifiée avec 0,1 % en volume d'acide chlorhydrique. Après l'élution des anthocyanes, le support est régénéré par un lavage avec du méthanol, permettant ainsi d'éliminer les tannins condensés retenus sur le support. La fraction contenant les anthocyanes est évaporée et lyophilisée pour conduire à 700 mg de poudre rouge foncé.

##### *II-3-4-2-2-Isolation de la malvidine par CPC*

Une injection se déroule en quatre étapes. Premièrement le rotor est rempli par la phase stationnaire avec une rotation de 200 tr/mn. Une fraction de 150 mg poudre obtenue après pré-purification sur résine XAD 7 HP est dissoute dans 10 mL de la phase stationnaire, puis injectée. La vitesse de rotation est alors augmentée pour obtenir 1100 tr/mn. La phase mobile initiale est alors envoyée dans la colonne en chassant 25 % de la phase stationnaire.

Lorsque la phase mobile initiale a traversé toute la colonne, le gradient entre la phase initiale et la phase stationnaire peut alors débiter.

Des fractions de 100 mL sont collectées et analysées en CLHP analytique (méthode 3) pour déterminer les fractions contenant majoritairement de la malvidine-3-*O*-glucoside (**11**). Ces fractions sont alors regroupées, évaporées sous pression réduite et lyophilisées pour conduire à 8 mg de malvidine-3-*O*-glucoside (**11**), pure à 97 %. Cette quantité représente environs 60 % de la malvidine-3-*O*-glucoside (**11**) présente dans les 150 mg injectés. Après avoir reproduit de nombreuses fois ces différentes étapes, nous avons obtenu 5 g de mélange d'anthocyanes pré-purifiés et 70 mg de malvidine-3-*O*-glucoside (**11**) pure à 97 %.

#### II-4-Conclusion

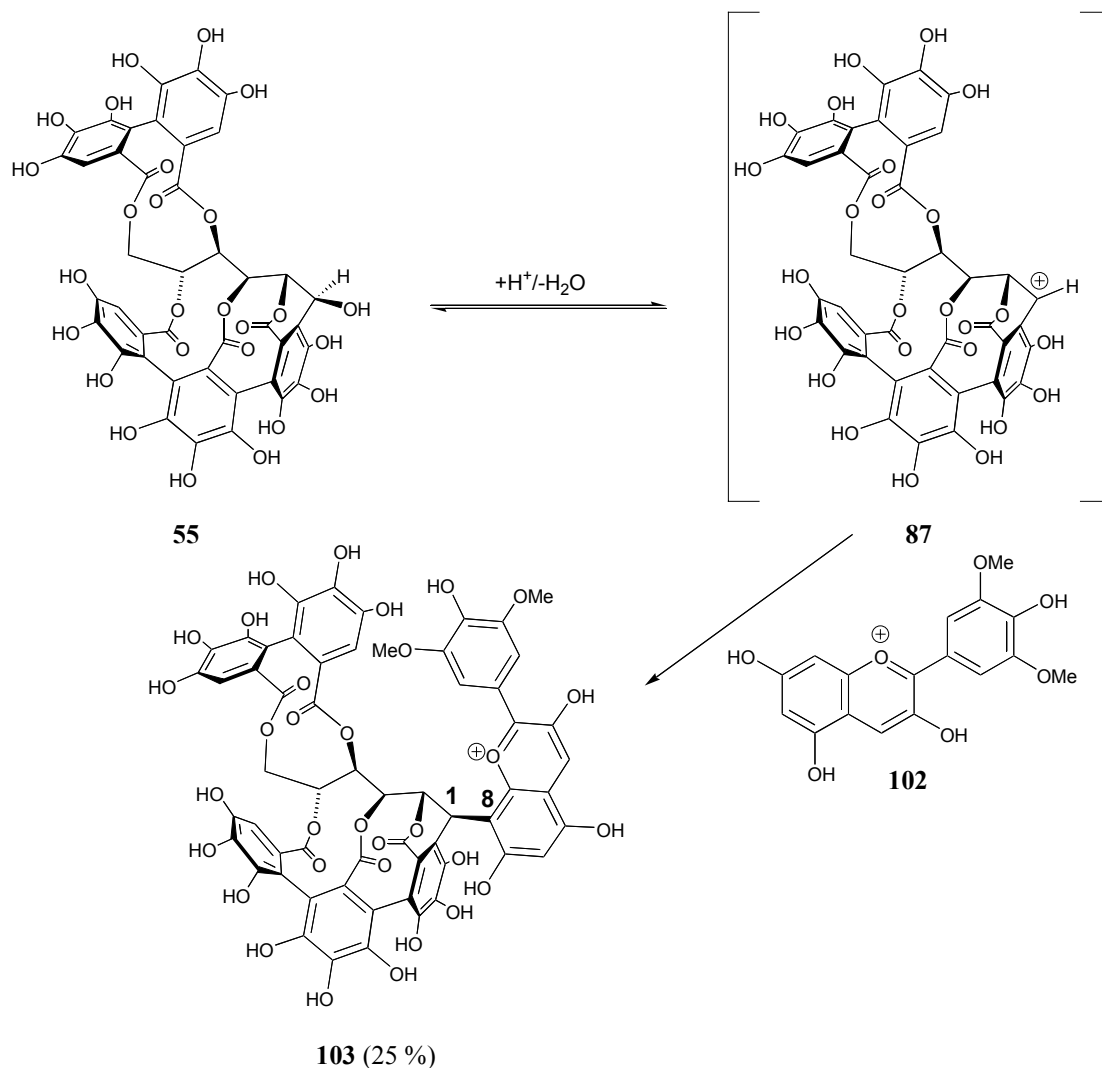
Malgré la relative complexité de mise au point du protocole de séparation par chromatographie de partage centrifuge (CPC), cette technique est extrêmement plus rapide que les techniques classiques. Pour les anthocyanes, il est possible d'obtenir dans notre cas 8 mg de malvidine-3-*O*-glucoside (**11**) pure en une seule injection de 4 heures, alors qu'il faut une semaine pour en obtenir 15 mg par CLHP semi-préparative.

### III-Hémisynthèse d'un anthocyano-ellagitannin

#### III-1-Conditions opératoires de l'hémisynthèse de l'adduit vescalagine-malvidine

Nous avons préféré dans un premier temps utiliser la malvidine (**102**) plus soluble en milieu organique que la malvidine-3-*O*-glucoside (**11**), pour valider notre hypothèse. L'absence de l'unité glucoside en position 3 n'a probablement que peu d'influence sur la réactivité des sommets 8 et 6 du cycle aromatique A de l'unité anthocyanique.

Le protocole mis en œuvre est similaire à celui utilisé pour l'hémisynthèse des acutissimines en milieu organique. Le chlorure de malvidine (**102**) est solubilisé dans du THF fraîchement distillé et acidifié avec 1 % en volume d'acide trifluoroacétique. Après solubilisation complète de la malvidine (**102**) par passage aux ultrasons, la vescalagine (**55**) est additionnée. Le milieu réactionnel est alors porté à une température de 60°C, et l'évolution de la réaction est suivie par CLHP analytique (méthode 4).

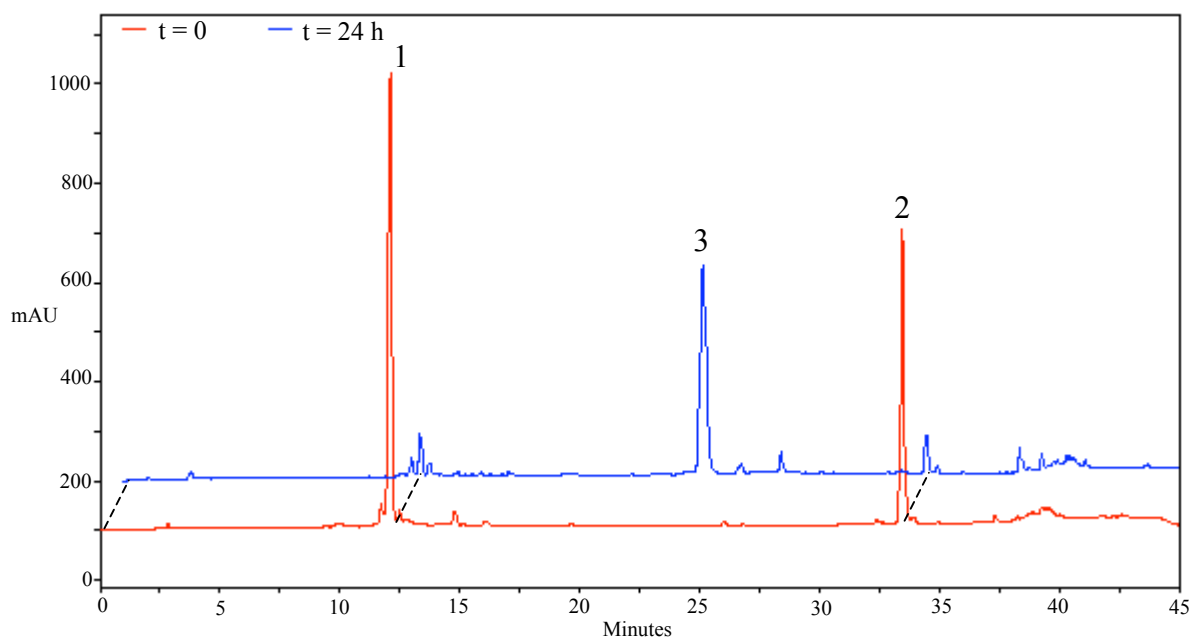


**Figure 78** : Réaction de formation de l'adduit vescalagine-malvidine (**103**)

### III-2-Analyse des chromatogrammes de l'hémisynthèse de l'adduit vescalagine-malvidine

Après vingt quatre heures de réaction, la vescalagine (**55**) et la malvidine (**102**) ont quasiment disparu, alors qu'un nouveau produit éluant à 25,1 min s'est formé (Figure 79). Ce nouveau produit absorbe à 280 nm comme la vescalagine (**55**) et la malvidine (**102**), mais également à 520 nm comme les anthocyanes, le produit formé est donc coloré. Le milieu réactionnel est évaporé et purifié par CLHP semi-préparative (méthode 7). Après purification complète et lyophilisation de la fraction collectée, 15 mg d'adduit vescalagine-malvidine sont obtenus sous forme d'une poudre rouge correspondant à un rendement de 25%.





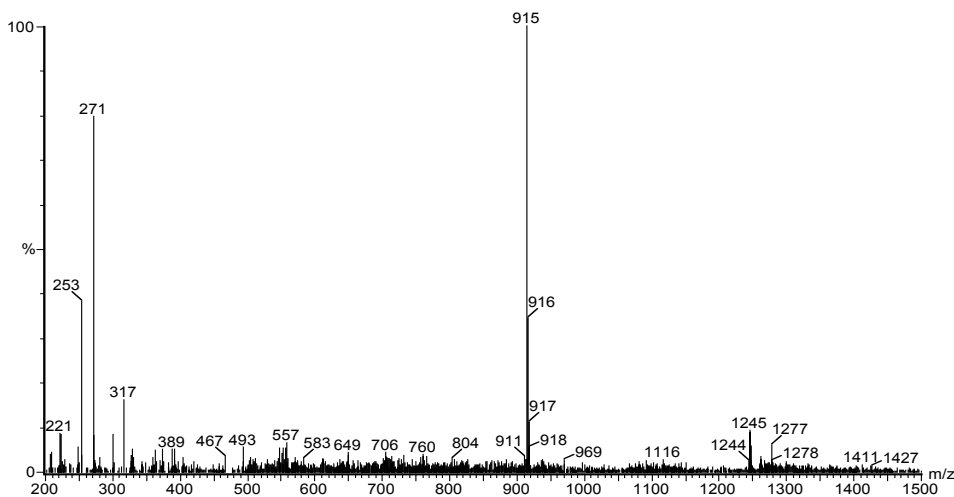
**Figure 79** : Suivi du milieu réactionnel de l'hémisynthèse de l'adduit vescalagine-malvidine (1: vescalagine (**55**), 2: malvidine (**102**), 3 : adduit vescalagine malvidine (**103**))

### III-3-Analyse structurale de l'adduit vescalagine-malvidine

#### III-3-1-Analyse par CLHP-ESI-MS à +30 eV et à -60 eV

L'étude structurale débute par une analyse en CLHP-ESI-MS (méthode 10) en mode positif avec une intensité de voltage de cône de +30 eV.<sup>150,165</sup> Le pic moléculaire présente alors une masse de 1247 qui est la masse de notre produit, l'adduit vescalagine-malvidine (**103**) étant chargé positivement. Cette masse de 1247 correspond comme dans les cas précédents à la perte de 18 unités de masse (H<sub>2</sub>O) suite à la condensation de la vescalagine (**55**) (m = 934) et de la malvidine (**102**) (m = 331) soit  $1247 = 934 + 331 - 18$ .

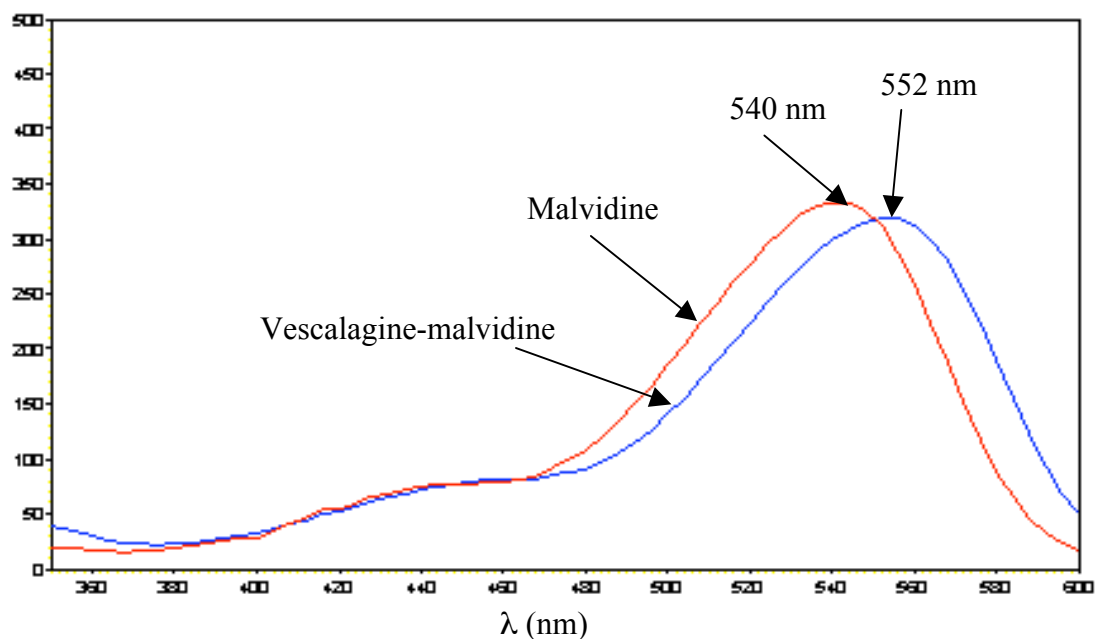
Malgré la charge positive de notre adduit, l'application d'une tension de cône de voltage de -60 eV fragmente plus facilement le composé **103** que l'utilisation d'une tension positive identique. La fragmentation de **103** conduit à la formation des fragments caractéristiques de l'unité ellagique comme dans le cas des flavano-ellagitannins. On note alors la présence du fragment de 915 qui résulte d'une perte de 331 en unité de masse (malvidine (**101**)) par rapport à l'ion moléculaire  $[M-2H]^+ = 1245$ , et le fragment 301 qui correspond à l'acide ellagique (Figure 80).



**Figure 80** : Spectre de masse à  $-60$  eV de l'adduit vescalagine-malvidine (**103**)

### III-3-2-Comparaison des spectres UV

La comparaison des spectres UV-visible de la malvidine (**102**) et de l'adduit vescalagine-malvidine (**103**) montre un effet bathochrome positif de 12 nm par rapport à la malvidine (**102**) seule (Figure 81). Ce déplacement positif est caractéristique de la substitution de l'un des sommets 6 ou 8 du cycle aromatique A de la malvidine (**102**). De tels déplacements positifs sont couramment observés lors de la formation des adduits flavan-3-ol-malvidine.<sup>61-66</sup>

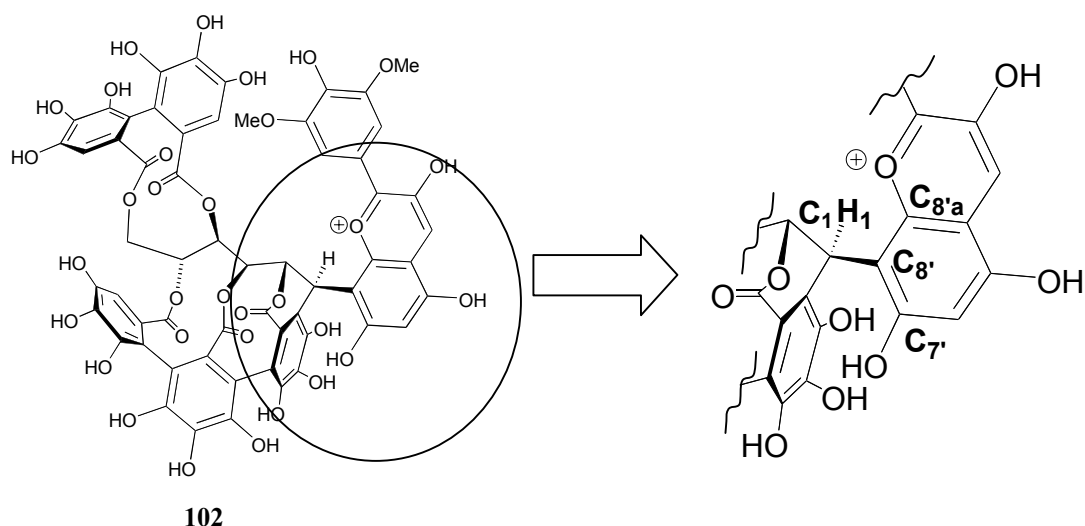


**Figure 81** : Comparaison entre le spectre visible de la malvidine (**102**) et de l'adduit vescalagine-malvidine (**103**)

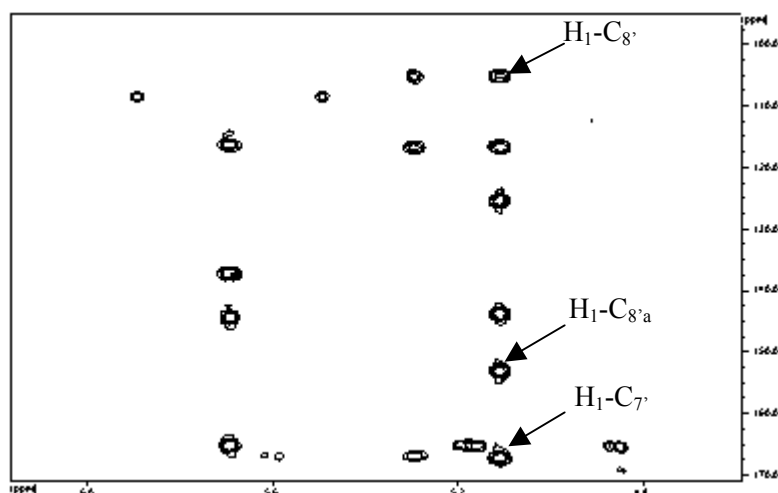
## III-3-3-Analyse par RMN de l'adduit vescalagine-malvidine

Les spectres RMN de l'adduit vescalagine-malvidine (**103**) n'ont été comparés qu'avec les données de la vescalagine (**55**) et de la malvidine (**102**) de la littérature,<sup>92,94,95,166,167</sup> car aucun anthocyano-ellagitannin n'a été précédemment isolé et caractérisé. Comme lors de la caractérisation des acutissimines, les deux critères structuraux importants sont la configuration du carbone C<sub>1</sub> et la détermination du sommet de connexion entre la vescalagine (**55**) et la malvidine (**102**). La configuration du carbone C<sub>1</sub> est déterminée par la constante de couplage entre le proton H<sub>1</sub> et le proton H<sub>2</sub> qui est inférieure à 1 Hz comme celle de la vescalagine (**55**) et des flavano-ellagitannins. L'orientation de l'unité flavylum de l'adduit vescalagine-malvidine (**103**) est donc  $\beta$ .<sup>127</sup>

Le sommet de connexion entre la vescalagine (**55**) et la mavidine (**102**) est déterminé par les corrélations proton-carbone à longue distance (HMBC) entre le proton H<sub>1</sub> de la vescalagine (**55**) et les carbones C<sub>8'</sub>, C<sub>7'</sub> et surtout C<sub>8'a</sub> de la mavidine (**102**). Ces corrélations montrent de façon inambigüe que la mavidine (**102**) est reliée au carbone C<sub>1</sub> de la vescalagine (**55**) par son sommet 8, comme dans le cas de l'acutissimine A (**85**) et de l'épiacutissimine A (**89**) (Figure 82 et Figure 83).



**Figure 82** : Agrandissement de l'environnement autour du carbone C<sub>1</sub> l'adduit vescalagine-malvidine (**103**)



**Figure 83** : Portion de la carte HMBC l'adduit vescalagine-malvidine (**103**)

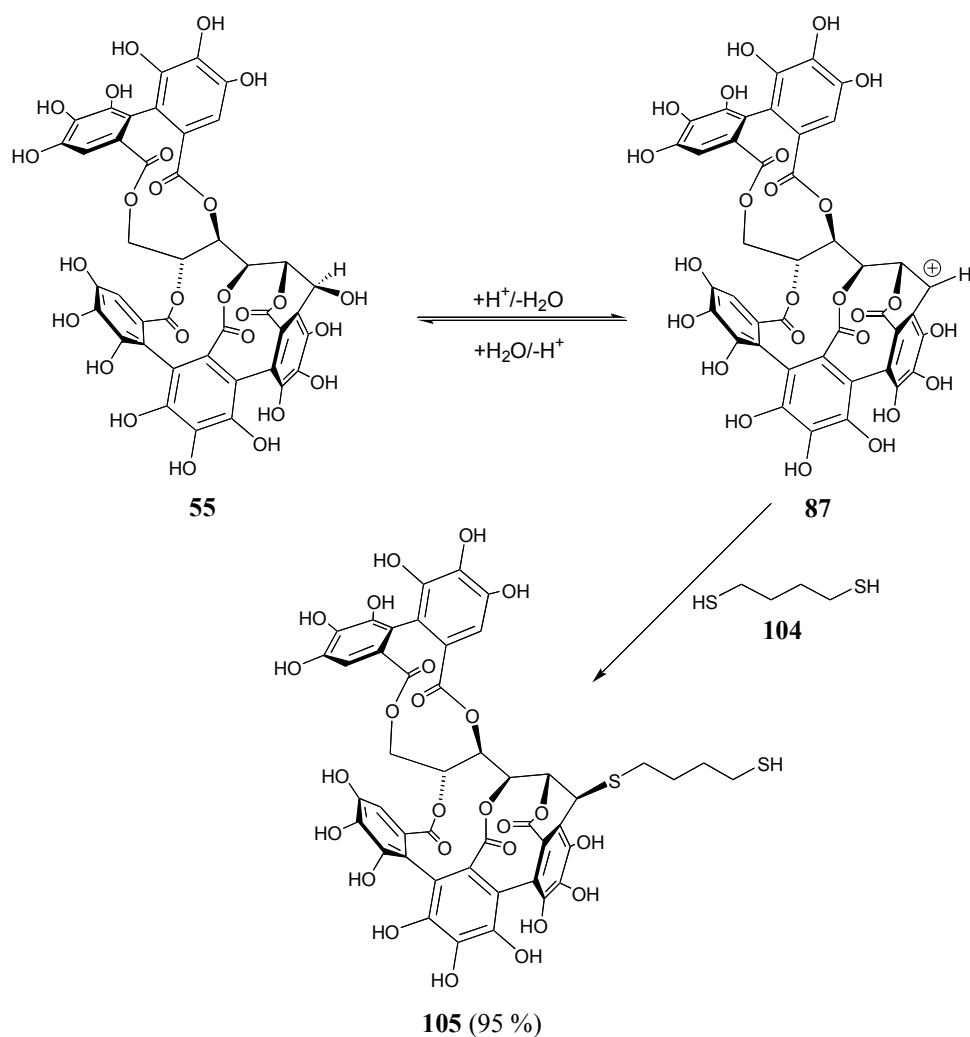
### III-5-Conclusion

La première hémisynthèse d'anthocyano-ellagitannin a été réalisée en milieu organique entre la malvidine (**102**) et la vescalagine (**55**), avec une rétention de configuration au niveau du carbone C<sub>1</sub> comme lors de l'hémisynthèse des flavano-ellagitannins. Ce nouveau composé vescalagine-malvidine (**103**) présente un effet bathochrome de 12 nm, soit une teinte plus violette que celle de la malvidine (**102**). La formation d'anthocyano-ellagitannin entre la vescalagine (**55**) et les anthocyanes natives du raisin, principalement la malvidine-3-*O*-glucoside (**11**), est donc probablement possible au cours de l'élevage des vins rouges en fûts de chêne. Il nous reste à réaliser l'hémisynthèse de l'adduit correspondant entre la vescalagine (**55**) et la malvidine-3-*O*-glucoside (**11**) que nous avons purifié à partir de baies de raisin.

## IV-Hémisynthèse d'un thioether d'ellagitannin

### IV-1-Condition opératoire de l'hémisynthèse du 4'-butanethiol-1-thioéthervescalagine

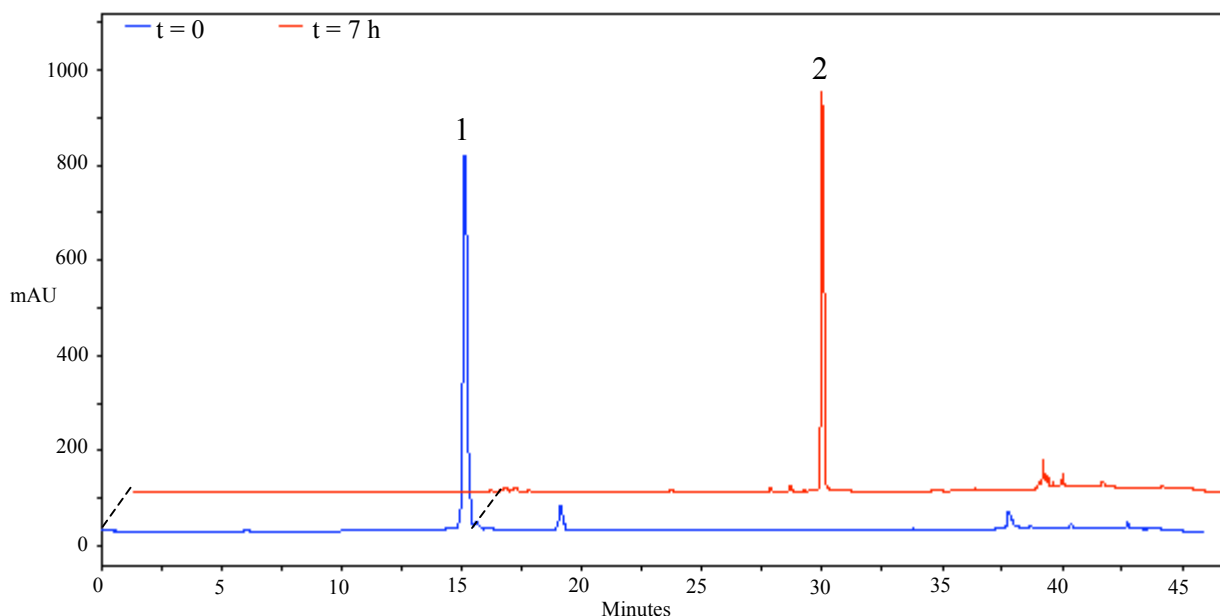
Le 1,4-butanedithiol (**104**) a été utilisé pour modéliser l'attaque nucléophile d'un thiol sur le carbocation benzylique **87** provenant de la déshydroxylation de la vescalagine (**55**) en milieu acide. La vescalagine (**55**) et le 1,4-butanedithiol (**104**) sont solubilisés dans du THF fraîchement distillé auquel est additionné 0,15 % en volume d'acide trifluoroacétique. Le milieu réactionnel est alors porté à une température de 60°C et l'évolution de la réaction est suivie par CLHP (méthode 1).



**Figure 84** : Réaction de formation du 4'-butanethiol-1-thioéthervescalagine (**105**)

#### IV-2-Analyse des chromatogrammes de l'hémisynthèse du 4'-butanethiol-1-thioéthervescalagine

La disparition de la vescalagine (**55**) est totale après 7 heures de réaction, alors que un produit à 29,8 min s'est formé (Figure 85). Cependant, malgré la formation d'un unique produit, une étape de purification est indispensable pour éliminer les impuretés apportées par la vescalagine (**55**), comme dans le cas de l'éthylvescalagine (**91**).



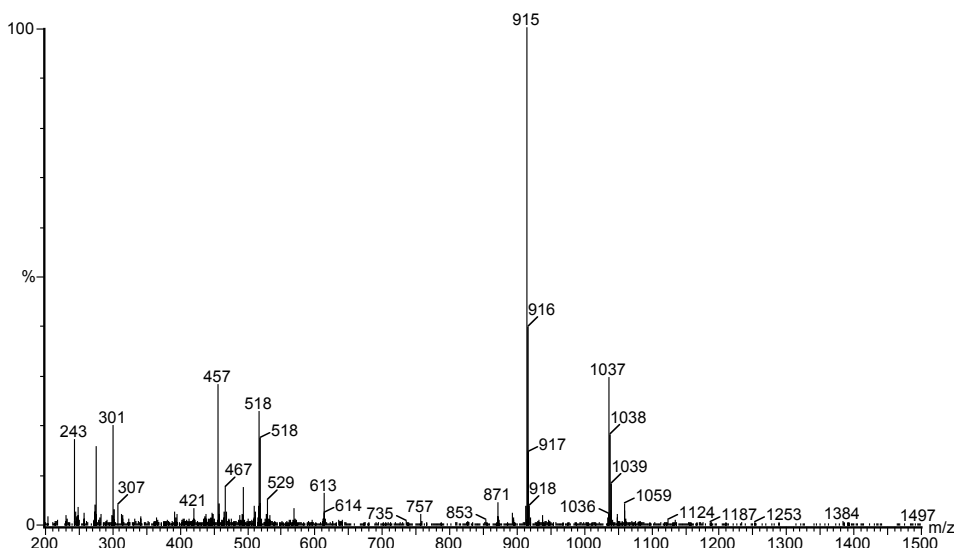
**Figure 85** : Suivi du milieu réactionnel (1: vescalagine (**55**), 2: 4'-butanethiol-1-thioéthervescalagine (**105**))

Cette purification s'effectue sur cartouche C<sub>18</sub>, le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite puis ressolubilisé dans l'eau. La solution ainsi obtenue est déposée sur la cartouche. Les impuretés sont éluées avec une solution H<sub>2</sub>O/EtOH (98/2, v/v). Le 4'-butanethiol-1-thioéthervescalagine (**105**) produit est élué avec une solution d'éthanol pur. Après évaporation sous pression réduite de l'éthanol et lyophilisation, 70 mg de produit sont obtenus sous forme d'une poudre blanche, correspondant à un rendement de 95 %.

