N° d'ordre : **3891**

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

par **Melle Sandy FABRE**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : **CHIMIE ORGANIQUE**

****

De la synthèse de procyanidines à leur quantification dans les baies de raisins et le vin

****

Soutenue le : 7 décembre 2009

Après avis de :

M. Laurent EL KAIM	Professeur-Paris	**Rapporteur**
Mme Hélène FULCRAND	Directeur de Recherches INRA-Montpellier	**Rapporteur**

Devant la commission d'examen formée de :

M. Victor DE FREITAS	Professeur-Porto	**Président**
Mme Hélène FULCRAND	Directeur de Recherches INRA-Montpellier	**Rapporteur**
M. Laurent EL KAIM	Professeur-Paris	**Rapporteur**
M. Pierre-Louis TEISSEDRE	Professeur-Bordeaux	**Examinateur**
M. Eric FOUQUET	Professeur-Bordeaux	**Directeur**
Mme Isabelle PIANET	Ingénieur de recherche CNRS- Bordeaux	**Directrice**
Mme Christiane VENENCIE	Directrice du Département Qualité Recherche -Baron Philippe de Rothschild S.A.	**Invitée**

- 2009 -

Remerciements

Je tenais tout d'abord à remercier Madame Hélène Fulcrand, directeur de recherche à l'INRA de Montpellier et Monsieur Laurent El Kaïm, enseignant-chercheur à l'ENSTA à Paris pour avoir accepté de juger mon manuscrit de thèse et surtout pour m'avoir délivré le précieux sésame. Merci également au Docteur Victor de Freitas d'être venu depuis Porto pour assister à ma soutenance et d'avoir endossé, de plus, le rôle de président du jury. Finalement je remercie le docteur Christiane Venencie et le professeur Pierre-Louis Teissedre, d'avoir bien voulu faire partie des membres du jury en plus de leur aide tout au long de ma thèse.

Je tiens aussi à remercier le Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux (CIVB) qui a soutenu financièrement ces recherches.

Je ne peux couper à un grand merci à mes deux directeurs de thèse, Eric et Isabelle, sans qui je ne rédigerais pas ces remerciements en ce moment. Merci pour m'avoir fait confiance en me proposant cette thèse et pour m'avoir soutenue et supportée pendant un peu plus de trois ans. J'ai surtout apprécié votre grande disponibilité et la liberté que vous m'avez accordée.

Eric, depuis que je te connais (9 ans maintenant !!!!), je t'avais toujours dit ne pas vouloir faire de thèse… je peux maintenant te dire que je n'ai aucun regret de m'être engagée dans cette aventure. Cela n'a bien sûr pas été le cas tous les jours mais maintenant que c'est fini je suis ravie de t'avoir fait confiance. Merci d'être comme tu es, même si des fois on a envie de t'étrangler… Heureusement qu'à ces moments, tu étais là, Isabelle. Finalement, vous faites un très bon binôme tous les deux !!!!!

Sans collaboration, cette thèse n'aurait pu être réalisée et je tenais ici à remercier les différents acteurs. Suite à une thèse précédente sur la même thématique, la société Baron Philippe de Rothschild a accepté de renouveler la collaboration. Je remercie notamment Christiane Venencie, directrice du laboratoire recherche et Robin Mathias, responsable laboratoire viticole et expérimentations pour leur gentillesse et leur aide précieuse. Une dédicace spéciale aux 27 072 grains de raisins que j'ai dû sacrifier pour la science.

Une importante partie du travail de cette thèse a été réalisée dans le laboratoire chimie appliquée de la faculté d'œnologie. Je tenais ici à remercier le professeur Teissedre d'avoir accepté cette collaboration et de m'avoir accueillie dans son laboratoire. Un grand merci également à tous les membres, passés et présents, du labo pour leur accueil et leur gentillesse et qui ont fait que je m'y suis sentie comme dans mon propre labo.

Je ne peux pas oublier ici de remercier toutes les personnes du CESAMO qui font que le travail de chaque chimiste organicien ne serait rien sans eux. Enormes mercis à Claire, Christiane, et Christelle, les trois massistes de l'ISM. Je tenais vraiment à vous remercier pour votre travail, votre aide et votre gentillesse tout au long de ces trois années. Il y a la RMN aussi… pas facile en ce qui concerne mes charmants polyphénols. Merci à Jean-Claude Lartigue et Jean-Michel Lasnier pour avoir, chacun votre tour, aider à gérer ce service indispensable, bien que nous clients, soyons extrêmement exigeants, voire impossibles. Noël, je tenais à te décerner un remerciement personnalisé, car en plus de ton aide indispensable en RMN, j'ai

beaucoup aimé ton enthousiasme et nos discussions. Il arrive même, parfois, que grâce à ton travail on se remette à croire au Père Noël !

La majeure partie de ce travail a été réalisée au sein du laboratoire de synthèse et molécules bioactives de l'ISM. Un laboratoire universitaire, c'est tous les ans des départs et de nouvelles arrivées. Que tous les membres actifs ou passifs soient remerciés. Il m'est impossible de tous vous remercier sans en oublier certains donc voici un extrait non exhaustif.

Eric et Jürgen, vous n'étiez pas là au début mais votre arrivée a marqué un grand tournant pour moi. Un immense merci pour tout. Votre présence aussi bien au labo qu'à l'extérieur m'a été indispensable et m'a aidée à un point inimaginable. Isabelle, merci pour ton initiation à la vie du labo et aux polyphénols. Julie, Redouane et Damien, nous avons débuté et fini ces trois ans ensemble, merci pour tous ces souvenirs. Géraldine, tu n'es pas restée assez longtemps à mon goût mais merci pour tous les bons moments que nous avons partagés en espérant qu'il y en aura plein d'autres. Magali, merci pour ton soutien et tes discussions, cela m'a beaucoup aidée.

Un grand merci à mes quatre chers stagiaires, Greg, Emeline, Aude et Ludivine. Je regrette de ne pas avoir pu vous consacrer plus de temps à chacun mais j'espère que cette expérience vous a apportée autant qu'à moi.

Un grand merci également à Muriel, Marie-Hélène et Delphine pour leur aide indispensable de tous les jours.

Une spéciale dédicace à Anil, notre professeur indien préféré. Merci pour les excellents moments passés en France mais surtout pout ton accueil en Inde !!!!

Merci également aux nouveaux que je n'ai pas côtoyés longtemps mais que j'espère apprendre à connaître plus.

Une thèse c'est du travail personnel mais c'est avant tout trois ans de vie avec tout ce qui va avec : joies, rires, fêtes, colocations, discussions, partages, voyages, (…) Que tous ces participants en soient remerciés ici. Je ne voudrais oublier personne mais vu que ce n'est pas une tache facile, je ferai un remerciement global à toutes les personnes qui :

- ont été à mes côtés pendants ces trois années

- n'ont jamais trop compris tout ce que je faisais pendant ces années mais qui m'ont quand même soutenue

- ont cru en moi... quand je ne me sentais pas capable

- m'ont encouragée pendant ces années...sans vous je n'aurais pas terminé

- ont relu et corrigé ce travail... parce que franchement, c'est mieux après…

- ont été avec moi le 7 décembre, dans la salle ou en pensée... c'est grâce à vous tous que je ne suis pas partie en courant.

Merci enfin à toute ma famille, de m'avoir supportée et aidée malgré mon manque indiscutable de visite.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS **1**

AVANT PROPOS **4**

INTRODUCTION GENERALE **5**

I. GENERALITES SUR LE VIN, LE RAISIN ET LES PROCYANIDINES **7**

I.1 LE VIN ET SES PROPRIETES 7

I.1.1. Matière première : le raisin *7*

I.1.2. De la vigne au vin : la vinification et l'élevage *8*

I.1.3. Le vin : Composition *9*

I.1.4. Propriétés organoleptiques *11*

I.1.5. Effets sur la santé *12*

I.2 LES POLYPHENOLS ET LES TANINS : CLASSIFICATION ET DEFINITION 13

I.3 LES PROCYANIDINES 16

I.3.1. Structures *16*

I.3.2. Effets potentiels sur les plantes *19*

I.3.3. Effets potentiels sur la santé *19*

I.4 LES PROCYANIDINES DANS LA VIGNE 19

I.4.1. Biosynthèse *20*

I.4.2. Composition *24*

I.5 LES PROCYANIDINES DANS LE VIN 31

I.5.1. Composition *31*

I.5.2. Evolution dans le vin *31*

I.5.3. Propriétés supramoléculaires des tanins *34*

I.5.4. Interaction avec les protéines *36*

II. SYNTHESE DE PROCYANIDINES **39**

II.1 SYNTHESE DE PROCYANIDINES DANS LA LITTERATURE 39

II.1.1. Couplage entre unités non protégées *39*

II.1.2. Couplages entre unités protégées *43*

II.1.3. Synthèse d'oligomères supérieurs *55*

II.1.4. Synthèse des dimères gallates *59*

II.2 VOIE DE SYNTHESE UTILISEE POUR LA SYNTHESE DES STANDARDS....63
II.2.2. Préparation des dimères....63
II.2.3. Préparation des trimères et du tétramère....65
II.2.4. Etape de déprotection....67
II.3 UNE NOUVELLE SYNTHESE DES PROCYANIDINES GALLATES....69
II.3.1. Synthèse du précurseur....69
II.3.2. Synthèse des dimères : couplage catalysé....71
II.4 VERS LA SYNTHESE DE PROCYANIDINES 4-6....73
II.4.2. Couplage par addition nucléophile....74
II.4.3. Couplage par substitution nucléophile....81
II.5 NOUVELLE APPROCHE DE COUPLAGE : LA CATALYSE A L'OR....89
II.5.1. La catalyse à l'or : Introduction....89
II.5.2. Etude préliminaire : Benzylation de dérivés aromatiques....90
II.5.3. Etudes préliminaires : substitution d'alcool benzylique....92
II.5.4. Synthèse des dimères :....95
II.5.5. Catalyse à l'or, une voie d'accès aux liaisons 4-6....97
II.6 PARTIE EXPERIMENTALE....101

III. CARACTERISATION ET QUANTIFICATION DES PROCYANIDINES DU VIN ET DES RAISINS....137

III.1 BIBLIOGRAPHIE....138
III.1.1. Extraction des procyanidines à partir du raisin et du vin....138
III.1.2. Séparation des procyanidines par chromatographie....138
III.2 MATERIEL ET METHODES....140
III.2.1. Conditions expérimentales générales....140
III.2.2. Echantillons....140
III.2.3. Quantifications des procyanidines par CLHP....144
III.2.4. Comportement colloïdal des composés galloylés....146
III.3 RESULTATS ET DISCUSSION....149
III.3.1. Extraction des procyanidines des raisins....149
III.3.2. Mise au point de la méthode de dosage en CLHP....154
III.3.3. Suivi de la maturité des raisins....160
III.3.4. Evolution dans le moût et le vin au cours de la vinification....171
III.3.5. Analyse colloïdale des tanins : analyse des gallates....176
III.4 CONCLUSION....182

IV. ISOLATION ET CARACTERISATION D'UN NOUVEAU COMPOSE DES VINS ROUGES 185

IV.1 MISE EN EVIDENCE DU COMPOSE ET CARACTERISATION 185

IV.1.1. Mise en évidence par CLHP 185

IV.1.2. Caractérisation par spectrométrie de masse 187

IV.1.3. Purification du composé 188

IV.1.4. Caractérisation par spectrométrie de masse haute résolution 189

IV.1.5. Caractérisation par RMN 191

IV.1.6. Synthèse du composé : approche rétrosynthétique 192

IV.2 INDOLE ET VIN 193

IV.2.1. Bibliographie 193

IV.2.2. Aspect quantitatif du composé isolé dans les vins 194

IV.2.3. Influence sensorielle possible sur le vin 197

V. CONCLUSION GENERALE 199

ANNEXES 203

ANNEXE 1 : EVOLUTION DANS LES PEPINS EN 2006 204

ANNEXE 2 : EVOLUTION DANS LES PEPINS EN 2007 205

ANNEXE 3 : EVOLUTION DANS LES PELLICULES EN 2006 206

ANNEXE 4 : EVOLUTION DANS LES PELLICULES EN 2007 207

ANNEXE 5 : EVOLUTION DANS LES MOUTS ET LES VINS EN 2007 208

ANNEXE 6 : CONCENTRATIONS DES PEPINS – COMPARAISON AVEC LA LITTERATURE 209

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 211

Liste des abréviations

°C	Degré celsius
µAu	Micro-unité d'aire
µl	Microlitre
µm	Micromètre
µs	Microseconde
A	Groupe activant
Å	Ångström
Ac	Acétate
AcOEt	Acétate d'éthyle
Ar	Aromatique
Bn	Benzyle
Cat.	Catalytique
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
cm	Centimètre
COSY	COrrelated SpectroscopY
Cq	Carbone quaternaire
d	Doublet
Da	Dalton
DCC	1,3-dicyclohexylcarbodiimide
dd	Doublet de doublet
DDPH	diphenyl-2-picrylhydrazyl
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DEPT	Distorsionless Enhancement by Polarisation Transfert
DIBAL-H	Hydrure de diisobutylaluminium
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DMF	N,N-diméthylformamide
DMTSF	Diméthyl(méthylthio)sulfonium
DOSY	Diffusion-Ordered SpectroscopY
DPm	Degré de polymérisation moyen
EE	Ethyle éthyl éther
éq.	Equivalent
EI	Impact Electronique
ESI	ElectroSpray Ionisation
Et	Ethyle
EtOH	Ethanol
g	Gramme
G	Gallate
GC	Chromatographie gazeuse
h	Heure

HMBC	Heteronuclear Muliple Bond Connectivity
HMQC	Heteronuclear Muliple Quantum Coherence
HRMS	Spectrométrie de masse haute résolution
Hz	Hertz
IR	Infrarouge
J	Constante de couplage
kg	Kilogramme
l	Litre
LC	Chromatographie liquide
LSIMS	Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry
M	Mole.l^{-1}
m	Multiplet
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation
Me	Méthyle
MeOH	Méthanol
mg	Milligramme
MHz	Mégahertz
min	Minute
ml	Millilitre
mM	Millimole.l^{-1}
mm	Millimètre
MS	Spectrométrie de masse
NBS	N-bromosuccinimide
*n*BuLi	*n*-butyllithium
NIS	N-iodosuccinimide
nm	Nanomètre
NMMO	Oxyde de N-Méthylmorpholine
NOE	Nuclear Overhauser Effect
Nu	Nucléophile
P	Groupe protecteur
Ph	Phényle
ppm	Partie par million
q	Quadruplet
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROESY	Rotating Overhauser Enhancement SpectroscopY
s	Singulet
SN2	Substitution nucléophile d'ordre 2
T	Tesla
t	Triplet
ta	Température ambiante
TBDMS	*Tert*butyldiméthylsilyl
*tert*BuLi	*Tert*butyllithium
THF	Tétrahydrofurane
TMS	Tétraméthylsilane

TMSOTf	Triméthylsilyl triflate
TPAP	Perruthénate de tétrapropylammonium
Ts	Tosyle
TSP	2,2,3,3-acide-3-triméthylsilylpropionique
UV	Ultra Violet
v	Volume
X	Halogène
$Yb(OTf)_3$	Ytterbium triflate

Avant propos

Depuis des millénaires, la vigne et le vin ont marqué de leur empreinte les civilisations. Non seulement ils ont modelé les paysages et favorisé le commerce mais ils ont également contribué à forger des mythologies et des religions ainsi que des traditions et des habitudes alimentaires. L'histoire du vin a des origines si anciennes que ce breuvage est mentionné dans les premiers écrits connus ; ainsi la plus ancienne œuvre littéraire, un récit babylonien datant de 4000 ans, parle déjà du vin. Dans la Bible, la culture de la vigne est attribuée à Noé, le premier agriculteur : « Il planta une vigne et il en but le vin » (Genèse, Ancien Testament).

La viticulture apparaît, quant à elle, avec le passage progressif de la vigne sauvage à la vigne cultivée, vraisemblablement au septième millénaire avant notre ère. La vigne aurait fait son apparition dans le Caucase et la Mésopotamie et aurait été domestiquée par les peuples d'Asie occidentale : Sumériens, Babyloniens et Assyriens. Le bassin méditerranéen, où la culture de la vigne s'est pleinement épanouie sous l'impulsion des Grecs et des Romains, est le berceau de la civilisation du vin.

En France, le premier vignoble a été implanté à Massilia, l'actuelle Marseille, 600 ans avant J.C. La vigne y a été importée par les Phocéens, mais ce sont les Romains qui ont répandu sa culture à travers toute la Gaule. Ces mêmes Gaulois ont d'ailleurs amélioré les procédés de vinification par le vieillissement en fûts de chêne. Pourtant c'est au Moyen-âge qu'est apparu le vin tel que nous le connaissons aujourd'hui car auparavant il était coupé d'eau et agrémenté d'herbes, de miel et d'aromates.

L'histoire du vin se confond en partie avec celle des civilisations occidentales. Le vin, synonyme de convivialité, d'art de vivre et d'ivresse, a toujours été chargé d'une valeur symbolique, voire d'un sens religieux. Aujourd'hui, il est devenu un des emblèmes de la culture française, de ses traditions et de sa gastronomie.

Introduction générale

En dehors de leurs aspects religieux et culturel, le vin et la vigne ont fait l'objet de nombreuses recherches scientifiques depuis la fin du XIX ème siècle. En effet, un grand nombre d'équipes s'est intéressé à l'œnologie afin d'améliorer les qualités organoleptiques du précieux breuvage. En essayant d'appréhender les qualités et les défauts du vin, mais en saisissant aussi ses propriétés, l'œnologie a permis de mieux le comprendre et donc de l'améliorer. La science de la viticulture a, quant à elle, permis d'optimiser la production en s'intéressant à la vigne. Elle a rendu possible la lutte contre les maladies (virus, parasites, agents pathogènes…) ainsi qu'une amélioration de la vigne par l'adaptation des variétés (croisement, génome…), contribuant ainsi à bonifier le vin qui en est issu.

A l'exception du caractère gustatif, qui suscite toujours un grand intérêt de la part des scientifiques, le vin est source d'attentions particulières en raison de ses propriétés bénéfiques pour la santé. Ce dernier aspect est d'ailleurs à l'origine du concept de « french paradox », largement attribué aux polyphénols, un des nombreux groupes de molécules qui le composent. Les polyphénols du vin, également responsables de sa couleur et de son goût, sont à l'origine de cette thèse. Ils peuvent être subdivisés en plusieurs groupes, dont les procyanidines auxquelles nous allons nous intéresser plus particulièrement.

Une étude plus spécifique concernant certaines de ces procyanidines a donc été entreprise afin de mieux caractériser ces molécules et d'en étudier l'évolution dans la vigne et le vin. Pour cela, la première étape du travail, qui sera présentée dans le deuxième chapitre de ce manuscrit, a été de réaliser leur synthèse chimique.

Leur analyse quantitative, au sein des raisins et du vin, ainsi que l'étude des propriétés supramoléculaires de certaines procyanidines, seront développées dans le troisième chapitre.

Au cours des études quantitatives, un nouveau composé, de structure indolique, a pu être identifié et isolé dans des vins rouges. Sa caractérisation ainsi que ses possibles « influences organoleptiques » feront l'objet du quatrième et dernier chapitre.

Avant d'aborder ces aspects, nous aurons discuté, dans le premier chapitre, de l'état actuel des connaissances relatives au vin, au raisin et plus précisément aux procyanidines.

I. Généralités sur le vin, le raisin et les procyanidines

I.1 Le vin et ses propriétés

Selon la définition légale élaborée lors du conseil européen du 17 mai 1999, le vin est « le produit obtenu exclusivement par la fermentation alcoolique, totale, ou partielle, de raisins frais, foulés ou non, ou de moûts de raisins ».

I.1.1. Matière première : le raisin

Le raisin, à l'origine même du vin, provient de la vigne et se présente sous forme de grappes composées de baies. La vigne, de la famille des Vitacées, est composée de nombreuses espèces dont la plus reconnue et la plus cultivée est *Vitis vinifera* à l'origine de très nombreux cépages parmi lesquels le cabernet, le chardonnay, le merlot, le pinot…. La baie de raisins se consomme, en tant que fruit, telle quelle ou sous forme séchée, mais sa valorisation la plus importante économiquement est la confection de vins et alcools, *via* la fermentation de son jus. La grappe de raisins est constituée de quatre parties distinctes[1] :

- les rafles (3 à 6 % de la grappe) qui, rattachées aux sarments de la vigne, forment la charpente de la baie.
- la pellicule (7 à 10%) de couleur blanche (verdâtre, jaunâtre, jaune doré) ou rouge (rose ou noir-violet).
- les pépins (0 à 6%) localisés au centre de la baie.
- la pulpe (83 à 91%) pratiquement toujours incolore quelque soit la nature du cépage (rouge ou blanc) à l' exception des cépages teinturiers.