#### IV-3-Analyse structurale du 4'-butanethiol-1-thioéthervescalagine

##### IV-3-1- Analyse par CLHP-ESI-MS à -30 eV et à -60 eV

L'étude structurale du 4'-butanethiol-1-thioéthervescalagine débute par une analyse CLHP-ESI-MS (méthode 10) en mode négatif avec une intensité de voltage de cône à -30 eV. Cette analyse montre que le pic à 29,8 min que nous avons attribué au 4'-butanethiol-1-thioéthervescalagine (**105**) a bien une masse moléculaire de 1038. Cette masse peut correspondre comme dans les cas précédents, à la perte de 18 unités de masse (H<sub>2</sub>O) suite à la condensation sur la vescalagine (**55**) (m = 934) du 1,4 butanedithiol (**104**) (m = 122) soit 1038 = 934 + 122 - 18.



**Figure 86 :** Spectre de masse du 4'-butanethiol-1-thioéthervescalagine (**105**)

L'utilisation d'une intensité de voltage de cône de  $-60$  eV permet de fragmenter le 4'-butanethiol-1-thioéthervescalagine (**105**) pour conduire à la formation des fragments caractéristiques de l'unité ellagique observés précédemment. On note alors la présence d'un ion moléculaire bichargé  $[M-2H]^{2-} = 518$  ainsi que des fragment 915 et 301 (Figure 86). Des fragments d'intensité plus faible sont également présent comme le fragment 871 qui résulte d'une perte de 44 unités de masse ( $CO_2$ ), ainsi que le fragment 613 qui provient d'une perte de 302 unités de masse (HHDP) par rapport au fragment 915. Tous ces fragments montrent que ce produit comporte bien l'unité ellagique sur laquelle est connectée une structure de masse 122 (masse de **104**).

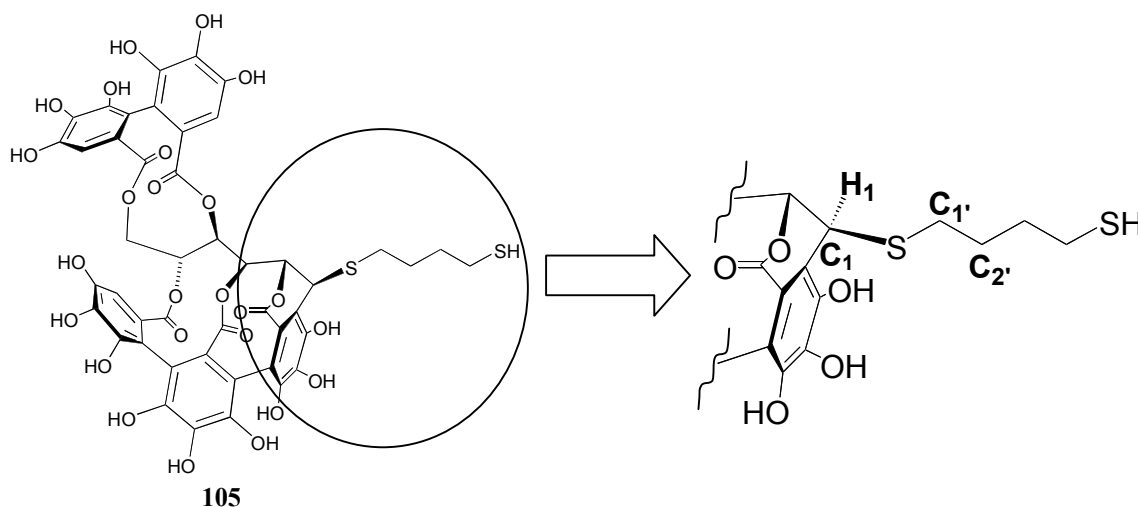
#### IV-3-2-Analyse par RMN du 4'-butanethiol-1-thioéthervescalagine

La comparaison de l'analyse par RMN du proton du produit obtenu avec la vescalagine (**55**) montre une très grande similitude entre les spectres. La différence la plus significative est la présence d'un multiplet à 1,8 ppm représentant quatre protons attribuables aux deux  $CH_2$  aliphatiques de la chaîne thiol, et de deux triplets à 2,73 ppm et 2,91 ppm représentant chacun deux protons attribuables aux deux unités  $-CH_2-S-$ . Comme pour les flavano-ellagitannins, la constante de couplage entre le proton  $H_1$  et le proton  $H_2$  est inférieure à 1 Hz. La fonction thioéther a donc adopté une orientation- $\beta$  comme dans toutes les réactions de substitution nucléophile étudiées à partir de la vescalagine (**55**).<sup>127</sup>

L'analyse par RMN du carbone montre la présence de quatre carbones supplémentaires par rapport à la vescalagine (**55**). Deux carbones à 33,3 et 34,0 ppm caractéristiques de carbones aliphatiques, les deux autres à 31,8 et 38,6 ppm pouvant être les deux carbones liés à un atome de soufre.

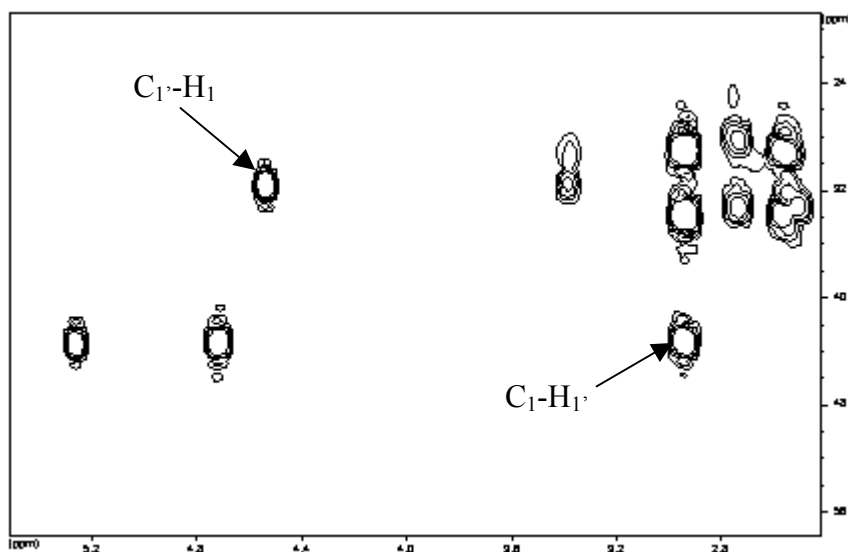
L'analyse des corrélations proton-carbone à longue distance (HMBC) montre une corrélation entre le carbone C<sub>1'</sub> et le proton H<sub>1</sub> ainsi qu'entre les deux protons H<sub>1'</sub> et le carbone C<sub>1</sub>. Ces deux corrélations au travers de la liaison thioether montrent avec certitude que la fonction thioether est bien positionnée sur le carbone C<sub>1</sub> de la chaîne glucosidique (Figure 87 et Figure 88).

En conclusion, toutes ces analyses RMN ont donc permis de déterminer avec certitude la structure du 4'-butanethiol-1-thioéthervescalagine (**105**). Le 4'-butanethiol-1-thioéthervescalagine (**105**) résulte donc d'une addition du 1,4-butanedithiol (**103**) sur le carbone C<sub>1</sub> de la vescalagine (**55**) avec rétention de configuration de ce carbone.



**Figure 87** : Agrandissement de l'environnement autour du carbone C<sub>1</sub> du 4'-butanethiol-1-thioéthervescalagine (**105**)





**Figure 88** : Portion de la carte HMBC du 4'-butanethiol-1-thioéthervescalagine (**105**)

#### IV-5-Conclusion

La première hémisynthèse d'un thioéther d'ellagitannin a été réalisée à partir de la vescalagine (**55**) et du 1,4-butanedithiol (**104**) en milieu organique. La formation de ce nouveau complexe montre que le carbocation benzylique **87** formé en milieu acide à partir de la vescalagine (**55**) peut être piégé par un atome de soufre. On peut donc s'attendre à trouver dans les vins des complexes covalents entre des ellagitannins *C*-glycosidiques (comme la vescalagine (**55**)) et des composés aromatiques comportant une fonction thiol ou des peptides comportant un résidu cystéine.

#### V-Conclusion

L'addition de la malvidine sur le carbocation **87** dérivé de la vescalagine (**55**) a conduit à la formation de l'adduit vescalagine-malvidine (**103**), premier représentant d'une nouvelle famille de composés que sont les anthocyano-ellagitannins. Cet adduit présente un effet bathochrome par rapport à l'anthocyane de départ, sa couleur tendant vers une teinte plus violette. La formation des anthocyano-ellagitannins au cours de l'élevage en fûts de chêne des vins rouge est donc possible et pourrait participer à l'évolution de la couleur des vins au cours de cet élevage.

Par analogie avec *Quercus acutissima* dont les feuilles comportent de la vescalagine (**55**) et de la catéchine (**2**) à l'état libre ainsi que leurs produits de condensation, les acutissimines **85** et **86**, des anthocyano-ellagitannins pourrait être présents dans les feuilles de *Acer rubrum* (érable rouge du Canada) ou des anthocyanes et des tannins hydrolysables sont simultanément présents.<sup>168-171</sup>

La formation de thioéthers d'ellagitannins résultant de l'addition d'un thiol sur le carbocation **87** a été réalisé en milieu organique pour la première fois. L'addition de composés comportant une fonction thiol comme certains composés aromatiques du vin est donc possible dans les vins élevés en fûts de chêne. Cependant, la détection de ces thioester-ellagitannins dans les vins sera difficile, les teneurs en thiols volatiles des vins sont généralement inférieur au milligramme par litre.

**DOSAGE DES FLAVANO-ELLAGITANNINS ET DE  
L'ETHYLVEscalAGINE DANS UN VIN ROUGE  
ELEVE EN FUTS DE CHENE**



## **I-Introduction**

L'hémisynthèse des acutissimines **85**, **86**, **89** et **90** a été réalisée en milieu organique ainsi qu'en milieu modèle du vin. Il a également été montré que leur formation résultait d'un mécanisme général en milieu acide, se traduisant par l'attaque nucléophile sur le carbocation **87** dérivé de la vescalagine (**55**). La formation de l'éthylvescalagine (**91**), qui résulte de l'addition de l'éthanol sur le carbocation **87**, a également été observée en milieu organique et en milieu modèle du vin. Pour confirmer la formation de ces composés dans le vin, leur identification ainsi que leur dosage ont été réalisées sur un vin rouge élevé pendant 18 mois en fûts de chêne.

## **II-Identification des flavano-ellagitannins et de l'éthylvescalagine dans le vin**

### **II-1-Extraction sélective d'un vin rouge**

Le vin rouge est un milieu très complexe qui contient de nombreux produits différents. Des étapes de purification sont indispensables avant de pouvoir envisager toute identification par CLHP-ESI-MS. Tous les produits indésirables génèrent un bruit de fond important au cours de l'analyse en masse et en UV qui masquent nos produits présents en faible quantité.

#### *II-1-1-1<sup>er</sup> étape sur gel XAD 7 HP*

La première étape de purification est réalisée sur un gel de résine XAD 7 HP.<sup>153,164,165</sup> L'échantillon de vin rouge est évaporé à sec sous pression réduite puis repris dans de l'eau. La solution ainsi obtenue est alors déposée en tête de colonne contenant la résine XAD 7 HP, qui a été préalablement activée pendant une nuit dans du méthanol et lavée avec de l'eau. L'acide tartrique et les composés non phénoliques sont éliminés par un lavage avec 250 mL d'une solution d'eau acidifiée avec 0,4 % en volume d'acide formique. La fraction contenant les ellagitannins C-glycosidiques natifs et nos complexes est éluée avec 250 mL d'une solution H<sub>2</sub>O/MeOH (80/20, v/v) acidifiée avec 0,4 % en volume d'acide formique. Le gel est ensuite régénéré par lavage avec du méthanol.

*II-1-2-2<sup>ème</sup> étapes sur gel TSK HW 40 F*

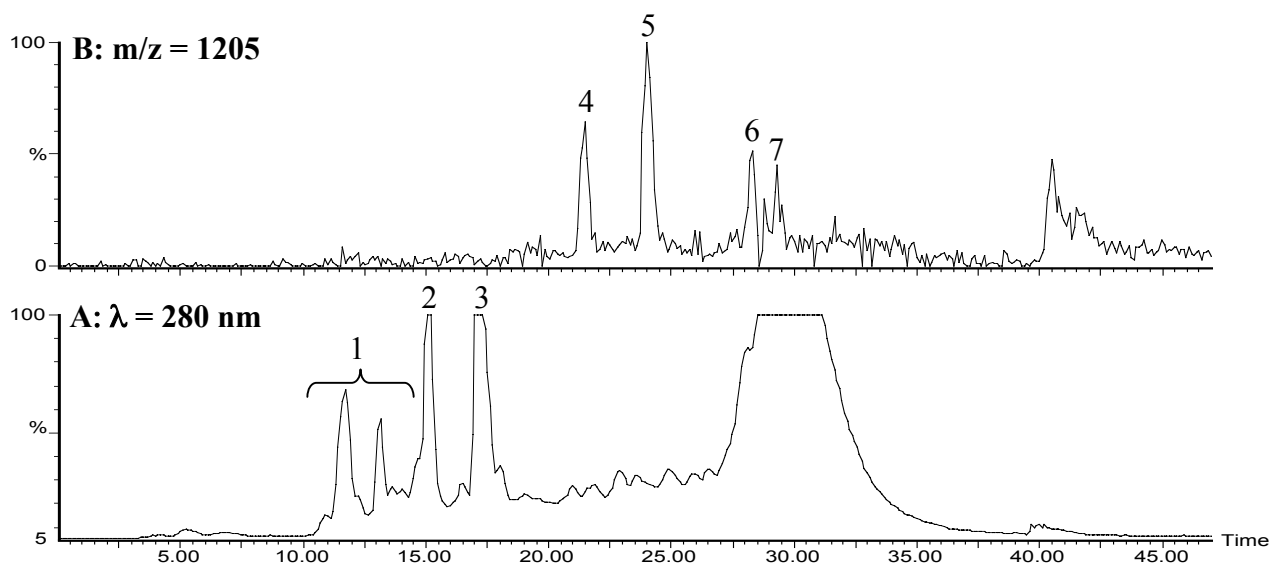
La fraction éluée avec 20 % de méthanol aqueux contient les ellagitannins C-glycosidiques natifs ainsi que nos complexes, mais également des polyphénols de masse moléculaires faibles. Le milieu étant encore trop complexe, une seconde étape de purification est nécessaire. L'utilisation d'un gel TSK a été envisagée, car il a la particularité de retenir de façon sélective les tannins par rapport aux autres polyphénols.<sup>172-174</sup>

La seconde étape de purification est donc réalisée sur un gel de TSK HW 40 F. La fraction éluée avec 20 % de méthanol est évaporée à sec sous pression réduite, puis reprise dans l'eau. La solution ainsi obtenue est alors déposée sur une colonne remplie de gel TSK HW 40 F. La solution est alors lavée avec 50 mL d'eau acidifiée avec 0,4 % en volume d'acide formique, puis les polyphénols, non retenus par le gel, sont élués avec 50 mL d'une solution H<sub>2</sub>O/MeOH (30/70, v/v) acidifiée avec 0,4 % en volume d'acide formique. La fraction ellagique retenue par le gel est alors éluée par 50 mL d'une solution H<sub>2</sub>O/Acétone (30/70, v/v) acidifiée avec 0,4 % d'acide formique. Cette fraction est évaporée à sec sous pression réduite, puis resolubilisée dans 400 µL d'eau avant d'être injectée en CLHP-ESI-MS (méthode 11) dans le but d'identifier les flavano-ellagitannins ainsi que l'éthylvescalagine **(91)**.

Les deux étapes de purification décrites précédemment ont, dans un premier temps, été mises au point sur un milieu modèle du vin (solution aqueuse à 12 % d'éthanol acidifié avec 5 g/L d'acide tartrique avec un pH ajusté à 3,2) enrichi à 10 mg/L en acutissimine A pure **(85)**. L'utilisation de cette solution enrichie en acutissimine A **(85)** pure permet de vérifier que la totalité de l'acutissimine A **(85)** est bien récupérée en fin de purification. Après cette validation sur solution modèle, les étapes de purification ont également été testées sur un vin rouge enrichi à 10 mg/L en acutissimine A **(85)** pure pour vérifier que la complexité du milieu ne perturbe pas les étapes de purification. Du fait de la similitude de structure entre les différentes acutissimines **85**, **86**, **89** et **90**, ayant de surcroît des comportements chromatographiques similaires, la validation de ces étapes a été réalisée uniquement sur l'acutissimine A pure **(85)**.

## II-2-Identification par CLHP-ESI-MS des acutissimines et épiacutissimines A et B

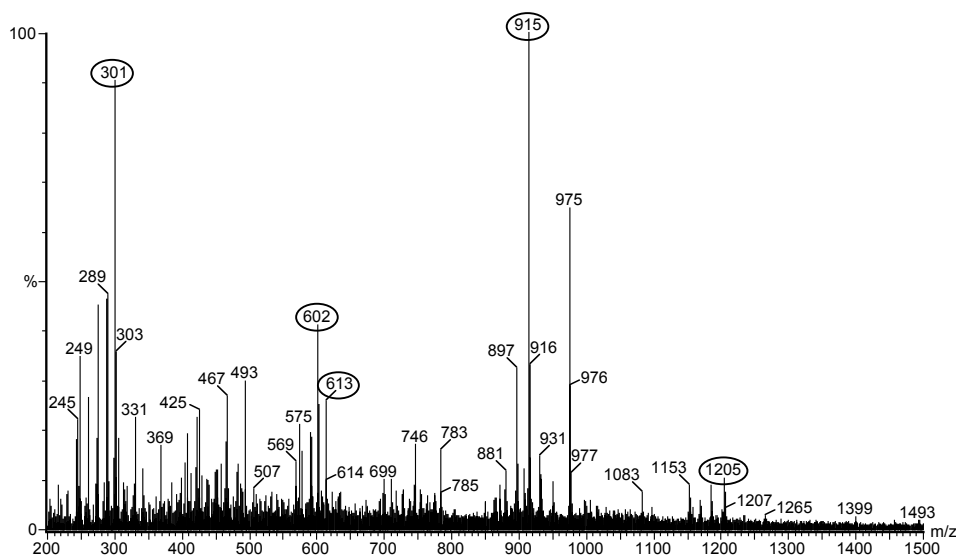
Cette identification a été réalisée à partir d'un vin rouge élevé pendant 18 mois en barrique neuve. Les deux étapes de purification détaillées précédemment ont été appliquées sur un échantillon de 100 mL de ce vin. Le chromatogramme obtenu par l'analyse CLHP à 280 nm est très complexe, malgré les étapes de purification (Figure 89). Il est cependant aisé de reconnaître les ellagitannins C-glycosidiques natifs que sont les monomères vescalagine (**55**, pic 2, Figure 89) et castalagine (**56**, pic 3, Figure 89), ainsi que les roburines **59**, **61**, et **62** (zone 1, Figure 89). Les flavono-ellagitannins recherchés étant présents en faible quantité, il est difficile de les distinguer par la seule détection UV. Grâce à l'utilisation de la spectrométrie de masse comme moyen de détection sélective des ions moléculaires recherchés (mode SIR,  $[M-H]^- = 1205$  pour les acutissimines **85**, **86**, **89** et **90**), il apparaît alors quatre pics dont les temps de rétention sont identiques à ceux observés pour les acutissimines pures **85**, **86**, **89** et **90** (pic 4-7, Figure 89) obtenus par hémisynthèse en milieu organique.



**Figure 89** : A : chromatogramme à 280 nm, B : chromatogramme de masse spécifique  $m/z = 1205$  (1: roburine A, B, C, et grandinine (**59**, **61**, **62** et **57**), 2 :vescalagine (**55**), 3: castalagine (**56**), 4 : épiacutissimine B (**90**), 5 : acutissimine A (**85**), 6 : épiacutissimine A (**89**), 7 : acutissimine B (**86**))

Les spectres de masse des produits purs (Figure 31) et ceux obtenus pour les quatre pics de masse moléculaire ,  $[M-H]^- = 1205$  (Figure 90) sont identiques. Il est possible de noter la présence des fragments caractéristiques de nos flavano-ellagitannins (915, 613 et 301),

ainsi que l'ion moléculaire bichargé  $[M-2H]^{2-}$  à 602 unités de masse. La présence de pics parasites est à noter et s'explique par le fait que le milieu analysé est encore complexe et qu'il y a coélution d'autres composés avec les acutissimines. L'identification des acutissimines **85**, **86**, **89** et **90** dans ce vin rouge élevé en fûts de chêne est néanmoins indiscutable grâce aux comportements chromatographiques identiques des produits purs et de ceux observés par CLHP-ESI-MS dans le vin.

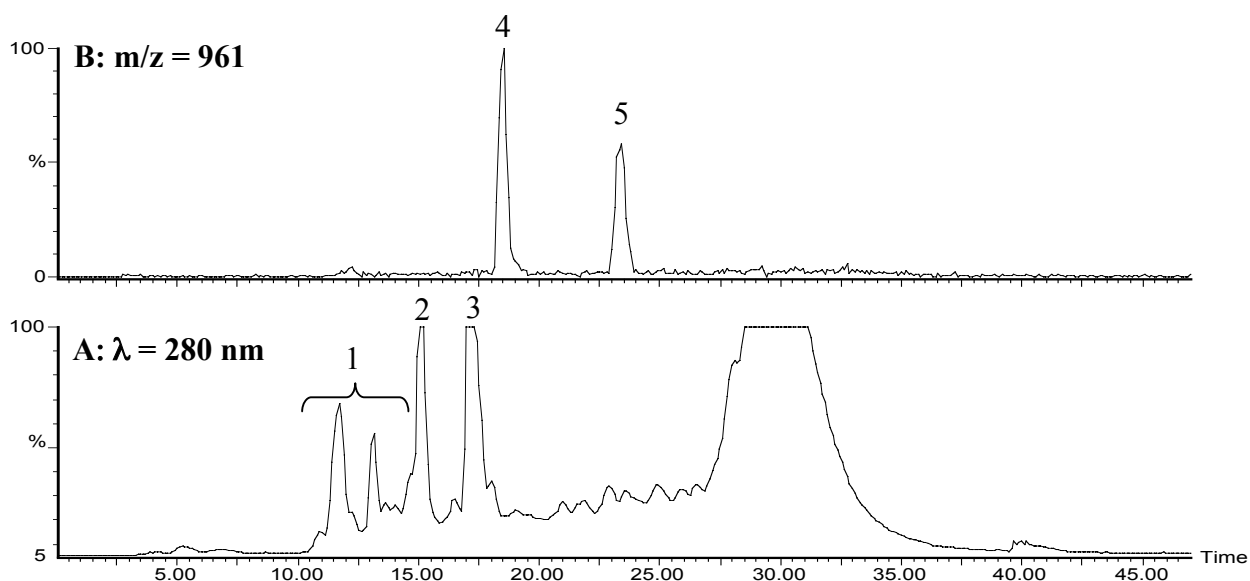


**Figure 90:** Spectre de masse de l'acutissimine A (**85**) détectée dans le vin

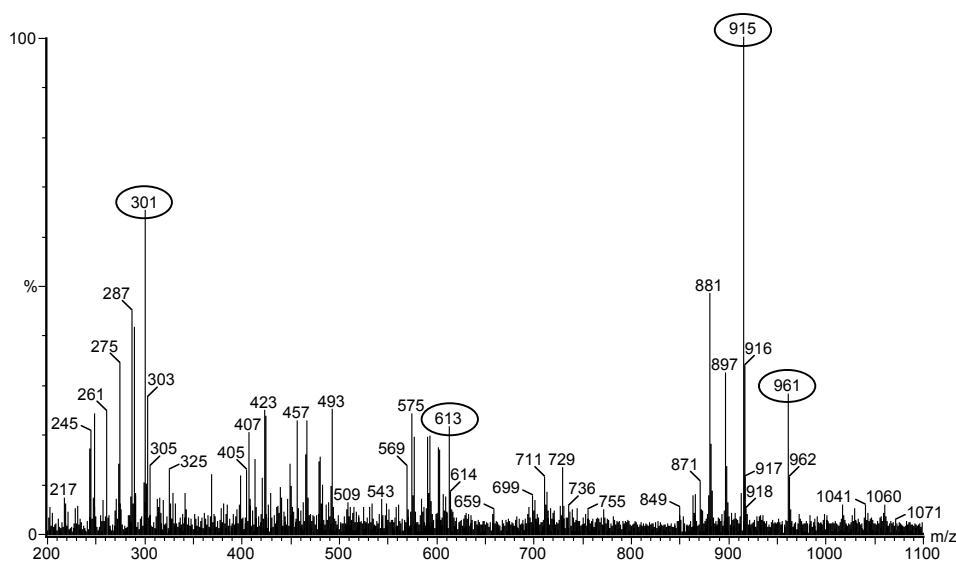
### II-3-Identification par couplage CLHP-ESI-MS de l'éthylvescalagine

L'identification de l'éthylvescalagine (**91**) a également été réalisée à partir d'un échantillon de vin rouge identique à celui utilisé pour l'identification des acutissimines **85**, **86**, **89** et **90** et préparé également de manière similaire. Le chromatogramme obtenu par l'analyse CLHP à une longueur d'onde de 280 nm est dans ce cas également trop compliqué pour permettre une identification directe. L'utilisation du détecteur de masse réglé sur l'ion moléculaire de l'éthylvescalagine (**91**)  $[M-H]^- = 961$  rend possible cette identification. Il apparaît deux pics alors qu'un seul était attendu (Figure 91). Cependant parmi les produits ainsi détectés, seul le second (pic 5) a un temps de rétention identique à celui de l'éthylvescalagine (**91**).





**Figure 91** : A : chromatogramme à 280 nm, B : chromatogramme de masse spécifique  $m/z=961$  (1: roburine A, B, C, et grandinine (59, 61, 62 et 57), 2 :vescalagine (55), 3: castalagine (56), 4 : pic inconnu non ellagique de masse moléculaire  $[M-H]^- = 961$ , 5 : éthylvescalagine (91)).



**Figure 92** : Spectre de masse de l'éthylvescalagins (91) détectée dans le vin

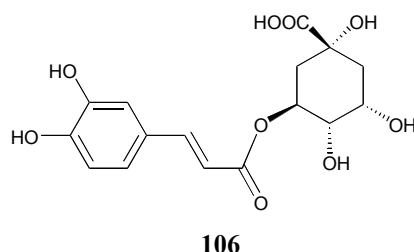
La comparaison du spectre de masse de l'éthylvescalagine (91) pure avec celui obtenu pour le second produit (pic 5) de masse moléculaire 961 (Figure 92) montre une très grande similitude. Il est ici aussi possible de noter la présence des fragments caractéristiques de l'unité ellagique (915, 613 et 301). Comme dans le cas des flavano-ellagitannins,

l'identification de l'éthylvescalagine (**91**) dans l'échantillon de vin rouge élevé en fûts de chêne est indiscutable.

Le premier pic 4 également de masse moléculaire 961 n'est pas l'éthylvescalagine (**91**) car son temps de rétention est différent de l'éthylvescalagine (**91**) pure et le spectre de masse de ce produit ne montre pas la présence des fragments ellagiques caractéristiques de masse 915 et 301. Ce produit non identifié n'est donc pas un ellagitannin.

### III-Dosage des flavano-ellagitannins et de l'éthylvescalagine dans un vin élevé en fûts de chêne par étalonnage interne

#### III-1-Principe du dosage par étalonnage interne



**Figure 93** : Structure de l'étalon interne, l'acide chlorogénique (**106**)

La méthode de dosage par étalonnage interne est basée sur la comparaison entre les aires des pics correspondant aux produits à quantifier, dans notre cas les acutissimines **85**, **86**, **89** et **90** et l'éthylvescalagine (**91**), avec celle de l'étalon interne, l'acide chlorogénique (**106**) (Figure 93). Malgré sa structure très différente de celle de nos flavano-ellagitannins, l'acide chlorogénique (**106**) a été choisi comme étalon interne car son temps de rétention et sa sensibilité à l'ionisation sont proche de ceux de nos composés. Il est également généralement utilisé comme étalon interne pour le dosage par CLHP-ESI-MS des tannins hydrolysables,<sup>175</sup> et est totalement absent dans les vins obtenus à partir de raisin de type *Vitis vinifera*.<sup>176</sup> Cette absence a été vérifiée par CLHP-ESI-MS avant le dosage de nos composés dans l'échantillon de vin rouge.