Les compositions moyennes sont présentées sur le Tableau I.1 ci-dessous. La pulpe, qui est le constituant principal du moût, possède la même composition que ce dernier : une forte concentration en eau et en glucides. Les pellicules, seules à contenir les anthocyanes, substances colorantes, contiennent aussi des substances aromatiques. Nous pouvons noter également que ce sont les pépins qui contiennent la proportion la plus importante de tanins.

	Rafles	Pellicules	Pépins	Pulpe
Eau	78-80	78-80	25-45	70-85
Glucides	0,5-1,5	-	34-36	14-25
Acides organiques	0,5-1,6	0,8-1,6	-	0,9-2,7
Anthocyanes	-	0-0,5	-	-
Tanins	2-7	0,4-3	4-10	< 0,05
Composés azotés	1-1,5	1,5-2	4-6,5	0,6-0,7
Minéraux	2-2,5	1,5-2	2-4	<0,3
Lipides	-	-	13-20	-

D'après Cabanis et al.[1] ; Quantités exprimées en % de poids frais

Tableau I.1

I.1.2. <u>De la vigne au vin : la vinification et l'élevage</u>

I.1.2.1. ***<u>La vinification</u>*** [2]

Dans cette partie nous nous intéresserons uniquement à la vinification des vins rouges. Il existe de nombreuses façons de faire du vin, qui dépendent du type de vin recherché ou encore des régions. La description qui suit est seulement générale et ne rentre pas dans les détails.

La vendange des raisins à maturité constitue la première étape du processus. Les grappes sont ensuite égrappées et foulées, puis la vendange est mise en cuve. La fermentation alcoolique, qui consiste en la transformation par les levures du sucre en alcool éthylique et en dioxyde de carbone, est alors effectuée. La macération est conduite simultanément et ces deux étapes peuvent durer entre 3 et 21 jours. Le contenu de la cuve est divisé en deux phases :

- une phase liquide, le moût, constitué par le jus fermenté des raisins, qui se transforme en vin au fur à mesure de la disparition des sucres.
- une phase solide, le marc, constitué par la pulpe et les parties solides des baies de raisins (les pépins, les pellicules et les rafles si elles n'ont pas été préalablement triées).

Au cours de la macération, le vinificateur procède à des remontages. Cette opération consiste à prélever le jus en bas de cuve et de le reverser par-dessus le chapeau constitué par le marc afin de favoriser l'extraction des composés phénoliques. Une fois cette étape terminée, le vinificateur procède à l'écoulage pour séparer le vin du marc et le

placer dans une cuve : c'est le vin de goutte. Le marc est alors pressuré et le vin extrait est mis dans une cuve différente. Ce liquide extrait à partir du marc, appelé vin de presse, est également vinifié de son côté. Il pourra être rajouté au vin de goutte en quantité plus ou moins importante au moment de l'assemblage.

L'étape suivante est la fermentation malolactique qui se produit naturellement grâce à des bactéries lactiques. Celles-ci, dont la principale est Œ*nococcus oeni*, vont transformer l'acide malique en acide lactique qui possède une acidité moindre. Il arrive parfois que cette étape ne se déclenche pas ou mette trop de temps à se déclencher. Dans ces cas-là, des bactéries exogènes sont alors rajoutées. A la fin de cette fermentation, qui dure 10 jours environ, le vin est placé dans des fûts en chêne ou des cuves où va s'effectuer l'élevage. Entre ces deux étapes, il est possible que le vinificateur procède à un assemblage préliminaire en mélangeant certaines de ces cuves.

I.1.2.2. ***L'élevage***

L'élevage du vin est une étape essentielle dans l'élaboration du produit final. Elle se situe entre la fin des fermentations et la mise en bouteille.

Son objectif est principalement, selon les types d'élevage, d'aider à la clarification du vin en éliminant ses impuretés par les opérations de soutirage, de faire évoluer ses arômes par le vieillissement et de compléter sa structure par l'apport de tanins externes (tanins du bois) dans le cas d'élevage en barrique. L'élevage peut s'effectuer en cuve où le vin garde mieux son côté fruité ou en barrique de chêne où le vin s'enrichit des tanins contenus dans le bois et opère une très lente oxydation au travers des parois. L'élevage peut durer entre quelques mois et 18 mois, voire même 24 mois dans certains cas, avant d'être suivi d'un assemblage. C'est le moment où l'œnologue exerce son art pour marier les cépages afin d'obtenir un vin riche et harmonieux.

I.1.3. **Le vin : Composition**

Le vin[3] est un mélange complexe et l'étude de sa composition chimique, bien qu'elle s'enrichisse régulièrement, n'est toujours pas, à ce jour, achevée. Le nombre de composés identifiés s'est énormément accru grâce notamment au développement des techniques d'analyses chimiques comme la chromatographie gazeuse (GC), la chromatographie liquide à

haute performance (CLHP), la chromatographie en couche mince (CCM), la spectroscopie infrarouge (IR), la résonance magnétique nucléaire (RMN) ou encore la spectrométrie de masse (MS)…

Plus de 700 composés[4] ont été identifiés et la plupart ont des concentrations comprises entre 10^{-1} et 10^{-6} $mg.l^{-1}$. Ces concentrations se trouvent souvent en dessous des limites de détections sensorielles et très peu de composés joue un rôle individuel sur la perception organoleptique du vin. Ce sont ensemble que ces composés contribuent significativement aux propriétés des vins.[5]

L'eau (environ 80%) et l'alcool éthylique (10 à 14%) sont les principaux composants du vin. Cependant, les différences entre les vins sont exprimées par les 5% restants : acides, sels minéraux, vitamines, protéines, polysaccharides, polyphénols, composés volatils…. Le Tableau I.2 ci-dessous nous indique les valeurs moyennes des principaux composés[1] rencontrés dans le vin. En ce qui concerne le moût, ses constituants sont principalement issus de la pulpe des baies. Au cours de la fermentation alcoolique, les sucres sont transformés en alcool et autres produits secondaires tels que les polyols, divers acides organiques et composés volatils. Nous pouvons également noter la différence de concentration en polyphénols entre les moûts et le vin. Ceux-ci présents en plus grandes quantités dans les parties dures du raisin (rafles, pépins, pellicules), vont être cédés, petit à petit, au vin lors de la macération.

	Moûts	Vins
Eau	700-850	750-900
Oses	140-250	0,1-2
Polysaccharides	3-5	2-4
Alcools	-	69-121
Polyols	-	5-20
Acides organiques	9-27	3-20
Polyphénols	0,5	2-6
Composés azotés	4-7	3-6
Minéraux	0,8-2,8	0,6-2,5
Vitamines	0,25-0,8	0,2-0,7

D'après Cabanis et al.[1] ; Quantités exprimées en $g.l^{1}$ de vin

Tableau I.2

La fermentation malolactique, qui entraine la transformation de l'acide malique en acide lactique, va également entrainer une modification de la composition du vin, avec la formation de produits secondaires. Ces évolutions au cours de la vinification sont les principales mais le vin ne cessera jamais d'évoluer même après sa mise en bouteille et ce jusqu'à sa dégustation.

I.1.4. **Propriétés organoleptiques**

La qualité du vin s'apprécie surtout au niveau de sa dégustation où les cinq sens du consommateur sont mis en éveil.

Le premier est la vue, le vin sera caractérisé suivant sa couleur (« sa robe »), son éclat, sa limpidité et sa fluidité. Alors que l'éclat peut renseigner sur l'acidité du vin, sa fluidité reflète la teneur en glycérol (gras), alcool (éthanol) et sucres. La couleur et son intensité, qui peut nous donner une indication sur la richesse du vin, est, dans le cas des vins rouges, directement corrélée à la présence des anthocyanes. Ces molécules, de la famille des flavonoïdes, sont des pigments responsables des colorations bleu, rouge, mauve, rose ou orange de toutes les espèces végétales.[6,7] Le changement de couleur des vins entre les tons bleus violacés des vins jeunes et les tons plus cuivrés (reflets oranges) des plus vieux est en partie dû à la condensation des anthocyanes avec les tanins et la formation de nouveaux pigments polymérisés.[8,9] Nous développerons les différents types d'interactions possibles dans une partie spécifique (voir I.5.2).

Le deuxième sens exploité lors de la dégustation d'un vin est l'odorat. La complexité des différentes odeurs du vin, exprimées par les composés volatils, peut s'expliquer par leur infinie variété. En effet on distingue :

- les arômes primaires qui sont les arômes variétaux provenant du raisin et qui seront influencés par le cépage, le climat, le terroir et le millésime.
- les arômes secondaires qui proviennent de la fermentation alcoolique.
- les arômes tertiaires (ou bouquet) qui proviennent de l'évolution (oxydation/réduction) lors de l'élevage.

Le troisième sens sollicité est le goût. La perception en bouche peut être caractérisée par quatre sensations : salé, sucré, acide et amer. Le sucré, qui se perçoit immédiatement, est bien sûr apporté par les sucres et est amplifié par l'alcool. Le second

goût perçu par le consommateur est l'acidité due aux acides tartrique, lactique et citrique contenus dans les vins. Le goût salé provient des sels minéraux mais est souvent masqué par les autres saveurs. Enfin, vient l'amertume qui se développe lentement et demeure longtemps. Elle est souvent confondue et/ou assimilée avec une autre sensation : l'astringence. L'astringence, caractéristique des vins rouges liée aux tanins, est encore une sensation mal connue mais elle pourrait être définie comme une sensation de sécheresse en bouche d'origine tactile. Ressentie au niveau de la langue et de la paroi buccale, c'est ici le sens du touché qui est mis à contribution.

Pour terminer, le dernier sens qui est l'ouïe, ne nous apporte aucune information réelle et qualitative par rapport au vin, mais plutôt une évocation de plaisir (ouverture d'une bouteille, bruit du vin versé dans le verre…).

I.1.5. **Effets sur la santé**

Dès l'antiquité, le vin est reconnu comme un remède divin, Hippocrate (460-377 av. J.-C.) disait « Le vin est une chose merveilleusement appropriée à l'homme si, en santé comme en maladie, on l'administre avec à propos et juste mesure, suivant la constitution individuelle ».

Pasteur en publiant son livre « Etude sur le vin »[10] apporte une importante contribution à l'image du vin comme boisson à vertu thérapeutique en annonçant sans réserve que "le vin de France aliment, c'est-à-dire le vin naturel peut être, à bon droit, considéré comme la plus saine, la plus hygiénique des boissons ».

Plus récemment, Renaud [11] avec l'introduction de l'expression « french paradox » a relancé la notion d'un effet thérapeutique bénéfique du vin. D'après ses recherches épidémiologiques, « Pour un niveau de facteurs de risque semblable à d'autres pays comme l'Angleterre et les Etats-Unis (cholestérol, hypertension artérielle, tabagisme, consommation de graisses saturées), la France a une mortalité coronarienne et cardio-vasculaire plus basse ou beaucoup plus basse que la majorité des pays industrialisés », ce qu'il explique par une consommation plus importante de vin chez les français.

Cet effet bénéfique est largement attribué aux polyphénols contenus dans le vin. Ils sont également présents dans les autres aliments d'origine végétale et certaines de leurs propriétés pharmacologiques sont depuis longtemps décrites.[12] Néanmoins, vis-à-vis des

autres aliments contenant des polyphénols, le vin présente différents avantages.[3] En effet, le processus de vinification n'altère pas les polyphénols et permet leur extraction des parties les plus riches que sont la peau et les pépins. Finalement l'alcool, en favorisant la solubilité permet une meilleure extraction au cours de la vinification et améliore la biodisponibilité des polyphénols. Les propriétés et l'activité biologique des polyphénols seront discutées plus en détail dans un paragraphe suivant sur les procyanidines.

I.2 Les polyphénols et les tanins : classification et définition

Métabolites secondaires des plantes, les polyphénols sont largement représentés dans tout le règne végétal. Plus de 8000 substances[13] composent cette classe de molécules, anciennement nommée tanins végétaux,[14] avec des masses moléculaires allant de quelques dizaines de Dalton jusqu'à des masses supérieures à 30 000 Daltons. La plus concise et simple définition a été proposée en 1862 par Bate-Smith et Swain.[15] Elle reprend leurs principales caractéristiques : « composés phénoliques solubles dans l'eau, possédant une masse comprise entre 500 $g.mol^{-1}$ et 3000 $g.mol^{-1}$, qui, en plus de la réactivité usuelle des composés phénoliques, ont la capacité de faire précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les autres protéines ».

Il est possible de classer les polyphénols suivant trois catégories : les flavonoïdes, les stilbènes et les acides phénoliques, ces deux derniers étant communément englobés sous le terme de non-flavonoïdes. La Figure I.1 représente ces différentes catégories, en précisant une des nombreuses sources de chaque sous-groupe avec un exemple.

Les flavonoïdes, groupe le plus important ne comptant pas moins de 5000 composés, sont caractérisés par un squelette phénylbenzopyrane en C_{15} (C_6-C_3-C_6) commun.[13] Concernant la nomenclature, l'hétérocycle du benzopyrane est nommé cycle C, alors que le cycle aromatique fusionné est nommé cycle A et le phényle substitué cycle B. Le cycle A peut être *méta*-trihydroxylé, on parle de type phloroglucinol ou *méta*-dihydroxylé et on parle alors de type résorcinol.[12] Le cycle B peut être mono-, di- ou tri-hydroxylé. Suivant la substitution, l'oxydation et la saturation du cycle C, il est possible de classer les flavonoïdes en 7 groupes différents : flavanones, flavones, flavonols, isoflavones, anthocyanes, flavan-3-ol et proanthocyanidines.

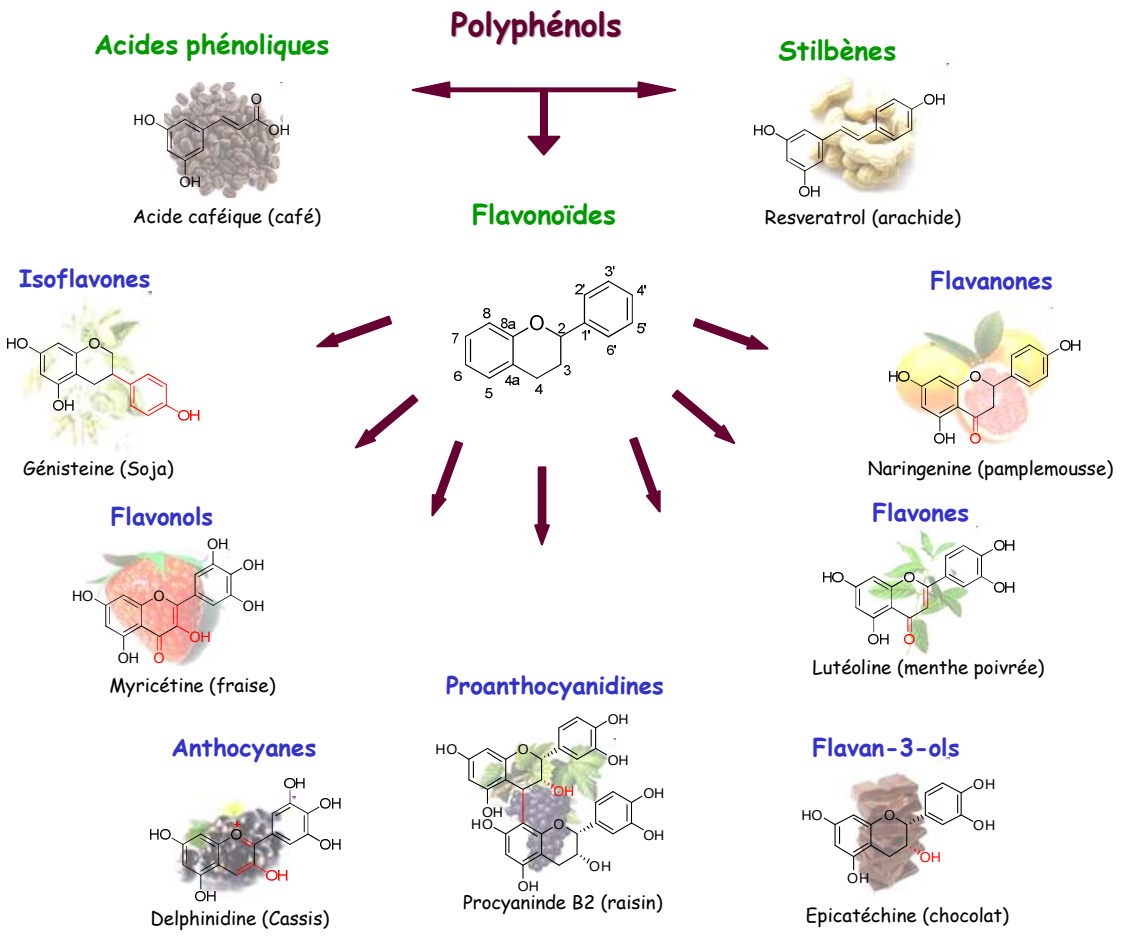


Figure I.1

Les proanthocyanidines, sont aussi couramment appelées tanins condensés : Le terme « tanins » vient de leur utilisation ancestrale pour tanner la peau, grâce à leurs propriétés à précipiter les protéines, et le terme « condensés » est utilisé en opposition avec les autres types de tanins. En effet, il est possible de classer les tanins en quatre groupes différents en fonction de leurs propriétés structurales[16]: les gallotanins, les ellagitanins, les tanins condensés et les tanins complexes.

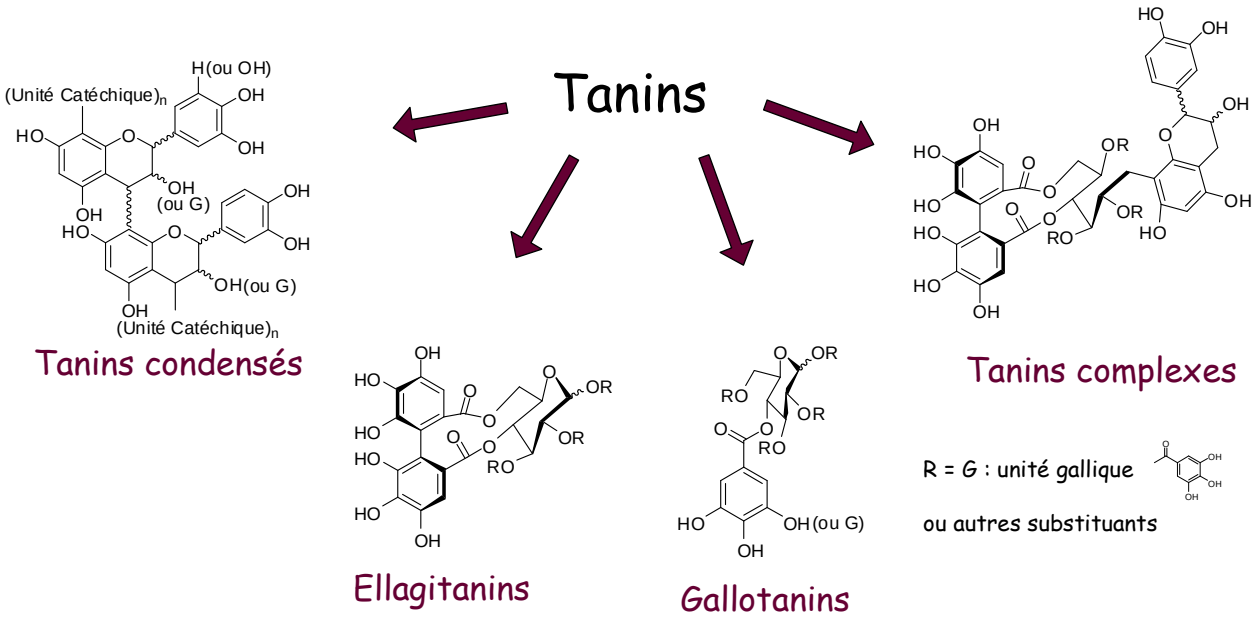


Figure I.2

Les gallotanins et les ellagitanins sont regroupés aussi sous le terme de tanins hydrolysables car ils ont la propriété d'être hydrolysés en leurs constituants primaires par traitement à l'eau chaude. Ceux du vin proviennent du bois de la barrique utilisée pour l'élevage des vins ou de l'addition de tanins œnologiques. Les tanins condensés, appelés aussi proanthocyanidines, correspondent à des oligomères ou des polymères de flavanols. Enfin, les tanins complexes de part leur structure combinant des unités de flavanols et de gallo- ou ellagitanins, sont également appelés flavano-ellagitanins.

La découverte, en 1936, des proanthocyanidines, tout d'abord désignées sous le nom de facteur vitaminique P en raison de leur caractère antioxydant, est attribuée à Jack Masquelier, un professeur français.

Suivant le nombre et la position des groupes hydroxyles que l'on trouve sur le noyau flavanol, on distingue différentes classes de proanthocyanidines[13,17] : les procyanidines (3,5,7,3',4'-pentahydroxylées), les prodelphinidines (3,5,7,3',4',5'-hexahydroxylées), les profisétinidines (3,7,3',4'-tétrahydroxylées), les prorobinétinidines (3,7,3',4',5'-pentahydroxylées), les proguibourtinidines (3,7,4'-trihydroxylées), les protéracacinidines (3,7,8,4'-tétrahydroxylées), les proapigénidines, les prolutéolinidines, les protricinidines et les propélargonidines (3,5,7,4'-tétrahydroxylées) et d'autres minoritaires.

Il nous a paru important dans un premier temps de rappeler cette classification concernant les différents polyphénols et les tanins afin de limiter certains abus de langages courants. Nous allons dès lors nous intéresser plus particulièrement aux procyanidines et aux flavan-3-ols, que nous engloberons par la suite sous le terme de procyanidines ou tanins. Les prodelphinidines seront également évoquées car elles sont une des unités constitutives importantes au niveau des pellicules.

I.3 Les procyanidines

I.3.1. Structures

Les procyanidines, comme nous l'avons indiqué précédemment, sont des oligomères et des polymères constitués d'unités flavan-3-ols. Les deux unités monomériques les plus abondantes sont la (+)-catéchine **1** et la (-)-épicatéchine **2**. Cette dernière peut aussi être présente sous forme estérifiée par l'acide gallique **3** (Figure I.3).

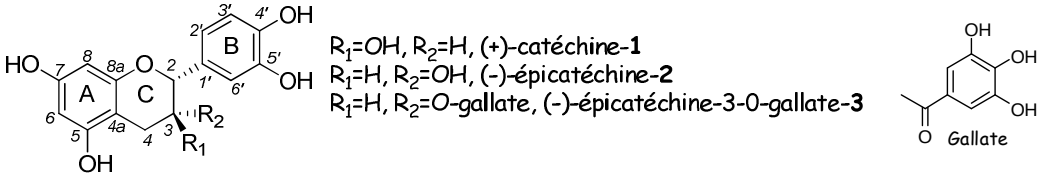
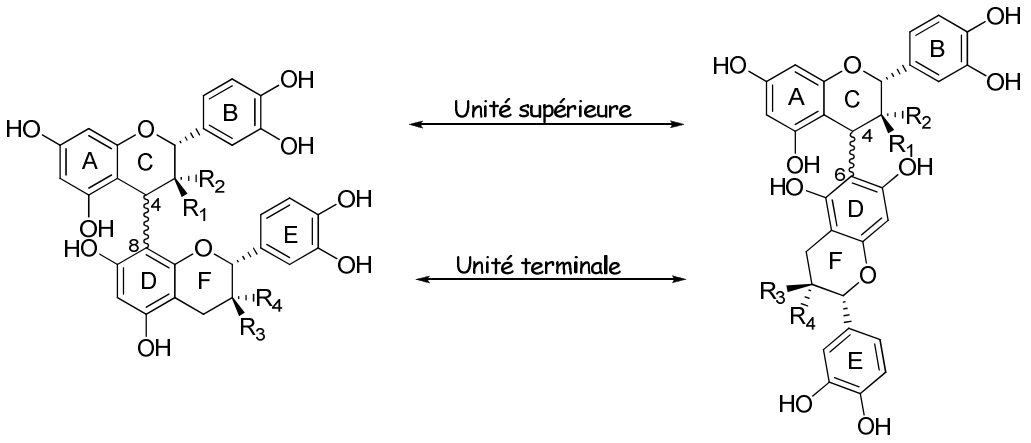


Figure I.3

La diversité des unités monomères et du type de liaisons interflavanes liant les monomères entre eux, entraîne un nombre considérable de procyanidines différentes. Concernant les dimères, deux types de procyanidines peuvent être rencontrés [19]: Les procyanidines de type B qui résultent de la condensation de deux unités liées entre elles par une liaison intermonomérique de type C_4-C_6 ou C_4-C_8 et les procyanidines de type A qui possèdent en plus une liaison éther entre l'oxygène portée par les carbone C_5 ou C_7 de l'unité terminale et le carbone C_2 de l'unité supérieure.

La Figure I.4 ci-après représente les différentes procyanidines dimères de type B constituées par les unités catéchine ou épicatéchine. Les unités gallates ne sont pas présentées ici mais rappelons tout de même que seules les unités épicatéchines peuvent être galloylées. La nomenclature utilisée de nos jours a été introduite par Hemingway[17] en 1982. Elle permet de distinguer les monomères engagés et le type de liaison impliquée.



R_1	R_2	R_3	R_4		Type de liaison	
					4-8	4-6
H	OH	OH	H	—	B1 : Epicatéchine-4β-8-catéchine	B7 : Epicatéchine-4β-6-catéchine
H	OH	H	OH	—	B2 : Epicatéchine-4β-8-épicatéchine	B5 : Epicatéchine-4β-6-épicatéchine
OH	H	OH	H	⋯	B3 : Catéchine-4α-8-catéchine	B6 : Catéchine-4α-6-catéchine
OH	H	H	OH	⋯	B4 : Catéchine-4α-8-épicatéchine	B8 : Catéchine-4α-8-épicatéchine

Figure I.4

Les procyanidines de types A, moins abondantes que celles de types B peuvent être obtenues à partir de ces dernières *via* une oxydation intramoléculaire[20,21] (Figure I.5). Récemment, des procyanidines de type A sous forme gallate ont été identifiées dans des pépins de raisins.[22]

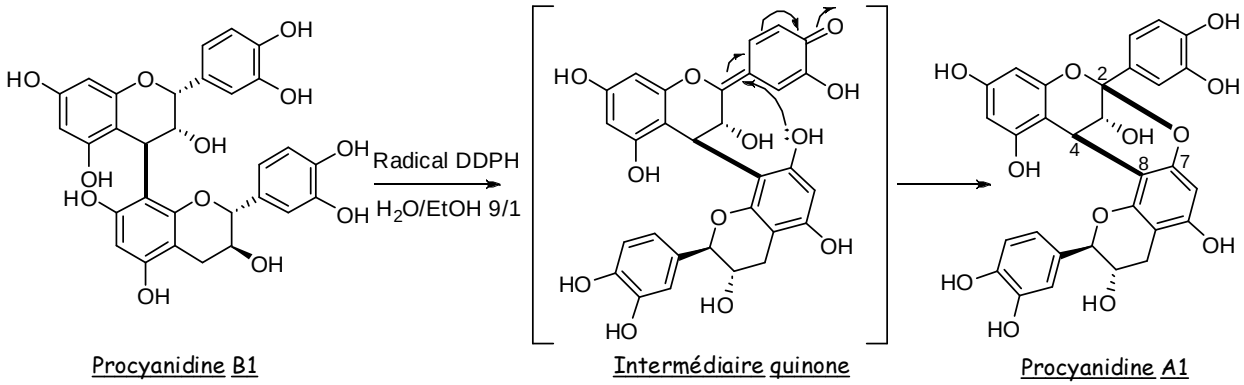


Figure I.5

Les procyanidines sont aussi abondamment présentes sous formes oligomères, entre 3 et 10 unités flavanols, avec des masses moléculaires allant de 900 à 3000 $g.mol^{-1}$ et sous formes polymères où le nombre d'unités flavanols dépasse les 10 et les masses sont supérieures à 3000 $g.mol^{-1}$. Ces procyanidines peuvent être de structure linéaire lorsqu'elles sont reliées entre elles uniquement par des liaisons C_4-C_6 ou C_4-C_8. Elles peuvent aussi posséder une structure branchée lorsqu'elles sont constituées des deux types de liaisons (Figure I.6). Il est également possible de retrouver des procyanidines oligomères possédant des liaisons de type A.[23] Sans oublier que toutes les unités épicatéchines sont susceptibles d'être estérifiées, le nombre de combinaisons différentes possibles est faramineux.

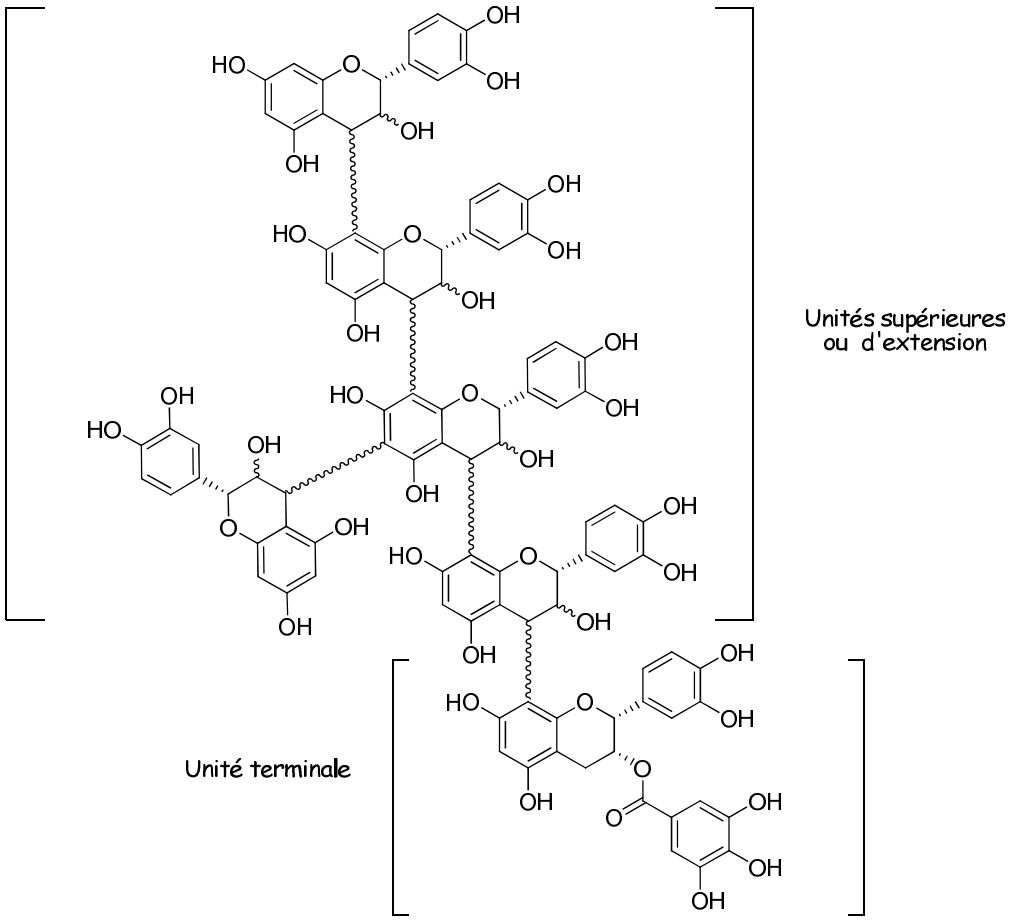


Figure I.6

I.3.2. **Effets potentiels sur les plantes**

Les polyphénols sont seulement des métabolites secondaires des plantes mais comme Haslam le souligne dans un livre sur les polyphénols en 1989,[12] « Beaucoup de métabolites secondaires sont intimement concernés dans l'interaction complexe entre les plantes et leur environnement et que c'est de plus *la raison d'être* (en français dans le texte) de leur existence ». Selon Bate-Smith, les tanins végétaux seraient un moyen de défense contre les animaux et les microbes en raison de leurs propriétés gustatives.[19]

Les polyphénols peuvent intervenir à plusieurs niveaux, entre autres dans les relations hôtes/parasites, avec la constitution de barrières physiques ou chimiques, dans les relations plantes/animaux, en ayant un effet sur la pollinisation ou sur la protection vis à vis des herbivores, ou encore dans la protection contre les rayonnements UV.[24]

Aujourd'hui, il est reconnu que le rôle biologique des procyanidines dans les plantes est surtout lié à la protection contre les infections, les insectes ou bien encore les herbivores.[19] Ces différentes propriétés sont induites par leurs capacités à interagir avec les protéines, à chélater les métaux et à leur activité antioxydante.[25] Ces trois capacités sont également à l'origine des effets bénéfiques des procyanidines sur la santé humaine.

I.3.3. **Effets potentiels sur la santé**

Les procyanidines font l'objet d'un grand nombre d'études concernant leurs propriétés pharmacologiques intéressantes. Nous ne détaillerons pas ces diverses propriétés mais nous donnons seulement un bref aperçu de leurs diverses applications potentielles : action antioxydante, action contre les maladies cardiovasculaires, contre les cancers, agent antimicrobien, antiviral, neuroprotecteur… (Revue de Kennedy *et al.*[19]).

I.4 **Les procyanidines dans la vigne**

Les flavan-3-ols et les tanins se trouvent dans les parties solides de la grappe de raisins (pépins, pellicules et rafles). Nous nous limiterons à l'étude des tanins des pépins et pellicules qui influent le plus sur la qualité du vin. Les différentes unités monomériques trouvées dans les grappes de raisins *vitis vinifera* sont la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine, la (+)-gallocatéchine et la (-)-épigallocatéchine.[26,27] Les unités d'épicatéchine peuvent être également présentes sous formes estérifiées par l'acide gallique en position C3.

Dans les pépins, les tanins sont présents dans les enveloppes externes sous les cellules épidermiques. Dans les pellicules, ils se trouvent sous forme libre dans les vacuoles ou liés aux protéines et aux polysaccharides des membranes vacuolaires et des parois cellulaires. Suivant la partie du raisin étudiée, la composition en tanins présente certaines différences. Alors que les pellicules contiennent des formes dihydroxylées (procyanidines) et trihydroxylées (prodelphinidines) sur le cycle B,[28] les pépins ne contiennent que des formes dihydroxylées.[29]

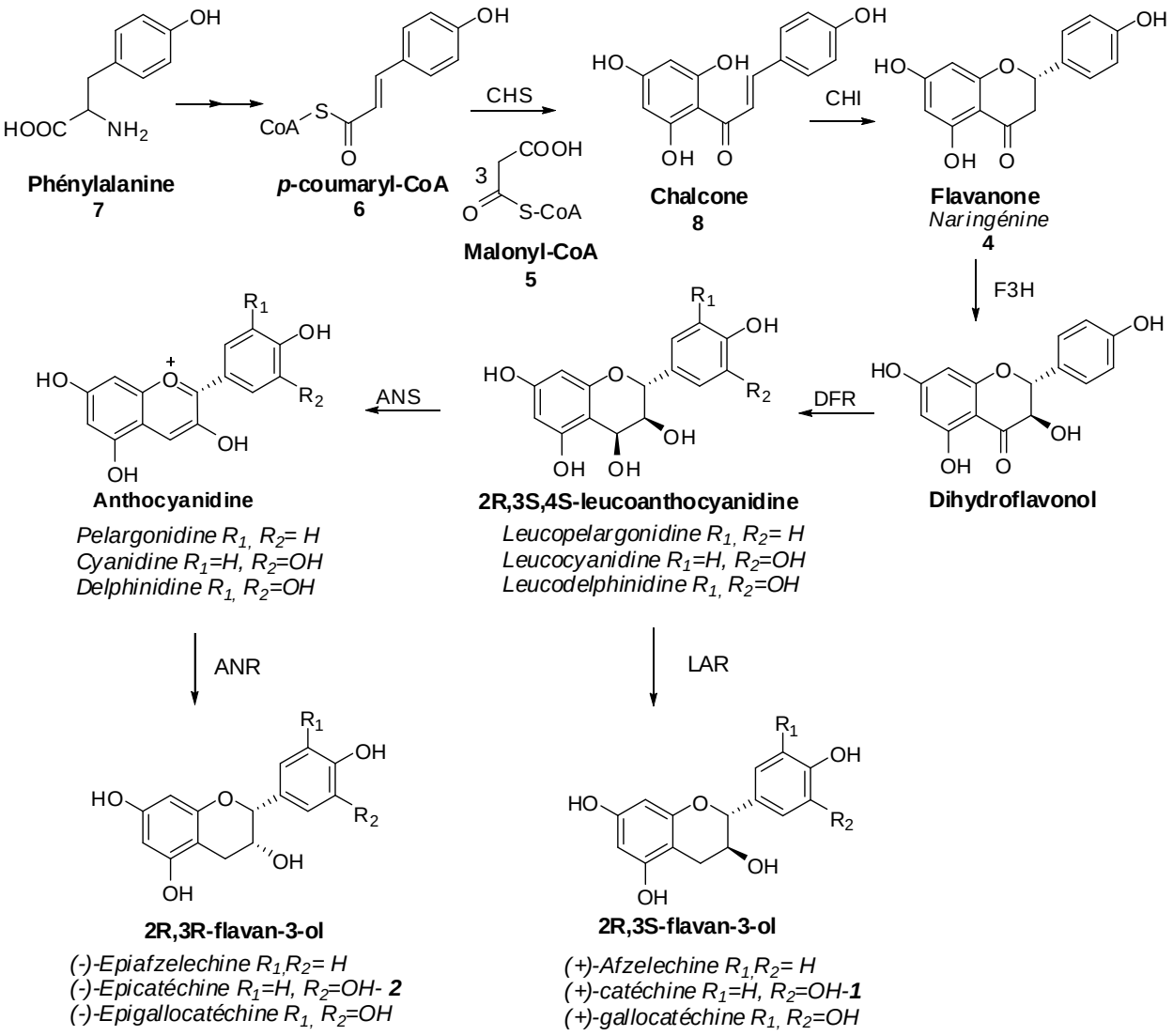
Une différence est notable également au niveau du degré de polymérisation moyen (DPm ; nombre moyen d'unité monomère par chaîne). Alors que les tanins extraits à partir des pellicules présentent un DPm d'environ 30, ceux des pépins présentent, quant à eux, un DPm aux alentours de 10.[28,29,30]

I.4.1. **Biosynthèse**

La biosynthèse des procyanidines a été très largement étudiée. Elle comporte deux étapes : la formation des unités de base et la condensation de ces unités pour former des oligomères ou des polymères : les procyanidines. A ce jour, seule la formation des unités de base est complètement élucidée.

I.4.1.1. ***Biosynthèse des unités de base***

Les premières étapes de la biosynthèse des flavan-3-ols sont communes avec celles de tous les flavanoïdes et conduisent à la synthèse de la Naringénine **4**. Après condensation de trois unités de malonyl-Coenzyme A **5** avec le précurseur *p*-coumaryl-CoEnzyme A **6** issu de l'acide aminé phénylalanine **7**, la chalcone **8** est obtenue. Cette dernière est transformée en flavanone **4** par action de l'enzyme chalcone isomérase (CHI). Différentes cascades enzymatiques permettent la fonctionnalisation du flavanone **4** et l'accès aux flavanols catéchine **1** et épicatéchine **2**, *via* les anthocyanidines pour cette dernière (Figure I.7).[31,32]



CHS : chalcone synthase; CHI : chalcone isomérase; F3H : flavanone 3-hydroxylase; DFR : dihydroflavonol réductase; ANS : anthocyanidines synthase; ANR : anthocyanidine réductase; LAR : leucoanthocyanidine réductase.

Figure I.7

I.4.1.2. ***Biosynthèse des oligomères et des polymères***

La voie d'accès aux procyanidines et le mécanisme de condensation des unités flavan-3-ols demeurent encore incertains.[32,33,34] Un débat sur l'existence d'un mécanisme enzymatique ou non enzymatique demeure encore. Mais le problème plus fondamental de la nature des substrats de départ reste encore irrésolu. La résolution de cette question passera par de solides études combinant la chimie, la biochimie et la génétique. Il est établi que les unités terminales sont la catéchine ou l'épicatéchine obtenues respectivement *via*

l'action enzymatique de la LAR (leucoanthocyanidine réductase) et de l'ANR (anthocyanidine réductase). L'interrogation concerne la nature des unités d'extensions. Différents modèles ont été établis et impliquent, soit la participation des leucoanthocyanidines, soit celle des flavanols (catéchine et épicatéchine) ou encore celle des anthocyanidines que nous ne détaillerons pas ici.

a) Polymérisation via les leucoanthocyanidines

Pour cette voie, les 2R,3S,4S-leucoanthocyanidines **9** sont premièrement transformées en 2R,3S-quinone méthide **10a**, et peuvent ainsi être utilisées comme unités d'extensions. Cette voie de biosynthèse est appuyée par les travaux de Creasey et Swain en 1965.[35] Ils ont été les premiers à synthétiser la leucocyanidine à partir de la (+)-dihydroquercétine et à mettre en évidence la synthèse de procyanidine par des réactions de condensation entre la leucocyanidine et la catéchine ou l'épicatéchine. Néanmoins cette hypothèse néglige le fait que la formation enzymatique des leucocyanidines est 2R,3S-*trans*-stéréospécifique, alors que les unités d'extensions majoritaires des oligomères et des polymères sont de configuration 2R,3R-*cis* (unité épicatéchine). Duan *et al.*[25] émettent l'hypothèse que la 2R,3S-quinone méthide **10a** dérivée de la leucocyanidine **9** peut être convertie en 2R,3R-quinone méthide **10b** *via* un flavan-3-en-3-ol **11**. Cette quinone peut alors être condensée directement avec un flavanol **1** ou **2** ou bien être convertie préalablement en son carbocation **12a,b** (Figure I.8). Les dimères ainsi obtenus pourraient par la suite se condenser à nouveau avec un précurseur carbocation ou quinone et ainsi former les oligomères et des polymères.