Pour déterminer la concentration de composés dans un échantillon, il faut préalablement connaître le coefficient de réponse relatif de chaque composé X que l'on veut

doser par rapport à celui de l'étalon interne EI. Ce coefficient noté  $K_{X/EI}$  est déterminé par la formule suivante :

$$K_{X/EI} = \frac{[X] A_{EI}}{[AI] A_X}$$

[X] : Concentration du produit X en mg/L  
[EI] : concentration de l'étalon interne en mg/L  
 $A_X$  : aire du pic SIR du produit X  
 $A_{EI}$  : aire du pic SIR de l'étalon interne

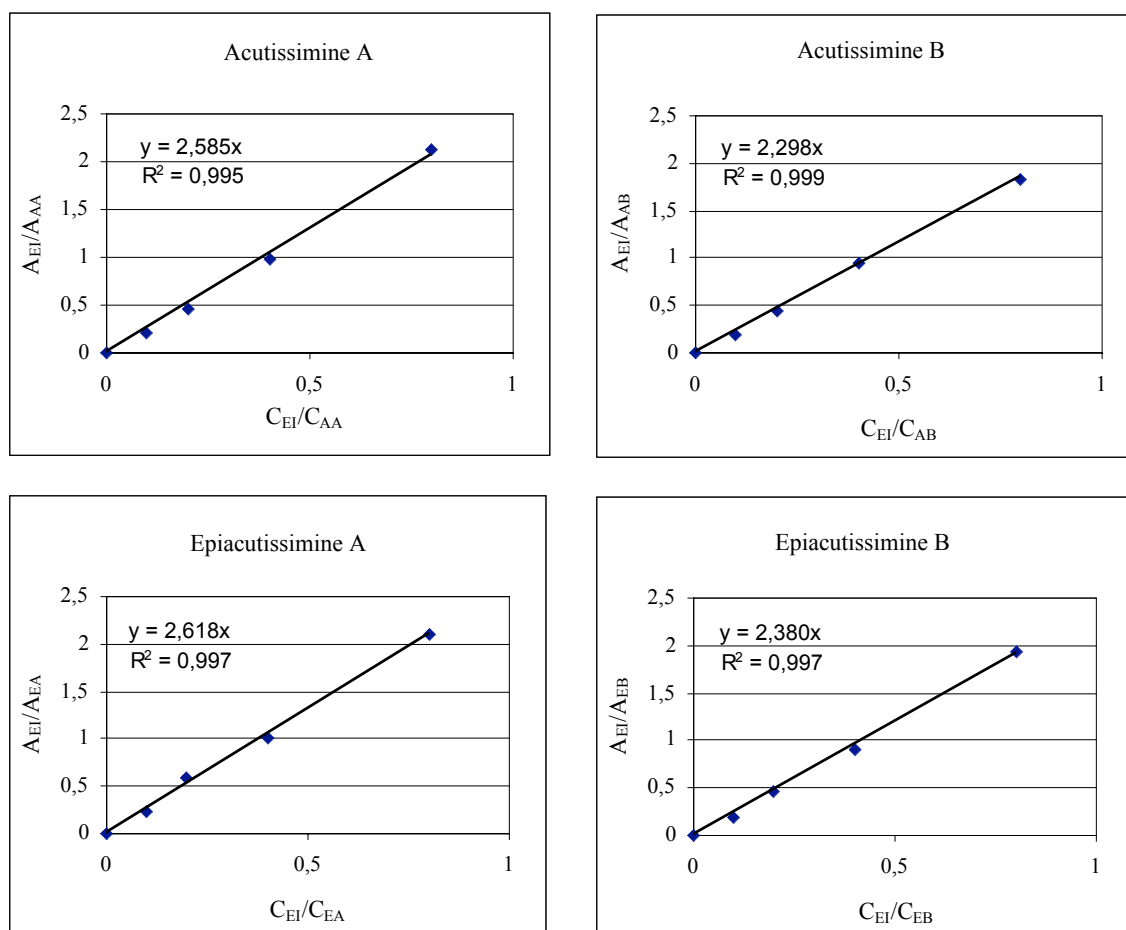
Lorsque le coefficient  $K_{X/EI}$  est déterminé, la seconde étape du dosage consiste à analyser l'échantillon à doser dans lequel a été additionné une quantité connue de l'étalon interne. Enfin l'application de la formule ci-dessus permet de déterminer la concentration du composé à doser dans l'échantillon.

### III-2-Droite d'étalonnage des flavano-ellagitannins

Le coefficient de réponse  $K_{X/EI}$  de chacune des acutissimines **85**, **86**, **89** et **90** est déterminé séparément. Chaque acutissimine pure obtenue par hémisynthèse en milieu organique est injectée en concentration croissante de 25 à 200 mg/L en mélange avec une concentration fixe de 20 mg/L d'acide chlorogénique (**106**).

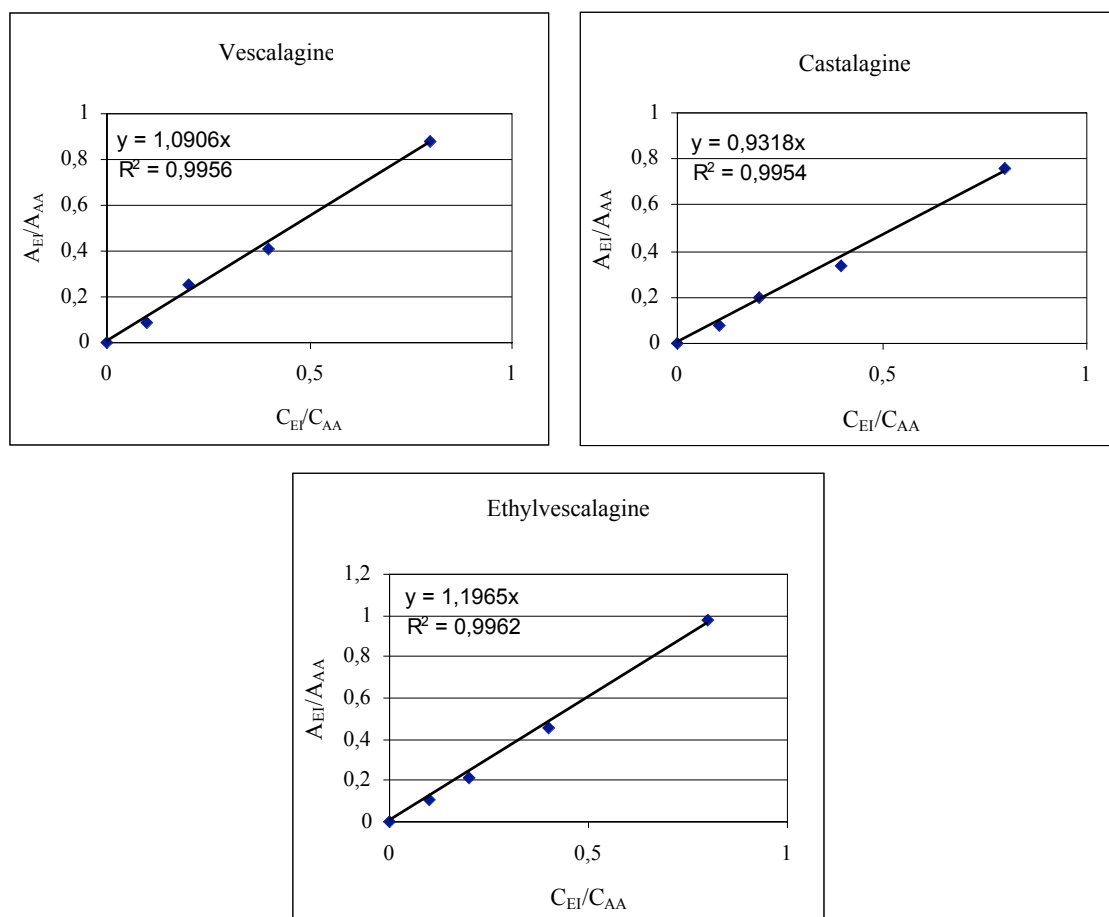
La concentration des acutissimines est probablement inférieure à 25 mg/l dans les vins. Cependant, comme lors de leur identification, l'échantillon de vin subit deux étapes de purification et de concentration. Ceci implique que lorsque l'analyse en CLHP-ESI-MS est réalisée, la concentration des acutissimines dans l'échantillon injecté est comprise entre 25 à 200 mg/L. La concentration réelle dans le vin est alors obtenue par un simple calcul de dilution.

Les acutissimines **85**, **86**, **89** et **90** montrent une excellente linéarité sur la gamme de concentration utilisée ainsi que des coefficients de réponse très proches (Figure 94). Une légère différence est notable entre la série A **85** et **89** et la série B **86** et **90**, et peut s'expliquer par le fait que l'acutissimine A (**85**) a une structure globale plus proche de celle de l'épiacutissimine A (**89**) que de celle de l'acutissimine B (**86**).



**Figure 94 :** Coefficient de réponse des quatre acutissimines **85**, **86**, **89** et **90** pour des concentrations exprimées en mg/L

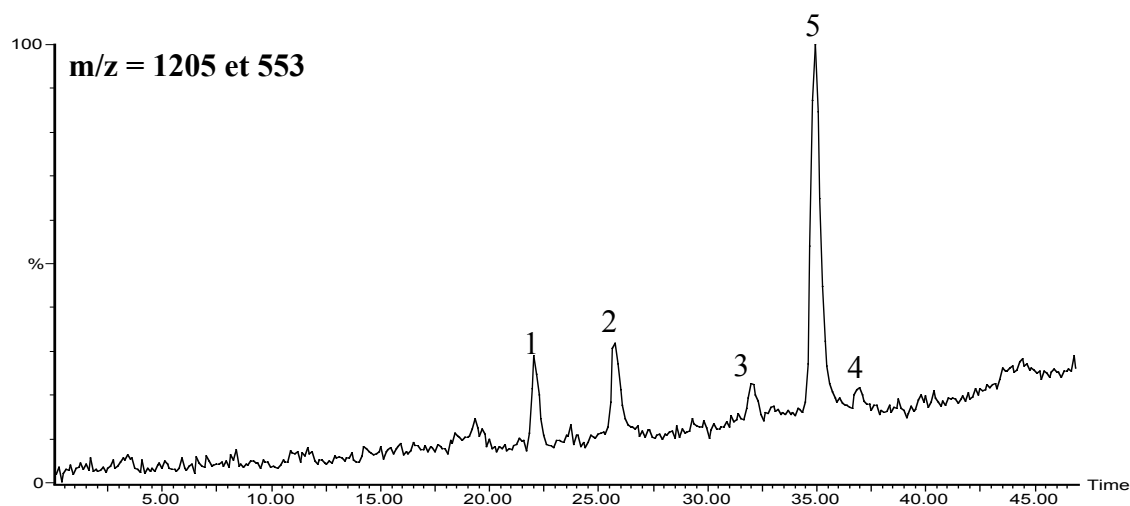
Une gamme de concentration identique a également été utilisée pour la détermination du coefficient de réponse de l'éthylvescalagine (**91**) ainsi que pour celui des deux principaux monomères des ellagitannins C-glycosidiques du bois chêne, la vescalagine (**55**) et la castalagine (**56**) (Figure 95). Le coefficient de réponse de **55** et **56** ainsi que celui de **91** sont très proches et présentent également une excellente linéarité.



**Figure 95** : Coefficient de réponse de la vescalagine (55), de la castalagine (56) et de l'éthylvescalagine (91) pour des concentrations exprimées en mg/L

### III-3-Dosage des flavano-ellagitannins et de l'éthylvescalagine dans un vin rouge élevé en fûts de chêne

La détermination des coefficients de réponse des différents composés à doser ayant été réalisée, un échantillon de vin rouge élevé en fûts de chêne est purifié suivant les deux étapes décrites précédemment. La fraction éluée lors la purification sur gel de TSK-HW-40F par une solution contenant 70 % d'acétone dans l'eau acidifiée, est évaporée à sec sous pression réduite puis resolubilisée dans 400  $\mu$ L d'une solution contenant 20 mg/L d'acide chlorogénique (106). Cette solution est alors injectée en CLHP-ESI-MS (méthode 12) pour réaliser le dosage des quatre acutissimines 85, 86, 89 et 90, de l'éthylvescalagine (91) et des monomères des ellagiques vescalagine (55) et castalagine (56) (Figure 96).



**Figure 96 :** Chromatogramme de masse spécifique  $m/z = 1205$  et  $553$  (1 : épiacutissimine B (**90**), 2 : acutissimine A (**85**), 3 : épiacutissimine A (**89**), 4 : acutissimine B (**86**) et 5 : l'acide chlorogénique (**106**))

Les pics des produits à doser sont alors intégrés et la concentration dans le vin du produit dosé est déterminée par la formule ci-dessous, en prenant en compte le facteur de dilution entre l'échantillon injecté et le volume de vin prélevé avant les deux étapes de purification.

$$[X]_v = [EI] \times K_{X/EI} \times \frac{A_X}{A_{EI}} \times \frac{0,4}{V_v}$$

$[X]_v$  : Concentration du produit X en mg/L dans le vin

$[EI]$  : concentration de l'étalon interne en mg/L dans l'échantillon injecté (20 mg/L)

$A_X$  : aire du pic en mode SIR du produit X

$A_{EI}$  : aire du pic en mode SIR de l'étalon interne

$V_v$  : volume de vin avant purification en mL

L'application de cette formule conduit aux concentrations listées ci-dessous pour les différentes acutissimines **85**, **86**, **89** et **90** et pour l'éthylvescalagine (**91**). Pour être représentatif de la teneur moyenne de ces composés dans les vins rouges élevés en fûts de

chêne, ce dosage devra être reproduit sur d'autres vins rouges avec des origines différentes ainsi que des durées de séjour en fûts de chêne différentes.

Acutissimine A ( <b>85</b> ) :	0,40 mg/L	Ethylvescalagine ( <b>91</b> ) :	0,85 mg/L
Acutissimine B ( <b>86</b> ) :	0,28 mg/L	Vescalagine ( <b>55</b> ) :	2,20 mg/L
Epiacutissimine A ( <b>89</b> ) :	0,30 mg/L	Castalagine ( <b>56</b> ) :	8,10 mg/L
Epiacutissimine B ( <b>90</b> ) :	0,35 mg/L		

Ces teneurs inférieures au milligramme par litre peuvent paraître faibles. Il a été montré que seul la vescalagine (**55**) réagit pour conduire à la formation des acutissimines **85**, **86**, **89** et **90** et de l'éthylvescalagine (**91**). L'addition sur le carbocation benzylique **87** de dimère, voire d'oligomères procyanidiques peut être également envisagée. La réactivité des sommets 8 et 6 de leurs unités flavan-3-ol est comparable à celle de la catéchine (**2**) ou de l'épicatéchine (**3**). De tels tannins complexes formés d'une procyanidine B3 reliée à une unité ellagique C-glycosidiques ont déjà été isolés dans l'écorce du chêne asiatique *Quercus miyagii*.<sup>114</sup>

Un vin élevé en fûts de chêne moins de 18 mois pourrait révéler des concentrations plus élevées en acutissimines **85**, **86**, **89** et **90**. En effet, l'oxydation des acutissimines peut conduire à la formation de produits ayant des structures de type "camelliatannins".<sup>177</sup> Par exemple, l'acutissimine A (**85**) peut s'oxyder en mongolicaine A (**106**) (Figure 97).<sup>128,178</sup> Une telle oxydation a été observée dans un milieu modèle du vin saturé en oxygène.

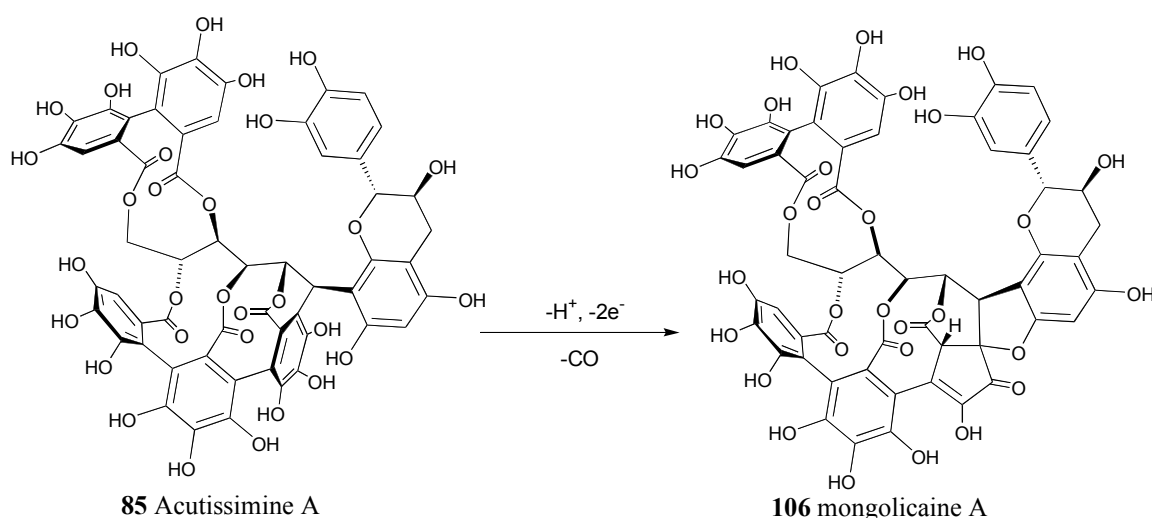


Figure 97 : Formation de la mongolicaine A (**107**) à partir de l'acutissimine A (**85**)

#### **IV-Conclusion**

La présence indiscutable des acutissimines **85**, **86**, **89** et **90** et de l'éthylvescalagine (**91**) dans un vin rouge élevé en fûts de chêne a été démontrée avec des teneurs inférieures au milligramme par litre. L'identification et le dosage de ces molécules dans un vin prouvent que leur mécanisme de formation révélé en milieu organique et observé en milieu modèle du vin est bien effectif dans le vin au cours de son élevage et de son vieillissement. La formation de ces produits dans le vin représente la première hypothèse vérifiée de l'évolution des ellagitannins C-glycosidiques dans les vins. Jusqu'à présent leur devenir et leur disparition n'étaient objet que de spéculations établies par des méthodes indirectes. Pour la première fois, des produits de condensation entre ellagitannins C-glycosidiques et flavan-3-ols ont été identifiés dans le vin.



**PARTIE EXPERIMENTALE**



## I-Conditions expérimentales générales

La catéchine (**2**) et l'épicatéchine (**3**) ont été achetées chez Fluka et la malvidine (**102**) provient de chez Extrasynthèse. Les ellagitannins C-glycosidiques (**55** et **56**) ont été purifiés à partir de bois de chêne.<sup>179</sup> La résine XAD 7 HP ainsi que les cartouches C<sub>18</sub> ont été achetées chez Supelco alors que le gel TSK HW 40F provient de chez VWR Internationale. Le tétrahydrofurane (THF) utilisé comme solvant de réaction est purifié par distillation sur sodium-benzophénone, sous azote. Le méthanol utilisé pour les analyses et les séparations par CLHP est de qualité CLHP et l'eau utilisée est de qualité Milli-Q (Millipore). Les réactions sont conduites sous atmosphère d'azote. La température ambiante se situe entre 20° et 25°C. Les évaporations sont réalisées sous pression réduite, à des températures inférieures à 50°C.

## II-Techniques d'analyse

### II-1-Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres RMN 1D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, DEPT 135) et 2D (COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H, HMQC et HMBC) ont été enregistrés sur des appareils BRUKER DPX 300 et 400. Pour chaque composé, le solvant est précisé lors de la description des spectres sous forme de tableau. Les déplacements chimiques sont exprimés en δ (ppm) relatif au solvant utilisé comme référence interne (Acétone-*d*<sub>6</sub> : δ 2,09 ppm pour la RMN <sup>1</sup>H et δ 29,8 ppm pour la RMN <sup>13</sup>C ; MeOH-*d*<sub>4</sub> : δ 3,31 ppm pour la RMN <sup>1</sup>H et δ 49,00 ppm pour la RMN <sup>13</sup>C, D<sub>2</sub>O : δ 4,79 ppm pour la RMN <sup>1</sup>H). Les constantes de couplages (*J*) sont exprimées en Hz. La multiplicité des carbones a été déterminée par des expériences DEPT 135. Les abréviations suivantes sont utilisées pour décrire la multiplicité des signaux : s (singulet), d (doublet), dd (doublet dédoublé), t (triplet), q (quadruplet), m (massif complexe ou multiplet).

### II-2-Spectrométrie infrarouge (IR)

Les spectres IR ont été enregistrés au moyen d'un spectromètre PERKIN-ELMER IR-FT Paragon 1000 PC. Après lyophilisation, les échantillons sont broyés et mélangés avec du KBr qui après pressage conduit à la formation d'une pastille d'environ un millimètre d'épaisseur sur laquelle les spectres sont enregistrés.

### II-3-Spectrométrie de masse (SM)

Les spectrogrammes de masse basse et haute résolution ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre de masse hybride FISIONS-INSTRUMENTS de type AUTOSPEC-EQ à géométrie EBEQQ en utilisant la technique LSIMS (Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry) au laboratoire de spectrométrie de masse du CESAMO de l'université de Bordeaux 1.

### II-4-Mesure du pouvoir rotatoire

Les pouvoirs rotatoires ont été enregistrés sur un polarimètre ADP 220 BELLINGHAM STANLEY. Le solvant utilisé ainsi que la concentration de l'échantillon sont précisés avec le pouvoir rotatoire sur les fiches produits.

### II-5-Analyse par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)

De nombreux systèmes CLHP ont été utilisés, donc par souci de clarté les caractéristiques techniques des différents appareils vont être présentées puis les conditions d'analyses et les gradients utilisés sont présentés sous forme de fiche méthode.

Appareillage pour la CLHP analytique : Système THERMO-FINIGAN équipé d'un dégazeur SCM 1000, de pompes P 1000 XR, d'un passeur AS 3000, d'un détecteur à barrette de diode UV 6000 LP piloté par le logiciel d'acquisition Chrom-Quest 3.0.

Appareillage pour la CLHP semi-preparative : Système VARIAN équipée de pompes ProStar 215 et d'un détecteur ProStar UV-Vis 320

Appareillage pour la CLHP analytique et semi-preparative : Système BECKMAN GOLD équipé de pompes module 126 et d'un détecteur à barrette de diode module 168 piloté par le logiciel d'acquisition 32 Karat 5.0.

Appareillage pour la CLHP couplé à un détecteur masse (CLHP-ESI-SM) : La partie CLHP est un système HEWLETT PACKARD HP 1100 qui est couplée à un spectromètre de masse

MICROMASS PLATFORM II. Ces deux systèmes sont pilotés par le logiciel d'acquisition Masslynx 3.4.

Préparation des échantillons pour le suivi réactionnel : Un volume de 100 µl des milieux réactionnels est prélevé puis dilué dans 1,5 mL d'eau, la solution ainsi obtenue est placée dans un vial serti de façon hermétique avant injection.

## Méthode 1

**Appareil** : système THERMO-FINIGAN

**Débit** : 1,0 mL/min

**Température** : ambiante

**Volume injecté** : 10 µL

**Colonne** : Merck Lichrosphère RP 18 (4,6 x 250 mm, 5 µm)

**Détection** : 280 nm

**Solvant** : A : eau + 0,1 % de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ; B : méthanol + 0,1 % de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

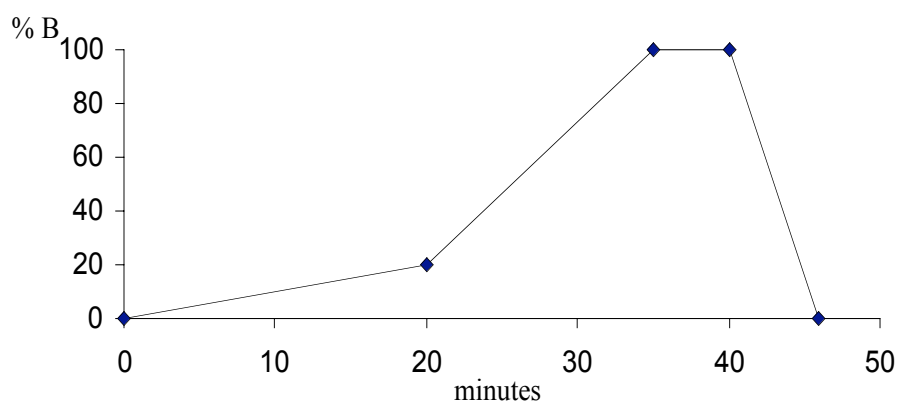
**Gradient** :

de 0 à 20 % de B en 20 min

de 20 à 100 % de B en 15 min

100 % de B pendant 5 min

de 100 à 0 % de B en 6 min



Représentation graphique du gradient ci-dessus

## Méthode 2

**Appareil :** système THERMO-FINIGAN

**Débit :** 1,0 mL/min

**Température :** ambiante

**Volume injecté :** 10  $\mu$ L

**Colonne :** Merck Lichrosphère RP 18 (4,6 x 250 mm, 5  $\mu$ m)

**Détection :** 280 nm

**Solvant :** A : eau + 0,1 % de  $H_3PO_4$  ; B : méthanol + 0,1 % de  $H_3PO_4$

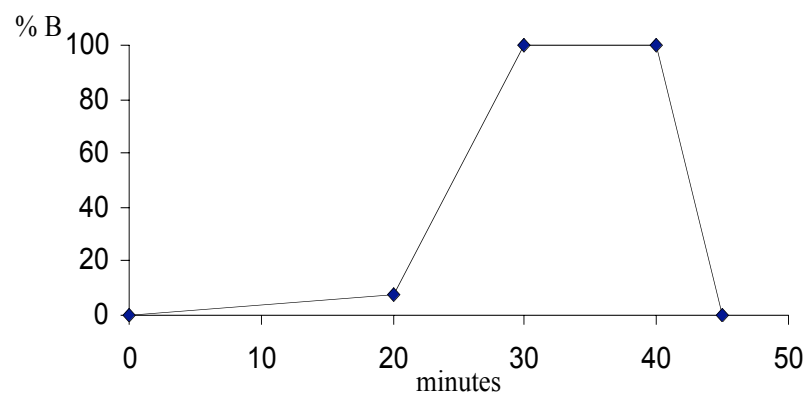
**Gradient :**

de 0 à 10 % de B en 20 min

de 10 à 100 % de B en 10 min

100 % de B pendant 10 min

de 100 à 0 % de B en 5 min



Représentation graphique du gradient ci-dessus

### Méthode 3

**Appareil :** système BECKMAN GOLD

**Débit :** 1,0 mL/min

**Température :** ambiante

**Volume injecté :** 10  $\mu$ L

**Colonne :** Waters XTerra RP<sub>18</sub> (4,6 x 100 mm, 3,5  $\mu$ m)

**Détection :** 280 nm

**Solvant :** A : eau + 10 % d'acide formique; B : méthanol + 10 % d'acide formique

**Gradient :**

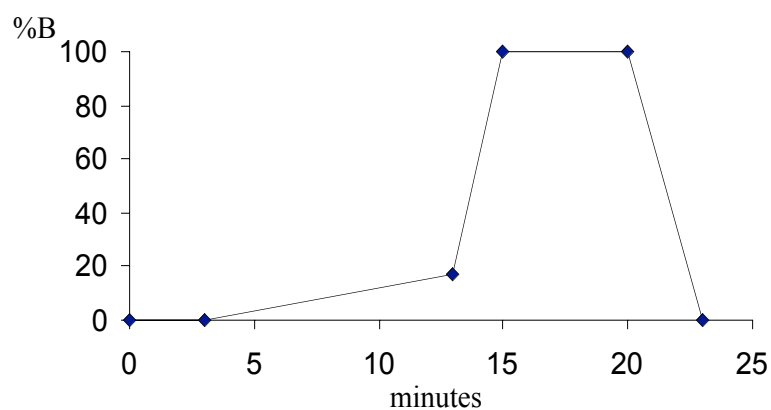
0 % de B pendant 3 min

de 0 à 17 % de B en 10 min

de 17 à 100 % de B en 2 min

100 % de B pendant 5 min

de 100 à 0 % de B en 3 min



Représentation graphique du gradient ci-dessus

## Méthode 4

**Appareil :** système THERMO-FINIGAN

**Débit :** 1,0 mL/min

**Température :** ambiante

**Volume injecté :** 10  $\mu$ L

**Colonne :** Merck Lichrosphère RP 18 (4,6 x 250 mm, 5  $\mu$ m)

**Détection :** 280 nm

**Solvant :** A : eau + 0,1 % de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ; B : méthanol + 0,1 % de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