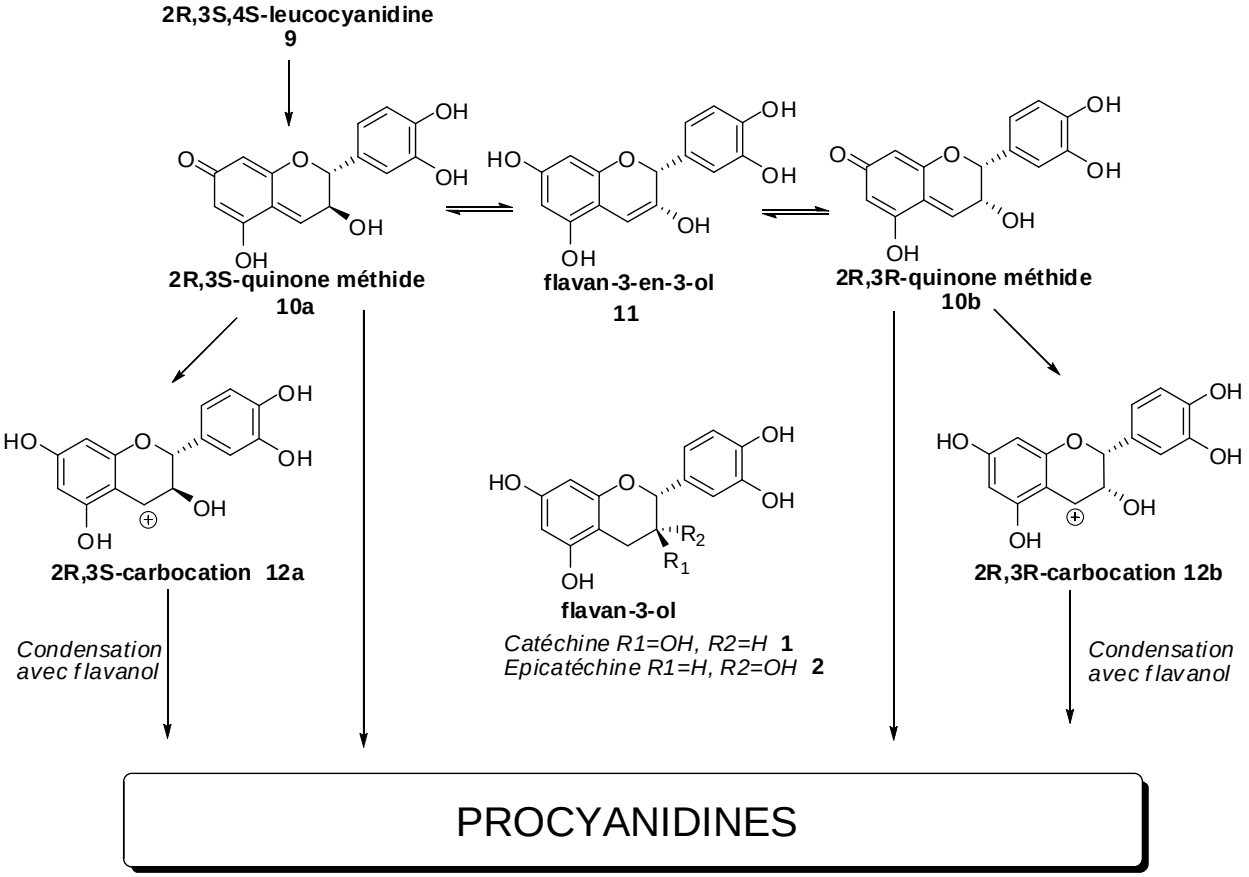


Figure I.8

b) Polymérisation via les flavan-3-ols

Une autre voie, également envisagée, stipule que les précurseurs des unités d'extensions soient directement issus de la catéchine et de l'épicatéchine. En partant de ce modèle, plusieurs transformations enzymatiques ou non enzymatiques sont envisageables. La catéchine **1** et l'épicatéchine **2** sont préalablement oxydées en intermédiaires quinones (méthide **10a**,**b** ou ortho **13**) par action enzymatique de la PPO (polyphénols oxydase). Ces intermédiaires quinones sont alors convertis en carbocation **12a,b** *via* un intermédiaire flavan-3-en-3-ol **11** ou par une réduction non–enzymatique. Les carbocations 2R,3S **12a** et 2R,3R **12b** ainsi obtenus vont se condenser avec un flavan-3-ol pour former une procyanidine dimère. L'élongation se poursuit par condensation avec de nouveaux carbocations (Figure I.9).

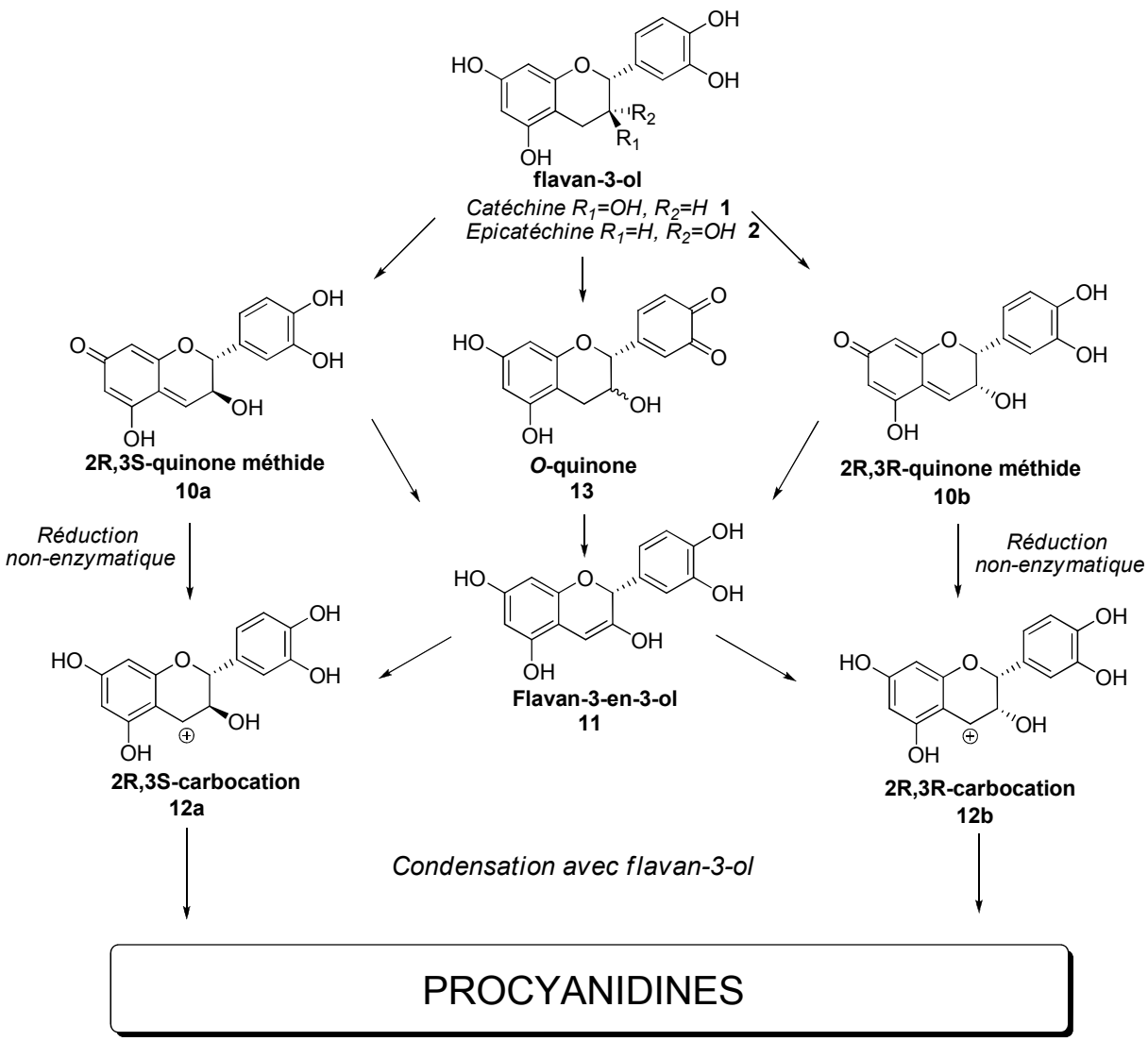


Figure I.9

I.4.2. **Composition**

I.4.2.1. ***Composés identifiés***

La composition en procyanidines des pépins de raisins a été largement étudiée afin d'éclaircir leur rôle et leurs propriétés organoleptiques. Plus d'une trentaine de composés monomères, dimères et trimères ont été clairement identifiés dans des extraits de pépins. Le Tableau I.3 ci-dessous présente ces derniers ainsi que la référence de leur première identification.

Monomères		Dimères					
		Natif			Gallates		
Cat	1	B1	Epi-4β-8-Cat	2	B1-3-*O-G*	Epi-3-*O-G*-4β-8-Cat	5
Epi	1	B2	Epi-4β-8-Epi	2	B2-3-*O-G*	Epi-3-*O-G*-4β-8-Epi	5
ECG	1	B3	Cat-4α-8-Cat	2	B2-3'-*O-G*	Epi-4β-8-Epi-3-*O-G*	4
		B4	Cat-4α-8-Epi	2	B4-3'-*O-G*	Cat-4α-8-Epi-3-*O-G*	5
		B5	Epi-4β-6-Epi	5	B5-3-*O-G*	Epi-3-*O-G*-4β-6-Epi	8
		B6	Cat-4α-6-Cat	5	B7-3-*O-G*	Epi-3-*O-G*-4β-6-Cat	7
		B7	Epi-4β-6-Cat	4	B2-3,3'-di-*O-G*	Epi-3-*O-G*-4β-8-Epi-3-*O-G*	5
		B8	Cat-4α-6-Epi	5			

1) Su,[26] 1968 ; 2) Czochanska,[27] 1979 ; 4) Boukharta[36], 1988 ; 5) Ricardo Da Silva,[37] 1991 ; 7) Santos-Buelga,[38] 1995 ; 8) De Freitas,[39] 1998.

Trimères					
Natif			Gallates		
C1	Epi-4β-8-Epi-4β-8-Epi	4	*C1-3"-O-G*	Epi-4β-8-Epi-4β-8-Epi-3-*O-G*	6
C2	Cat-4α-8-Cat-4α-8-Cat	3	T2-3"-*O-G*	Epi-4β-8-Epi-3-*O-G*-4β-8-Cat	5
T2	Epi-4β-8-Epi-4β-8-Cat	4	*C1-3',3"-di-O-G*	Epi-4β-8-Epi-3-*O-G*-4β-8-Epi-3-*O-G*	7
T3	Epi-4β-8-Epi-4β-6-Cat	5		Epi-4β-8-Cat-4α-6-Epi-3-*O-G*	8
T4	Epi-4β-6-Epi-4β-8-Epi	5		Epi-4β-6-Cat-4α-6-Epi-3-*O-G*	8
T5	Epi-4β-8-Epi-4β-6-Epi	5			
T6	Epi-4β-6-Epi-4β-8-Cat	5			
	Cat-4α-8-Cat-4α-8-Epi	7			
	Cat-4α-8-Epi-4β-8-Epi	8			
	Cat-4α-8-Epi-4β-8-Cat	8			

3) Macheix,[40]1986 ; 4) Boukharta,[36] 1988 ; 5) Ricardo Da Silva,[37] 1991 ;6) Santos-Buelga,[41] 7) Santos-Buelga,[38] 1995 ; De Freitas,[39] 1998.

Tableau I.3

L'analyse des procyanidines des pellicules amène plus de difficultés étant donné qu'elles sont présentes en plus faibles quantités et que d'autres composés phénoliques sont présents en quantités non négligeables tels que les flavonols, les anthocyanes ou encore les dérivés hydroxycinnamiques.[42] En 1995, Escribano-Bailón *et al.* ont étudié la composition en procyanidines des pellicules de plusieurs variétés de raisin. Bien que la même équipe ait détecté, la même année, 27 procyanidines et flavan-3-ols dans des extraits de pépins, ils ont seulement détecté 10 composés dans les pellicules.[42] Le Tableau I.4 ci-dessous présente ces différents composés ainsi que leur distribution dans des pellicules de la variété Merlot.

Composés		Distribution - Variété Merlot
Cat	(+)-catéchine	+++
Epi	(-)-Epicatéchine	+
ECG	(-)-épicatéchine-3-O-gallate	-
B1	Epi-4β-8-Cat	++
B2	Epi-4β-8-Epi	-
B3	Cat-4α-8-Cat	+
B4	Cat-4α-8-Epi	+
B2-3'-O-G	Epi-4β-8-Epi-3-O-G	-
T2	Epi-4β-8-Epi-4β-8-Cat	+++
C1	Epi-4β-8-Epi-4β-8-Epi	-

Tableau I.4

I.4.2.2. ***Composition globale des oligomères et polymères***

D'importantes variabilités dans la composition apparaissent suivant la variété de raisin et le millésime étudié. Les différentes conditions de cultures telles que la nature des sols, l'irrigation, le climat entrainent également des différences sur la composition en procyanidines des raisins. Néanmoins, certaines données générales concernant la composition des pépins et des pellicules peuvent être données.

En 1972, Thompson *et al.*[43] ont développé une méthode pour l'étude structurale des proanthocyanidines oligomères et polymères. Cette méthode a été adaptée en 1991 par Rigaud *et al.*[44] pour l'analyse structurale des tanins de raisin et celle-ci est depuis largement utilisée.[28,29,41,45] Cette méthode, appelée thiolyse, consiste à hydrolyser les proanthocyanidines en milieu acide en présence d'un agent nucléophile (le toluène a-thiol **14** étant le plus utilisé). Les unités terminales des proanthocyanidines sont libérées sous leur forme libre alors que les unités supérieures produisent les thioéthers benzyliques correspondants (Figure I.10). Les monomères ainsi libérés après la réaction sont séparés et dosés par CLHP. En 1992, Koupai-Abyazani *et al.*[46] utilisent un autre nucléophile, le phloroglucinol **15**, pour l'analyse des procyanidines de sainfoin. En raison de l'odeur incommodante du toluène a-thiol **14**, ce nucléophile est parfois préférentiellement utilisé.[47,48,49]

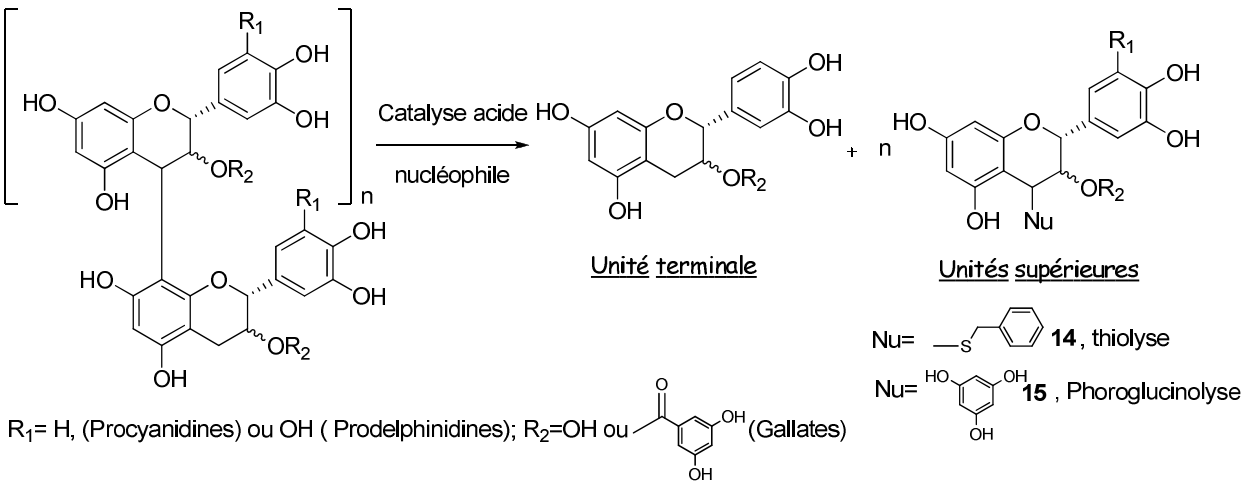


Figure I.10

Ces deux méthodes, bien que présentant plusieurs limites notamment en raison d'une dépolymérisation parfois incomplète,[50,51,52] permettent d'accéder aux degrés de polymérisation moyens des différents extraits de procyanidines oligomères et polymères mais aussi de connaître les proportions des différentes unités constitutives (terminales et supérieures).

En utilisant la méthode de thiolyse, une équipe de l'Institut des Produits de la Vigne de Montpellier a étudié la composition globale en proanthocyanidines des pépins, pellicules et des rafles de différentes variétés de raisin *Vitis Viniféra*.[28,29,30,53] Leurs différents résultats concernant la variété Merlot sont présentés sur le tableau I.5.

	DPm	% gallate	% EGC	% Epi	% Cat	mg tanins/ kg récolté
Pellicules	28,18	5,16	22,69	67,20	4,96	1605
Pépins	10,35	32,45	non détecté	54,36	13,19	2323,5
Rafles	9,17	15,55	2,44	67,66	14,35	221,3

Tableau I.5

Les pépins présentent la plus forte concentration en tanins suivis par les rafles et les pellicules. Ce sont les pellicules qui présentent le plus haut degré de polymérisation moyen (DPm), alors que les pépins et les rafles présentent des DPm aux alentours de 10.

Une autre différence majeure est la présence de prodelphinindes (EGC : épigallocatéchine), uniquement détectées dans les pellicules et les rafles.

Bien que le pourcentage d'unités épicatéchine soit plus élevé que celui d'unités de catéchine, les unités terminales sont majoritairement constituées de catéchine notamment pour les pellicules et les rafles. Ceci est nettement moins marqué dans les pépins, où les concentrations entre les trois monomères, pour les unités terminales, sont relativement proches. Dans les trois cas, l'épicatéchine est majoritaire en ce qui concerne les unités d'extension. Concernant les composés galloylés, ce sont les pépins qui présentent le plus grand pourcentage suivis par les rafles.

Plus récemment Mattivi *et al.*[45] ont réalisé la même étude mais en utilisant la technique de phloroglucinolyse, pour les variétés de Merlot et de Cabernet-Sauvignon entre autres. Alors que les résultats précédents ont été constatés sur des extraits obtenus après extraction des pépins et pellicules réduits initialement en poudre, ces derniers ont analysé des extraits obtenus à partir des parties solides entières et en utilisant des solvants moins agressifs (solution modèle de vin). La seule différence notable concerne les DPm qui sont inférieurs et relativement semblables pour les pellicules et les pépins (DPm=2,9-4 pour les variétés Merlot et Cabernet-Sauvignon). Les autres observations restent vérifiées :

- Les pépins présentent une concentration supérieure en proanthocyanines.
- Les unités supérieures sont majoritairement composées d'épicatéchine (ils constatent même une absence de catéchine dans le cas des pellicules).
- Les unités terminales des pellicules sont majoritairement constituées de catéchine. Alors que les proportions entre les trois monomères sont partagées pour les pépins.
- Les gallates sont présents en plus grande quantité dans les pépins que les pellicules (détectés à l'état de traces et non quantifiés).

I.4.2.3. ***Distribution des monomères et dimères***

Peu de travaux ont été réalisés sur les valeurs quantitatives en procyanidines dans les raisins, excepté pour les différents dimères. Nous allons présenter brièvement ces

quelques résultats ainsi que des données concernant les différents monomères présents dans les pépins et les pellicules de Cabernet-Sauvignon et de Merlot..

Alors que la catéchine, sous forme libre, est largement majoritaire dans les extraits de pellicules,[42,54,45,49] la différence avec l'épicatéchine est beaucoup moins marquée dans les pépins, et cette dernière peut même être parfois majoritaire.[55,56,54,49,45] L'épicatéchine gallate est le monomère le moins abondant aussi bien dans les pépins que dans les pellicules.[49,45,54,56] Certains auteurs notent même une absence d'épicatéchine gallate dans les pellicules .[42,49,45]

En ce qui concerne les dimères, les composés possédant une liaison de type 4-8 sont présents en plus grande quantité que les dimères de type 4-6. De Freitas *et al.* ont réalisé l'analyse quantitative de ces composés dans des pellicules et des pépins de Merlot et de Cabernet Sauvignon.[54] Tandis que les huit dimères ont pu être quantifiés dans les pépins seul le dimère B5 de la série 4-6 a pu être détecté dans les pellicules. Selon leurs résultats, le dimère B2 est le dimère majoritaire dans les pépins et les pellicules des deux variétés. Ceci est rapporté par d'autres auteurs concernant les pépins,[55,57,58,59] alors qu'il semblerait que les pellicules soient plutôt majoritairement composées du dimère B1.[42,58,59] Les dimères gallates, bien que détectés dans les pépins sont présents en quantités moins importantes.