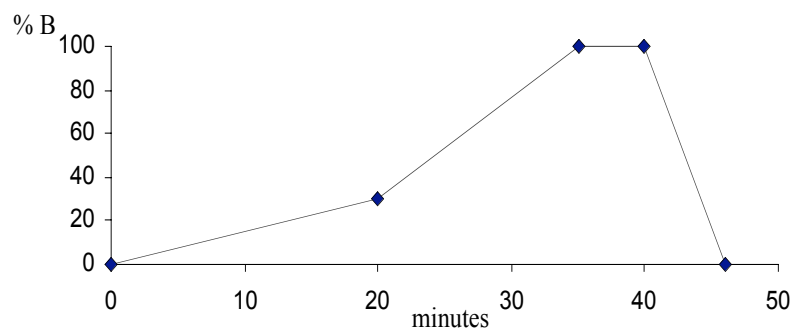
**Gradient :**

de 0 à 30 % de B en 20 min

de 30 à 100 % de B en 15 min

100 % de B pendant 5 min

de 100 à 0 % de B en 5 min



Représentation graphique du gradient ci-dessus



## Méthode 5

**Appareil :** système VARIAN

**Débit :** 16,0 mL/min

**Température :** ambiante

**Volume injecté :** 500  $\mu$ L

**Colonne :** Dinamax C-18 (10 x 250 mm, 5  $\mu$ m)

**Détection :** 280 nm

**Solvant :** A : eau + 0,4 % d'acide formique ; B : méthanol + 0,4 % d'acide formique

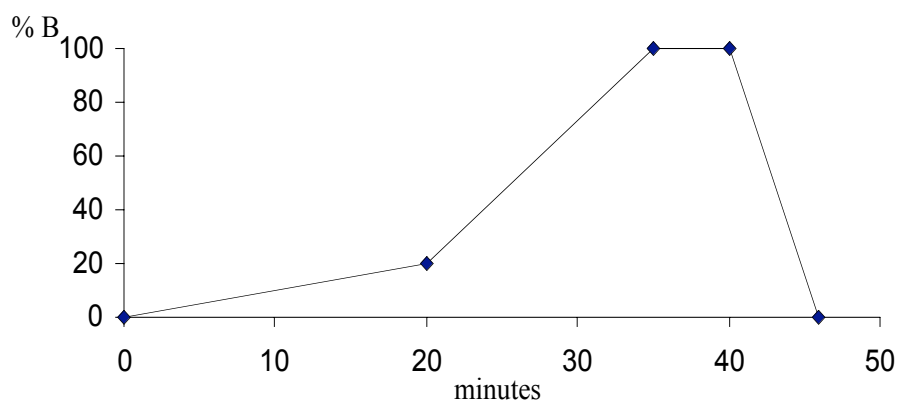
**Gradient :**

de 0 à 20 % de B en 20 min

de 20 à 100 % de B en 15 min

100 % de B pendant 5 min

de 100 à 0 % de B en 6 min



Représentation graphique du gradient ci-dessus

## Méthode 6

**Appareil :** système BECKMAN GOLD

**Débit :** 5,0 mL/min

**Température :** ambiante

**Volume injecté :** 100  $\mu$ L

**Colonne :** Merck Lichrosphère RP 18 (10 x 250 mm, 10  $\mu$ m)

**Détection :** 280 nm

**Solvant :** A : eau + 10 % d'acide formique; B : méthanol + 10 % d'acide formique

**Gradient :**

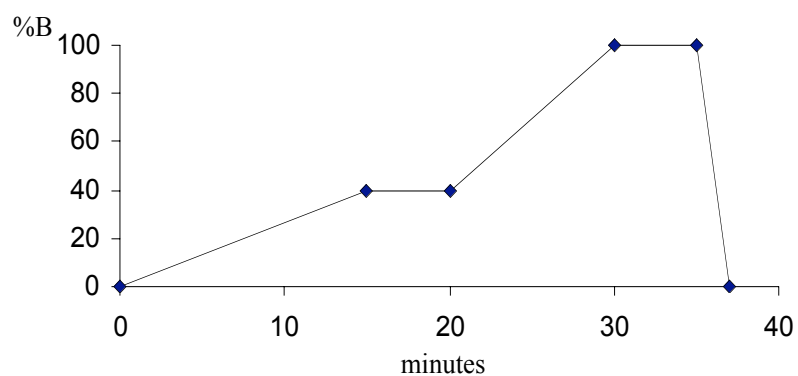
de 0 à 40 % de B en 15 min

40 % de B pendant 5 min

de 40 à 100 % de B en 10 min

100 % de B pendant 5 min

de 100 à 0 % de B en 2 min



Représentation graphique du gradient ci-dessus

## Méthode 7

**Appareil :** système VARIAN

**Débit :** 16,0 mL/min

**Température :** ambiante

**Volume injecté :** 500  $\mu$ L

**Colonne :** Dinamax C-18 (10 x 250 mm, 5  $\mu$ m)

**Détection :** 280 nm

**Solvant :** A : eau + 5 % d'acide formique ; B : méthanol + 5 % d'acide formique

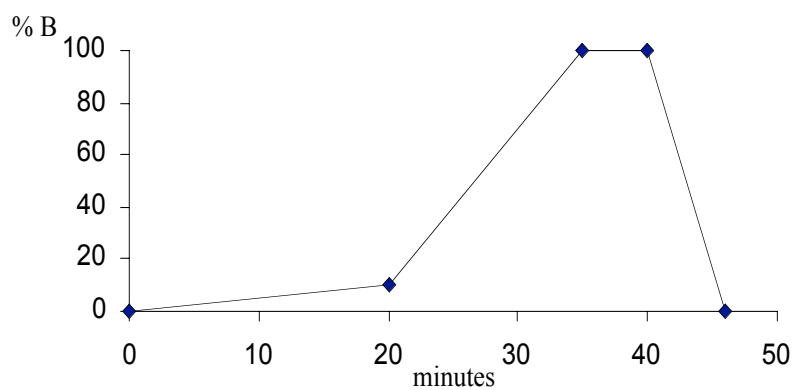
**Gradient :**

de 0 à 10 % de B en 20 min

de 10 à 100 % de B en 15 min

100 % de B pendant 5 min

de 100 à 0 % de B en 6 min



Représentation graphique du gradient ci-dessus

## Méthode 8

**Appareil :** système VARIAN

**Débit :** 16,0 mL/min

**Température :** ambiante

**Volume injecté :** 500  $\mu$ L

**Colonne :** Dinamax C-18 (10 x 250 mm, 5  $\mu$ m)

**Détection :** 280 nm

**Solvant :** A : eau + 0,4 % d'acide formique ; B : méthanol

**Gradient :**

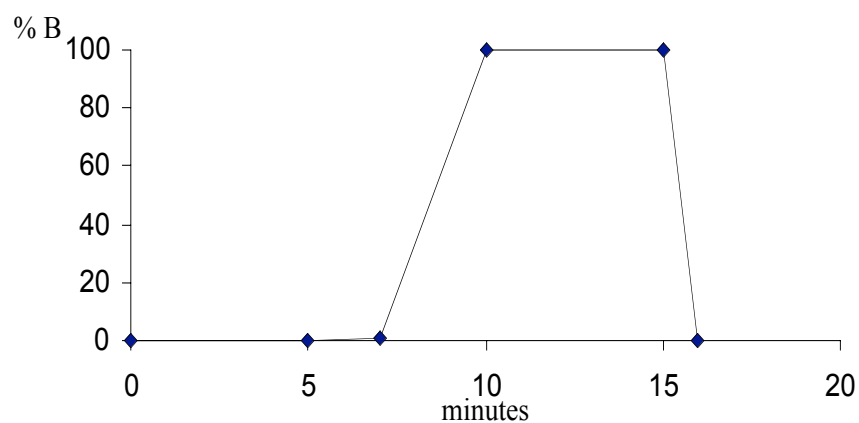
0 % de B pendant 5 min

de 0 à 1 % de B en 2 min

de 1 à 100 % de B en 3 min

100 % de B pendant 5 min

de 100 à 0 % de B en 2 min



Représentation graphique du gradient ci-dessus

## Méthode 9

**Appareil :** système VARIAN

**Débit :** 16,0 mL/min

**Température :** ambiante

**Volume injecté :** 500  $\mu$ L

**Colonne :** Dinamax C-18 (10 x 250 mm, 5  $\mu$ m)

**Détection :** 280 nm

**Solvant :** A : eau + 0,4 % d'acide formique ; B : méthanol

**Gradient :**

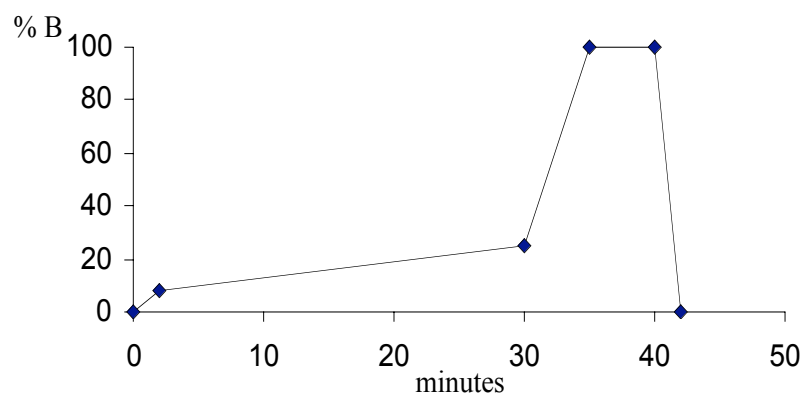
de 0 à 8 % de B en 2 min

de 8 à 25 % de B en 28 min

25 à 100 % de B en 5 min

100 % de B pendant 5 min

de 100 à 0 % de B en 2 min



Représentation graphique du gradient ci-dessus

## Méthode 10

### Paramètre du détecteur masse

**Appareil :** MICROMASS PLATFORM II

**Détection :** mode négatif

**Débit dans la source :** 0,1 mL/min

**Température de source :** 120°

**Débit d'azote de désolvatation :** 220 L/h

**Débit d'azote de séchage :** 9 L/h

**Tension dans le capillaire :** 3,5 kV

**Tension de cône utilisée :** 30 eV, 60 eV, 90 eV

### Paramètre du système liquide chromatographie

**Appareil :** HEWLETT PACKARD HP 1100

**Débit :** 1,0 mL/min

**Température :** ambiante

**Volume injecté :** 50 µL

**Colonne :** Merck Lichrosphère RP 18 (4,6 x 250 mm, 5 µm)

**Détection :** 280 nm

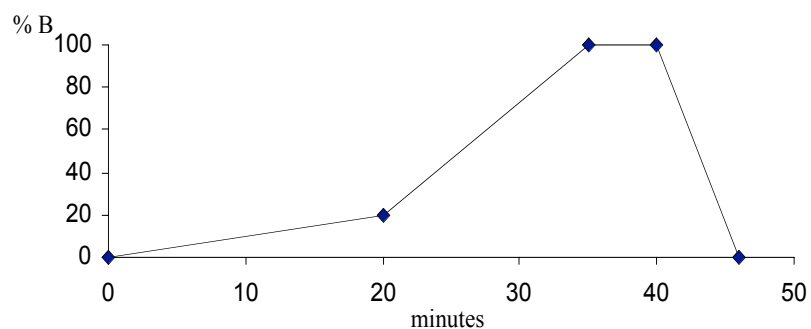
**Solvant :** A : eau + 0,4 % d'acide formique ; B : méthanol + 0,4 % d'acide formique

**Gradient :** de 0 à 20 % de B en 20 min

de 20 à 100 % de B en 15 min

100 % de B pendant 5 min

de 100 à 0 % de B en 6 min



Représentation graphique du gradient ci-dessus

## Méthode 11

### Paramètre du détecteur masse

**Appareil :** MICROMASS PLATFORM II

**Détection :** mode positif

**Débit dans la source :** 0,1 mL/min

**Température de source :** 120°

**Débit d'azote de désolvatation :** 220 L/h

**Débit d'azote de séchage :** 9 L/h

**Tension dans le capillaire :** 3,5 kV

**Tension de cône utilisée :** 30 eV, 60 eV, 90 eV

### Paramètre du système liquide chromatographie

**Appareil :** HEWLETT PACKARD HP 1100

**Débit :** 1,0 mL/min

**Température :** ambiante

**Volume injecté :** 50 µL

**Colonne :** Merck Lichrosphère RP 18 (4,6 x 250 mm, 5 µm)

**Détection :** 280 nm

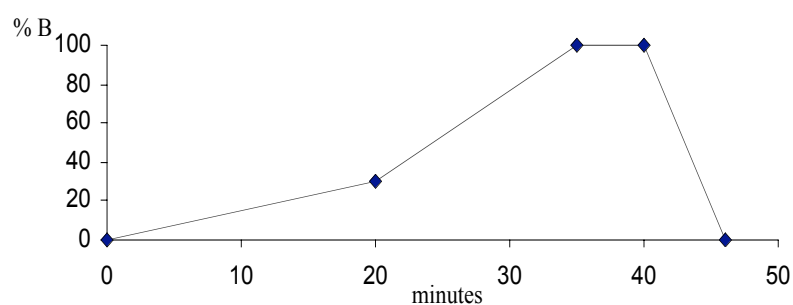
**Solvant :** A : eau + 0,4 % d'acide formique ; B : méthanol + 0,4 % d'acide formique

**Gradient :** de 0 à 30 % de B en 20 min

de 30 à 100 % de B en 15 min

100 % de B pendant 5 min

de 100 à 0 % de B en 5 min



Représentation graphique du gradient ci-dessus

## Méthode 12

### Paramètre du détecteur masse

**Appareil :** MICROMASS PLATFORM II

**Détection :** mode positif

**Débit dans la source :** 0,1 mL/min

**Température de source :** 120°

**Débit d'azote de désolvatation :** 220 L/h

**Débit d'azote de séchage :** 9 L/h

**Tension dans le capillaire :** 3,5 kV

**Tension de cône utilisée :** 60 eV

### Paramètre du système liquide chromatographie

**Appareil :** HEWLETT PACKARD HP 1100

**Débit :** 1,0 mL/min

**Température :** ambiante

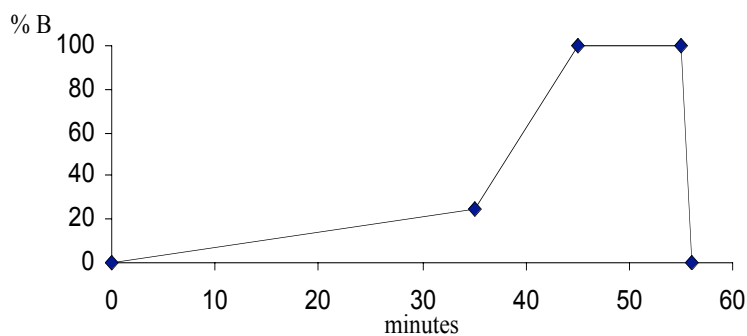
**Volume injecté :** 50 µL

**Colonne :** Merck Lichrosphère RP 18 (4,6 x 250 mm, 5 µm)

**Détection :** 280 nm

**Solvant :** A : eau + 0,4 % d'acide formique ; B : méthanol + 0,4 % d'acide formique

**Gradient :** de 0 à 25 % de B en 35 min  
de 25 à 100 % de B en 10 min  
100 % de B pendant 10 min  
de 100 à 0 % de B en 5 min



Représentation graphique du gradient ci-dessus



### III-Méthode de modélisation moléculaire

Les calculs ont été effectués sur une station Silicon Graphic O<sub>2</sub> en utilisant les logiciels MacroModel (7.0) et Spartan (5.0)

#### III-1-Étude conformationnelle par la méthode Monte-Carlo

La construction de la vescalagine (**55**) et de la castalagine (**56**) est obtenue en utilisant une approche quasi-biomimétique. Une molécule de glucose sous sa forme pyrane est dans un premier temps galloylée pour donner le 1,2,3,4,6-*O*-pentagalloyl- $\beta$ -D-glucopyranose (**69**) qui subit une minimisation rapide en utilisant le champ de force MM3\*.<sup>134,135</sup> La liaison carbone-carbone biarylique entre les cycles IV et V est réalisée pour conduire à la tellimagrandine II (**71**) qui est minimisée. Puis systématiquement les différentes étapes de couplage de la figure 22 sont réalisées pour conduire à la vescalagine (**55**) et de la castalagine (**56**) (Figure 22, page 25). Après chaque étape le produit obtenu est minimisé en utilisant le champ de force MM3\*.<sup>134,135</sup>

Après construction de la structure de la vescalagine (**55**) et de la castalagine (**56**), leurs conformères de plus basse énergie sont déterminés par la méthode Monte-Carlo (TNCG 1000 cycles) avec le champ de force MM3\*.<sup>134,135</sup> Pour cette minimisation, toutes les liaisons carbone-carbone de la chaîne glucosidique sont sélectionnées ainsi que toutes les liaisons carbone-oxygène des différents groupes hydroxyles. A partir de ces conformères de plus basse énergie, l'alcool benzylique en position C<sub>1</sub> est supprimé et une hybridation sp<sup>2</sup> est imposée au carbone C<sub>1</sub> ainsi qu'une charge positive à la molécule générant ainsi le carbocation **87**. Celui-ci est de nouveau minimisé de manière identique. L'étude conformationnelle des acutissimines A (**85**) et B (**86**) a également été effectuée par cette méthode ce qui a permis la détermination de leur angle dièdre H<sub>1</sub>-C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>.

#### III-2-Modélisation orbitaire du carbocation benzylique intermédiaire

Les données géométriques du conformère **87** sont transférées sous Spartan (5.0) pour réaliser les calculs et modélisations orbitales souhaitées. Les coefficients atomiques de la LUMO de **87** sont déterminés par un calcul *ab initio* de type Hartree-Fock (HF) effectué avec

la base de calcul STO-3G (Figure 70).<sup>139</sup> Les représentations graphiques de la LUMO ont été générées par le logiciel en projetant les coefficients de la LUMO sur la carte de densité électronique à 0,02 électron/au<sup>3</sup> afin de visualiser les différences entre les faces  $\alpha$  et  $\beta$ .<sup>136</sup> Les zones en bleu représentent les sites les plus électrophiles.

#### IV-Synthèse et caractérisation des différents composés

Les protocoles expérimentaux sont tous rassemblés au début de ce paragraphe et les caractérisations effectuées sont ensuite décrites sous la forme de fiches produits.

Les composés et les protocoles expérimentaux sont classés par ordre croissant par rapport au numéro que nous leur avons attribué dans les chapitres précédents.

##### IV-1-Protocoles expérimentaux

###### **Hémisynthèse des acutissimines A (85) et B (86)**

*Hémisynthèse en milieu organique* : La (-)-vescalagine (**55**, 42,3 mg, 0,045 mmol) et la (+)-catéchine (**2**, 16 mg, 0,055 mmol) sont solubilisées dans du THF (20 mL) fraîchement distillé, auquel est additionné de l'acide trifluoroacétique (300  $\mu$ L, 3,9 mmol). Après solubilisation, le milieu réactionnel est alors porté à une température de 60°C, l'évolution de la réaction est suivie par CLHP (méthode 1). Lorsque la réaction est finie (environ 7 heures), le solvant est évaporé sous pression réduite, le résidu ainsi obtenu est resolubilisé dans l'eau (30 mL) puis congelé à -20°C avant lyophilisation pour conduire à 66 mg d'une poudre légèrement jaune. La séparation des deux produits est réalisée par CLHP semi-préparative (méthode 5) pour conduire après évaporation et lyophilisation à 35 mg d'acutissimine A (**85**) sous forme d'une poudre blanche, ce qui représente un rendement de 65%, et à 12 mg d'acutissimine B (**86**) également sous forme d'une poudre blanche ce qui correspond à un rendement 22%.

*Hémisynthèse en milieu aqueux acide* : La (-)-vescalagine (**55**, 1,6 mg, 1,71  $\mu$ mol) et la (+)-catéchine (**2**, 2 mg, 6,89  $\mu$ mol) sont solubilisées dans l'eau (2 mL) à laquelle est additionnée de l'acide trifluoroacétique (20  $\mu$ L), ce qui conduit à la formation d'une solution aqueuse de pH = 1. Après solubilisation, le milieu réactionnel est placé à température ambiante et son évolution est suivie par CLHP (méthode 2) ainsi que par CLHP-ESI-SM (méthode 10).

Hémisynthèse en milieu modèle du vin : Le milieu utilisé est une solution aqueuse à 12 % en éthanol, acidifiée à 5 g/l avec de l'acide tartrique. Le pH de la solution est ensuite ajustée à 3,2 par l'addition d'une solution de soude (1 N). La (-)-vescalagine (**55**, 1,6 mg, 1,71  $\mu$ mol) et la (+)-catéchine (**2**, 2mg, 6,89  $\mu$ mol) sont solubilisées dans la solution modèle (2 mL). Après solubilisation, le milieu réactionnel est placé à température ambiante et l'évolution de la réaction est suivie par CLHP (méthode 2) ainsi que par CLHP-ESI-SM (méthode 10).

### **Hémisynthèse des épiacutissimines A (**89**) et B (**90**) en milieu organique**

La (-)-vescalagine (**55**, 42,3 mg, 0,045 mmol) et la (-)-épicatechine (**3**, 16 mg, 0,055 mmol) sont solubilisées dans du THF (20 mL) fraîchement distillé auquel est additionné de l'acide trifluoroacétique (300  $\mu$ L, 3,9 mmol). Après solubilisation, le milieu réactionnel est alors porté à une température de 60°C, l'évolution de la réaction est suivie par CLHP (méthode 1). Lorsque la réaction est finie (environs 7 heures), le solvant est évaporé sous pression réduite, le résidu ainsi obtenu est resolubilisé dans l'eau (30 mL), puis congelé à -20°C avant lyophilisation pour conduire à 66 mg d'une poudre légèrement jaune foncé. La séparation des deux produits est réalisée par CLHP semi-préparative (méthode 5) pour conduire après évaporation et lyophilisation à 28 mg d'épiacutissimine A (**89**) sous forme d'une poudre blanche, ce qui représente un rendement de 51%, et à 14 mg d'épiacutissimine B (**90**) également sous forme d'une poudre blanche ce qui correspond à un rendement 26%.

### **Hémisynthèse de l'éthylvescalagine (**91**)**

Hémisynthèse en milieu organique : La (-)-vescalagine (**55**, 20,1 mg, 0,018 mmol) est solubilisée dans du THF (20 mL) fraîchement distillé auquel est additionné de l'acide trifluoroacétique (300  $\mu$ L, 3,9 mmol) puis de l'éthanol (2,5 mL, 0,042 mmol). Après solubilisation, le milieu réactionnel est alors porté à une température de 60°C, l'évolution de la réaction est suivie par CLHP (méthode 2) et est totale après 4 heures. La purification de l'éthylvescalagine (**55**) est réalisée sur cartouche C<sub>18</sub> (Supleco, 10 g), le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite pour conduire à 23 mg puis resolubilisé dans l'eau. La solution ainsi obtenue est déposée sur la cartouche préalablement activée par un passage de 50 mL d'éthanol et de 50 mL d'eau, les impuretés sont éluées avec 50 mL d'une solution H<sub>2</sub>O/EtOH (98/2, v/v), puis l'éthylvescalagine (**55**) est éluée avec 50 mL d'éthanol absolu. Après évaporation et lyophilisation, nous obtenons 16,2 mg d'éthylvescalagine (**55**) sous forme d'une poudre blanche, ce qui représente un rendement de 94 %.

Hémisynthèse en milieu aqueux acide : La (-)-vescalagine (**55**, 1,6 mg, 1,71  $\mu\text{mol}$ ) est solubilisée dans l'eau (2 mL) à laquelle est additionnée de l'acide trifluoroacétique (20  $\mu\text{L}$ ), ce qui conduit à la formation d'une solution aqueuse de pH =1, ainsi que de l'éthanol (250  $\mu\text{L}$ , 0,0042 mmol). Après solubilisation, le milieu réactionnel est laissé à température ambiante et son évolution est suivie par CLHP (méthode 2) ainsi que par CLHP-ESI-SM (méthode 10).

Hémisynthèse en milieu modèle du vin : Le milieu utilisé est une solution aqueuse à 12 % en éthanol, acidifiée à 5 g/L avec de l'acide tartrique. Le pH de la solution est ensuite ajustée à 3,2 par l'addition de soude. La (-)-vescalagine (**55**, 1,6 mg, 1,71  $\mu\text{mol}$ ) est solubilisée dans la solution modèle (2 mL). Après solubilisation le milieu réactionnel est laissé à température ambiante et son évolution de la réaction est suivie par CLHP (méthode 2) ainsi que par CLHP-ESI-SM (méthode 10).

#### **Hydrolyse de la castalagine (56) :**

La castalagine (**56**, 43,1 mg, 0,046 mmol) est solubilisée dans une solution aqueuse contenant 10 % d'acide chlorhydrique (20 mL). Après solubilisation, le milieu réactionnel est alors porté à une température de 60°C, l'évolution de la réaction est suivie par CLHP (méthode 1). Après 65 heures de réaction, l'hydrolyse est complète et on note alors la présence d'un précipité blanc causé par l'acide ellagique (**63**) formé qui n'est pas soluble dans l'eau. Le milieu réactionnel est premièrement filtré pour obtenir 13,5 mg d'acide ellagique (**63**) sous forme d'une poudre blanche. La purification du mélange castaline (**82**)/vescaline (**81**) est réalisée sur cartouche C<sub>18</sub> (Supleco, 10 g), le milieu réactionnel est déposé sur la cartouche préalablement activée par un passage de 50 mL d'éthanol et de 50 mL d'eau, la castaline (**82**) est éluée avec 50 mL d'une solution H<sub>2</sub>O/MeOH (95/5, v/v). Après évaporation et lyophilisation, nous obtenons 24,7 mg du mélange castaline (**82**)/vescaline (**81**) sous forme d'une poudre grise ce qui représente un rendement de 85 %. La castaline (**82**) et la vescaline (**81**) sont séparée par CLHP semi-préparative (méthode 8) pour conduire après évaporation et lyophilisation à 9,2 mg de vescaline (**81**) sous forme d'une poudre grise ce qui correspond à un rendement de 31,6% et à 15,5 mg de castaline (**82**) également sous forme d'une poudre grise ce qui représente un rendement 53,3%.

#### **Hydrolyse de la vescalagine (55) :**

La vescalagine (**55**, 8,4 mg, 8,99  $\mu\text{mol}$ ) est solubilisée dans une solution aqueuse contenant 10 % d'acide chlorhydrique (5 mL). Après solubilisation, le milieu réactionnel est alors porté à

une température de 60°C, l'évolution de la réaction est suivie par CLHP (méthode 1). Après 39 heures de réaction, l'hydrolyse est complète, on note alors la présence d'un précipité blanc causé par l'acide ellagique (**63**) formé qui n'est pas soluble dans l'eau. Le milieu réactionnel est premièrement filtré pour obtenir 2,6 mg d'acide ellagique (**63**) sous forme d'une poudre blanche. La purification de la vescaline (**81**) est réalisée sur cartouche C<sub>18</sub> (Supleco, 10 g), le milieu réactionnel est déposée sur la cartouche préalablement activée par un passage de 50 mL d'éthanol et de 50 mL d'eau, la vescaline (**81**) est éluée avec 50 mL d'une solution H<sub>2</sub>O/MeOH (95/5, v/v). Après évaporation et lyophilisation, nous obtenons 4,6 mg de vescaline (**81**) sous forme d'une poudre grise ce qui représente un rendement de 81 %.

#### **Epimérisation de la castaline (**82**) en vescaline (**81**) :**

La castaline (**82**, 10 mg, 0,015 mmol) est solubilisée dans une solution aqueuse contenant 10 % d'acide chlorhydrique (5 mL). Après solubilisation, le milieu réactionnel est alors porté à une température de 60°C, l'évolution de la réaction est suivie par CLHP (méthode 1) et est complète après 6 jours. La purification de la vescaline (**81**) est réalisée sur cartouche C<sub>18</sub> (Supleco, 10 g), le milieu réactionnel est déposé sur la cartouche qui a été préalablement activée par un passage de 50 mL d'éthanol et de 50 mL d'eau, la vescaline (**81**) est éluée avec 50 mL d'une solution H<sub>2</sub>O/MeOH (95/5, v/v) puis les produits de dégradation sont élués avec 50 mL de méthanol. Après évaporation et lyophilisation, nous obtenons 6,5 mg de vescaline (**81**) sous forme d'une poudre grise ce qui représente un rendement de 65 % et 3 mg de produit de dégradation. Le produit de dégradation majoritaire est purifié par CLHP semi-préparative (méthode 9) pour conduire après évaporation et lyophilisation à 2 mg de vescalène (**94**) sous forme d'une poudre jaune ce qui correspond à un rendement de 21%

#### **Hémisynthèse des acutissimines C (**92**) et D (**93**) en milieu organique :**

La (-)-vescaline (**81**, 2 mg, 3,16 µmol) et la (+)-catéchine (**2**, 1 mg, 3,44 µmol) sont solubilisées dans du THF (2 mL) fraîchement distillé auquel est additionné de l'acide trifluoroacétique (30 µL, 0,39 mmol). Après solubilisation, le milieu réactionnel est alors porté à une température de 60°C, l'évolution de la réaction est suivie par CLHP (méthode 1) ainsi que par CLHP-ESI-SM (méthode 10).

#### **Hémisynthèse des épiacutissimines C (**96**) et D (**97**) en milieu organique :**

La (-)-vescaline (**81**, 2 mg, 3,16 µmol) et la (-)-épicatéchine (**3**, 1 mg, 3,44 µmol) sont solubilisées dans du THF (2 mL) fraîchement distillé auquel est additionné de l'acide

trifluoroacétique (30  $\mu$ L, 0,39 mmol). Après solubilisation, le milieu réactionnel est alors porté à une température de 60°C, l'évolution de la réaction est suivie par CLHP (méthode 1) ainsi que par CLHP-ESI-SM (méthode 10).

#### **Hémisynthèse de l'adduit vescalagine-malvidine (103) en milieu organique :**

La (-)-vescalagine (**55**, 42,3 mg, 0,045 mmol) et le chlorure malvidine (**102**, 16,5 mg, 0,045 mmol) sont solubilisées dans du THF (20 mL) fraîchement distillé auquel est additionné de l'acide trifluoroacétique (300  $\mu$ L, 3,9 mmol). Après solubilisation, le milieu réactionnel est alors porté à une température de 60°C, l'évolution de la réaction est suivie par CLHP (méthode 4) ainsi que par CLHP-ESI-SM (méthode 10). Lorsque la réaction est finie (environ 24 heures), le solvant est évaporé sous pression réduite, le résidu ainsi obtenu est resolubilisé dans l'eau (30 mL) puis congelé à - 20°C avant lyophilisation pour conduire à 67 mg d'une poudre rouge. La purification de l'adduit vescalagine-malvidine (**103**) est réalisée par CLHP semi-préparative (méthode 7) pour conduire après évaporation et lyophilisation à 14 mg de l'adduit vescalagine-malvidine (**103**) ce qui représente un rendement de 25%.

#### **Hémisynthèse du 4'-butanethiol-1-thioéthervescalagine (105)**

La (-)-vescalagine (**55**, 42,3 mg, 0,045 mmol) et le 1,4-butanedithiol (**104**, 67,1 mg, 0,55 mmol) sont solubilisées dans du THF (20 mL) fraîchement distillé, auquel est additionné de l'acide trifluoroacétique (300  $\mu$ L, 3,9 mmol). Après solubilisation, le milieu réactionnel est alors porté à une température de 60°C, l'évolution de la réaction est suivie par CLHP (méthode 1). Lorsque la réaction est finie (environ 7 heures), le solvant est évaporé sous pression réduite, le résidu ainsi obtenu est resolubilisé dans l'eau (30 mL) puis congelé à - 20°C avant lyophilisation pour conduire à 47 mg d'une poudre blanche. La purification du 4'-butanethiol-1-thioéthervescalagine (**105**) est réalisée sur cartouche C<sub>18</sub> (Supleco, 10 g), la poudre blanche obtenue par lyophilisation est resolubilisée dans l'eau (20 mL). La solution ainsi obtenue est déposée sur la cartouche préalablement activée par un passage de 50 mL d'éthanol et de 50 mL d'eau, les impuretés sont éluées avec 50 mL d'une solution H<sub>2</sub>O/EtOH (98/2, v/v), puis le 4'-butanethiol-1-thioéthervescalagine (**105**) est éluée avec 50 mL de méthanol. Après évaporation et lyophilisation, nous obtenons 44,5 mg de 4'-butanethiol-1-thioéthervescalagine (**105**) sous forme d'une poudre blanche, ce qui représente un rendement de 95 %.

### Extraction sélective des flavano-ellagitannins du vin

Un échantillon de vin rouge élevé en fûts de chêne (100 mL) est évaporé sous pression réduite et conduit à 3,83 g d'un résidu visqueux rouge foncé.

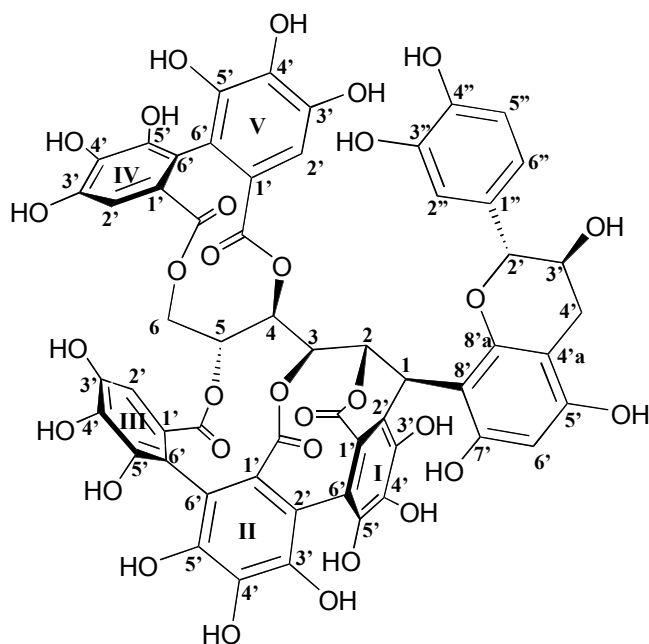
Etape sur gel XAD 7 HP : Ce résidu est solubilisé dans l'eau (20 mL) puis déposé sur une colonne de résine XAD 7 HP (150 mm x 40 mm) qui a préalablement été gonflée pendant une nuit dans le méthanol. L'acide tartrique et les composés non phénoliques sont éliminés par un lavage avec 250 mL d'une solution d'eau acidifiée avec 0,4 % d'acide formique. Après évaporation cette fraction conduit à un résidu incolore de 2,823 g également sous forme d'une solution visqueuse de couleur blanche. La fraction contenant les ellagitannins C-glycosidiques natifs et nos complexes est éluée avec 250 mL d'une solution H<sub>2</sub>O/MeOH (80/20, v/v) acidifiée avec 0,4 % d'acide formique qui après évaporation et lyophilisation conduit à 372 mg d'une poudre rouge. Le gel est ensuite régénéré par lavage avec du méthanol.

Etape sur gel TSK HW 40 F : La fraction éluée avec la solution H<sub>2</sub>O/MeOH (80/20, v/v) contenant les ellagitannins C-glycosidiques natifs ainsi que nos complexes de 372 mg est solubilisé dans l'eau (5 mL). La solution ainsi obtenue est alors déposée sur une colonne remplie de gel TSK HW 40 F. La solution est alors lavée avec 50 mL d'eau acidifiée à 0,4 % d'acide formique qui conduit à une solution incolore. Les polyphénols de faible masse moléculaire non retenus par le gel sont élués avec 50 mL d'une solution H<sub>2</sub>O/MeOH (30/70, v/v) acidifiée avec 0,4 % d'acide formique. La fraction ainsi obtenue présente une couleur rouge claire. La fraction ellagique retenue par le gel est alors éluée par 50 mL d'une solution H<sub>2</sub>O/Acétone (30/70, v/v) acidifiée avec 0,4 % d'acide formique qui après évaporation conduit 52 mg d'un solide rouge clair marron clair. Ce résidu est résolubilisé dans 400 µL d'eau puis filtré avant que 50 µL de cette solution soit injectés en CLHP-ESI-MS.

#### IV-2-Carractéristique spectrales

Les spectres RMN de l'acutissimine B (**86**) et de l'épiacutissimine A (**89**) n'ont pu être réalisés dans l'acétone-*d*<sub>6</sub> en raison de problème de solubilité. Un mélange acétone-eau a alors été utilisé. Dans ce système de solvant, deux rotamères du cycle C de l'unité flavan-3-ol apparaissent et sont désignés par ra et rb. De tels rotamères ont déjà été observés chez les procyanidines.<sup>180,181</sup>

## Acutissimine A (85)



Numéro CAS : [108906-66-7]

 $C_{56}H_{38}O_{31}$   $M = 1206 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 

Poudre amorphe blanche

CLHP : méthode 1

tr : 23,1 min

IR :  $\text{cm}^{-1}$  (pastille KBr)

3383 OH aromatique (bande large)  
1740 C=O ester

$[\alpha]_D^{22} = -80,0$  [ $c = 0,2$  acétone]  
 $[\alpha]_D^{22} = -74,0$  [ $c = 1,2$  acétone], litt.<sup>113</sup>

RMN solvant : acétone- $d_6$ 

position	$\delta_H$ (mult., $J$ en Hz)	$\delta_C$ (mult.)	HMQC	HMBC
<b>glucose</b>				
1	4,80 (s)	37,5 (d)	C-1	C-7', C-8', C-8'a, C-1', C-2', C-3' <sub>1</sub> H-2, H-3
2	5,18 (s)	77,2 (d)	C-2	C-1, C-4, C-8', C-2', C <sub>I</sub> =O H-4
3	4,74 (d, 6,9)	71,9 (d)	C-3	C-1, C-4, C-5, C <sub>II</sub> =O H-4
4	5,24 (t, 7,3)	70,7 (d)	C-4	C-2, C-3, C-5, C <sub>V</sub> =O H-2, H-3, H-5
5	5,63 (d, 7,5)	70,8 (d)	C-5	C-4, C-6, C <sub>III</sub> =O H-3, H-4, H-6
6	$\alpha$ 4,08 (d, 12,0)	65,4 (t)	C-6	C-5
	$\beta$ 4,68 (d, 12,1)		C-6	H-5



position	$\delta_H$ (mult., $J$ en Hz)	$\delta_C$ (mult.)	HMQC	HMBC
<b>aromatique</b>				
1 <sub>I</sub>		126,6 (s)		H-1
1 <sub>[II-V]</sub>		124,4 (s), 125,1 (s), 127,2 (s), 127,6 (s)		
2 <sub>I</sub>		119,9 (s)		H-1, H-2
2 <sub>III</sub>	6,77 (s)	108,5 (d)	C-2 <sub>III</sub>	C-3 <sub>III</sub> , C-4 <sub>III</sub> , C-6 <sub>III</sub> , C <sub>III</sub> =O
2 <sub>IV</sub>	7,07 (s)	106,6 (d)	C-2 <sub>IV</sub>	C-3 <sub>IV</sub> , C-4 <sub>IV</sub> , C-6 <sub>IV</sub> , C <sub>IV</sub> =O
2 <sub>V</sub>	6,62 (s)	107,0 (d)	C-2 <sub>V</sub>	C-3 <sub>V</sub> , C-4 <sub>V</sub> , C-6 <sub>V</sub> , C <sub>V</sub> =O
2 <sub>II</sub> et		113,10 (s), 114,19 (s),		
6 <sub>[I-II]</sub>		116,5 (s)		
3 <sub>I</sub>		143,2 (s)		H-1
3 <sub>III</sub>		145,2 (s)		H-2 <sub>III</sub>
3 <sub>IV</sub>		145,0 (s)		H-2 <sub>IV</sub>
3 <sub>V</sub>		144,83 (s)		H-2 <sub>V</sub>
3 <sub>II</sub> et		143,3 (s), 144,0 (s),		
5 <sub>[I-V]</sub>		144,58 (s), 144,7 (s), 144,80 (s), 145,12 (s)		
4 <sub>[I-II]</sub>		135,0 (s), 136,2 (s)		
4 <sub>III</sub>		136,1 (s)		H-2 <sub>III</sub>
4 <sub>IV</sub>		136,6 (s)		H-2 <sub>IV</sub>
4 <sub>V</sub>		135,3 (s)		H-2 <sub>V</sub>
6 <sub>III</sub>		113,17 (s)		H-2 <sub>III</sub>
6 <sub>IV</sub>		114,13 (s)		H-2 <sub>IV</sub>
6 <sub>V</sub>		114,7 (s)		H-2 <sub>V</sub>
<b>carbonyle</b>				
C <sub>I</sub> =O		167,4 (s)		H-2
C <sub>II</sub> =O		165,6 (s)		H-3
C <sub>III</sub> =O		166,9 (s)		H-5, H-2 <sub>III</sub>
C <sub>IV</sub> =O		167,0 (s)		H-2 <sub>IV</sub>
C <sub>V</sub> =O		169,1 (s)		H-4, H-2 <sub>V</sub>
<b>catéchine</b>				
2 <sub>'</sub>	5,49 (s)	79,6 (d)	C-2 <sub>'</sub>	
3 <sub>'</sub>	4,56 (s)	67,3 (d)	C-3 <sub>'</sub>	
4 <sub>'</sub>	$\alpha$ 2,86 (d, 16,5) $\beta$ 2,39 (d, 14,5)	23,4 (t)	C-4 <sub>'</sub> C-4 <sub>'</sub>	
4 <sub>'a</sub>		97,9 (s)		H-6 <sub>'</sub>
5 <sub>'</sub>		155,7 (s)		H-6 <sub>'</sub>
6 <sub>'</sub>	6,04 (s)	96,5 (d)	C-6 <sub>'</sub>	C-4 <sub>'a</sub> , C-5 <sub>'</sub> , C-7 <sub>'</sub> , C-8 <sub>'</sub>
7 <sub>'</sub>		156,9 (s)		H-1, H-6 <sub>'</sub>
8 <sub>'</sub>		104,5 (s)		H-1, H-2, H-6 <sub>'</sub>
8 <sub>'a</sub>		152,6 (s)		H-1
1 <sub>''</sub>		131,2 (s)		H-5 <sub>''</sub>
2 <sub>''</sub>	6,88 (s)	112,6 (d)	C-2 <sub>''</sub>	C-3 <sub>''</sub> , C-4 <sub>''</sub> , C-6 <sub>''</sub> H-6 <sub>''</sub>
3 <sub>''</sub>		144,50 (s)		H-2 <sub>''</sub> , H-5 <sub>''</sub>
4 <sub>''</sub>		144,4 (s)		H-2 <sub>''</sub> , H-5 <sub>''</sub> , H-6 <sub>''</sub>
5 <sub>''</sub>	6,79 (d, 8,3)	115,9 (d)	C-5 <sub>''</sub>	C-1 <sub>''</sub> , C-3 <sub>''</sub> , C-4 <sub>''</sub>
6 <sub>''</sub>	6,94 (d, 7,7)	117,9 (d)	C-6 <sub>''</sub>	C-2 <sub>''</sub> , C-4 <sub>''</sub> H-2 <sub>''</sub>

**CLHP-ESI-SM : méthode 10**

1205	$[M-H]^-$	613	$(([M-H]^- - 290) - 302)$
1053	$([M-H]^- - 152)$	602	$[M-2H]^{2-}$
915	$([M-H]^- - 290)$	301	$([M-H]^- - 904)$

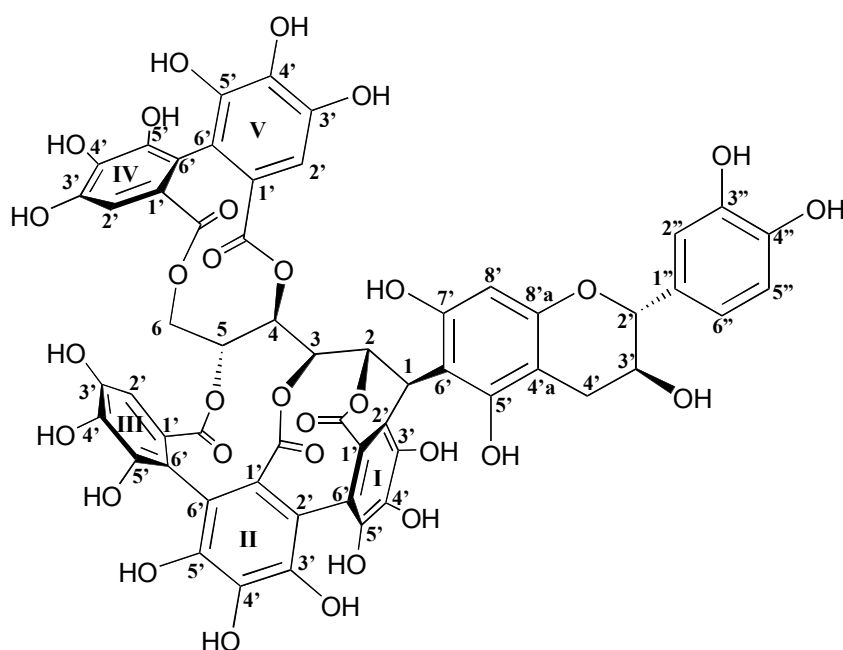
**SM : m/z (intensité relative) (LSIMS)**

1245 (5)	$[M+K]^+$	1055 (4)	$([M+H]^+ - 152)$
1229 (5)	$[M+Na]^+$	303 (6)	$([M+H]^+ - 904)$
1207 (8)	$[M+H]^+$		

**SMHR : (LSIMS)**    calculé pour  $C_{56}H_{39}O_{31}$  ( $[M+H]^+$ ) : 1207,1475    trouvé: 1207,1408



## Acutissimine B (86)



Numéro CAS : [108906-65-6]

 $C_{56}H_{38}O_{31}$  $M = 1206 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 

Poudre amorphe blanche

CLHP : méthode 1

tr : 26,5 min

IR :  $\text{cm}^{-1}$  (pastille KBr)

3392 OH aromatique (bande large)  
1734 C=O ester

$[\alpha]_D^{22} = -7,5$  [ $c = 0,2$ , acétone]  
 $[\alpha]_D^{22} = -5,5$  [ $c = 1,2$  acétone], litt.<sup>113</sup>

RMN solvant : acétone- $d_6$ /D<sub>2</sub>O (9 : 1)

position	$\delta_H$ (mult., $J$ en Hz)	$\delta_C$ (mult.)	HMQC	HMBC
<b>glucose</b>				
1	4,72 (s)	37,7 (d)	C-1	C-5', C-6', C-7', C-1', C-2', C-3' <sub>I</sub> H-2, H-3
2	5,11 (s)	77,9 (d)	C-2	C-1, C-4, C-6', C-2', C-1' <sub>I</sub> , C-1=O H-3, H-4
3	4,83 (d, 7,5)	71,6 (d)	C-3	C-1, C-1=O H-5
4	5,25 (t, 7,3, 7,4)	70,0 (d)	C-4	C-2, C-5, C-5=O H-2, H-5
5	5,64 (d, 7,6)	71,0 (d)	C-5	C-3, C-4, C-6, C-1=O H-4, H-6
6	$\alpha$ 4,03 (d, 13,0) $\beta$ 4,87 (d, 13,3)	65,5 (t)	C-6 C-6	C-5, C-5=O H-5
<b>aromatique</b>				
1' <sub>I</sub>		126,3 (s)		H-1
1' [III-V]		124,7 (s), 125,0 (s), 126,7 (s), 127,7 (s)		
2' <sub>I</sub>		120,3 (s)		H-1, H-2
2' <sub>III</sub>	6,80 (s)	108,4 (d)	C-2' <sub>III</sub>	C-3' <sub>III</sub> , C-4' <sub>III</sub> , C-6' <sub>III</sub> , C-1=O
2' <sub>IV</sub>	6,64 (s)	107,2 (d)	C-2' <sub>IV</sub>	C-3' <sub>IV</sub> , C-4' <sub>IV</sub> , C-6' <sub>IV</sub> , C-1=O

position	$\delta_{\text{H}}$ (mult., $J$ en Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (mult.)		HMBC
<b>aromatique</b>				
2' <sub>V</sub>	7,10 (s)	109,7 (d)	C-2' <sub>V</sub>	C-3' <sub>V</sub> , C-4' <sub>V</sub> , C-6' <sub>V</sub> , C <sub>V</sub> =O
2' <sub>II</sub> and		113,2 (s), 113,7 (s),		
6' <sub>[I-II]</sub>		116,45 (s)		
3' <sub>I</sub>		143,3 (s)		H-1
3' <sub>III</sub>		145,2 (s)		H-2' <sub>III</sub>
3' <sub>IV</sub>		145,1 (s)		H-2' <sub>IV</sub>
3' <sub>V</sub>		145,0 (s)		H-2' <sub>V</sub>
3' <sub>II</sub> et		143,2 (s), 144,1 (s),		
5' <sub>[I-V]</sub>		144,31 (s), 144,38 (s),		
		144,5 (s), 144,6 (s)		
4' <sub>[I-II]</sub>		135,0 (s), 136,5 (s)		
4' <sub>III</sub>		136,2 (s)		H-2' <sub>III</sub>
4' <sub>IV</sub>		135,4 (s)		H-2' <sub>IV</sub>
4' <sub>V</sub>		137,0 (s)		H-2' <sub>V</sub>
6' <sub>III</sub>		114,38 (s)		H-2' <sub>III</sub>
6' <sub>IV</sub>		114,31 (s)		H-2' <sub>IV</sub>
6' <sub>V</sub>		116,49 (s)		H-2' <sub>V</sub>
<b>carbonyle</b>				
C <sub>I</sub> =O		167,3 (s)		H-2
C <sub>II</sub> =O		165,6 (s)		H-3
C <sub>III</sub> =O		167,0 (s)		H-5, H-2' <sub>III</sub>
C <sub>IV</sub> =O		169,1 (s)		H-6, H-2' <sub>IV</sub>
C <sub>V</sub> =O		166,9 (s)		H-4, H-2' <sub>V</sub>
<b>catéchine</b>				
2' <sub>ra</sub>	4,54 (s)	82,1 (d)	C-2' <sub>ra</sub>	C-1'' <sub>ra</sub> H-4' <sub>ra</sub>
2' <sub>rb</sub>	4,57 (s)	82,2 (d)	C-2' <sub>rb</sub>	C-1'' <sub>rb</sub>
3' <sub>ra</sub>	3,99 (s)	67,8 (d)	C-3' <sub>ra</sub>	H-4' <sub>ra</sub>
3' <sub>rb</sub>	4,01 (s)	68,0 (d)	C-3' <sub>rb</sub>	H-4' <sub>rb</sub>
4' <sub>ra</sub>	$\alpha$ 2,88 (dd, 5,5 ; 16,0) $\beta$ 2,49 (dd, 8,4 ; 16,0)	26,7 (t)	C-4' <sub>ra</sub>	C-2' <sub>ra</sub> , C-3' <sub>ra</sub> , C-4' <sub>ara</sub> , C-8' <sub>ara</sub>
4' <sub>rb</sub>	$\alpha$ , $\beta$ 2,61 (dd, 8,8 ; 15,2)	28,4 (t)	C-4' <sub>rb</sub>	C-3' <sub>rb</sub> , C-4' <sub>arb</sub> , C-8' <sub>arb</sub>
4' <sub>ara</sub>		100,1 (s)		H-4' <sub>ra</sub>
4' <sub>arb</sub>		100,9 (s)		H-4' <sub>rb</sub>
5''*		157,0 (s)		H-1
6''*		106,9 (s)		H-1
7''*		157,1 (s)		H-1
8' <sub>ra</sub>	5,87 (s)	94,8 (d)	C-8' <sub>ra</sub>	C-8' <sub>ara</sub>
8' <sub>rb</sub>	6,04 (s)	95,8 (d)	C-8' <sub>rb</sub>	C-8' <sub>arb</sub>
8' <sub>ara</sub>		155,0 (s)		H-4' <sub>ra</sub> , H-8' <sub>ra</sub>
8' <sub>arb</sub>		156,5 (s)		H-4' <sub>rb</sub> , H-8' <sub>rb</sub>
1'' <sub>ra</sub>		131,2 (s)		H-2' <sub>ra</sub>
1'' <sub>rb</sub>		131,5 (s)		H-2' <sub>rb</sub> , H-2'', H-5'', H-6''
2'' <sub>ra</sub>	6,83 (s)	119,5 (d)	C-2'' <sub>ra</sub>	C-1'' <sub>ra</sub> , C-3'' <sub>ra</sub> , C-4'' <sub>ra</sub> , C-6'' <sub>ra</sub> H-6'' <sub>ra</sub>
2'' <sub>rb</sub>	6,82 (s)	119,9 (d)	C-2'' <sub>rb</sub>	C-1'' <sub>rb</sub> , C-3'' <sub>rb</sub> , C-4'' <sub>rb</sub> , C-6'' <sub>rb</sub> H-6'' <sub>rb</sub>
3''*		144,9 (s)		H-2'', H-5''
4''*		144,8 (s)		H-2'', H-5'', H-6''
5'' <sub>ra</sub>	6,81 (d, 1,6)	115,46 (d)	C-5'' <sub>ra</sub>	C-1'' <sub>ra</sub> , C-3'' <sub>ra</sub> , C-4'' <sub>ra</sub> , C-6'' <sub>ra</sub>
5'' <sub>rb</sub>	6,76 (d, 1,8)	115,49 (d)	C-5'' <sub>rb</sub>	C-1'' <sub>rb</sub> , C-3'' <sub>rb</sub> , C-4'' <sub>rb</sub> , C-6'' <sub>rb</sub>
6'' <sub>ra</sub>	6,96 (d, 1,3)	115,0 (d)	C-6'' <sub>ra</sub>	C-1'' <sub>ra</sub> , C-2'' <sub>ra</sub> , C-4'' <sub>ra</sub>
6'' <sub>rb</sub>	6,91 (d, 1,9)	115,3 (d)	C-6'' <sub>rb</sub>	C-1'' <sub>rb</sub> , C-2'' <sub>rb</sub> , C-4'' <sub>rb</sub>

\* <sup>1</sup>H ou <sup>13</sup>C ayant un déplacement chimique identique pour chacun des rotamères

**CLHP-ESI-SM : méthode 10**

1205	$[M-H]^-$	613	$(([M-H]^- - 290) - 302)$
1053	$([M-H]^- - 152)$	602	$[M-2H]^{2-}$
915	$([M-H]^- - 290)$	301	$([M-H]^- - 904)$

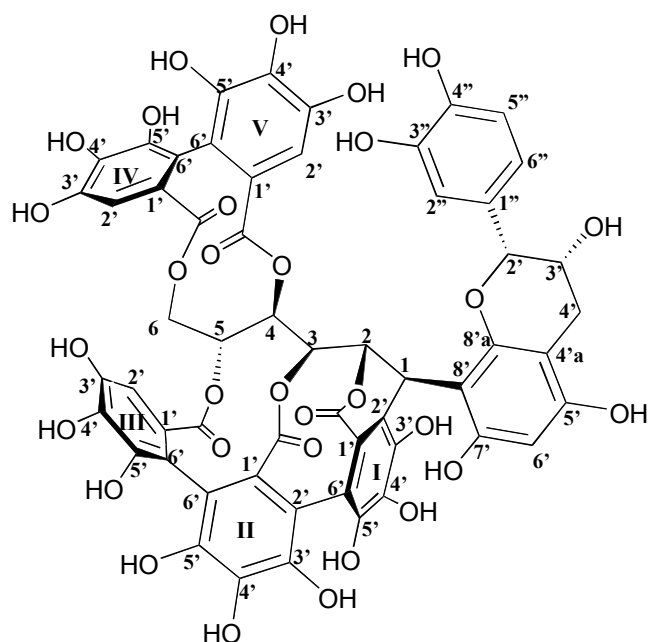
**SMBR : m/z (relative intensity) (LSIMS)**

1245 (13,5)	$[M+K]^+$	1077 (10,4)	$([M+Na]^+ - 152)$
1229 (46,6)	$[M+Na]^+$	1055 (14,6)	$([M+H]^+ - 152)$
1207 (11,7)	$[M+H]^+$	303 (28,1)	$([M+H]^+ - 904)$

**SMHR : (LSIMS)**    calculé pour  $C_{56}H_{38}O_{31}Na$  ( $[M+Na]^+$ ) : 1229,1294    trouvé: 1229,1306



## Epiacutissimine A (89)

Numéro CAS : *nouveau produit*C<sub>56</sub>H<sub>38</sub>O<sub>31</sub>M = 1206 g.mol<sup>-1</sup>

Poudre amorphe blanche

CLHP : méthode 1

tr : 27,1 min

IR : cm<sup>-1</sup> (pastille KBr)

3355 OH aromatique (bande large)  
1740 C=O ester

[α]<sub>D</sub><sup>22</sup> = -65,4 [c = 0,53, acétone]RMN solvant : acétone-*d*<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O (9 : 1)

position	δ <sub>H</sub> (mult., <i>J</i> en Hz)	δ <sub>C</sub> (mult.)	HMQC	HMBC
<b>glucose</b>				
1	4,69 (s)	37,8 (d)	C-1	C-7', C-8', C-8'a, C-1', C-2', C-3' <sub>I</sub> H-2, H-3
2	5,10 (s)	77,8 (d)	C-2	C-1, C-3, C-4, C-8', C-2', C <sub>I</sub> =O H-2, H-4
3	4,86 (d, 4,1)	71,6 (d)	C-3	C-1, C-2, C <sub>II</sub> =O H-2, H-4, H-5
4	5,22 (t, 7,3 ; 7,4)	70,0 (d)	C-4	C-2, C-3, C-5, C <sub>V</sub> =O H-2
5	5,62 (d, 7,6)	70,9 (d)	C-5	C-3, C <sub>III</sub> =O H-4, H-6
6	α 4,05 (d, 12,0) β 4,81 (d, 12,1)	65,5 (t)	C-6 C-6	C-5
<b>aromatique</b>				
1' <sub>I</sub>		126,3 (s)		H-1
1' <sub>[II-V]</sub>		124,7 (s), 125,0 (s), 126,6 (s), 127,6 (s)		
2' <sub>I</sub>		120,3 (s)		H-1, H-2
2' <sub>III</sub>	6,79 (s)	108,4 (d)	C-2' <sub>III</sub>	C-3' <sub>III</sub> , C-4' <sub>III</sub> , C-6' <sub>III</sub> , C <sub>III</sub> =O
2' <sub>IV</sub>	6,63 (s)	106,9 (d)	C-2' <sub>IV</sub>	C-3' <sub>IV</sub> , C-4' <sub>IV</sub> , C-6' <sub>IV</sub> , C <sub>IV</sub> =O



position	$\delta_H$ (mult., $J$ en Hz)	$\delta_C$ (mult.)	HMQC	HMBC
<b>aromatique</b>				
2' <sub>V</sub>	7,07 (s)	109,4 (d)	C-2' <sub>V</sub>	C-3' <sub>V</sub> , C-4' <sub>V</sub> , C-6' <sub>V</sub> , C <sub>V</sub> =O
2' <sub>II</sub> et		113,2 (s), 113,7 (s),		
6' <sub>[I-II]</sub>		116,4 (s)		
3' <sub>I</sub>		143,3 (s)		H-1
3' <sub>III</sub>		145,28 (s)		H-2' <sub>III</sub>
3' <sub>IV</sub>		145,21 (s)		H-2' <sub>IV</sub>
3' <sub>V</sub>		145,0 (s)		H-2' <sub>V</sub>
3' <sub>II</sub> et		143,2 (s), 144,1 (s),		
5' <sub>[I-V]</sub>		144,31 (s), 144,38 (s),		
		144,5 (s), 144,6 (s),		
4' <sub>[I-II]</sub>		135,0 (s), 136,6 (s)		
4' <sub>III</sub>		136,2 (s)		H-2' <sub>III</sub>
4' <sub>IV</sub>		135,4 (s)		H-2' <sub>IV</sub>
4' <sub>V</sub>		137,0 (s)		H-2' <sub>V</sub>
6' <sub>III</sub>		114,3 (s)		H-2' <sub>III</sub>
6' <sub>IV</sub>		114,4 (s)		H-2' <sub>IV</sub>
6' <sub>V</sub>		116,5 (s)		H-2' <sub>V</sub>
<b>carbonyle</b>				
C <sub>I</sub> =O		167,3 (s)		H-2
C <sub>II</sub> =O		165,6 (s)		H-3
C <sub>III</sub> =O		169,1 (s)		H-5, H-2' <sub>III</sub>
C <sub>IV</sub> =O		166,9 (s)		H-2' <sub>IV</sub>
C <sub>V</sub> =O		167,0 (s)		H-4, H-2' <sub>V</sub>
<b>épicatechine</b>				
2'ra	4,88 (s)	78,7 (d)	C-2'ra	C-1'' H4'ra
2'rb	4,88 (s)	78,9 (d)	C-2'rb	C-1''
3'ra	4,21 (s)	66,3 (d)	C-3'ra	H4'ra
3'rb	4,29 (s)	66,4 (d)	C-3'rb	
4'ra	$\alpha$ 2,66 (dd, 3,2 ; 16,2) $\beta$ 2,81 (dd, 4,4 ; 16,6)	29,1 (t)	C-4'ra	C-2'ra, C-3'ra, C-4'a, C-8'ara
4'rb	2,97 (bs)	28,4 (t)	C-4'rb	
4'a*		99,4 (s)		H4'ra, H6'ra, H6'rb
5'*		157,1 (s)		H6'ra, H6'rb
6'ra	5,92 (s)	95,8 (d)	C-6'ra	C-5', C-7', C-4'a
6'rb	6,03 (s)	95,1 (d)	C-6'rb	C-5', C-7', C-4'a
7'*		157,0 (s)		H-1, H6'ra, H6'rb
8'*		107,2 (s)		H-1, H-2
8'ara		155,0 (s)		H-1, H4'ra
8'arb		156,5 (s)		H-1
1''*		131,5 (s)		H-2'', H-2'', H5'', H-6''
2''ra	7,03 (s)	114,8 (d)	C-2''ra	C-1''ra, C-3''ra, C-4''ra, C-6''ra H-6''ra
2''rb	7,08 (s)	114,9 (d)	C-2''rb	C-1''rb, C-3''rb, C-4''rb, C-6''rb H-6''rb
3''*		144,8 (s)		H-2'', H5''
4''*		144,9 (s)		H-2'', H5'', H-6''
5''ra	6,86 (bs)	115,1 (d)	C-5''ra	C-1''ra, C-3''ra, C-4''ra
5''rb	6,82 (bs)	115,2 (d)	C-5''rb	C-1''rb, C-3''rb, C-4''rb
6''ra	6,80 (bs)	118,8 (d)	C-6''ra	C-1''ra, C-2''ra, C-4''ra H-2''ra
6''rb	6,84 (bs)	118,9 (d)	C-6''rb	C-1''rb, C-2''rb, C-4''rb H-2''rb

\*  $^1\text{H}$  ou  $^{13}\text{C}$  ayant un déplacement chimique identique pour chacun des rotamères

**CLHP-ESI-SM : méthode 10**

1205	$[M-H]^-$	613	$(([M-H]^- - 290) - 302)$
1053	$([M-H]^- - 152)$	602	$[M-2H]^{2-}$
915	$([M-H]^- - 290)$	301	$([M-H]^- - 904)$

**SM : m/z (relative intensity) (LSIMS)**

1245 (30,7)	$[M+K]^+$	1077 (10,5)	$([M+Na]^+ - 152)$
1229 (100,0)	$[M+Na]^+$	1055 (12,5)	$([M+H]^+ - 152)$
1207 (19,8)	$[M+H]^+$	303 (36,5)	$([M+H]^+ - 904)$