I.4.2.4. ***Evolution***

La croissance de la baie se caractérise par une évolution du poids et du volume suivant une courbe en deux étapes de croissance (chacune pouvant former une courbe de type sigmoïde) séparées par une phase stationnaire.[60,61] La phase I, dite croissance herbacée, est initiée par la fécondation des fleurs et correspond au développement de la baie. Au cours de cette phase, les monomères et les procyanidines s'accumulent au niveau des tissus des pellicules et des pépins. La phase II, qui se termine par la véraison, correspond à un ralentissement ou un arrêt de la croissance. La phase III, caractérisée par une deuxième période de croissance de la baie, correspond à la phase de maturation où s'effectue l'accumulation des sucres. Cette période correspond également à une diminution de la quantité en procyanidines et monomères (Figure I.11).[61,62,63]

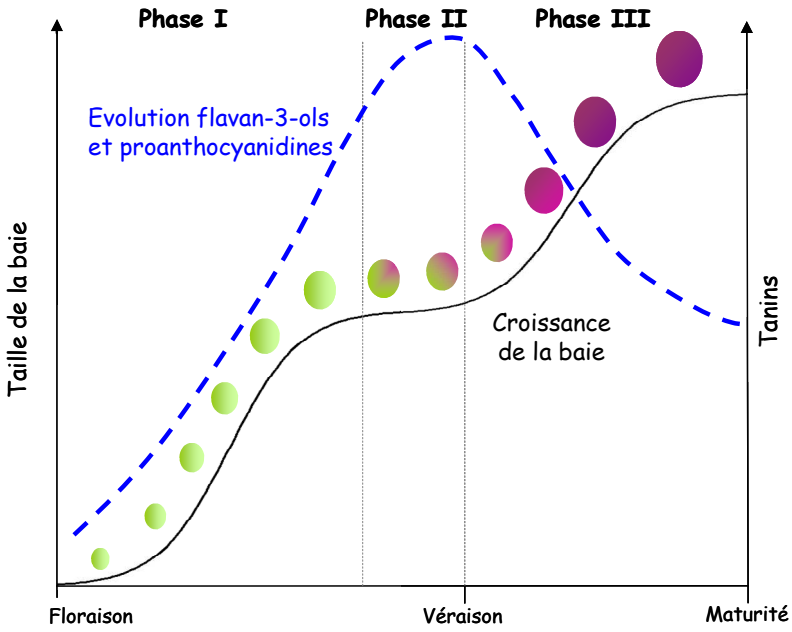


Figure I.11

Il est clairement établi que l'accumulation des monomères et des proanthocyanidines s'effectue lors de la première phase et atteint son maximum aux alentours de la véraison.[61,62,63] La diminution constatée après la véraison est observée aussi bien dans les pépins que dans les pellicules.[63,64] Néanmoins, bien que plusieurs hypothèses viennent étayer cette diminution aucune preuve directe n'a été apportée. Cette baisse pourrait être attribuée à une réduction de l'extrabilité des proanthocyanidines, résultant de leur conjugaison avec d'autres composants cellulaires ou encore liée à des réactions d'oxydation.[63,64] Cette diminution de concentration concerne aussi bien les monomères que les oligomères et les polymères, même si la concentration en monomères décroît plus rapidement (avec ECG>>Cat>Epi).[56]

De Freitas *et al.*[54] ont étudié plus spécifiquement l'évolution au cours de la maturation du raisin (variété Merlot et Cabernet-Sauvignon) de la concentration de 8 procyanidines dimères, d'un trimère (C1) et des trois monomères constitutifs.

Les différents composés présentent tous une diminution au cours de la maturation du raisin. La diminution est similaire et décroît graduellement pour la variété de Merlot alors que pour la variété Cabernet-Sauvignon, des fluctuations au cours du temps sont observées.

I.5 Les procyanidines dans le vin

Dans les vins rouges, la concentration en tanins totaux peut être comprise entre 1 et 4 $g.l^{-1}$, et est influencée par la nature du cépage, le terroir, les conditions de vinification ainsi que les conditions climatiques.[65]

La nature des procyanidines du vin est largement liée à celles des baies. Les procyanidines des baies vont être transférées au moût, puis au vin, au cours de la macération. Alors que les procyanidines des pellicules sont extraites rapidement dès le début de la fermentation alcoolique, les procyanidines des pépins sont extraites préférentiellement lors de la macération post-fermentation.[66] Une fois le vin pressé, la concentration en procyanidines est maximale, néanmoins sa composition ne va jamais cesser d'évoluer.

I.5.1. Composition

Les cinq monomères (Cat, Epi, ECG, gallocatéchine et épigallocatéchine) rencontrés dans les baies de raisins, aussi bien au niveau des pépins que des pellicules, sont retrouvés au niveau du vin.[54,67,68]

Les différentes procyanidines dimères ont également été détectées dans les vins rouges.[54] Des dimères[68] et oligomères[69] composés exclusivement d'unités (épi)catéchine, ou en mélange avec des unités (épi)gallocatéchine sont également présents. Concernant les composés gallates, certains dimères ont été détectés dans des vins rouges, bien que les quantités soient relativement faibles.[57]

La structure caractéristique des tanins du vin a été moins étudiée que celle des baies, néanmoins des DPm de 6,4 et 9 ont été déterminés à partir de vin rouge de variété Cabernet –Sauvignon.[69,57]

Malgré les différences de concentrations suivant les vins étudiés, il apparait que la catéchine et la procyanidine dimère B1 sont les composés les plus abondants.[57,70,71]

I.5.2. Evolution dans le vin

Durant la vinification et le vieillissement du vin, sa composition évolue continuellement, ce qui entraine une perte d'astringence et un changement de couleur.[32] Ces changements sont associés à différentes réactions chimiques impliquant les polyphénols.[72]

Nous détaillerons dans ce paragraphe les réactions directes et indirectes impliquant les procyanidines et les anthocyanes, flavanoides glycosilés ou non responsables de la couleur des vins.

I.5.2.1. ***Réactions directes***

En l'absence d'oxygène et au pH du vin (3,2-3,8), une rupture des liaisons interflavanes des procyanidines peut être observée. Ceci conduit à la formation d'une part, de procyanidines de masses moléculaires inférieures **16** et d'autre part de carbocations en positions 4 **17**. Ces derniers peuvent réagir avec une autre molécule de procyanidines au niveau des sites nucléophiles (C6 et C8), aboutissant ainsi à des polymères de plus hautes masses moléculaires. Ces carbocations **17** peuvent également réagir comme électrophiles avec la forme hémiacétale d'une anthocyane **18**. L'adduit incolore tanin-anthocyane **(T-A) 19** obtenu peut subir une déshydratation pour donner la forme flavylium rouge correspondante **20** (Figure I.12).[25]

La procyanidine **16** libérée après la coupure de la liaison interflavane ou tout autre procyanidine native a également la possibilité de réagir avec une anthocyane. L'anthocyane sous sa forme flavylium **21** (colorée) se comporte comme un électrophile et va réagir avec une position nucléophile (C6 ou C8) de la procyanidine **16** et former ainsi un adduit anthocyane-tanin **(A-T) 22**. Le flavène **A-T** incolore **22** peut être oxydé en flavylium rouge **23** et former un sel de xanthylium jaune **24**.[73] Le flavène **22** peut également donner un produit de condensation bicyclique incolore **25**.[74]

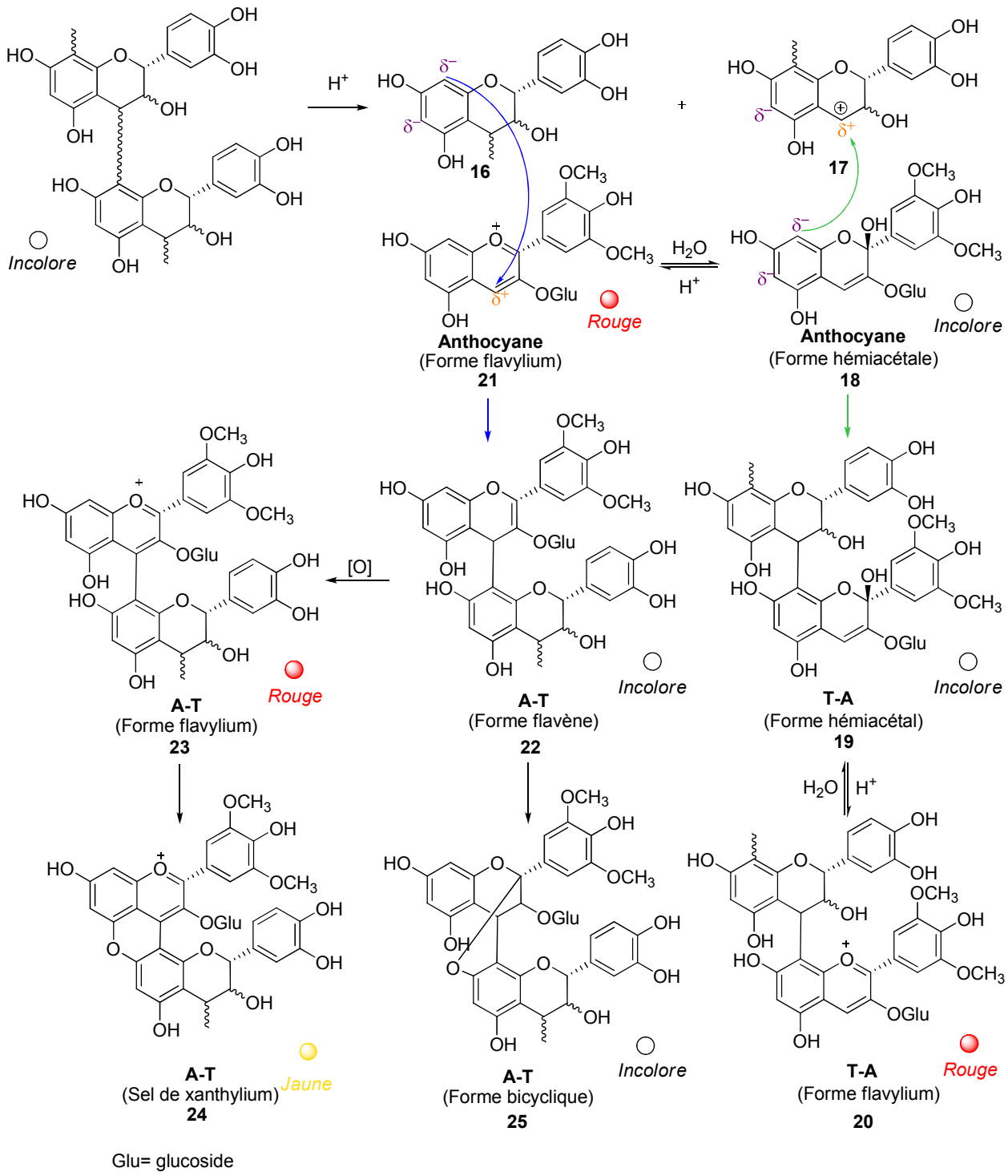
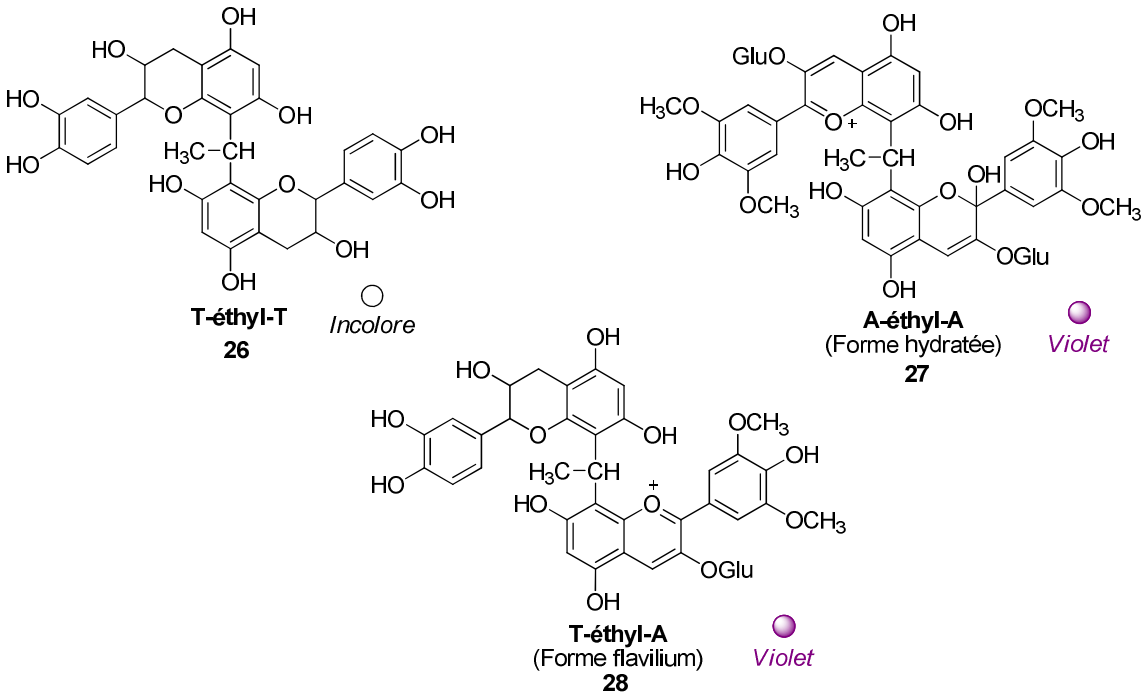


Figure I.12

I.5.2.2. ***Réactions indirectes via* l'acétaldéhyde**

Un autre type de condensation entre les flavan-3-ols et les anthocyanes, peut être rencontré dans le vin. Cette condensation indirecte, est induite par la présence

d'acétaldéhyde et possède une cinétique plus rapide que les réactions directes.[75] L'acétaldéhyde présent dans le vin provient du métabolisme des levures lors de la fermentation alcoolique ou de l'oxydation de l'éthanol par les polyphénols en présence d'oxygène.[76] L'acétaldéhyde, sous sa forme carbocation, va réagir avec un flavan-3-ol en position C6 ou C8. Le carbocation formé après déshydratation du produit de condensation flavanol-acétaldéhyde va réagir avec une anthocyane ou un flavan-3-ol (ou un tanin) en position C8 ou C6. Différents types d'adduits (**T-éthyl-T 26**, **A-éthyl-A 27**, **T-éthyl-A 28**), obtenus *via* cette voie et possédant des propriétés colorantes différentes, ont été détectés dans des vins. (Figure I.13). Ces adduits peuvent ensuite évoluer vers des composés de masses moléculaires plus élevées qui finissent par précipiter.[77]



T-éthyl-T : Dimère catéchine-éthyl-catéchine[78], **T-éthyl-A** : Malvidine-3-Glucoside-éthyl-catéchine[79], **A-éthyl-A** : Malvidine-3-Glucoside-éthyl- Malvidine-3-Glucoside[80]

Figure I.13

I.5.3. Propriétés supramoléculaires des tanins

Les tanins sont connus pour s'associer entre eux, avec des polysaccharides ou encore des protéines présents dans le vin pour former des complexes colloïdaux. Ces phénomènes peuvent jouer un rôle important dans la limpidité et la stabilité du vin.[81,82] En effet, ces associations, de types réversibles, peuvent entraîner la formation de particules

de plus ou moins grandes tailles engendrant des troubles, voire des précipités dans le vin.[83] Les interactions que les tanins peuvent entraîner sont également à l'origine de certaines propriétés organoleptiques des vins. Notamment, ils sont connus pour interagir avec des protéines présentes dans la salive (en particulier des protéines riches en proline, PRP)[84,85,86] et provoquer la sensation d'astringence, ou encore s'associer avec des récepteurs spécifiques situés sur la langue et induire une sensation d'amertume.[87]

I.5.3.1. ***Auto-association des tanins***

Les tanins possèdent la propriété de s'auto-associer pour former des micelles, des particules, voire des agrégats en solution aqueuse ou hydroalcoolique. Cette particularité a fait l'objet de plusieurs études à partir de systèmes modèles par RMN,[88,89] par diffusion de la lumière (DLS)[90,91,92] et par diffusion des rayons X ou des neutrons aux petits angles.[81,93] Si cette propriété d'auto-association des tanins est admise par l'ensemble des équipes qui travaillent sur ce sujet, des désaccords existent sur l'influence de la structure et du degré de polymérisation des tanins sur la taille des agrégats formés. Certaines études concluent sur la formation d'agrégats de tanins dans des conditions de concentrations proches du vin.[90,91,92] Riou *et al.* [90] observent, que l'augmentation du degré de polymérisation entraîne une diminution de la concentration micellaire critique (*CMC* ; concentration à partir de laquelle des micelles se forment) et une augmentation de la taille des micelles formées. Néanmoins, il est à noter que ces études ont été réalisées à partir d'extrait de tanins de degré de polymérisation moyen défini mais possédant une polydispersitée non contrôlée. Poncet-Legrand *et al.*[92] n'ont, quant à eux, pas pu établir de relation simple et directe entre comportement colloïdal et degré de polymérisation moyen des fractions. Mais ils ont montré que l'épicatéchine gallate, en raison de son cycle aromatique trihydroxylé, était moins soluble que l'épicatéchine. Les fractions polymères galloylés ou non n'ont pas montré de comportement significativement différent. Par ailleurs, ils ont démontré l'importance de l'influence de la concentration en éthanol et de la force ionique du milieu sur l'auto-association des tanins.

Plus récemment, Pianet *et al.*[89] ont étudié le comportement colloïdal spécifique de trois monomères (catéchine, épicatéchine et épigallocatéchine gallate), de quatre dimères (B1-B4) et d'un trimère (C2) en mesurant leur coefficient de diffusion translationnel

respectif par RMN DOSY. Contrairement aux études précédentes, ils ont montré que la CMC augmentait avec l'augmentation du degré de polymérisation et que les micelles formées étaient de plus petites tailles (< 5 nm). Ces différences peuvent être expliquées par les structures 3D et le niveau d'hydratation des molécules. Les monomères, qui ont un plus faible niveau d'hydratation que les dimères et trimères, ont une structure relativement plane qui favorise l'empilement intermoléculaire. Cet empilement permet la formation de micelles de grandes tailles voire même des précipités. La structure spatiale des oligomères de catéchine est induite, quant à elle, par différents éléments structuraux : deux éléments constitutifs, la stéréochimie du carbone 3 de l'hétérocycle et le type de liaison interflavane (4-6 ou 4-8), et aussi des propriétés conformationnelles comme la conformation de l'hétérocycle C et la non libre rotation au niveau des deux carbones impliqués dans la liaison interflavane. Cet empêchement à la libre rotation conduit à l'existence de deux formes rotamères en équilibre pour les dimères[94] et quatre pour les trimères.[95] Dans tous les cas, la structure majoritaire que l'on retrouve dans un milieu hydroalcoolique est une structure favorisant un stacking intramoléculaire entre les cycles aromatiques, ces interactions se faisant aux dépens des interactions intermoléculaires. D'autre part, les valeurs de CMC augmentent avec le degré de polymérisation des différentes procyanidines étudiées : entre 5 et 10 mM pour les monomères (1 à 3 g/l), de 15 à 20 mM pour les dimères et trimères (10 à 14 g/l). Ces valeurs sont supérieures aux concentrations rencontrées dans le vin ce qui semble montrer que les procyanidines d'un degré de polymérisation inférieur ou égal à 4 ne peuvent pas être responsables à eux seuls de la turbidité du vin. Ces résultats, s'ils sont en désaccord avec les résultats de Riou *et al,*[90] sont en revanche, en accord avec une étude sur une fraction de tanins de DPm= 11 de Zanchi *et al.*[82] qui démontrait que seuls 2% des composés possèdent un comportement colloïdal, cette fraction correspondant, à priori, à des tanins oxydés.[93]

I.5.4. **Interaction avec les protéines**

Les tanins possèdent également la propriété de s'associer avec les protéines. Cette propriété est utilisée lors de la vinification au cours du collage mais elle est plus particulièrement étudiée dans le cadre de la dégustation, où l'interaction des tanins avec les protéines de la salive est responsable de l'astringence. L'astringence est un attribut

sensoriel fondamental des vins rouges, contribuant à leur caractère et à leur qualité. Ressentie comme une sensation de sécheresse, de rugosité ou de resserrement en bouche, elle est définie comme une sensation tactile.[96]

En raison de leurs nombreuses fonctions carbonyles, les protéines de la salive riche en proline (PRP) sont d'excellentes candidates pour des liaisons hydrogènes fortes et sont décrites comme jouant un rôle significatif dans l'interaction tanin-salive. Cette interaction réduit l'efficacité lubrifiante de la salive et ceci est alors perçu comme de l'astringence.[97]

Néanmoins la nature des interactions mises en jeu reste sujette à controverse. Alors que certains auteurs sont en faveur d'interactions de Van der Waals, de type hydrophobe, entre les acides aminés non polaires et le cycle aromatique des polyphénols,[98,99] d'autres auteurs sont plutôt en faveur de liaisons de type hydrogène entre les groupements hydroxyles des tanins et les fonctions carbonylées des protéines.[100,101]

La formation des complexes tanin-protéine est influencée aussi bien par le milieu dans lequel la complexation s'opère[102] (pH, concentration en éthanol…) que par la nature des tanins, leurs tailles, leurs structures et la nature des protéines.