**SMHR : (LSIMS)**    calculé pour  $C_{56}H_{38}O_{31}Na$  ( $[M+Na]^+$ ) : 1229,1294    trouvé: 1229,1288



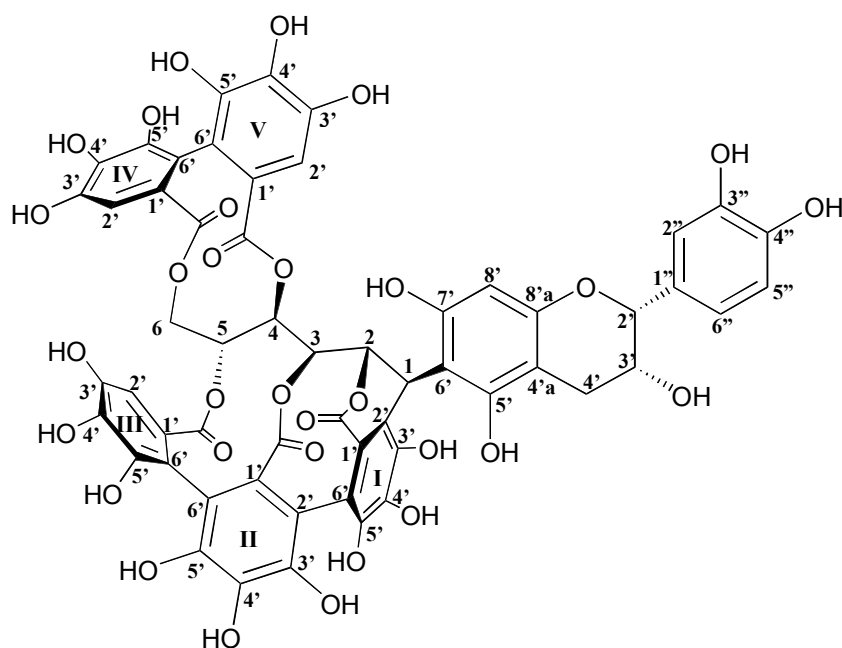
## Epiacutissimine B (90)

Numéro CAS : *nouveau produit* $C_{56}H_{38}O_{31}$ M = 1206 g.mol<sup>-1</sup>

Poudre amorphe blanche

CLHP : méthode 1

tr : 21,4 min

IR : cm<sup>-1</sup> (pastille KBr)

3338 OH aromatique (bande large)  
1734 C=O ester

 $[\alpha]_D^{22} = -90,7$  [*c* = 0,38, acétone]RMN solvant : acétone-*d*<sub>6</sub>

position	$\delta_H$ (mult., <i>J</i> en Hz)	$\delta_C$ (mult.)	HMQC	HMBC
<b>glucose</b>				
1	4,79 (s)	37,2 (d)	C-1	C-5', C-6', C-7', C-1'₁, C-2'₁, C-3'₁ H-2, H-3
2	5,13 (s)	77,7 (d)	C-2	C-1, C-4, C-6', C-2'₁, C <sub>I</sub> =O H-4
3	4,78 (bs)	71,8 (d)	C-3	C-1, C <sub>II</sub> =O H-5
4	5,18 (t, 7,7)	69,5 (d)	C-4	C-2, C-5, C <sub>V</sub> =O H-2, H-5, H-6
5	5,62 (d, 7,6)	70,8 (d)	C-5	C-3, C-4, C-6, C <sub>III</sub> =O H-4, H-6
6	$\alpha$ 4,02 (d, 12,4) $\beta$ 4,76 (d, 10,4)	65,6 (t)	C-6 C-6	C-5, C <sub>IV</sub> =O H-5

position	$\delta_H$ (mult., $J$ en Hz)	$\delta_C$ (mult.)	HMQC	HMBC
<b>aromatique</b>				
1' <sub>I</sub>		125,0 (s)		H-1
1' <sub>[II-V]</sub>		124,4 (s), 126,4 (s), 127,0 (s), 127,5 (s)		
2' <sub>I</sub>		120,8 (s)		H-1, H-2
2' <sub>III</sub>	6,75 (s)	109,1 (d)	C-2' <sub>III</sub>	C-3' <sub>III</sub> , C-4' <sub>III</sub> , C-6' <sub>III</sub> , C <sub>III</sub> =O
2' <sub>IV</sub>	6,59 (s)	108,3 (d)	C-2' <sub>IV</sub>	C-3' <sub>IV</sub> , C-4' <sub>IV</sub> , C-6' <sub>IV</sub> , C <sub>IV</sub> =O
2' <sub>V</sub>	6,75 (s)	106,8 (d)	C-2' <sub>V</sub>	C-3' <sub>V</sub> , C-4' <sub>V</sub> , C-6' <sub>V</sub> , C <sub>V</sub> =O
2' <sub>II</sub> et		113,1 (s), 115,3 (s),		
6' <sub>[I-II]</sub>		116,5 (s)		
3' <sub>I</sub>		142,7 (s)		H-1
3' <sub>III</sub>		145,25 (s)		H-2' <sub>III</sub>
3' <sub>IV</sub>		145,21 (s)		H-2' <sub>IV</sub>
3' <sub>V</sub>		144,8 (s)		H-2' <sub>V</sub>
3' <sub>II</sub> et		143,3 (s) 144,0 (s),		
5' <sub>[I-V]</sub>		144,2 (s), 144,53 (s), 145,27 (s), 145,3 (s)		
4' <sub>[I-II]</sub>		136,9 (s), 137,8 (s)		
4' <sub>III</sub>		135,2 (s)		H-2' <sub>III</sub>
4' <sub>IV</sub>		135,0 (s)		H-2' <sub>IV</sub>
4' <sub>V</sub>		136,1 (s)		H-2' <sub>V</sub>
6' <sub>III</sub>		114,2 (s)		H-2' <sub>III</sub>
6' <sub>IV</sub>		114,31 (s)		H-2' <sub>IV</sub>
6' <sub>V</sub>		114,38 (s)		H-2' <sub>V</sub>
<b>carbonyle</b>				
C <sub>I</sub> =O		167,1 (s)		H-2
C <sub>II</sub> =O		166,0 (s)		H-3
C <sub>III</sub> =O		167,0 (s)		H-5, H-2' <sub>III</sub>
C <sub>IV</sub> =O		169,1 (s)		H-6, H-2' <sub>IV</sub>
C <sub>V</sub> =O		165,6 (s)		H-4, H-2' <sub>V</sub>
<b>épicatechine</b>				
2'	5,49 (s)	79,2 (d)	C-2'	
3'	4,56 (s)	66,2 (d)	C-3'	
4'	$\alpha$ 2,86 (d, 16,5) $\beta$ 2,39 (d, 14,5)	26,7 (t)	C-4'	
4'a		99,3 (s)		H-8'
5'		156,7 (s)		H-1
6'		105,1 (d)		H-1, H-2, H-8'
7'		153,2 (s)		H-1
8'	6,06 (s)	96,4 (d)	C-8'	C-4'a, C-6', C-8'a
8'a		155,6 (s)		H-8'
1''		130,9 (s)		H-5''
2''	6,96 (s)	113,9 (d)	C-2''	C-3'', C-6'' H-6''
3''		144,4 (s)		H-2''
4''		144,5 (s)		H-5'', H-6''
5''	6,64 (d, 8,6)	114,8 (d)	C-5''	C-1'', C-4'' H-6''
6''	6,79 (bs)	119,1 (d)	C-6''	C-2'', C-4'', C-5'' H-2''

**CLHP-ESI-SM : méthode 10**

1205	$[M-H]^-$	613	$(([M-H]^- - 290) - 302)$
1053	$([M-H]^- - 152)$	602	$[M-2H]^{2-}$
915	$([M-H]^- - 290)$	301	$([M-H]^- - 904)$

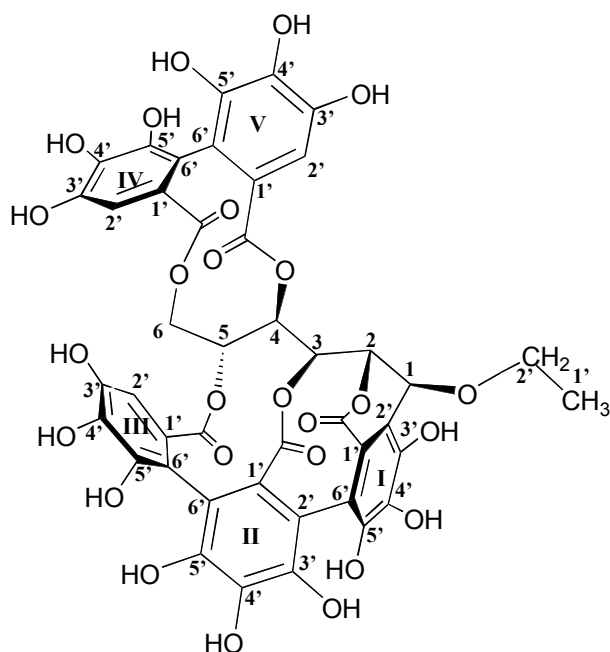
**SMBR : m/z (relative intensity) (LSIMS)**

1245 (24,9)	$[M+K]^+$	1077 (8,9)	$([M+Na]^+ - 152)$
1229 (71,3)	$[M+Na]^+$	1055 (17,1)	$([M+H]^+ - 152)$
1207 (24,3)	$[M+H]^+$	303 (39,9)	$([M+H]^+ - 904)$

**SMHR : (LSIMS)**    calculé pour  $C_{56}H_{38}O_{31}Na$  ( $[M+Na]^+$ ) : 1229,1294    trouvé: 1229,1292



## Ethylvaescalagine (91)

Numéro CAS : *nouveau produit*C<sub>43</sub>H<sub>30</sub>O<sub>26</sub> M = 962 g.mol<sup>-1</sup>

Poudre amorphe blanche

CLHP : méthode 2

tr : 26,2 min

IR : cm<sup>-1</sup> (pastille KBr)

3383 OH aromatique (bande large)  
1740 C=O ester

[α]<sub>D</sub><sup>22</sup> = - 88,2 [c = 0,5, acétone]RMN solvant : acétone-*d*<sub>6</sub>

position	δ <sub>H</sub> (mult., J en Hz)	δ <sub>C</sub> (mult.)	HMQC	HMBC
<b>glucose</b>				
1	4,80 (d, 2,0)	68,2 (d)	C-1	C-2', C-1'₁, C-2'₁, C-3'₁
2	5,38 (s)	74,7 (d)	C-2	C-3, C-4, C-2'₁, C <sub>I</sub> =O H-4
3	4,56 (dd, 7,0 ; 9,2)	71,6 (d)	C-3	C-4, C-5, C <sub>II</sub> =O H-2, H-4
4	5,25 (t, 7,3)	69,4 (d)	C-4	C-2, C-5, C <sub>V</sub> =O H-2, H-3, H-5
5	5,67 (d, 7,5)	70,9 (d)	C-5	C-4, C <sub>III</sub> =O H-3, H-4, H-6
6	α 4,03 (d, 12,5) β 5,11 (d, 12,9)	65,2 (t)	C-6 C-6	C-5, C <sub>IV</sub> =O



position	$\delta_H$ (mult., $J$ en Hz)	$\delta_C$ (mult.)	HMQC	HMBC
<b>aromatique</b>				
1 <sub>I</sub>		125,4 (s)		H-1
1 <sub>[II-V]</sub>		125,0 (s), 125,8 (s), 126,9 (s), 128,0 (s)		
2 <sub>I</sub>		115,2 (s)		H-1, H-2
2 <sub>III</sub>	6,80 (s)	108,6 (d)	C-2 <sub>III</sub>	C-3 <sub>III</sub> , C-4 <sub>III</sub> , C-6 <sub>III</sub> , C <sub>III</sub> =O
2 <sub>IV</sub>	6,65 (s)	107,2 (d)	C-2 <sub>IV</sub>	C-3 <sub>IV</sub> , C-4 <sub>IV</sub> , C-6 <sub>IV</sub> , C <sub>IV</sub> =O
2 <sub>V</sub>	6,79 (s)	108,5 (d)	C-2 <sub>V</sub>	C-3 <sub>V</sub> , C-4 <sub>V</sub> , C-6 <sub>V</sub> , C <sub>V</sub> =O
2 <sub>II</sub> et 6 <sub>[I-II]</sub>		112,4 (s), 113,9 (s), 114,8 (s)		
3 <sub>I</sub>		144,6 (s)		H-1
3 <sub>III</sub>		145,2 (s)		H-2 <sub>III</sub>
3 <sub>IV</sub>		145,0 (s)		H-2 <sub>IV</sub>
3 <sub>V</sub>		145,1 (s)		H-2 <sub>V</sub>
3 <sub>II</sub> et 5 <sub>[I-V]</sub>		143,9 (s), 144,20 (s), 144,28 (s), 144,3 (s), 144,5 (s), 147,3 (s)		
4 <sub>[I-II]</sub>		134,6 (s), 136,4 (s)		
4 <sub>III</sub>		136,1 (s)		H-2 <sub>III</sub>
4 <sub>IV</sub>		135,5 (s)		H-2 <sub>IV</sub>
4 <sub>V</sub>		136,7 (s)		H-2 <sub>V</sub>
6 <sub>III</sub>		114,0 (s)		H-2 <sub>III</sub>
6 <sub>IV</sub>		114,3 (s)		H-2 <sub>IV</sub>
6 <sub>V</sub>		115,8 (s)		H-2 <sub>V</sub>
<b>carbonyle</b>				
C <sub>I</sub> =O		163,8 (s)		H-2
C <sub>II</sub> =O		164,8 (s)		H-3
C <sub>III</sub> =O		166,2 (s)		H-5, H-2 <sub>III</sub>
C <sub>IV</sub> =O		168,5 (s)		H-6, H-2 <sub>IV</sub>
C <sub>V</sub> =O		166,0 (s)		H-4, H-2 <sub>V</sub>
<b>éthanol</b>				
1 <sub>'</sub>	1,30 (t, 7,0)	15,6 (q)	C-1 <sub>'</sub>	
2 <sub>'</sub>	3,87 (q, 6,9 ; 9,2) 3,98 (q, 7,0 ; 9,2)	64,4 (t)	C-2 <sub>'</sub> C-2 <sub>'</sub>	H-1, H-1''

**CLHP-ESI-SM : méthode 10**

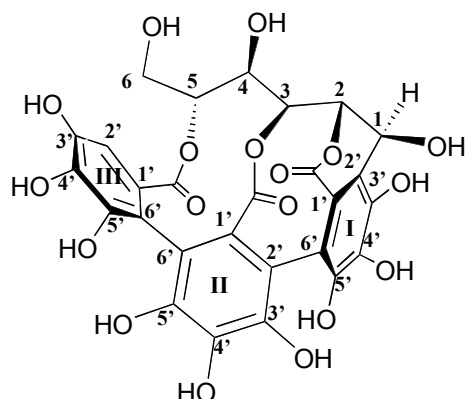
961	[M-H] <sup>-</sup>
915	([M-H] <sup>-</sup> -46)
301	([M-H] <sup>-</sup> - 660)

**SM : m/z (intensité relative) (LSIMS)**

1001 (11,6)	[M+K] <sup>+</sup>	935 (14,5)	([M+H] <sup>+</sup> -28)
985 (24,5)	[M+Na] <sup>+</sup>	917 (7,5)	([M+H] <sup>+</sup> -46)
963 (45,7)	[M+H] <sup>+</sup>	303 (54,3)	([M+H] <sup>+</sup> -660)
949 (6,2)	([M+H] <sup>+</sup> -14)		

**SMHR : (LSIMS)** calculé pour C<sub>43</sub>H<sub>31</sub>O<sub>26</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) : 963,1110

trouvé: 963,1103

**Vescaline (81)**

Numéro CAS : [19086-75-0]

 $C_{27}H_{20}O_{18}$      $M = 632 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 

Poudre amorphe blanche

**CLHP** : méthode 1            **tr** : 5,5 min**IR** :  $\text{cm}^{-1}$  (pastille KBr)

3383	OH aromatique (bande large)
1740	C=O ester

**CLHP-ESI-SM** : méthode 10

631	$[\text{M}-\text{H}]^{-}$
613	$([\text{M}-\text{H}]^{-} - 46)$
559	$([\text{M}-\text{H}]^{-} - 90)$

**SM** : m/z (intensité relative) (LSIMS)

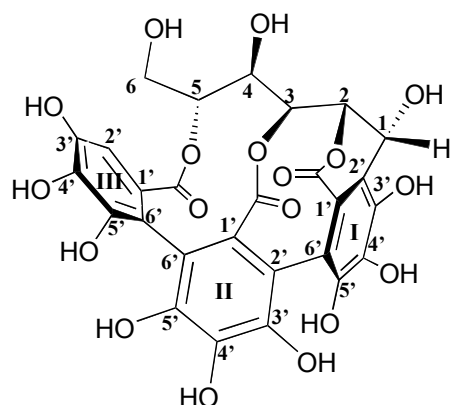
655 (100,0)	$[\text{M}+\text{Na}]^{+}$
633 (25,9)	$[\text{M}+\text{H}]^{+}$

**SMHR** : (LSIMS)    calculé pour  $C_{27}H_{20}O_{18}Na$  ( $[\text{M}+\text{Na}]^{+}$ ) : 655,0547

trouvé: 655,0554

RMN solvant : D<sub>2</sub>O

position	$\delta_H$ (mult., <i>J</i> en Hz)	$\delta_C$ (mult.)	HMQC	HMBC
<b>glucose</b>				
1	4,45 (d, 1,5)	63,9 (d)	C-1	C-2, C-3, C-1' <sub>I</sub> , C-2' <sub>I</sub> , C-3' <sub>I</sub> H-2, H-3
2	5,32 (s)	74,2 (d)	C-2	C-1, C-2' <sub>I</sub> , C <sub>I</sub> =O H-1, H-4, H-6
3	4,83 (d, 7,8)	70,7 (d)	C-3	C-1, C-4, C-5, C <sub>II</sub> =O H-1, H-4
4	3,95 (m)	67,6 (d)	C-4	C-2, C-3, C-5 H-3, H-5
5	5,04 (m)	76,0 (d)	C-5	C <sub>III</sub> =O H-3, H-4, H-6
6	3,82 (m)	60,8 (t)	C-6	C-4, C-5
<b>aromatique</b>				
1' <sub>I</sub>		121,3 (s)		H-1
1' <sub>II</sub>		126,9 (s)		
1' <sub>III</sub>		124,8 (s)		H-2' <sub>III</sub>
2' <sub>I</sub>		116,2 (s)		H-1, H-2
2' <sub>III</sub>	6,79 (s)	108,5 (d)	C-2' <sub>III</sub>	C-1' <sub>III</sub> , C-3' <sub>III</sub> , C-4' <sub>III</sub> , C-6' <sub>III</sub> , C <sub>III</sub> =O
2' <sub>II</sub> et		112,1 (s), 113,0 (s),		
6' <sub>[I-II]</sub>		115,9 (s)		
3' <sub>I</sub>		143,61 (s)		H-1
3' <sub>III</sub>		145,0 (s)		H-2' <sub>III</sub>
3' <sub>II</sub> et		143,68 (s), 143,7 (s),		
5' <sub>[I-III]</sub>		143,8 (s), 145,1 (s)		
4' <sub>[I-II]</sub>		134,2 (s), 137,9 (s)		
4' <sub>III</sub>		135,7 (s)		H-2' <sub>III</sub>
6' <sub>III</sub>		113,1 (s)		H-2' <sub>III</sub>
<b>carbonyle</b>				
C <sub>I</sub> =O		166,7 (s)		H-2
C <sub>II</sub> =O		168,1 (s)		H-3
C <sub>III</sub> =O		168,3 (s)		H-5, H-2' <sub>III</sub>

**Castaline (82)**

Numéro CAS : [19086-75-0]

C<sub>27</sub>H<sub>20</sub>O<sub>18</sub>    M = 632 g.mol<sup>-1</sup>

Poudre amorphe blanche

**CLHP** : méthode 1            **tr** : 5,5 min**IR** : cm<sup>-1</sup> (pastille KBr)

3383	OH aromatique (bande large)
1740	C=O ester

**CLHP-ESI-SM** : méthode 10631            [M-H]<sup>-</sup>**SM** : m/z (intensité relative) (LSIMS)

655 (100,0)	[M+Na] <sup>+</sup>
633 (15,5)	[M+H] <sup>+</sup>

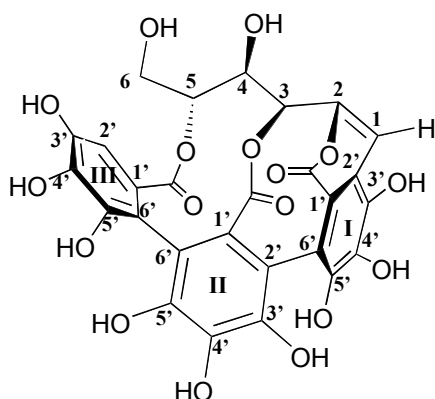
**SMHR** : (LSIMS)    calculé pour C<sub>27</sub>H<sub>20</sub>O<sub>18</sub>Na ([M+Na]<sup>+</sup>) : 655,0547

trouvé: 655,0556

RMN solvant : D<sub>2</sub>O

position	$\delta_H$ (mult., $J$ en Hz)	$\delta_C$ (mult.)	HMQC	HMBC
<b>glucose</b>				
1	5,59 (d, 3,5)	65,8 (d)	C-1	C-2, C-3, C-1' <sub>I</sub> , C-2' <sub>I</sub> , C-3' <sub>I</sub> H-2, H-3
2	5,13 (d, 3,0)	72,3 (d)	C-2	C-1, C-2' <sub>I</sub> , C <sub>I</sub> =O H-1, H-4, H-6
3	4,88 (d, 6,8)	68,7 (d)	C-3	C-1, C-4, C-5, C <sub>II</sub> =O H-1, H-4
4	3,95 (t, 7,5)	67,5 (d)	C-4	C-2, C-3, C-5 H-3, H-5
5	5,04 (m)	74,4 (d)	C-5	C <sub>III</sub> =O H-3, H-4, H-6
6	3,84 (m)	60,8 (t)	C-6	C-4, C-5
<b>aromatique</b>				
1' <sub>I</sub>		121,0 (s)		H-1
1' <sub>II</sub>		126,7 (s)		
1' <sub>III</sub>		124,8 (s)		H-2' <sub>III</sub>
2' <sub>I</sub>		116,5 (s)		H-1, H-2
2' <sub>III</sub>	6,80 (s)	108,5 (d)	C-2' <sub>III</sub>	C-1' <sub>III</sub> , C-3' <sub>III</sub> , C-4' <sub>III</sub> , C-6' <sub>III</sub> , C <sub>III</sub> =O
2' <sub>II</sub> et 6' <sub>[I-II]</sub>		112,1 (s), 113,3 (s), 115,4 (s)		
3' <sub>I</sub>		143,2 (s)		H-1
3' <sub>III</sub>		145,0 (s)		H-2' <sub>III</sub>
3' <sub>II</sub> et 5' <sub>[I-III]</sub>		143,62 (s), 143,64 (s), 143,7 (s), 145,6 (s)		
4' <sub>[I-II]</sub>		134,3 (s), 137,6 (s)		
4' <sub>III</sub>		135,7 (s)		H-2' <sub>III</sub>
6' <sub>III</sub>		113,0 (s)		H-2' <sub>III</sub>
<b>carbonyle</b>				
C <sub>I</sub> =O		166,4 (s)		H-2
C <sub>II</sub> =O		166,9 (s)		H-3
C <sub>III</sub> =O		168,3 (s)		H-5, H-2' <sub>III</sub>

## Vescalène (94)

Numéro CAS : *nouveau produit* $C_{27}H_{18}O_{17}$      $M = 614 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 

Poudre amorphe jaune

CLHP : méthode 1            tr : 27,9 min

IR :  $\text{cm}^{-1}$  (pastille KBr)

3378	OH aromatique (bande large)
1730	C=O ester

CLHP-ESI-SM : méthode 10

613	$[\text{M}-\text{H}]^-$
595	$([\text{M}-\text{H}]^- - 18)$

SM : m/z (intensité relative) (LSIMS)

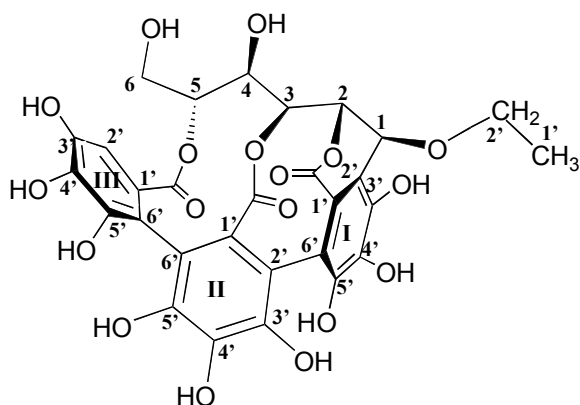
615 (5,7)	$[\text{M}+\text{H}]^+$
597 (76,2)	$([\text{M}+\text{H}]^+ - 18)$

SMHR : (LSIMS)    calculé pour  $C_{27}H_{17}O_{16}$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+ - 18$ ): 597,0410

trouvé: 597,0421

RMN solvant : acétone- $d_6$ 

position	$\delta_H$ (mult., $J$ en Hz)	$\delta_C$ (mult.)	HMQC	HMBC	COSY
<b>glucose</b>					
1	6,96 (s)	100,6 (d)	C-1	C-2, C-3, C-2' <sub>I</sub> , C-3' <sub>I</sub> H-3	
2		151,6 (s)		H-1, H-4	
3	4,46 (d, 5,3)	82,3 (d)	C-3	C-1, C-4, C-5, C <sub>II</sub> =O	H-4
4	4,29 (m)	71,9 (d)	C-4	H-1 C-2, C-5	H-3, H-5
5	4,30 (d, 4,1)	75,1 (d)	C-5	H-3, H-6	
6	$\alpha$ 3,78 (dd, 2,7 ; 9,5) $\beta$ 4,11 (dd, 4,6 ; 9,5)	73,7 (t)	C-6	H-3, H-4, H-6 C-4, C-5	H-4, H-6 H-5
<b>aromatique</b>					
1' <sub>[I-III]</sub>		117,9 (s), 122,1 (s), 124,5 (s)		H-1	
2' <sub>I</sub>		112,0 (s)			
2' <sub>III</sub>	7,62 (s)	111,2 (d)	C-2' <sub>III</sub>	C-3' <sub>III</sub> , C-4' <sub>III</sub> , C-6' <sub>III</sub> , C <sub>III</sub> =O	
2' <sub>II</sub> et		108,8 (s), 109,2 (s),			
6' <sub>[I-II]</sub>		113,7 (s)			
3' <sub>I</sub>		139,7 (s)		H-1	
3' <sub>III</sub>		139,9 (s)		H-2' <sub>III</sub>	
3' <sub>II</sub> et		136,8 (s), 137,7 (s),			
5' <sub>[I-III]</sub>		139,2 (s), 140,4 (s)			
4' <sub>[I-II]</sub>		145,0 (s), 146,9 (s)			
4' <sub>III</sub>		148,6 (s)		H-2' <sub>III</sub>	
6' <sub>III</sub>		114,0 (s)		H-2' <sub>III</sub>	
<b>carbonyle</b>					
C <sub>I</sub> =O		158,9 (s)			
C <sub>II</sub> =O		160,7 (s)		H-3	
C <sub>III</sub> =O		161,7 (s)		H-2' <sub>III</sub>	

**Ethylvescaline (100)**CAS : *nouveau produit* $C_{29}H_{24}O_{18}$      $M = 660 \text{ g.mol}^{-1}$ 

Poudre amorphe blanche

CLHP : (méthode 1)      **tr** : 17,8 minIR :  $\text{cm}^{-1}$  (pastille KBr)

3380	OH aromatique (bande large)
1738	C=O ester

CLHP-ESI-SM : méthode 10

659	$[M-H]^-$
613	$([M-H]^- - 46)$
559	$([M-H]^- - 90)$

SM : m/z (intensité relative) (LSIMS)

683 (96,7)	$[M+Na]^+$
------------	------------

SMHR : (LSIMS)    calculé pour  $C_{29}H_{24}O_{18}Na$  ( $[M+Na]^+$ ) : 683,0860

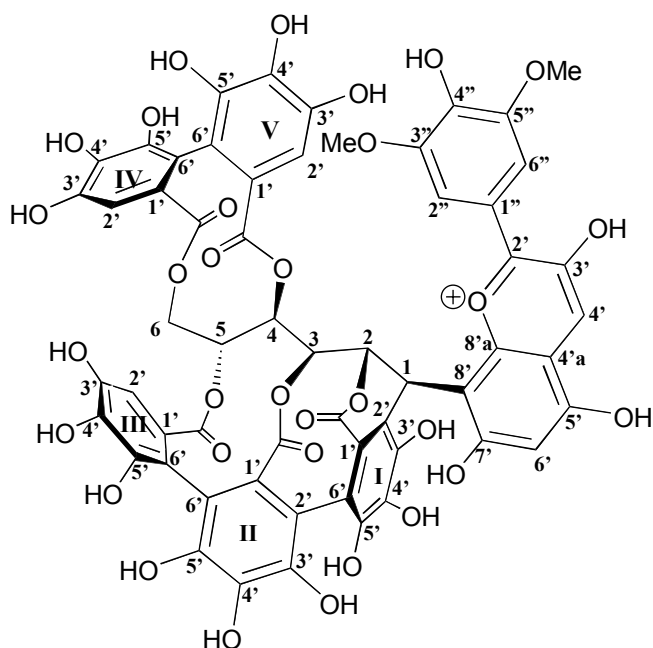
trouvé: 683,0842



RMN solvant : acétone- $d_6$ 

position	$\delta_H$ (mult., $J$ en Hz)	$\delta_C$ (mult.)	HMQC	HMBC
<b>glucose</b>				
1	4,65 (d, 1,2)	65,8 (d)	C-1	C-2', C-2, C-3, C-1', C-2', C-3'
2	5,37 (s)	72,6 (d)	C-2	H-2, H-3 C-1, C-2', C <sub>I</sub> =O
3	4,46 (d, 2,8)	71,2 (d)	C-3	H-1, H-4, H-6 C-1, C-4, C-5, C <sub>II</sub> =O
4	5,15 (m)	72,5 (d)	C-4	H-1, H-4 C-2, C-3, C-5
5	5,47 (d, 2,0)	74,4 (d)	C-5	H-3, H-5 C <sub>III</sub> =O
6	3,84 (m)	60,8 (t)	C-6	H-3, H-4, H-6 C-4, C-5
<b>aromatique</b>				
1' <sub>I</sub>		127,3 (s)		H-1
1' <sub>II</sub>		127,4 (s)		
1' <sub>III</sub>		129,5 (s)		H-2' <sub>III</sub>
2' <sub>I</sub>		118,7 (s)		H-1, H-2
2' <sub>III</sub>	6,76 (s)	108,7 (d)	C-2' <sub>III</sub>	C-1' <sub>III</sub> , C-3' <sub>III</sub> , C-4' <sub>III</sub> , C-6' <sub>III</sub> , C <sub>III</sub> =O
2' <sub>II</sub> et		115,1 (s), 116,3 (s),		
6' <sub>[I-II]</sub>		117,4 (s)		
3' <sub>I</sub>		145,6 (s)		H-1
3' <sub>III</sub>		146,59 (s)		H-2' <sub>III</sub>
3' <sub>II</sub> et		145,2 (s), 145,4 (s),		
5' <sub>[I-III]</sub>		146,54 (s), 148,6 (s)		
4' <sub>[I-II]</sub>		136,1 (s), 138,5 (s)		
4' <sub>III</sub>		137,3 (s)		H-2' <sub>III</sub>
6' <sub>III</sub>		115,8 (s)		H-2' <sub>III</sub>
<b>carbonyle</b>				
C <sub>I</sub> =O		166,5 (s)		H-2
C <sub>II</sub> =O		167,2 (s)		H-3
C <sub>III</sub> =O		168,9 (s)		H-5, H-2' <sub>III</sub>
<b>éthanol</b>				
1'	1,19 (t, 5,0)	15,7 (q)	C-1'	
2'	3,47 (m)	57,6 (t)	C-2'	H-1, H-1''
	3,88 (m)		C-2'	

## Vescalagine-malvidine (103)

Numéro CAS : *nouveau produit* $C_{58}H_{39}O_{32}$      $M = 1247 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 

Poudre amorphe rouge

CLHP : méthode 4

tr : 29,8 min

IR :  $\text{cm}^{-1}$  (pastille KBr)

3380    OH aromatique (bande large)  
1736    C=O ester

RMN solvant : MeOH- $d_4$ /TFA (999 : 1)

position	$\delta_H$ (mult., J en Hz)	$\delta_C$ (mult.)	HMQC	HMBC
<b>glucose</b>				
1	5,09 (s)	38,5 (d)	C-1	C-2, C-3, C-7', C-8', C-8'a, C-1', C-2', C-3' <sub>1</sub> H-2, H-3
2	5,28 (s)	78,1 (d)	C-2	C-1, C-4, C-8', C-2' <sub>1</sub> , C <sub>I</sub> =O H-1, H-4
3	4,81 (s)	72,8 (d)	C-3	C-1, C-4, C <sub>II</sub> =O H-1, H-4
4	5,14 (t, 7,5)	70,1 (d)	C-4	C-2, C-3, C-5, C <sub>V</sub> =O H-2, H-3, H-6
5	5,58 (d, 7,6)	71,5 (d)	C-5	C <sub>III</sub> =O H-4, H-6
6	$\alpha$ 3,91 (d, 7,1) $\beta$ 4,84 (d, 6,9)	66,7 (t)	C-6 C-6	C-4, C-5, C <sub>IV</sub> =O

position	$\delta_H$ (mult., $J$ en Hz)	$\delta_C$ (mult.)	HMQC	HMBC
<b>aromatique</b>				
1' <sub>I</sub>		126,7 (s)		H-1
1' [III-V]		124,2 (s), 125,4 (s), 127,5 (s), 128,2 (s)		
2' <sub>I</sub>		118,0 (s)		H-1, H-2
2' <sub>III</sub>	6,79 (s)	109,79 (d)	C-2' <sub>III</sub>	C-3' <sub>III</sub> , C-4' <sub>III</sub> , C-6' <sub>III</sub> , C <sub>III</sub> =O
2' <sub>IV</sub>	6,54 (s)	108,4 (d)	C-2' <sub>IV</sub>	C-3' <sub>IV</sub> , C-4' <sub>IV</sub> , C-6' <sub>IV</sub> , C <sub>IV</sub> =O
2' <sub>V</sub>	5,68 (s)	109,71 (d)	C-2' <sub>V</sub>	C-3' <sub>V</sub> , C-4' <sub>V</sub> , C-6' <sub>V</sub> , C <sub>V</sub> =O
2' <sub>II</sub> et		114,6 (s), 115,3 (s),		
6' [I-III]		116,4 (s)		
3' <sub>I</sub>		144,8 (s)		H-1
3' <sub>III</sub>		146,5 (s)		H-2' <sub>III</sub>
3' <sub>IV</sub>		146,3 (s)		H-2' <sub>IV</sub>
3' <sub>V</sub>		145,6 (s)		H-2' <sub>V</sub>
3' <sub>II</sub> et		144,7 (s), 144,8 (s),		
5' [I-V]		145,3 (s), 145,4 (s), 145,6 (s), 147,6 (s)		
4' [I-III]		136,5 (s), 138,9 (s)		
4' <sub>III</sub>		137,9 (s)		H-2' <sub>III</sub>
4' <sub>IV</sub>		137,1 (s)		H-2' <sub>IV</sub>
4' <sub>V</sub>		138,6 (s)		H-2' <sub>V</sub>
6' <sub>III</sub>		115,4 (s)		H-2' <sub>III</sub>
6' <sub>IV</sub>		115,8 (s)		H-2' <sub>IV</sub>
6' <sub>V</sub>		117,5 (s)		H-2' <sub>V</sub>
<b>carbonyle</b>				
C <sub>I</sub> =O		168,5 (s)		H-2
C <sub>II</sub> =O		166,7 (s)		H-3
C <sub>III</sub> =O		168,3 (s)		H-5, H-2' <sub>III</sub>
C <sub>IV</sub> =O		170,6 (s)		H-6, H-2' <sub>IV</sub>
C <sub>V</sub> =O		166,5 (s)		H-4, H-2' <sub>V</sub>
<b>malvidine</b>				
2'	5,49 (s)	162,1 (s)		H-4', H-2'', H-6''
3'	4,56 (s)	147,3 (s)		H-4'
4'	2,86 (d, 16,5)	135,2 (d)	C-4'	C-2', C-3', C-4'a, C-5', C-8'a
4'a		114,2 (s)		H-4', H-6'
5'		157,6 (s)		H-4', H-6'
6'	6,77 (s)	103,6 (d)	C-6'	C-4'a, C-5', C-7', C-8'
7'		156,9 (s)		H-1, H-6'
8'		106,5 (s)		H-1, H-2, H-6'
8'a		154,4 (s)		H-1, H-4'
1''		121,1 (s)		H-2'', H-6''
2''	7,60 (s)	109,0 (d)	C-2''	C-2', C-1'', C-3'', C-4'', C-6'' H-6''
3''		149,81 (s)		H-2'', OMe
4''		145,1 (s)		H-2'', H-6''
5''		149,82 (s)		H-6'', OMe
6''	7,60 (s)	109,0 (d)	C-6''	C-2', C-1'', C-2'', C-4'', C-5'' H-2''
OMe	3,79 (s)	56,8 (q)		C-3'', C-5''

**CLHP-ESI-SM : méthode 10**

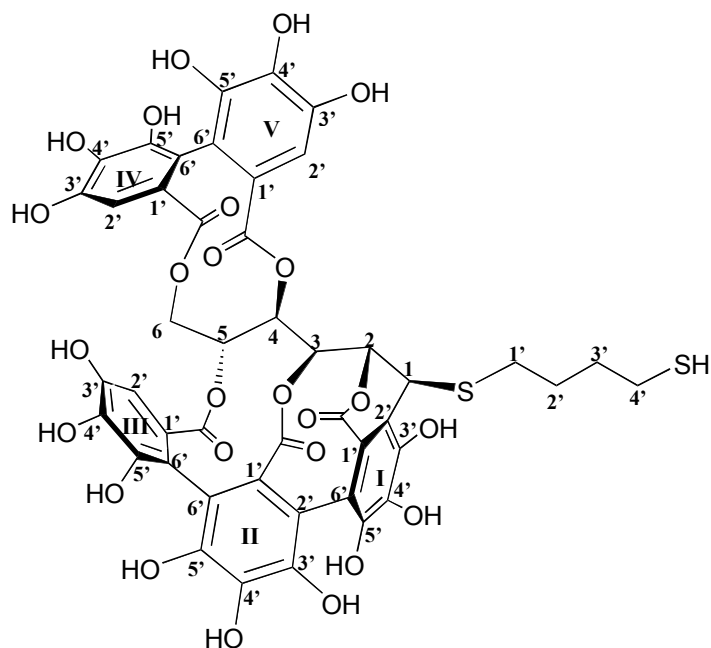
1245	$[M-2H]^-$
915	$([M-H]^- - 331)$
301	$([M-H]^- - 904)$

**SM : m/z (intensité relative) (LSIMS)**

1270 (9,1)	$[M+Na]^+$
1247 (40,7)	$[M]^+$
303 (11,5)	$([M+H]^+ - 942)$

**SMHR : (LSIMS)**    calculé pour  $C_{58}H_{40}O_{32}$  : 1248,1506    trouvé: 1248,150



**4'-butanethiol-1-thioéthervescalagine (105)**Numéro CAS : *nouveau produit* $C_{45}H_{34}O_{25}S_2$   $M = 1038 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 

Poudre amorphe blanche

CLHP : méthode 1

tr : 29,5 min

IR :  $\text{cm}^{-1}$  (pastille KBr)

3374 OH aromatique (bande large)  
1744 C=O ester

 $[\alpha]_D^{22} = -44,6$  [ $c = 0,47$  acétone]RMN solvant : acétone- $d_6$ 

position	$\delta_H$ (mult., $J$ en Hz)	$\delta_C$ (mult.)	HMQC	HMBC
<b>glucose</b>				
1	4,53 (d, 1,9)	43,5 (d)	C-1	C-1', C-1'1, C-2'1, C-3'1 H-2, H-3, H-1'
2	5,26 (s)	76,4 (d)	C-2	C-1, C-3, C-4, C-2'1, C1=O H-4
3	4,70 (d, 6,8)	70,9 (d)	C-3	C-1, C-4, C-5, CII=O H-2, H-4, H-5
4	5,22 (t, 7,3)	69,8 (d)	C-4	C-2, C-5, CV=O H-2, H-3, H-5
5	5,61 (d, 7,1)	71,2 (d)	C-5	C-3, C-4, C-6, CIII=O H-3, H-4, H-6
6	$\alpha$ 3,97 (dd, 12,8 ; 2,1)	65,6 (t)	C-6	C-5, CIV=O
	$\beta$ 5,03 (dd, 12,9 ; 2,2)		C-6	H-6

position	$\delta_H$ (mult., $J$ en Hz)	$\delta_C$ (mult.)	HMQC	HMBC
<b>aromatique</b>				
1 <sub>I</sub>		125,3 (s)		H-1
1 <sub>[II-V]</sub>		125,4 (s), 125,7 (s), 127,4 (s), 128,2 (s)		
2 <sub>I</sub>		117,2 (s)		H-1, H-2
2 <sub>III</sub>	6,74 (s)	109,0 (d)	C-2 <sub>III</sub>	C-3 <sub>III</sub> , C-4 <sub>III</sub> , C-6 <sub>III</sub> , C <sub>III</sub> =O
2 <sub>IV</sub>	6,77 (s)	109,2 (d)	C-2 <sub>IV</sub>	C-3 <sub>IV</sub> , C-4 <sub>IV</sub> , C-6 <sub>IV</sub> , C <sub>IV</sub> =O
2 <sub>V</sub>	6,59 (s)	107,6 (d)	C-2 <sub>V</sub>	C-3 <sub>V</sub> , C-4 <sub>V</sub> , C-6 <sub>V</sub> , C <sub>V</sub> =O
2 <sub>II</sub> et		112,8 (s), 114,38 (s),		
6 <sub>[I-II]</sub>		115,2 (s)		
3 <sub>I</sub>		143,6 (s)		H-1
3 <sub>III</sub>		145,4 (s)		H-2 <sub>III</sub>
3 <sub>IV</sub>		145,53 (s)		H-2 <sub>IV</sub>
3 <sub>V</sub>		145,55 (s)		H-2 <sub>V</sub>
3 <sub>II</sub> et		144,1 (s), 144,51 (s),		
5 <sub>[I-V]</sub>		144,55 (s), 144,59 (s), 144,8 (s), 147,0 (s)		
4 <sub>[I-II]</sub>		134,9 (s), 137,19 (s)		
4 <sub>III</sub>		135,8 (s)		H-2 <sub>III</sub>
4 <sub>IV</sub>		137,11 (s)		H-2 <sub>IV</sub>
4 <sub>V</sub>		136,5 (s)		H-2 <sub>V</sub>
6 <sub>III</sub>		114,5 (s)		H-2 <sub>III</sub>
6 <sub>IV</sub>		116,2 (s)		H-2 <sub>IV</sub>
6 <sub>V</sub>		114,32 (s)		H-2 <sub>V</sub>
<b>carbonyle</b>				
C <sub>I</sub> =O		163,8 (s)		H-2
C <sub>II</sub> =O		164,8 (s)		H-3
C <sub>III</sub> =O		166,2 (s)		H-5, H-2 <sub>III</sub>
C <sub>IV</sub> =O		168,5 (s)		H-6, H-2 <sub>IV</sub>
C <sub>V</sub> =O		166,0 (s)		H-4, H-2 <sub>V</sub>
<b>thiol</b>				
1'	2,91 (t, 7,1)	31,8 (t)	C-1'	C-1, C-2', C-3' H-1, H-2', H-3'
2'	1,85 (m)	33,4 (t)	C-2'	C-1', C-3', C-4' H-1', H-3'
3'	1,79 (m)	33,3 (t)	C-3'	C-2', C-4' H-1', H-2', H-4'
4'	2,71 (t, 7,2)	38,7 (t)	C-4'	C-3' H-2', H-3'

**CLHP-ESI-SM : méthode 10**

1037	[M-H] <sup>-</sup>	518	[M-2H] <sup>2-</sup>
915	([M-H] <sup>-</sup> - 122)	301	([M-H] <sup>-</sup> - 660)
613	(([M-H] <sup>-</sup> - 122) - 302)		

**SM : m/z (intensité relative) (LSIMS)**1061 (59,5) [M+Na]<sup>+</sup>**SMHR : (LSIMS)** calculé pour C<sub>45</sub>H<sub>34</sub>O<sub>25</sub>S<sub>2</sub>Na ([M+Na]<sup>+</sup>) : 1061, 1110 trouvé: 1061,1103

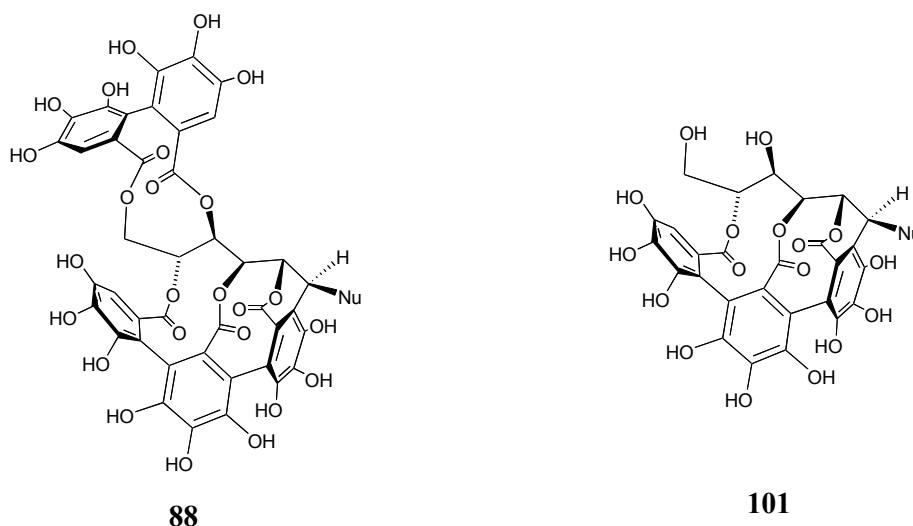




## **CONCLUSION GENERALE**



Au cours de ce travail, le mécanisme postulé pour l'évolution des ellagitannins C-glycosidiques dans le vin a été démontré par la formation de divers produits de substitution nucléophile entre la vescalagine (**55**) et différents nucléophiles. L'hémisynthèse des flavano-ellagitannins **85**, **86**, **89** et **90** a été réalisée en milieu organique par condensation entre la vescalagine (**55**) et la catéchine (**2**) ou l'épicatéchine (**3**). Leur formation a également été montrée en milieu hydroalcoolique modèle du vin.



NuH	Produit obtenu de type 88	Produit obtenu de type 101
sommet 8 de <b>2</b>	acutissimine A ( <b>85</b> )	acutissimine C ( <b>92</b> )
sommet 6 de <b>2</b>	acutissimine B ( <b>86</b> )	acutissimine D ( <b>93</b> )
sommet 8 de <b>3</b>	épicutissimine A ( <b>89</b> )	épicutissimine C ( <b>96</b> )
sommet 6 de <b>3</b>	épiacutissimine B ( <b>90</b> )	épiacutissimine D ( <b>97</b> )
oxygène de l'éthanol	éthylvescalagine ( <b>91</b> )	éthylvescaline ( <b>100</b> )
sommet 8 de <b>102</b>	adduit vescalagine-malvidine ( <b>102</b> )	
soufre d'un thiol	thioéther de la vescalagine	

**Figure 98** : Bilan de tous les composés hémisynthésés

Le mécanisme de formation de ces flavano-ellagitannins est une simple substitution nucléophile unimoléculaire sous catalyse acide. Premièrement la protonation suivi de la déshydratation de l'alcool benzylique de la vescalagine (**55**) conduit à la formation d'un intermédiaire carbocationique commun. Cet intermédiaire subit alors une attaque nucléophile stéréosélective assurant l'orientation- $\beta$  sur le carbone  $C_1$ . La formation de nombreux autres

produits d'addition sur l'intermédiaire carbocationique dérivé de la vescalagine a été démontré au cours de ce travail. L'addition d'éthanol conduisant, par exemple, à la formation de l'éthylvescalagine (**91**).

L'hémisynthèse du premier membre d'une nouvelle famille de composés, les anthocyano-ellagitannins, a été effectuée. Ce nouveau composé est l'adduit vescalagine-malvidine (**103**) qui résulte de la condensation entre la malvidine (**102**) et la vescalagine (**55**) selon un mécanisme de formation identique à celui conduisant aux flavano-ellagitannins. Cet adduit vescalagine-malvidine est coloré et présente un effet bathochrome de 12 nm. La formation d'anthocyano-ellagitannins à partir des anthocyanes natives du raisin, au cours de l'élevage en fûts de chêne des vins rouges, pourrait donc contribuer à l'évolution de la couleur de ces vins rouges.

La présence indiscutable des acutissimines **85**, **86**, **89**, **90** et de l'éthylvescalagine (**91**) dans un vin rouge élevé en fûts de chêne a été démontrée avec des teneurs légèrement inférieures au milligramme par litre. L'identification et la quantification de ces molécules dans un vin élevé en fûts de chêne prouvent que leur mécanisme de formation vérifié en milieu organique et en milieu modèle du vin est bien effectif dans le vin au cours de son élevage. La formation de ces produits dans le vin représente la première hypothèse vérifiée de l'évolution chimique des ellagitannins C-glycosidiques dans les vins.

## Perspectives

Les anthocyano-ellagitannins potentiellement présents dans le vin rouge sont des produits de substitution entre la vescalagine (**55**) et les anthocyanes natives du raisin, principalement, la malvidine-3-*O*-glucoside (**11**). L'obtention de l'adduit vescalagine-malvidine-3-*O*-glucoside devra être réalisée par hémisynhèse en milieu organique pour permettre ainsi son identification, sa quantification et déterminer son influence sur l'évolution de la couleur des vins au cours de leur vieillissement.

Les composés d'oxydation des flavano-ellagitannins devront être étudiés plus précisément. Ces produits d'oxydation de type "camelliatannins" sont probablement présents dans les vins.<sup>128,178</sup> Par exemple l'acutissimine A (**85**) conduirait à la formation de mongolicaine A (**106**) en milieu modèle de vin saturé en oxygène.

Pour affiner les teneurs en flavano-ellagitannins et en éthylvescalagine (**91**) des vins rouges élevés en fût de chêne, la quantification de ces composés devra être reproduite sur des vins provenant d'appellations différentes et ayant des durées de séjour en fûts de chêne différentes. La quantification des acutissimines des séries C et D pourra également être réalisée sur ces vins.

Par analogie avec le cas des acutissimines, la formation de produits résultant d'une attaque nucléophile de procyanidines sur le carbocation **87** est également à envisager. En effet, un tel tannin complexe résultant de la condensation entre la vescalagine (**55**) et la procyanidine B<sub>3</sub> a déjà été isolé dans l'écorce de chêne *Quercus mongolica*.<sup>114</sup>

De même la formation possible d'autres flavano-ellagitannins entre la roburine A (**59**) et les flavan-3-ols du vin devra être envisagée. En effet, le carbocation benzylique dérivant de la roburine A (**59**) est semblable à celui provenant de la vescalagine (**55**). Dans ce cas également un tannin complexe résultant de la condensation de la roburine A (**59**) et de la catéchine (**2**) a déjà été isolé dans le règne végétal.<sup>111</sup>



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**





- (1) Ribéreau-Gayon, P., Interprétation Chimique de la Couleur des Vins Rouges. *Vitis* **1973**, *12*, 119-142.
- (2) Souquet, J. M.; Cheynier, V.; Broussaud, F.; Moutounet, M., Polymeric Proanthocyanidins from Grape Skins. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 509-512.
- (3) Ribéreau-Gayon, P.; Pontallier, P.; Glories, Y., Some Interpretation of Colour Changes in Yong Red Wines During their Conservation. *J. Sci. Food Agric.* **1983**, *34*, 505-516.
- (4) Boulton, R., The Copigmentation of Anthocyanins and its Role in the Color of Red Wine: A Critical Rewiew. *Am. J. Enol. Vitic.* **2001**, *52*, 67-87.
- (5) Moutounet, M.; Rabier, P.; Puech, J. L.; Verette, E.; Barillère, J. M., Analysis by HPLC of Extractible Substances in Oak Wood. Application to a Chardonnay Wine. *Scienc. Alim.* **1989**, *9*, 35-51.
- (6) Haslam, E., Polyphenol-Protein Interaction. *Biochem. J.* **1974**, *139*, 285-288.
- (7) Haslam, E., The Association of Proteins with Polyphenols. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1981**, 309-311.
- (8) McManus, J. P.; Davis, K. G.; Beart, J. E.; Gaffney, S.; Lilley, T. H.; Haslam, E., Polyphenol Interactions. Part1. Introduction; Some Observation on the Reversible Complexation of Polyphenols with Proteins and Polysaccharides. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* **1985**, 1429-1438.
- (9) Bate-Smith, E. C., Astringency in Foods. *Food* **1954**, *23*, 419-429.
- (10) Ricardo Da Silva, J. M.; Rosec, J. P.; Bourzeix, M.; Mourgues, J.; Moutounet, M., Dimer and Trimer Procyanidins in Carignan and Mourvedre Grape and Wines. *Vitis* **1992**, *31*, 55-63.
- (11) Amrani Joutei, K.; Glories, Y.; Mercier, M., Localisation des Tannins dans les Pellicule de Raisin. *Vitis* **1994**, *33*, 133-138.
- (12) Thorngate, J. H.; Singleton, V. L., Localisation of Procyanidins in Grape Seeds. *Am. J. Enol. Vitic.* **1994**, *45*, 259-262.
- (13) Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D. *Traité d'Oenologie 2. Chimie du Vin Stabilisation et Traitements*; Dunod:, **1998**; 163-237.
- (14) Prieur, C.; Rigaud, J.; Cheynier, V.; Moutounet, M., Oligomeric and Polymeric Procyanidins from Grape Seeds. *Phytochemistry* **1994**, *36*, 781-784.
- (15) Hemingway, R.; Foo, L. Y.; Porter, L. J., Linkage Isomerism in Trimeric and Polymeric 2,3-*cis* Procyanidins. *J. Chem. Perkin Trans. I* **1982**, 1209-1216.

- (16) Pecket, R. C.; Small, C. J., Occurrence, Location and Development of Anthocyanoplast. *Phytochemistry* **1980**, *19*, 2571-2576.
- (17) Amrani Joutei, K.; Glories, Y., Tanins et Anthocyanes: Localisation dans la Baies de Raisin et mode d'Extraction. *Rev. Fr. Oenol.* **1995**, *153*, 28-31.
- (18) Leone, A.; La Notte, E.; Gambacorta, G., Gli Antociani Nelle Fasi di Macerazione e di Elaborazione del Vino. L'influenza delle Tecnica Diffusiva sulla loro Estrazione. *Vignevini* **1984**, *4*, 17-25.
- (19) Fong, R. A.; Kepner, R. E.; Webb, A. D., Acetic Acid Acylated Anthocyanin Pigments in the Grape Skins of a Number of Varieties of *Vitis vinifera*. *Am. J. Enol. Vitic.* **1971**, *22*, 150-155.
- (20) Albach, R. F.; Kepner, R. E.; Webb, A. D., Structures of Acylated Anthocyanins in *Vitis vinifera*. *J. Food Sci.* **1965**, *30*, 69-76.
- (21) Brouillard, R.; Dubois, J. E., Mechanism of the Structural Transformation of Anthocyanins in Acidic Media. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 1359-1364.
- (22) Brouillard, R.; Dubois, J. E., Chemistry of Anthocyanin Pigments. 2. Kinetic and Thermodynamic Study of Proton Transfer, Hydration, and Tautomeric Reactions of Malvidin 3-Glucoside. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 8461-8468.
- (23) Brouillard, R.; Delaporte, B.; Dubois, J. E., Chemistry of Anthocyanin Pigments. 3. Relaxation Amplitudes in pH-Jump Experiments. *J. AM. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 6202-6205.
- (24) Glories, Y., La Couleur des Vins Rouges. II. Mesure, Origine et Interprétation. *Conn. Vigne Vin* **1984**, *18*, 253-271.
- (25) Cooper-Driver, G. A.; Bhattacharya, M., Role of Phenolics in Plant Evolution. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1165-1174.
- (26) Cooper-Driver, G. A., Contribution of Jeffrey Harborne and Co-workers to the Study of Anthocyanins. *Phytochemistry* **2001**, *56*, 229-236.
- (27) Winkel-Shirey, B., Biosynthesis of Flavonoids and Effect of Stress. *Current Opinion in Plant Biology* **2002**, *5*, 218-223.
- (28) Boss, P. K.; Davies, C.; Robinson, S. P., Analysis of the Expression of Anthocyanin Pathway Genes in Developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz Grape Berries and the Implication for Pathway Regulation. *Plant. Physiol.* **1996**, *111*, 1059-1066.
- (29) Holton, T. A.; Cornish, E. C., Genetics and Biochemistry of Anthocyanin Biosynthesis. *The Plant Cell.* **1995**, *7*, 1071-1083.

- (30) Somers, T., The Polymeric Nature of Wine Pigments. *Phytochemistry* **1971**, *10*, 2175-2186.
- (31) Timberlake, C. F.; Bridle, P., Interaction between Anthocyanins, Phenolic Compounds and Acetaldehyde and their Significance in Red Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1976**, *27*, 97-105.
- (32) Glories, Y., La Couleur des Vins Rouges. *Comm. Vigne Vin* **1984**, *18*, 195-217.
- (33) Bakker, J.; Timberlake, C. F., Isolation, Identification, and Characterisation of New Color-Stable Anthocyanins Occurring in Some Red Wines. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 35-43.
- (34) Fulcrand, H.; Benabdeljalil, C.; Rigaud, J.; Cheynier, V.; Moutounet, M., A New Class of Wine Pigments Generated by Reaction between Pyruvic Acid and Grape Anthocyanins. *Phytochemistry* **1998**, *47*, 1401-1407.
- (35) Benabdeljalil, C.; Cheynier, V.; Fulcrand, H.; Hakiki, A.; Mosaddak, M.; Moutounet, M., Mise en Evidence de Nouveaux Pigments Formés par Réaction des Anthocyanes avec des Métabolites de Levure. *Sc. Aliments* **2000**, *20*, 203-220.
- (36) Vivar-Quitana, A. M.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J. C., Anthocyanin-derived Pigments and Colour of Red Wines. *Analytica Chimica Acta* **2002**, *458*, 147-155.
- (37) Schwarz, M.; Wabnitz, T. C.; Winterhalter, P., Pathway Leading to the Formation of Anthocyanin-Vinylphenol Adducts and Related Pigments in Red Wines. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3682-3687.
- (38) Mateus, N.; Pascual-Teresa, S.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Santos-Buelga, C.; De Freitas, V., Structural Diversity of Anthocyanin-Derived Pigments in Port Wines. *Food Chem.* **2002**, *76*, 335-342.
- (39) Mateus, N.; Carvalho, E.; Carvalho, A. R. F.; Melo, A.; Gonzalo-Paramas, A. M.; Santos-Buelga, C.; De Freitas, V., Isolation and Structural Characterisation of New Acylated Anthocyanin-Vinyl-Flavanol Pigments Occuring in Aging Red Wines. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 277-282
- (40) Mateus, N.; Silva, A. M. S.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Santos-Buelga, C.; De Freitas, V., A New Class of Blue Anthocyanin-Derived Pigments Isolated from Red Wines. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 1919-1923.
- (41) Atanasova, V.; Fulcrand, H.; Cheynier, V.; Moutounet, M., Effect of Oxygenation on Polyphenol Changes Occuring in th Course of Wine-Making. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *458*, 15-27.

- (42) Beart, J. E.; Lilley, T.; Haslam, E., Polyphenol Interaction. Part2. Covalent Binding of Procyanidins to Proteins during Acid-catalysed Deconposition; Observation on Some Polymeric Ptoanthocyanidins. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* **1985**, 1439-1443.
- (43) Haslam, E., Biogenetically Patterned Synthesis of Procyanidins. *J. Chem.Scc. Chem. Commum.* **1974**, 594-595.
- (44) Haslam, E., *In Vino Veritas* : Oligimeric Procyanidins and the Ageing of Rd Wines. *Phytochemistry* **1980**, *19*, 2577-2592.
- (45) Bate-Smith, E. C., Leuco-anthocyanins. I. Detection and Identification of Anthocyanidins Formed in Plant Tissues. *Biochem. J.* **1954**, *58*, 122-125.
- (46) Matthews, S.; Mila, I.; Scalbert, A.; Pollet, B.; Lapierre, C.; Hervé du Penhoat, C. L. M.; Rolando, C.; Donnelly, D. M. X., Method for Estimation of Proanthocyanidins Based on their Acid Depolymerisation in the Presence of Nucleophiles. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1197-1201.
- (47) Jurd, L., Catechin Flavylum Salt Condensatio Reactions. *Tetrahedron* **1967**, *23*, 1057-1064.
- (48) Somers, T. C., The Polymeric Nature of Wine Pigments. *Phytochemistry* **1971**, *10*, 2175-2186.
- (49) Malien-Aubert, C.; Dangles, O.; Amiot, M. J., Influence of Procyanidins on the Color Stability of Oenin Solution. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3299-3305.
- (50) Liao, H.; Haslam, E., Polyphenol Interactions. Anthocyanins: Co-pigmentation and Colour Changes in Red Wines. *J. SCI; Food Agric.* **1992**, *59*, 299-305.
- (51) Clifford, M. N., Review Anthocyanins-Nature, Occurrence and Dietary Burden. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1063-1072.
- (52) Escribano-Bailon, T.; Dangles, O.; Brouillard, R., Coupling Reaction between Flavylum Ions and Catechin. *Phytochemistry* **1996**, *41*, 1583-1592.
- (53) Remy, S.; Fulcrand, H.; Labarde, B.; Cheynier, V.; Moutounet, M., Frist Confirmation in Red Wine of Products Resulting from Direct Anthocyanin-Tannin Reactions. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 745-751.
- (54) Wildenraldt, H. L.; Singleton, V. L., The Production of Aldehydes as a Result of Oxidation of Phenolic Compounds and its Relation to Wine Ageing. *Am. J. Enol. Vitic.* **1974**, *25*, 119-126.
- (55) Romano, P.; Suzzi, G.; Turbanti, L.; Polsinelli, M., Acetaldehyde Production in *Saccharomyces Cerevisiae* Wine Yeasts. *FEMS Microbiology Letters* **1994**, *118*, 213-218.