Noble *et al.*[103] ont étudié l'influence du degré de polymérisation, de la stéréochimie (catéchine *vs.* épicatéchine), et du type de liaison interflavane (4-8 *vs.* 4-6) sur l'astringence. Cette étude menée à partir de deux monomères (Cat et Epi), trois dimères (B3, B4 et B5) et deux trimères (C2 et Cat-Cat-Epi) semble montrer une influence des trois paramètres testés. En effet, l'astringence augmente avec le degré de polymérisation, même si le dimère B6, qui possède une liaison interflavane de type 4-6, est plus astringent que les trimères. La conformation du cycle C interviendrait également dans le mécanisme de l'astringence puisque la catéchine est moins astringente que l'épicatéchine . Le dimère et le trimère possédant seulement des unités catéchines (B3 et C2) sont également moins astringents que leurs homologues mixtes (Cat-Cat-Epi et B4). Le faible nombre de standards étudiés ne permet pas de généraliser ces observations mais confirme d'autres études montrant que l'augmentation de l'astringence est liée à une augmentation du degré de polymérisation.[97]

II. Synthèse de procyanidines

II.1 Synthèse de procyanidines dans la littérature

De nombreux articles relatent diverses voies de synthèse des procyanidines dimères ou possédant des degrés d'oligomérisation supérieurs. Certaines synthèses, et notamment les premières, consistent en un couplage en condition acide ou basique d'unités catéchiques sous leurs formes non protégées. Elles ne sont malheureusement ni régiosélectives, ni stéréosélectives. Les publications plus récentes impliquent le couplage d'unités catéchiques ayant leurs fonctions phénols protégées. Deux principales stratégies apparaissent alors : les couplages faisant intervenir des organométalliques et les couplages cationiques catalysés avec un acide de Lewis. Ces deux stratégies consistent en une condensation de deux unités flavanes dont les fonctions phénols ont été préalablement protégées : l'une ayant un caractère électrophile *via* le carbone benzylique 4 de l'hétérocycle pyrane, et l'autre un caractère nucléophile *via* le sommet 8 ou 6 du cycle phloroglucinol.

La difficulté de la synthèse est surtout due au contrôle de la régio- et stéréosélectivité de la liaison interflavane. Il conviendra également de parvenir à contrôler le degré d'oligomérisation désiré et, enfin, de travailler dans des conditions douces compte tenu de la sensibilité aux conditions acides, basiques et oxydantes des composés non protégés.

II.1.1. Couplage entre unités non protégées

La première synthèse de procyanidines a été réalisée par Geissman,[104] dès 1966. Dans cette synthèse, la liaison interflavane a été crée en condition acide (HCl aqueux, 0,1 N) entre une unité flavane-diol protégée, le tétra-*O*-méthyl-3',4',5,7-tétrahydroxyflavan-3,4-diol et la (+)-catéchine. Deux produits majoritaires non séparables ont été récupérés avec un rendement de 67%. Geissman *et al.* suggèrent que la formation de deux produits en quantités équivalentes est induite par une épimérisaton de la position 4. L'équipe de Roux a travaillé activement dans le début des années 80 à la synthèse de procyanidines oligomères *via* le couplage en condition acide d'une unité nucléophile, un flavan-3-ol, et d'une unité électrophile, un flavan-3,4-diol.[105,106,107] En 1983, ils ont achevé la synthèse de procyandines

dimères et de degrés d'oligomérisation supérieurs en condensant un flavandiol, obtenu par réduction de la taxifoline **29**, et la (+)-catéchine **1** en conditions stœchiométriques (Figure II.1).[106] Après séparation sur colonne Sephadex LH-20, ils ont pu isoler les procyanidines dimères B3 **30** (cat-(4α-8)-cat) et B6 **31** (cat-(4α-6)-cat), les trimères C2 **32** (cat-(4α-8)-cat-(4α-8)-cat) et son isomère **33** (cat-(4α-8)-cat-(4α-6)-cat) et un présumé tétramère **34** (cat-(4α-8)-cat-(4α-8)-cat-(4α-8)-cat), avec de faibles rendements de 17%, 2%, 20%, 2% et 5% respectivement.

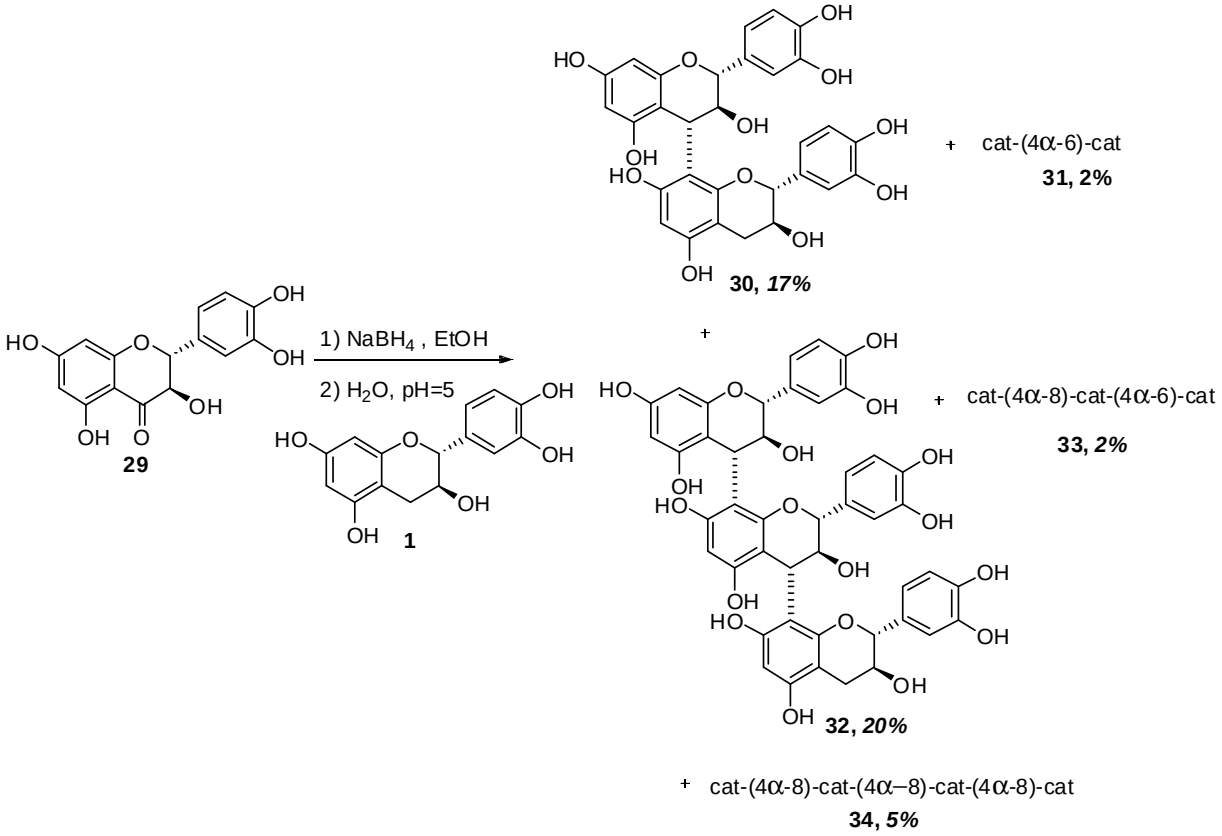


Figure II.1

Bien que la synthèse ne soit pas totalement régiosélective (formation de liaison 4-6), la substitution est, selon eux, largement favorable en position 8 pour des raisons d'encombrement stérique. En réalisant la synthèse en conditions non stœchiométriques, avec 5 équivalents de catéchine, les auteurs ont augmenté le rendement et amélioré la régiosélectivité mais celle-ci n'est pas totale et le degré d'oligomérisation n'est toujours pas contrôlé.

En 1983, Hemingway et Foo[108] ont décrit une méthode de couplage en milieu basique (Figure II.2). Le dérivé phényl thioéther **35** de l'épicatéchine est transformé en

intermédiaire méthylène quinone **36** qui va alors réagir avec la catéchine **1** pour former majoritairement deux dimères (B1 **37** et B7 **38**) plus d'autres oligomères, les rendements n'étant pas spécifiés.

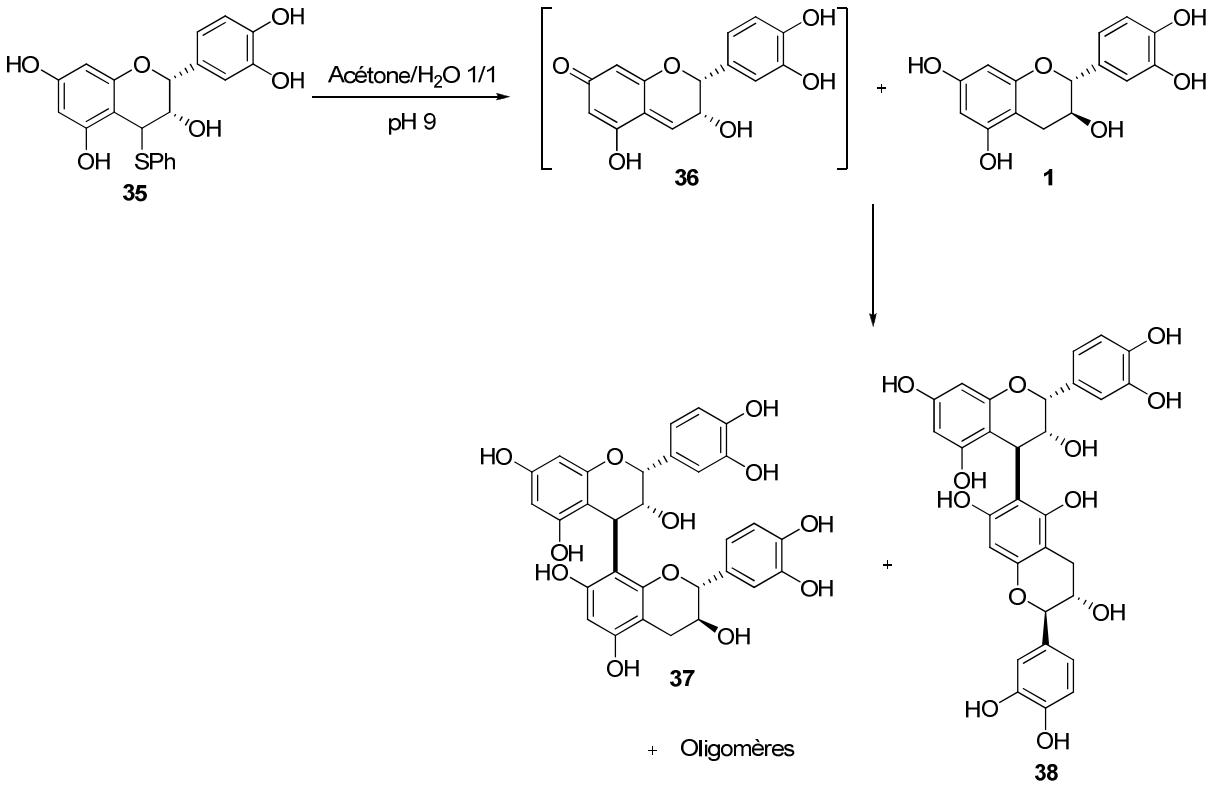


Figure II.2

Devant la labilité des liaisons interflavanes en milieu protique acide et basique, Steynberg[109] a réalisé la condensation d'un dérivé 4-thioéther **39** avec un flavan-3-ol en milieu aprotique. Pour cela il a utilisé deux acides de Lewis : le diméthyl(méthylthio)-sulfonium tétrafluoroborate (DMTSF) et le tétrafluoroborate d'argent ($AgBF_4$) afin d'activer la liaison C4-S (Figure II.3). En utilisant l'acide de Lewis DMTSF, seulement deux produits sont isolés : le dimère B1 **37** et le trimère analogue **40**. Malgré la formation du trimère, aucun autre dimère régioisomère ou oligomère n'a été détecté contrairement aux réactions en condition acide. L'utilisation d'$AgBF_4$ comme acide de Lewis a permis d'augmenter le rendement de B1 **37** (38% contre 22% pour le DMTSF). Il semblerait également que la stéréochimie du centre asymétrique créé soit contrôlée.

Le thioéther **39** utilisé est obtenu par extraction à partir d'extraits de tanins de *Pinus Taeda L.* ce qui rend difficile la généralisation de cette méthode en raison de la difficulté d'obtention du produit de départ.

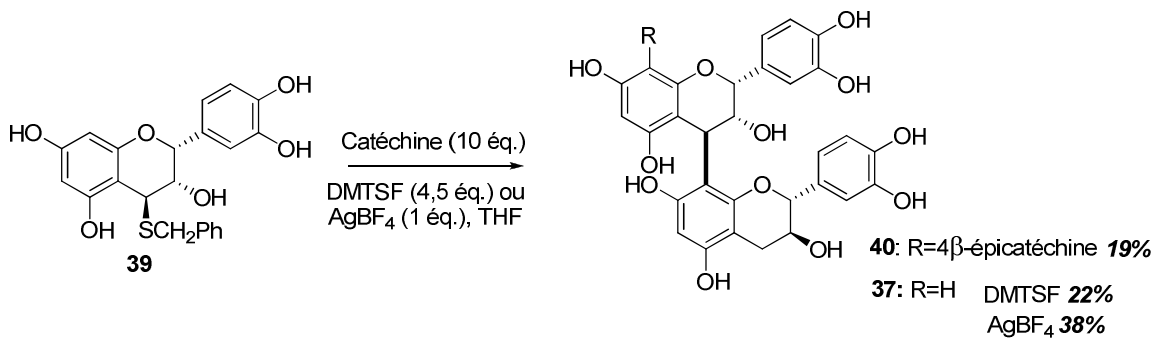


Figure II.3

Afin d'obtenir des dimères possédant la catéchine en unité supérieure, ils ont procédé à la synthèse de la 4-benzylsulfanylcatéchine **41** comme précurseur, obtenu dans un mélange 4/1 des deux épimères 4β **41a** et 4α **41b**. Le thioéther **41** est obtenu *via* une réduction de la (2R,3R)-2,3-*trans*-dihydroquercétine avec $NaBH_4$ dans l'éthanol suivie d'une thiolyse sous catalyse acide avec du benzylmercaptan. L'utilisation de ce thioéther **41** a permis la formation des dimères B4 **42** et B3 **30** avec des rendements respectifs de 35% et 51% (Figure II.4). Le dimère B3 **30** a par la suite été utilisé pour former le trimère C2 **32** par condensation avec le thioéther **41**. Le trimère C2 **32** est alors le seul produit isolé avec un rendement de 26%.

Bien que cette synthèse présente de nombreux avantages, tels que le contrôle de l'oligomérisation, de la régio- et stéréosélectivité, elle présente néanmoins l'inconvénient d'utiliser des précurseurs thioéthers. Dans le cas de l'épicatéchine, le précurseur est obtenu par extraction ce qui est long et fastidieux. Dans le cas de la catéchine, la synthèse du précurseur thioéther n'est pas stéréosélective. De plus il se pose toujours le problème de la stabilité et de la purification des produits non protégés.

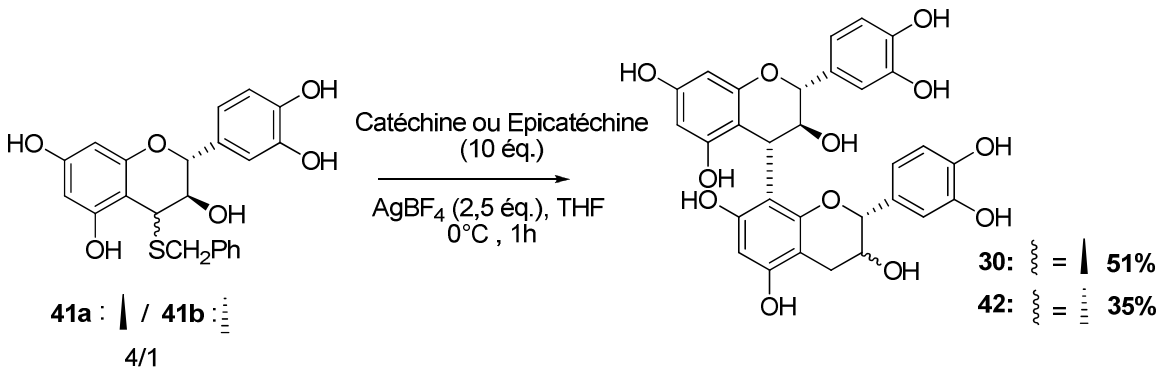


Figure II.4

II.1.2. **Couplages entre unités protégées**

Etant donné les désavantages des synthèses à partir de précurseurs déprotégés, de nombreux efforts de synthèse ont été réalisés à partir de précurseurs protégés. Quelques synthèses ont été réalisées par un couplage *via* des organométalliques mais la plupart utilisent un couplage cationique en présence d'un acide de Lewis entre une unité activée en position 4 et un flavan-3-ol. Ces deux méthodes sont décrites dans les paragraphes suivants.

La catéchine et l'épicatéchine sont instables en dehors de la zone de pH 5-8.[110,111] Des réactions de polymérisation ont lieu en milieu acide alors qu'en milieu basique des réactions d'épimérisation et de réarrangement en acide catéchinique sont observées (Figure II.5).

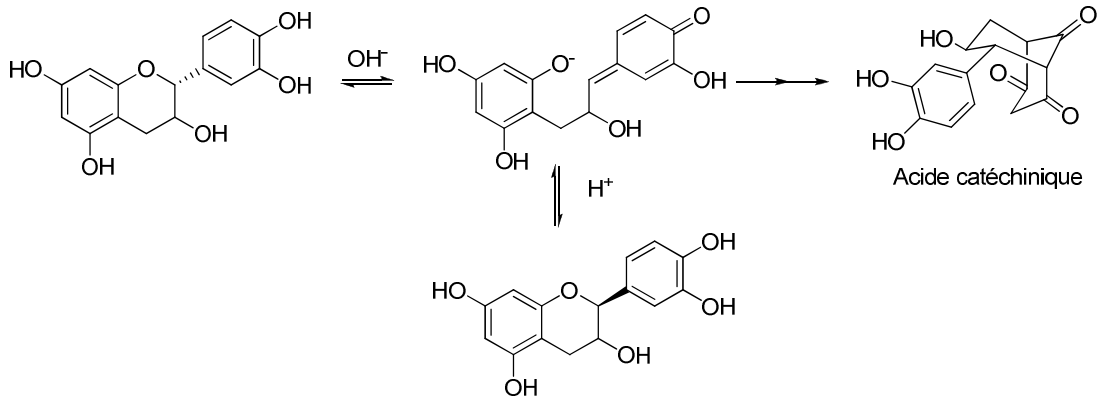
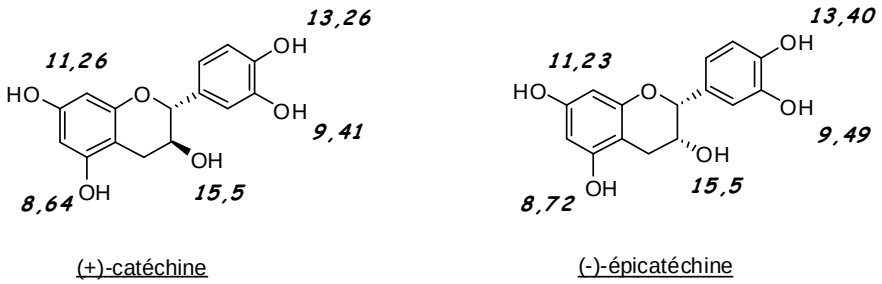


Figure II.5

La différence d'acidité des fonctions phénols[112,113] avec celle de l'alcool en position 3 (Figure II.6) permet de protéger les quatre fonctions phénols sans toutefois protéger l'alcool et ainsi laisser cette position libre pour une future fonctionnalisation telle que la galloylation.