- (56) Fulcrand, H.; Doc, T.; Es Safi, N.; Cheynier, V., Study of the Acetaldehyde Induced Polymerisation of Flavan-3-ol by Liquid-Chromatography-Ion Spray Mass Spectrometry. *J. Chromagr.* **1996**, *752*, 85-91.
- (57) Saucier, C.; Guerra, C.; Pianet, I.; Laguerre, M.; Glories, Y., (+)-Catechin-Acetaldehyde Condensation Products in Relation to Wine Ageing. *Phytochemistry* **1997**, *46*, 229-234.
- (58) Saucier, C.; Little, D.; Glories, Y., First Evidence of Acetaldehyde-Flavanol Condensation Products in Red Wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **1997**, *48*, 369-373.
- (59) Fulcrand, H.; Cheynier, V.; Ozmianski, J.; Moutounet, M., An Oxidized Tartaric Acid Residue as a New Bridge Potentially Competing with Acetaldehyde in Flavan-3-ol Condensation. *Phytochemistry* **1997**, *46*, 223-227.
- (60) Atanasova, V.; Fulcrand, H.; Le Guernevé, C.; Cheynier, V.; Moutounet, M., Structure of New Dimeric Acetaldehyde Malvidin 3-glucoside Condensation Product. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 6151-6153.
- (61) Bakker, J.; Picinelli, A.; Bridle, P., Model Wine Solution: Colour and Composition Changes During Ageing. *Vitis* **1993**, *32*, 111-118.
- (62) Escribano-Bailon, T.; Alvarez-Garcia, M.; Rivas-Gonzalo, J.; Heredia, F. J.; Santos-Buelga, C., Color and Stability of Pigments Derived from the Acetaldehyde-Mediated Condensation between Malvidin 3-O-Glucoside and (+)-Catechin. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1213-1217.
- (63) Baranowski, E. S.; Nagel, C. W., Kinetics of Malvidin-3-glucoside Condensation in Wine Model Systems. *J. Agric. Food Chem.* **1983**, *48*, 419-429.
- (64) Dallas, C.; Ricardo-da-Silva, J. M.; Laureano, O., Interactions of Oligomeric Procyanidins in Model Wine Solution Containing Malvidin-3-glucoside and Acetaldehyde. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 2402-2407.
- (65) Dallas, C.; Ricardo-da-Silva, J. M.; Laureano, O., Products Formed in Model Wine Solution Involving Anthocyanins Procyanidin B2 and Acetaldehyde. *J. Sci. Food Agric.* **1996**, *70*, 493-500.
- (66) Es-Safi, N. E.; Fulcrand, H.; Cheynier, V.; Moutounet, M., Studies on the Acetaldehyde-Induced Condensation of (-)-Epicatechin and Malvidin 3-O-Glucoside in a Model Solution System. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 2096-2102.
- (67) Harborne, J. B.; Williams, C. A., Advances in Flavonoid Research since 1992. *Phytochemistry* **2000**, *55*, 481-504.

- (68) Singleton, V. L., Maturation of Wines and Spirits: Comparaison, Facts, and Hypotheses. *Am. J. Enol. Vitic.* **1995**, *46*, 98-115.
- (69) Keller, R., Les Chenes dans le Monde. Les Chênes de Tonnellerie en France: *Quercus petraea* et *Quercus robur*. *J. Int. Sci. Vigne et Vin* **1992**, *Hors Série*, 7-28.
- (70) Chatonnet, P.; Dubourdiou, D., Comparative Study of the Characteristic of American White Oak (*Quercus alba*) and European Oak (*Quercus petraea* and *Q. robur*) for Production of Barrels Used in Barrel Aging of Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1998**, *49*, 79-85.
- (71) Zhentian, L.; Jervis, J.; Helm, R. F., C-Glucoside Ellagitannin from White Oak Heartwood and Callus Tissues. *Phytochemistry* **1999**, *51*, 751-756.
- (72) Chatonnet, P., Principales Origines et Caractéristiques des Chênes Destinés à l'Élevage des Vins. *Rev. Fr. Oenol.* **1995**, *75*, 15-18.
- (73) Mosedale, J. R.; Puech, J. L., Wood Maturation of Distilled Beverages. *Food Science and Technology* **1998**, *9*, 95-101.
- (74) Maga, J. A., The Contribution of Wood to the Flavor of Alcoholic Beverages. *Food Rev. Int.* **1989**, *5*, 39-99.
- (75) Chatonnet, P.; Boidron, J. N., Incidence du Traitement Thermique du Bois de Chêne sur sa Composition Chimique. Evolution de certain Composés en Fonction de l'Intensité de Brûlage. *Connaissance Vigne Vin* **1995**, *23*, 223-250.
- (76) Cadahia, E.; Munoz, L.; Fernandez de Simon, B.; Garcia-Vllejo, C., Chnges in Low Molecular Weight Phenolic Compounds in Spanish, French, and American Oak Woods during Natural Seasoning and Toasting. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1790-1798.
- (77) Fengel, D.; Wegener, G. *Wood: Chemistry, Ultrastruture Reaction.*; Gruyter Ed., **1984**; 319-344.
- (78) Jouin, D.; Tollier, M. T., Lignification of Oak Wood. Lignin Determination in Sapwood and Heartwood. *Cellulose Chem. Technol.* **1988**, *22*, 231-243.
- (79) Monties, B., Composition Chimique des Bois de Chêne: Composés Phénoliques, Relation avec quelques Propriétés Physiques et Chimiques Susceptibles d'Influencer la Qualités des Vins et des Eaux-de -Vie. *Connaissance Vigne Vin* **1987**, *21*, 169-190.
- (80) Puech, J. L., Influence du Bois de Chêne sur les Caractéristiques Analytiques des Eaux-de-Vie. *J. Int. Sci. Vigne et Vin* **1992**, *Hors Série*, 123-134.
- (81) Seikel, M. K., Phenolics of *Quercus rubra* Wood. *Phytochemistry* **1971**, *10*, 2249-2251.

- (82) Nabeta, K.; Yonekubo, J.; Miyake, M., Analysis of Volatile Constituents of European and Japanese Oaks. *Mokuzai Gakkaishi* **1986**, *33*, 408-415.
- (83) Puech, J. L.; Moutounet, M., Liquid Chromatographic Determination of Scopoletin in Hydroalcoholic Extract of Oak Wood and Distilled Alcoholic Beverages. *J. Assoc. Anal. Chem.* **1988**, *71*, 512-514.
- (84) Salagoity, M. H., La Scopolétine: un Marqueur de la Conservation en Fût de Chêne. *J. Int. Sci. Vigne et Vin* **1992**, *Hors Série*, 105-120.
- (85) Black, R.; Rossen, A.; Adam, S., The Chromatographic Separation of Hard -Wood Extractives Components Giving Color Reaction with Phloroglucinol. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 5344-5346.
- (86) Chatonnet, P., Les Composés Aromatiques du Bois de Chêne cédés au Vin. *J. Int. Sci. Vigne et Vin* **1992**, *Hors Série*, 81-91.
- (87) Pallenbach, E.; Scholz, E.; König, M.; Rimpler, H., Pranthocyanidins from *Quercus petraea* Bark. *Planta Med.* **1992**, *59*, 264-268.
- (88) Bate-Smith, E. C., Detection and Determination of Ellagitannins. *Phytochemistry* **1972**, *11*, 1153-1156.
- (89) Okuda, T.; Yoshida, T.; Hatano, T., Classification of Oligomeric Hydrolysable Tannins and Specificity of their Occurrence in Plants. *Phytochemistry* **1993**, *32*, 507-521.
- (90) Quideau, S.; Feldman, K. S., Ellagitannin Chemistry. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 475-503.
- (91) Mayer, M.; Seitz, H.; Jochims, J. C., Die struktur des castalagins. *Liebigs Ann. Chem.* **1969**, *721*, 186-193.
- (92) Mayer, M.; Seitz, H.; Jochims, J. C.; Schauerte, K.; Schilling, G., Schilling G. Struktur des Vescalagins. *Liebigs Ann. Chem.* **1971**, *751*, 60-68.
- (93) Nonaka, G.; Ishimaru, K.; Azuma, R.; Ishimatsu, M.; Nishioka, I., Tannins and Related Compounds. LXXXV. Structures of Novel C-Glycosidic Ellagitannins, Grandinin and Pterocarainins A and B. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 2071-2077.
- (94) Hervé Du Penhoat, C. L. M.; Michon, V. M. F.; Ohassan, A.; Peng, S.; Scalbert, A.; Gage, D., Roburine A, a Dimeric Ellagitannin from Heartwood of *Quercus robur*. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 329-332.
- (95) Hervé Du Penhoat, C. L. M.; Michon, V. M. F.; Peng, S.; Viriot, C.; Scalbert, A.; Gage, D., Structural Elucidation of New Dimeric Ellagitannins from *Quercus robur* L. Roburins A-E. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1991**, 1653-1660.

- (96) Masson, G.; Puech, J. L.; Moutounet, M., Localisation of the Ellagitannins in the Tissues of *Quercus Robur* and *Quercus Petraea* woods. *Phytochemistry* **1994**, *37*, 1245-1249.
- (97) Masson, G.; Moutounet, M.; Puech, J. L., Ellagitannins Content of Oak Wood as a Function of Species and of Sampling Position in the Tree. *Am. J. Enol. Vitic.* **1995**, *46*, 262-268.
- (98) Doussot, F.; De Jéso, B.; Quideau, S.; Pardon, P., Extractives Content in Cooperage Oak Wood during Natural Seasoning and Toasting; Influence of Tree Species, Geographic Location, and Single-Tree Effects. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 5955-5961.
- (99) Dubourdieu, D., Vinification des vins blancs secs en barriques. *J. Int. Sci. Vigne et Vin* **1992**, *Hors Série*, 137-143.
- (100) Scalbert, A.; Monties, B.; Janin, G., Tannins in Wood: Comparaison of Different Estimation Methods. *J. Agri. Food Chem.* **1989**, *37*, 1324-1329.
- (101) Niemetz, R.; Gross, G. G., Galltannin Biosynthesis: Purification of b-Glucogallin: 1,2,3,4,6-Pentagalloyl-b-D-Glucose Galloyltransferase from Sumac Leaves. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 327-332.
- (102) Grundhöfer, P.; Niemetz, R.; Schilling, G.; Gross, G. G., Biosynthesis and Subcellular Distribution of Hydrolysable Tannins. *Phytochemistry* **2001**, *57*, 915-927.
- (103) Niemetz, R.; Gross, G. G., Oxidation of Pentagalloylglucose to the Ellagitannins, Tellimagrandin II, by a Phenol Oxidase from *Tellima grandiflora* Leaves. *Phytochemistry* **2003**, *62*, 301-306.
- (104) Okuda, T.; Yoshida, T.; Hatano, T.; Yazaki, K.; Ashida, M., Ellagitannins of the *Casuarinaceae*, *Stachyuraceae* and *Myrtaceae*. *Phytochemistry* **1982**, *21*, 2871-2874.
- (105) Hatano, T.; Masao, R.; Yoshizaki, M.; Okuda, T., Seasonal Changes in the Tannins of *Liquidambar formosana* Reflecting their Biogenesis. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 2787-2789.
- (106) Moutounet, M.; Rabier, P.; Sarni, F.; Scalbert, A., Les Tannins du Bois de Chêne. Les Conditions de leur Présence dans les Vins. *J. Int. Sci. Vigne et Vin* **1992**, *Hors Série*, 75-79.
- (107) Viriot, C.; Scalbert, A.; Lapierre, C.; Moutounet, M., Ellagitannins and Lignins in Aging of Spirits in Oak Barrels. *J. Agri. Food Chem.* **1993**, *41*, 1872-1879.



- (108) Puech, J. L.; Mertz, C.; Michon, V.; Le Guernevé, C.; Doco, T.; Hervé du Penhoat, C., Evolution of Castalagin and Vescalagin in Ethanol Solution. Identification of New Derivatives. *J. Agri. Food Chem.* **1999**, *47*, 2060-2066.
- (109) Okuda, T.; Yoshida, T.; Ashida, M.; Yazaki, K., Tannins of *Casuarina* and *Stachyurus* species. Part 1. Structure of Pendunculagin, Casuarictin, Strictinin, Casuarinin, Casuariin and Stachyurin. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1983**, 1765-1772.
- (110) Nonaka, G. I.; Nishimura, H.; Nishioka, I., Tannins and Related Compounds. Part 26. Isolation and Structure of Stenophyllanins A, B and C, Novel Tannins from *Quercus stenophylla*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1985**, 163-172.
- (111) Lin, T. C.; Tanaka, T.; Nonaka, G. I.; Nishioka, I.; Young, T. J., Tannins and Related Compounds. CVIII. Isolation and Characterisation of Novel Complex Tannins (Flavano-ellagitannins), Anogeissimin and Anogeissusins A and B from *Anogeissus acuminata* (Roxb ex DC.) Guill. et Perr. var. *lanceolata* Wall. ex Clarke. *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 1144-1147.
- (112) Hatano, T.; Han, L.; Taniguchi, S.; Shingu, T.; Okuda, T.; Yoshida, T., Tannins and Related Polyphenols of Theaceous Plants. VIII. Camelliatannins C and E, New complex Tannins from *Camellia japonica* Leaves. *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 1629-1633.
- (113) Ishimaru, K.; Nonaka, G. I.; Nishioka, I., Tannins and Related Compounds. LV. Isolation and Characterisation of Acutissimins A and B, Novel Tannins from *Quercus* and *Castanea* Species. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 602-610.
- (114) Ishimaru, K.; Ishimatsu, M.; Nonaka, G. I.; Mihashi, K.; Iwase, Y.; Nishioka, I., Tannins and related compounds. LXXII. Isolation and characterisation of Mongolicinanin (Procyanidino-ellagitannin), Mongolinin A, Acutissimin C and Vescalagin carboxylic acid, novel tannins from *Quercus mongolica* and var. *grosserrata*. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 3319-3327.
- (115) König, M.; Scholz, E.; Hartmann, R.; Lehmann, W.; Rimpler, H., Ellagitannins and Complex Tannins from *Quercus petraea* Bark. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 1411-1415.
- (116) Lampire, O.; Mila, I.; Raminosa, M.; Hervé Du Penhoat, H.; Faucher, N.; Laprevote, O.; Scalbert, A., Polyphenols Isolated from the Bark of *Castanea sativa* Mill. Chemical Structure and Auto-Association. *Phytochemistry* **1998**, *57*, 623-631.
- (117) Haslam, E. *Practice Polyphenolics. From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action.*; Cambridge University Press; **1998**; 10-83.

- (118) Viriot, C.; Scalbert, A.; Hervé du Penhoat, C. L.; Moutounet, M., Ellagitannins in Woods of Sessile Oak and Sweet Chestnut Dimerization and Hydrolysis during Wood Ageing. *Phytochemistry* **1994**, *36*, 1253-1260.
- (119) Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M., Electrospray Ionisation-Principles and Practice. *Mass Spectrometry Reviews* **1990**, *9*, 37-70.
- (120) Mueller-Harvey, I., Analysis of Hydrolysable Tannins. *An. Feed Sci. Tech.* **2001**, *91*, 3-20.
- (121) Salminen, J. P.; Ossipov, V.; Haukioja, E.; Pihlaja, K., Characterisation of Hydrolysable Tannins from Leaves of *Betula pubescens* by High-Performance Liquid Chromatography-mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1999**, *864*, 283-291.
- (122) Mammela, P.; Savolainen, H.; Lindroos, L.; Kangas, J.; Vartiainen, T., Analysis of Oak Tannins by Liquid Chromatography-Electrospray Ionisation Mass Spectrometry. *Journal of chromatography A* **2000**, *891*, 75-83.
- (123) Barry, K. M.; Davies, N. W.; Mohammed, C. L., Identification of Hydrolysable Tannins in the Reaction Zone of *Eucalyptus nitens* Wood by High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionisation Mass Spectrometry. *Phytochem. Anal.* **2001**, *12*, 120-127.
- (124) Pelter, A.; Stainton, P.; Johnson, A. P.; Barber, M., The Mass Spectra of HeterocyclesI. The 4-Hydroxy-3-phenylcoumarins (*iso* Flavonols). *J. Heterocyclic Chem.* **1965**, *2*, 256-261.
- (125) Domon, B.; Hostettmann, K., Mass Spectrometric Studies of Underivatized Polyphenolic Glycosides. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 575-580.
- (126) Zywicki, B.; Reemtsma, T.; Jekel, M., Analysis of Commercial Vegetable Tanning Agents by Reversed-Phase Liquid Chromatography-Electrospray Ionisation-Tandem Mass Spectrometry and its Application to Wastewater. *J. Chromatography A* **2002**, *970*, 191-200
- (127) Karplus, M., Vicinal Proton Coupling in Nuclear Magnetic Resonance. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2870-2871.
- (128) Nonaka, G. I.; Sakai, T.; Tanaka, T.; Mihashi, K.; Nishioka, I., Tannins and Related Compounds. XCVII. Structure Revision of C-glycosidic Ellagitannins Castalagin, Vescalagin, Casuarinin and Stachyurin, and Related Hydrolysable Tannins. *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 2151-2156.

- (129) Balas, L.; Vercauteren, J., Extensive High-Resolution Reverse 2D NMR Analysis for the Structural Elucidation of Procyanidin Oligomers. *Magn. Reson. Chem.* **1994**, *32*, 386-393.
- (130) Khan, M. L.; Haslam, E.; Williamson, M. P., Structure and Conformation of the Procyanidin B-2 Dimer. *Magn. Reson. Chem.* **1997**, *35*, 854-858.
- (131) Es-Safi, N. E.; Le Guernevé, C.; Cheynier, V.; Moutounet, M., 2D NMR Analysis for Unambiguous Structural Elucidation of Phenolic Compounds Formed through Reaction between (+)-catechin and Glyoxylic Acid. *Magn. Reson. Chem.* **2002**, *40*, 693-704.
- (132) Davis, A. L.; Cai, Y.; Davis, A. P.; Lewis, J. R., <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR Assignments of some Green Tea Polyphenols. *Magn. Reson. Chem.* **1996**, *36*, 887-890.
- (133) Lin, T. C.; Hsu, F. L., Tannin and Related Compounds from *Terminalia catappa* and *Terminalia parviflora*. *J. Chim. Chem. Soc.* **1999**, *46*, 613-618.
- (134) Chang, G.; Guida, W. C.; Still, W. C., An Internal Coordinated Monte Carlo Method for Searching Conformational Space. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4379-4386.
- (135) Saundres, M.; Houk, K. N.; Wu, Y. D.; Still, W. C.; Lipton, M.; Chang, G.; Guida, W. C., Conformation of Cycloheptadecane. A Comparison of Methods for Conformational Searching. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1419-1427.
- (136) Spartan, v. 5.0. Wavefunction Inc., 18401 Von Karman Ave., Suite 370, Irvine, CA 92612
- (137) Vivas, N.; Laguerre, M.; Glories, Y.; Bourgeois, G.; Vitry, C., Structure Simulation of two Ellagitannins from *Quercus Robur* L. *Phytochemistry* **1995**, *39*, 1193-1199.
- (138) Vivas, N.; Laguerre, M.; Glories, Y., Structure et Propriétés Physico-chimiques des deux Principaux Ellagitannins du Bois de Chêne: Vescalagine et Castalagine. *Actualité Oenologique* **95** **1996**, 442-446.
- (139) Okajima, T., Ab initio MO Investigation on the Reactivity for Electrophilic Substitution of Phenolic with Oxirane and Aziridine, as the Model Compounds of Binding Site of Mutagen. *J. Molar. Struc.* **2001**, *536*, 73-82.
- (140) Yoshida, T.; Ohbayashi, H.; Ishihara, K.; Ohwashi, W.; Haba, K.; Okano, Y.; Shingu, T.; Okuda, T., Tannins and Related Polyphenols of Melastomataceous Plants. I. Hydrolysable Tannins from *Tibouchina semidecandra* Cogn. *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 2233-2240.

- (141) Tominaga, T.; Murat, M. L.; Dubourdiou, D., Development of a Method for Analysing the Volatile Thiols Involved in the Characteristic Aroma of Wine Made from *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon Blanc. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1044-1048.
- (142) Tominaga, T.; Blanchard, L.; Darriet, P.; Dubourdiou, D., A Powerful Aromatic Volatile Thiol, 2-Furanmethanethiol, Exhibiting Roast Coffee Aroma in Wine made from Several *Vitis vinifera* Grape Varieties. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4890-4895.
- (143) Tominaga, T.; Baltenweck-Guyot, R.; Peyrot des Gachons, C.; Dubourdiou, D., Contribution of Volatile Thiols to the Aromas of White Wines Made from Several *Vitis vinifera* Grape Varieties. *Am. J. Enol. Vitic.* **2000**, *51*, 178-181.
- (144) Da Costa, C. T.; Horton, D.; Margolis, S. A., Analysis of Anthocyanins in Food by Liquid Chromatography, Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Capillary Electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **2000**, *881*, 403-410.
- (145) Matsumoto, H.; Hanamura, S.; Kawakami, T.; Sato, Y.; Hirayama, M., Preparative-Scale Isolation of Four Anthocyanin Components of Black Currant (*Ribes nigrum* L.) Fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1541-1545.
- (146) Marston, A.; Borel, C.; Hostettman, K., Separation of Natural Products by Centrifugal Partition Chromatography. *J. Chromatogr.* **1988**, *450*, 91-99.
- (147) Okuda, T.; Yoshida, T.; Hatano, T., Application of Centrifugal Partition Chromatography to Tannins and Related Polyphenols. *J. Liq. Chromatogr.* **1988**, *11*, 2447-2454.
- (148) Shibusawa, Y.; Yanagida, A.; Ito, A.; Ichihashi, K.; Shindo, H.; Ito, Y., High-Speed Counter-Current Chromatography of Apple Procyanidins. *J. Chromatogr. A* **2000**, *886*, 65-73.
- (149) Vitrac, X.; Castagnino, C.; Waffo-Teguo, P.; Delaunay, J. C.; Vercauteren, J.; Monti, J. P.; Mérillon, J. M., Polyphenols Newly Extracted in Red Wine from Southwestern France by Centrifugal Partition Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5934-5938.
- (150) Baldi, A.; Romani, A.; Mulinacci, N.; Vincieri, F. F.; Casetta, B., HPLC/MS Application to Anthocyanins of *Vitis vinifera* L.. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2104-2109.
- (151) Sriram, G.; Surendranath, C.; Sureshkumar, G. K., Kinetics of Anthocyanin Extraction from Fresh and Dried Grape Waste. *Sep. Sci. Tech.* **1999**, *34*, 683-697.

- (152) Glories, Y., Recherche sur la Structure et les Propriétés des Composés Phénoliques Polymères des Vins Rouges. *Conn. Vigne Vin* **1976**, *10*, 51-71.
- (153) Froytlog, C.; Sliemstad, R.; Andersen, O. M., Combination of Chromatographic Techniques for the Preparative Isolation of Anthocyanins - Applied on Blackcurrant (*Ribes nigrum*) Fruit. *J. Chromatogr. A* **1998**, *825*, 89-95.
- (154) Csiktusnadi Kiss, G. A.; Forgacs, E.; Cserhati, T.; Candeias, M.; Vilas-Boas, L.; Bronze, R.; Spranger, I., Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatographic Separation of Pigments of Red Wines. *J. Chromatogr. A* **2000**, *889*, 51-57.
- (155) Fiorini, M., Preparative High-Performance Liquid Chromatography for the Purification of Natural Anthocyanins. *J. Chromatogr. A* **1995**, *692*, 213-219.
- (156) Ito, Y., High-Speed countercurrent Chromatography. *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.* **1986**, *17*, 65-143.
- (157) Foucault, A.; Rosset, R., La Chromatographie à Contre-Courant. *Analisis* **1988**, *16*, 157-167.
- (158) Foucault, A. P.; Chevoley, L., Counter-Current Chromatography: Instrumentation, Solvent Selection and some Recent Applications to Natural Product Purification. *J. Chromatogr. A* **1998**, *808*, 3-22.
- (159) Van Buel, M. J.; Van der Wielen, L.; Luyben, K., Pressure Drop in Centrifugal Partition Chromatography. *J. Chromatogr. A* **1997**, *773*, 1-12.
- (160) Van Buel, M. J.; Van der Wielen, L.; Luyben, K., Modelling Gradient Elution in Centrifugal Partition Chromatography. *J. Chromatogr. A* **1997**, *773*, 13-22.
- (161) Marchal, L.; Foucault, A.; Patissier, G.; Rosant, J. M.; Legrand, J., Influence of Flow Patterns on Chromatographic Efficiency in Centrifugal Partition Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2000**, *869*, 339-352.
- (162) Delaunay, J. C.; Castagnino, C.; Chèze, C.; Vercauteren, J., Preparative Isolation of Polyphenolic Compounds from *Vitis vinifera* by Centrifugal Partition Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2002**, *964*, 123-128.
- (163) Renault, J. H.; Thépenier, P.; Zèches-Hanrot, M.; Le Men-Olivier, L.; Durand, A.; Foucault, A.; Margraff, R., Preparative Separation Of Anthocyanins by Gradient Elution Centrifugal Partition Chromatography. *J. Chromatogr. A* **1997**, *763*, 345-352.
- (164) Di Stefano, R.; Guidoni, S., XAD 2 Resin in Separation of Phenolics. *Vitis* **1990**, *29*, 71-78.

- (165) Degenhardt, A.; Knapp, H.; Winterhalter, P., Rapid Isolation of Malvidin-3-glucoside from Red Wine by High Speed Counter-Current Chromatography (HSCCC). *Vitis* **2000**, *39*, 43-44.
- (166) Glabgen, W. E.; Seitz, H. U.; Metzger, J. W., High Performance Liquid Chromatography/Electrospray Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry of Anthocyanins from Plant Tissue, Cell Tissue and Cell Cultures of *Daucus carota* L.. *Biol. Mass Spectrom.* **1992**, *21*, 271-277.
- (167) Pedersen, A. T.; Andersen, O. M.; Aksnes, D. W.; Nerdal, W., NMR of Anthocyanins: Assignments and Effects of Exchanging Protons. *Magn. Reson. Chem.* **1993**, *31*, 972-976.
- (168) Kosir, I. J.; Kidric, J., Use of Modern Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Wine Analysis: Determination of Minor Compounds. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *458*, 77-84.
- (169) Hunter, M. D.; Forkner, R. E., Hurricane Damage Influences Foliar Polyphenolics and Susequent Herbivory on Surviving Trees. *Ecology* **1999**, *80*, 2676-2682.
- (170) Abou-Zaid, M. M.; Nozzolillo, C., 1-O-galloyl-a-L-rhamnose from *Acer rubrum*. *Phytochemistry* **1999**, *52*, 1629-1631.
- (171) Hartzfeld, P. W.; Forkner, R.; Hunter, M. D.; Hagerman, A. E., Determination of Hydrolysable Tannins (Gallaotannins and Ellagitannins) after Reaction with Potassium Iodate. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1785-1790.
- (172) De Freitas, V., Recherches sur les Tannins Condensés: Application à l'Etude des Structures et Propriétés des Procyanidines du Raisin et Vin. Thèse de doctorat, Bordeaux 2, **1995**.
- (173) De Freitas, V.; Glories, Y.; Bourgeois, G.; Vitry, C., Characterisation of Oligomeric and Polymeric Procyanidins from Grape Seeds by Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1435-1441.
- (174) Mirabel, M., Caractéristiques Chimiques et Organoleptiques des Tannins des Raisins de *Vitis vinifera* Var. Merlot et Carbernet Sauvignon Issus de Différents Terroirs Bordelais. Thèse de doctorat, Bordeaux 2, **2000**.
- (175) Salminen, J. P.; Ossipov, V.; Haukioja, E.; Pihlaja, K., Seasonal Variation in the Content of Hydolysable Tannins in Leaves of *Betula pubescens*. *Phytochemistry* **2001**, *57*, 15-22.
- (176) Cheynier, V.; Moutounet, M.; Sarni-Manchado, P. *Oemologie. Fondements Scientifiques et Technologiques.*; Lavoisier., **1998**; 125-162.

- (177) Han, L.; Hatano, T.; Yoshida, T.; Okuda, T., Tannins of Theaceous Plants. V. Camelliatannins F, G and H, Three New Tannins from *Camellia japonica* L.. *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, *42*, 1399-1409.
- (178) Kashiwada, Y., Antitumor Agent, 129. Tannins and Related Compounds as Selective Cytotoxic Agents. *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 1033-1043.
- (179) Scalbert, A.; Duval, L.; Peng, S.; Monties, B.; Hervé Du Penhoat, C., Polypjenols of *Quercus robur* L. II. Preparative isolation by low-pressure and hig-pressure liquid chromatography of heartwood ellagitannins. *J. Chromatogr.* **1990**, *502*, 107-119.
- (180) Hatano, T., Yoshida, T., Hemingway, R.W., In *Plant Polyphenols 2: Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology*; Gross, G.G., Heminqway, R.W., Yoshida, T., Eds., Kluwer Academic/Plenum Publishers : New York, NY, **1999**, 509-526.
- (181) De Bruyne, T., Pieters, L., Dommissse, R., Kolodziej, H., Wray, V., Vanden Berghe, D., Vlietinck, A., In *Plant Polyphenols 2: Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology*; Gross, G.G., Heminqway, R.W., Yoshida, T., Eds., Kluwer Academic/Plenum Publishers : New York, NY, **1999**, 193-209.