(+)-catéchine (-)-épicatéchine

Figure II.6 *Constantes de protonation des fonctions phénols et alcools* [112,113]

L'instabilité des précurseurs de la synthèse des procyanidines implique la protection des fonctions phénols. La littérature détaille de nombreuses méthodes de protection notamment la protection des fonctions phénols par des méthyles,[114] des acétates[115] ou bien encore des benzyles.[116] La protection par des fonctions benzyles demeure le choix de prédilection en raison de leur stabilité aussi bien en milieu acide que basique mais surtout en raison de la facilité de déprotection en milieu neutre par hydrogénolyse.[117,118] La protection par des groupements méthyles reste néanmoins utilisée,[119] notamment en méthodologie pour réduire l'encombrement stérique. Toutefois, jusqu'à présent, aucune méthode n'a permis de déprotéger les fonctions phénols en fin de réaction afin d'obtenir les procyanidines natives à partir de dérivés méthoxylés.

II.1.2.2. ***Couplage via les organométalliques***

La première synthèse de procyanidines impliquant un couplage *via* un organométallique a été réalisée par Weinges en 1967[120] (Figure II.7).

Le premier précurseur, l'unité électrophile **43**, est obtenu après méthylation des fonctions phénols de la taxifoline. Le second **44** est obtenu en quatre étapes à partir de la catéchine. Les fonctions phénols sont tout d'abord protégées par des groupes méthoxyles, puis la position 8 est bromée afin de réaliser l'échange halogène-métal. Après protection de l'alcool en position 3 par un benzyle, le lithien **45** est formé afin de réagir avec l'unité

électrophile **43**. Après hydrogénolyse catalytique et acétylation des hydroxyles en position 3, le dimère **46** est obtenu avec un rendement de 20%, la stéréochimie de la liaison interflavane n'a pas été précisée.

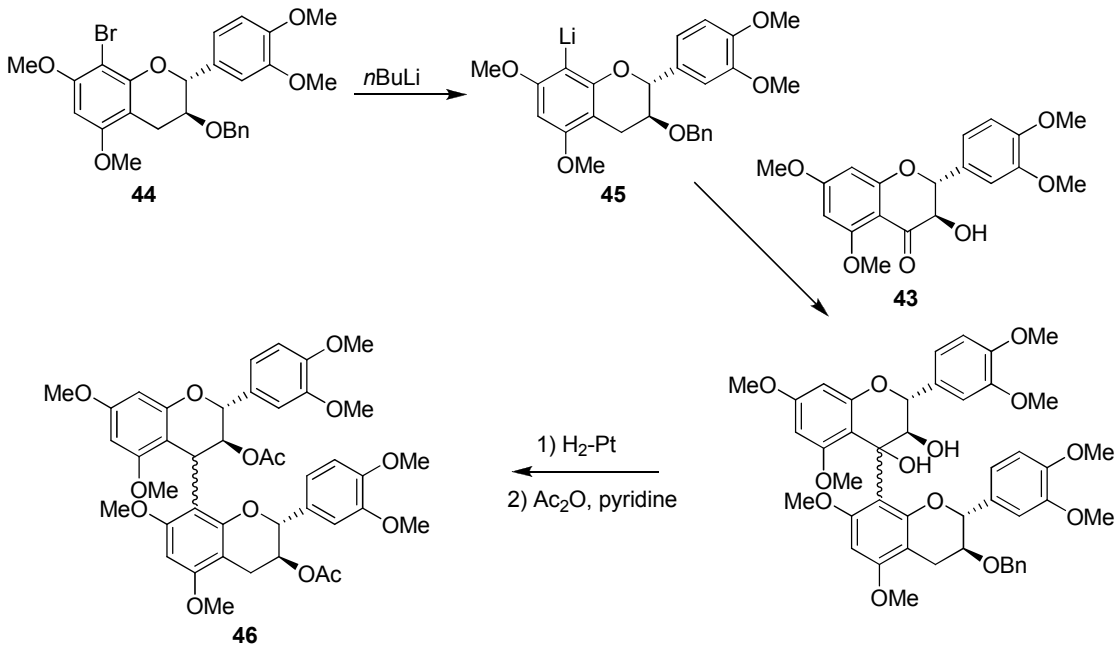


Figure II.7

Plus récemment, Tückmantel *et al.* [121] ont décrit une deuxième méthode de couplage *via* un organométallique.

Quatre étapes sont nécessaires à la préparation de l'unité électrophile **47**. Après protection des fonctions phénols de l'épicatéchine, la fonction hydroxyle en position 3 est protégée soit par benzylation **47a** soit par silylation **47b** (Figure II.8). Après oxydation de la position benzylique au DDQ, l'alcool résultant **48** est oxydé en cétone **49**. Pour préparer l'unité nucléophile **50**, la protection de l'hydroxyle en position 3 est également effectuée sur l'épicatéchine initialement benzylée et bromée en position 8 pour permettre l'échange halogène-métal. Le traitement de cette unité **50** par du *tert*-butyllithium, suivi de l'addition de la cétone **49** conduit à la formation d'un dimère **51** sous la forme d'un simple isomère. Après réduction et déprotection, le dimère épi-(4α-8)-épi **53**, absent à l'état naturel, a été obtenu.

Bien que présentant divers avantages, tels que la régiosélectivité du couplage et le contrôle de l'oligomérisation, cette méthode n'a permis d'obtenir que le dimère non naturel.

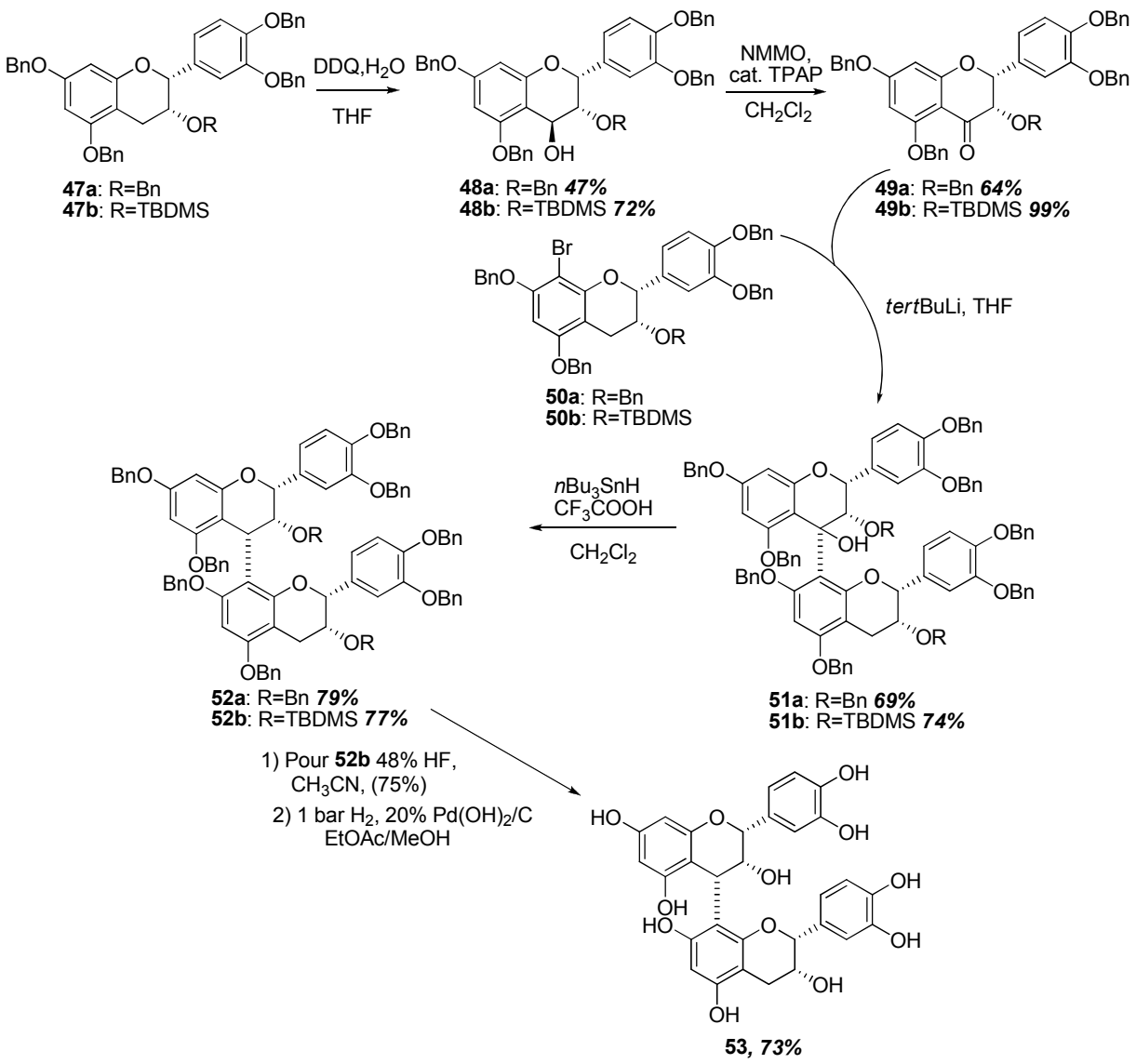


Figure II.8

II.1.2.3. ***Couplage cationique activé par un acide de Lewis***

La première synthèse impliquant ce type de réaction a été décrite en 1991 par Kawamoto.[118] Le couplage entre un flavane-diol **54** et le phloroglucinol **15** a été réalisé en présence de l'acide de Lewis : $TiCl_4$ (Figure II.9).

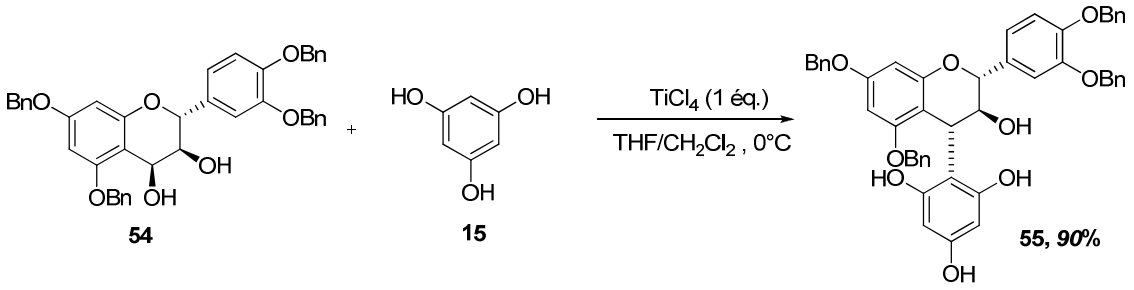


Figure II.9

Le dérivé trans **55** est alors obtenu avec un très bon rendement de 90%. Les fonctions benzyles sont déprotégées par hydrogénolyse catalysée au palladium sans altération de la liaison interflavane.

Dès lors de nombreuses équipes[122-132] ont utilisé cette voie de synthèse afin d'obtenir des procyanidines de catéchine. Le schéma synthétique reste le même dans tous les cas : en présence d'un acide de Lewis, une unité nucléophile **56-58** est couplée avec une unité électrophile **59-63** (Figure II.10).

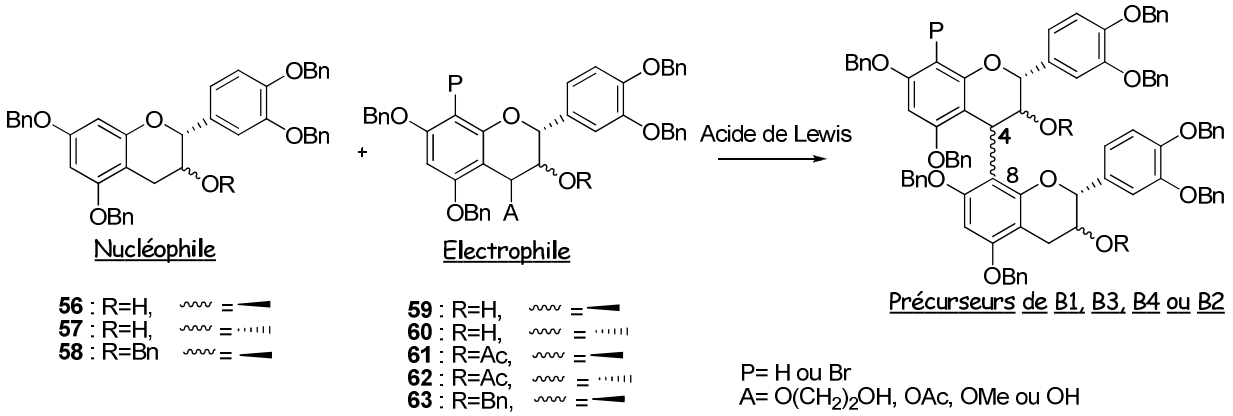


Figure II.10

Les unités nucléophiles **56-58** correspondent à la catéchine ou l'épicatéchine dont les fonctions phénols sont protégées par des benzyles et dont l'hydroxyle en position 3 a pu être préalablement protégé. Les unités électrophiles **59-63** qui vont réagir avec l'acide de Lewis sont activées en position 4 (hydroxyle, alcool éthylique, éther ou acétate). Les positions 3 et 8 peuvent également être protégées ou non.

	N	E	A	P	N/E	Acide de Lewis (nbre éq.)	Stéréosélectivité	Précurseurs de, Rendements en %
1	56	59a	OH	H	5	$TiCl_4$ (1)	60/40	B3, 65%
2	57	60a	$O(CH_2)_2OH$	H	4	$TiCl_4$ (2)	**Totale**	B2, 53%+ oligo
3	56	59a	OH	H	5	$TiCl_4$ (1)	65/35	B1+B3 (1/1), 65%
4	56	59b	OMe	H	5	$TiCl_4$ (1)	67/33	B3, 82%
5	56	61a	$O(CH_2)_2OEt$	H	4,5	TMSOTf (1)	98/2	B3, 97%
6	56 57	60b 59c	$O(CH_2)_2OEt$	H	0,8 0,5	TMSOTf (1)	**Totale**	B1, 43% B4, 84%
7	58	63	OAc	Br	**1,2**	$BF_3.OEt_2$ (1)	86/14	B3, 88%
8	56 57	60b,61a	$O(CH_2)_2OEt$	H	4,5	TMSOTf (1)	**Totale**	B3, 97%; B1, 67% B4, 90%; B2, 93%
9	56 57	59d,60c	$O(CH_2)_2OH$	Br	**1**	$TiCl_4$ (2)	**Totale**	B3, 67%; B1, 47% B4, 53%; B2, 43%
10	56 57	61b,62a	OMe	H	**1**	$Yb(OTf)_3$ (1)	98/2 ; 91/9 98/2 ; 88/12	B3, 64% ; B1, 62% B4, 59%; B2, 76%
11	56	61c 62b	OAc	H	0,7	TMSOTf (1)	97/3	B3, 82%+ oligo B1, 70%+ oligo

N= nucléophile, E= électrophile, A= groupe activant, P=groupe protecteur
1) Kawamoto,[122] 1991, 2) Tückmantel,[123,] 1999, 3) Vercauteren,[124,] 2001, 4) Vercauteren[125], 2001, 5) Saito,[126] 2002, 6) Saito,[127] 2003 (Couplage Intramoléculaire), 7) Suzuki,[128] 2004, 8) Saito, [129] 2004, 9) Fouquet,[130] 2006, 10) Makabe,[131] 2007, 11) Kondo,[132] 2008

Tableau II.1

Pour toutes ces synthèses, les précurseurs diffèrent suivant la stéréochimie de la position 3 (épicatéchine ou catéchine), la protection ou non de cette dernière et la protection de la position 8 mais également du type d'activation de la position 4. Ces dernières modifications seront discutées plus loin.

Comme nous pouvons le voir sur le Tableau II.1, seules les méthodes de Tückmantel (2), Saito (6 et 8) et Fouquet (9) présentent un complet contrôle de la stéréoselectivité de la liaison interflavane. Les synthèses de Saito (2), de Makabe (10) et de Kondo (11) présentent tout de même un très bon contrôle de la stéréochimie. Le contrôle de l'oligomérisation est bon dans tous les cas, excepté dans les synthèses de Tückmantel (2)

et de Kondo (11) où sont obtenus en plus du dimère, des oligomères d'ordres supérieurs (trimère et tétramère). Cependant, dans la majorité des cas, le contrôle est obtenu grâce à l'utilisation d'un large excès de l'unité nucléophile. Seules les synthèses de Saito (6), Suzuki (7), Fouquet (9) et Makabe (10) permettent le contrôle de l'oligomérisation en travaillant dans des conditions stœchiométriques ou quasiment stœchiométriques.

La méthode de Saito (6) diffère des autres car il s'agit dans ce cas d'un couplage intramoléculaire nécessitant le couplage préalable des deux unités *via* un lien diester temporaire. Elle présente l'avantage de ne pas utiliser l'unité nucléophile en excès et de permettre un contrôle total de la stéréochimie, cependant cette méthodologie n'a pu être appliquée qu'aux dimères ayant leurs deux unités différentes (B1 et B4). De plus, cette voie d'accès nécessite une augmentation du nombre d'étapes avec l'estérification préalable de l'alcool de l'unité inférieure puis la formation du lien diester et de la déprotection de ce lien. La figure II.11 présente cette stratégie intramoléculaire dans le cas de la synthèse du dimère B4.

Finalement seules les méthodes 9 et 10 permettent de réunir les différents avantages *ie.* obtenir les quatre dimères 4-8 dans des conditions stœchiométriques, un total contrôle de l'oligomérisation et une excellente stéréosélectivité. En ce qui concerne la synthèse de Makabé (10), nous pouvons néanmoins noter que la stéréosélectivité diminue lorsque l'unité supérieure s'avère être l'épicatéchine (88/12 pour B2 et 91/9 pour B1).

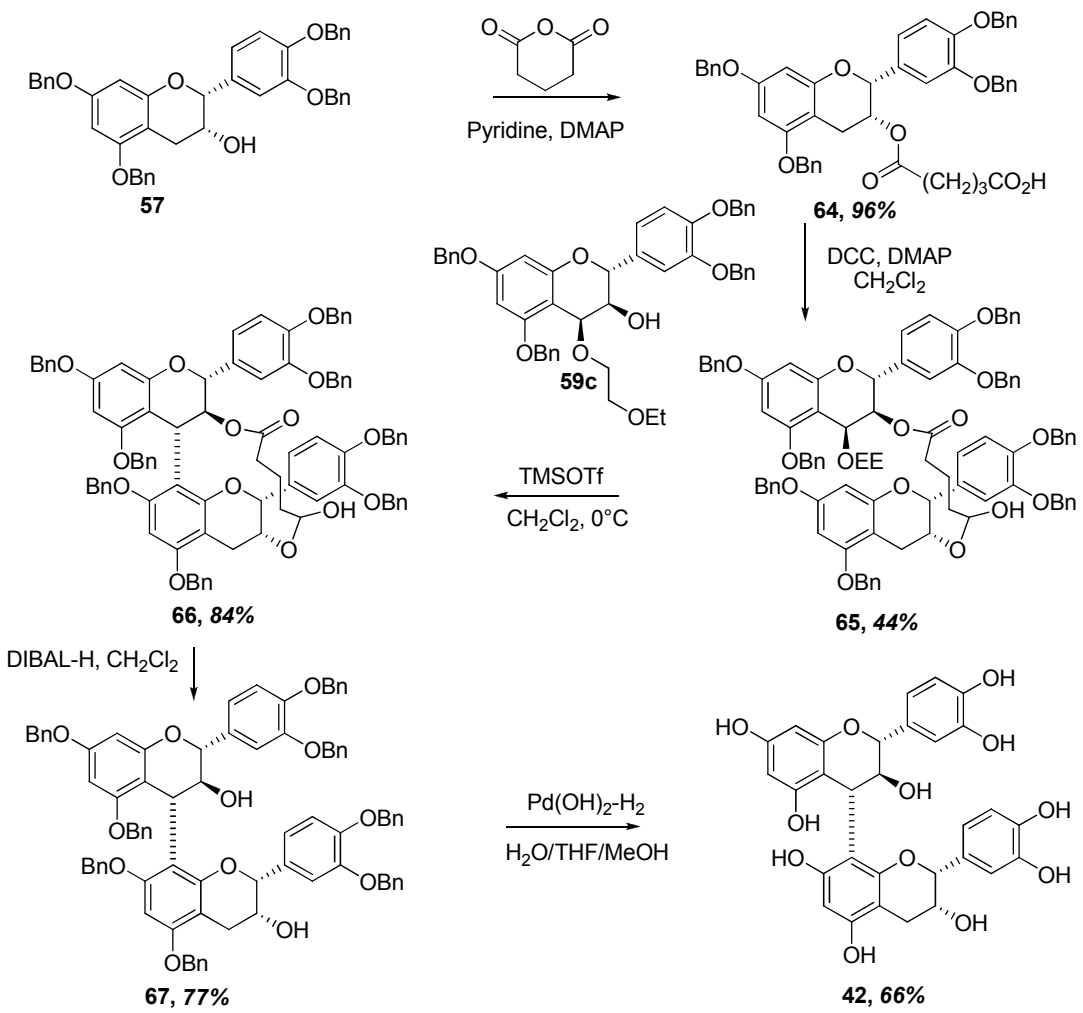


Figure II.11

a) Activation de la position 4

L'activation de la position 4 de l'unité supérieure avec un groupe partant est essentielle pour le couplage cationique activé avec un acide de Lewis. Cette étape peut être effectuée par la fonctionnalisation avec un hétéroatome tel qu'un brome[133] un soufre[108,109] ou un oxygène.[134,135] L'utilisation de l'oxygène permet d'offrir un bon équilibre entre la stabilité du précurseur obtenu et la réactivité de la liaison C-O en présence d'un acide de Lewis. L'oxydation diastéréosélective de cette fonction a été effectuée pour la première fois par Roux *et al.*[134] à l'aide de DDQ et a depuis été reprise par de nombreuses équipes.[123,124,126,130,131] La stéréochimie β obtenue est contrôlée, selon Steenkamp *et al.*,[136], par la stéréochimie du carbone C2. Le DDQ approche préférentiellement par la face

inférieure du cycle aromatique A, afin de minimiser les interactions avec le proton axial H2 et d'optimiser l'interaction « donneur-accepteur » des deux cycles aromatiques au sein du complexe à transfert de charge (Figure II.12).

Cette stéréochimie a depuis été confirmée par RMN 1D (^{1}H, ^{13}C, DEPT) et 2D (COSY, HMQC, HMBC).[130,137] De plus, au cours de la thèse soutenue en 2002 par Karine Barathieu,[138] une étude de dichroïsme circulaire et de modélisation moléculaire, a confirmé cette hypothèse.

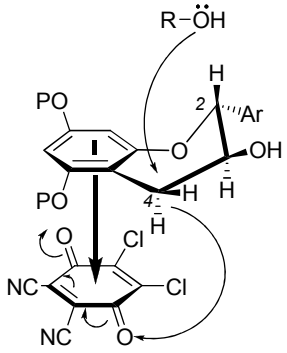


Figure II.12

Selon cette méthode, plusieurs nucléophiles, tels que l'eau, ou bien des alcools peuvent être utilisés. L'utilisation du méthanol permet d'améliorer la stabilité du précurseur par rapport à l'utilisation d'un dérivé 3,4-diol. Par ailleurs, là où Kawamoto[122] obtenait un mélange 3/2 entre le dimère naturel (trans) et le dimère non naturel (cis) avec un hydroxyle comme groupement partant, Vercauteren[125] obtenait un rapport 2/1 en utilisant les mêmes conditions de réaction mais avec un méthoxyle comme groupe partant.

Par contre l'utilisation d'éther hydroxylé permet d'améliorer considérablement le stéréocontrôle lors du couplage catalysé avec $TiCl_4$. Tückmantel[123] avait précédemment utilisé ce nucléophile lors de la synthèse du B2, en espérant que l'utilisation d'un nucléophile plus polaire permettrait une meilleure séparation du produit désiré des produits secondaires telle que l'épicatechine oxydée en C2. Au laboratoire, Isabelle Tarascou [130,137] a utilisé l'éthylène glycol comme nucléophile dans les mêmes conditions et dans ce cas seul le dimère naturel est obtenu.

Ceci peut être expliqué par le fait que $TiCl_4$ adopte préférentiellement un état bis-chélaté et que le substituant hydroxy-éthyloxy est un bon ligand bidentate. Le carbocation benzylique intermédiaire est stabilisé en ion oxonium par l'assistance de l'hydroxyle en

position 3. L'attaque du nucléophile ne peut alors se faire qu'en anti par rapport à l'oxonium (Figure II.13). Dans le cas d'un ligand monodentate, la stabilisation du carbocation intermédiaire par la formation d'un ion oxonium n'est pas possible car l'hydroxyle est déjà engagé dans la sphère de coordination du titane. L'attaque du nucléophile peut alors se faire par les deux faces et la stéréosélectivité est dans ce cas incomplète.

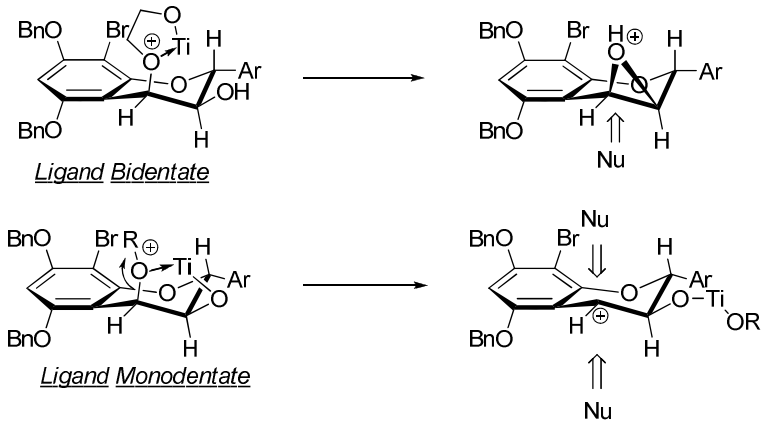
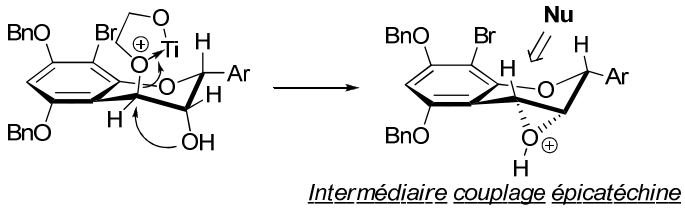


Figure II.13

Dans le cas de l'épicatéchine, la stéréochimie β, également obtenue dans le cas de la catéchine, est constatée après oxydation (stéréochimie induite par C2). Cependant, les dimères obtenus après couplage présentent bien la stéréochimie trans (β) des dimères naturels. Lors du couplage, la configuration de la position C4 est dans ce cas conservée.

Tückmantel n'ayant pas déterminé la stéréochimie du précurseur activé, aucune précision n'a été avancée pour expliquer cette rétention de configuration. Il semble logique de postuler une assistance de l'hydroxyle voisin pour expliquer ce diastéréocontrôle.

En effet le même complexe bidentate est formé, et l'hydroxyle du C3 alors en position axiale-axiale par rapport à l'oxygène du ligand et non engagé dans la sphère de coordination du titane assiste le départ du complexe activé. L'intermédiaire oxonium résultant peut alors être ouvert régiosélectivement en position benzylique par l'attaque du nucléophile et la configuration du carbone C4, résultant d'une double inversion de configuration, est alors conservée (Figure II.14).



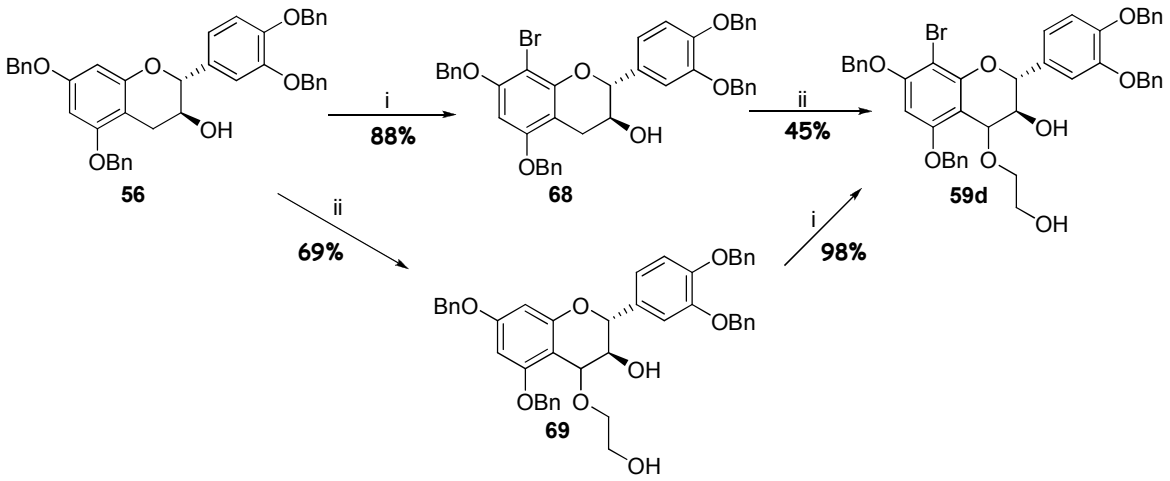
Intermédiaire couplage épicatéchine

Figure II.14

b) Protection de la position 8

Comme nous l'avons vu précédemment, un moyen peu élégant de contrôler l'oligomérisation est d'utiliser l'unité nucléophile en excès lors du couplage afin d'éviter que l'unité électrophile ne réagisse sur elle-même ou sur le dimère formé. Isabelle Tarascou[130,137] a, au cours de sa thèse, développé une nouvelle méthode afin de contrôler le degré d'oligomérisation. Le blocage de la position 8 de l'unité électrophile empêche l'unité électrophile de réagir sur la position 8 du dimère formé, bloquant ainsi tout accès aux oligomères d'ordre supérieur. La différence de réactivité des positions C6 et C8 permet d'obtenir des halogénations régiosélectives en positions C6 ou C8 en jouant à la fois sur les protections et la nature du solvant utilisé.[115,139,140,141]

Dans un premier temps, des essais ont été effectués avec l'iode comme groupe protecteur[138] mais devant la fragilité de la liaison C-I observée lors de l'étape de couplage, le brome a été préféré. Cette fonctionnalisation de la position C8 est d'ailleurs utilisée lors des couplages organométalliques[120,121] et cationiques.[128] Un équivalent de *N*-bromosuccinimide dans le dichlorométhane permet de bromer quantitativement la catéchine (ou l'épicatéchine) benzylée, activée. Il est préférable d'effectuer la bromation de la catéchine après l'activation de la position 4 afin d'augmenter le rendement global des deux étapes (Figure II.15).



i : NBS (1 éq.), CH_2Cl_2, -78°C, 1h puis ta, 6h ii : éthylène glycol (6 éq.), DDQ (2 éq.), CH_2Cl_2 ,ta, 3h puis DMAP (2 éq.), 10 min

Figure II.15

c) Déprotection des groupements benzyles

L'étape de déprotection doit être effectuée dans des conditions douces et neutres afin d'éviter à la fois la rupture de la liaison interflavane mais également la dégradation du dimère natif obtenu par ouverture du cycle et/ou épimérisation. Les différentes méthodes de la littérature proposent des hydrogénolyses catalytiques qui diffèrent par la nature du catalyseur, du donneur d'hydrogène, du solvant ou de la température de la réaction.

En utilisant le palladium sur charbon et ceci quelle que soit la source d'hydrogène (H_2,[118,122] 1,4-cyclohexadiène,[142] acide acétique[117]) et la nature du solvant (dioxane,[123,143] éthanol-THF 1/5,[144] méthanol), la débenzylation n'est pas totale. De meilleurs résultats sont obtenus avec un autre catalyseur palladié : le catalyseur de Pearlman ($Pd(OH)_2$ sur charbon). Ce catalyseur a été utilisé sous atmosphère d'hydrogène pour déprotéger des procyanidines benzylées dans différents systèmes de solvant : THF/H_20,[124] $THF/MeOH/H_20$,[145,146] AcOEt/MeOH.[121,130]

Au cours de sa thèse, Isabelle Tarascou a mis au point une méthode de débenzylation et de débromation simultanée. D'après Sajiki[147,148] l'utilisation de palladium sur charbon en présence de triéthylamine permet d'effectuer des réactions de déchloration de composés aromatiques chlorés. La triéthylamine permettrait d'activer le

catalyseur mais aussi de piéger l'acide chlorhydrique formé et ainsi d'éviter la dégradation du dimère natif.

En réalisant une hydrogénolyse avec le catalyseur de Pearlman et de la triéthylamine dans un mélange 1/1 (v/v) d'acétate d'éthyle et de méthanol, les quatre dimères natifs (B1, B2, B3, B4) ont ainsi pu être obtenus quantitativement après 18h de réaction (Figure II.16).

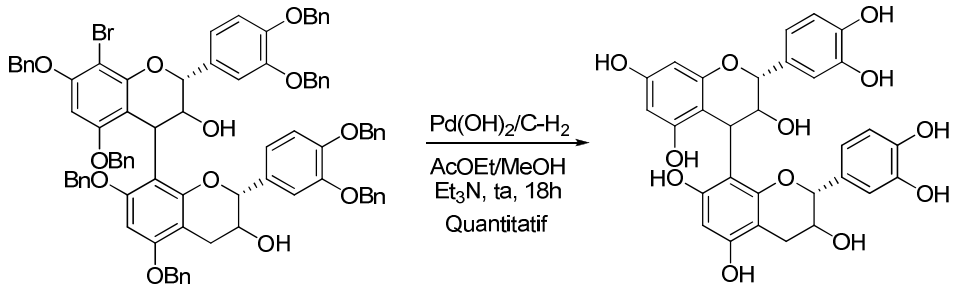
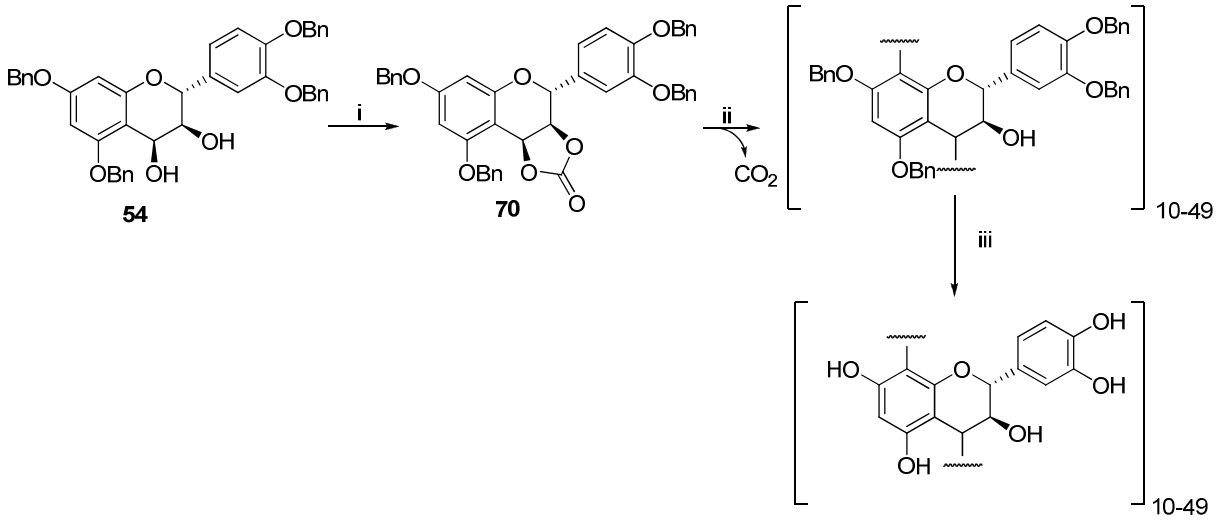


Figure II.16

II.1.3. **Synthèse d'oligomères supérieurs**

La synthèse d'oligomères supérieurs impose les mêmes problèmes que pour la synthèse des dimères : contrôle de la régiosélectivité, de la stéréosélectivité et du degré de l'oligomérisation.

En 1991, Kawamoto[122] a développé une méthode impliquant le couplage d'un flavan-3,4-diol benzylé et d'un flavanol benzylé en présence d'un acide de Lewis ($TiCl_4$). Cette méthode ne permet pas l'obtention de tanins condensés de haute masse moléculaire car l'acide de Lewis utilisé est désactivé par l'eau issue de la polymérisation déshydratante des dérivés flavan-3,4-diols de départ. Il a alors décidé de réaliser le couplage en utilisant d'autres précurseurs qui permettent une polymérisation après décarboxylation. En 1997, Kawamoto[149] décrit alors une synthèse de tanins condensés de haute masse moléculaire par polymérisation cationique de flavan-3,4-carbonate (Figure II.17). Après synthèse du flavan-3,4-carbonate **70**, à partir du flavan-3,4-diol **54** par addition de *N,N'*-carbonyldiimidazole, la polymérisation est effectuée en présence de $BF_3.Et_2O$ dans le dichlorométhane à 0°C. Après 10 jours de réaction, un mélange d'oligomères ayant un degré de polymérisation moyen (DP_m) de 49 est obtenu.



i : N,N'-carbonyldiimidazole (2 éq.), benzène, reflux, 4,5h ii : $BF_3.Et_2O$ (0,2 éq.), CH_2Cl_2 ,0°C, 24-264h
iii: 10% Pd-C, THF/EtOH (4/1), H_2, ta, 38h

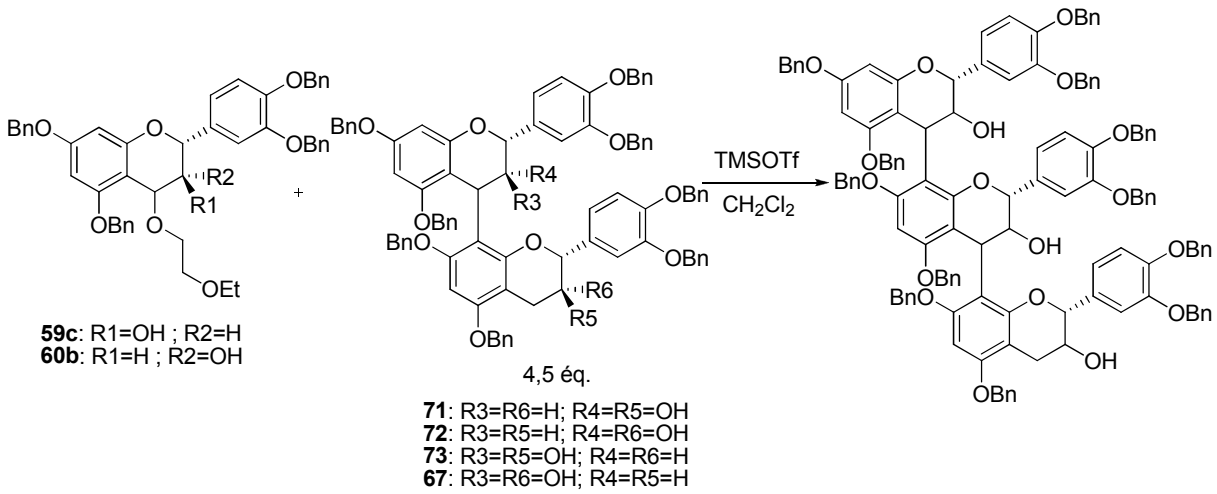
Figure II.17

Les auteurs précisent qu'il est possible de faire varier les masses moléculaires par une modulation du temps de réaction. La déprotection des fonctions phénols est réalisée par hydrogénolyse avec du Pd-C (10%) comme catalyseur dans un mélange éthanol/THF (4/1, v/v) 20%. Même si cette réaction est hautement régiosélective et stéréosélective, l'obtention d'un mélange d'oligomères nécessite le recours à de fastidieuses purifications par chromatographie afin d'obtenir l'oligomère recherché. Nous nous retrouvons donc avec les mêmes limitations que dans le cas d'isolation d'un oligomère particulier à partir d'un extrait naturel ce qui rend inapplicable cette méthodologie pour la préparation de quantités supérieures à quelques milligrammes.

Plus récemment, Kozikowski *et al.* [150] ont présenté une synthèse similaire où ils couplent un flavanol fonctionnalisé avec un thioéther en position 4 et un acétate en position 3 avec un des oligomères (dimère, trimère ou tétramère) d'épicatéchine obtenu lors d'un couplage cationique catalysé par $TiCl_4$[123] (entrée 2 tableau II.1). Cette synthèse leur permet d'obtenir des oligomères jusqu'à l'undécamère. Mais dans ce cas-là également, l'oligomérisation n'est pas contrôlée et l'utilisation ultérieure de chromatographie préparative est indispensable.

En 2004, Saito *et al.*[145,146] ont présenté une synthèse stéréosélective de procyanidines trimères. En reprenant leur méthodologie de synthèse des dimères de

procyanidines par couplage intermoléculaire[129] (entrée 8, tableau II.1), ils ont réalisé la synthèse de trimères de procyanidines en couplant la catéchine ou l'épicatéchine benzylée activée avec un dimère benzylé en présence de l'acide de Lewis TMSOTf (Figure II.18).



59c: R1=OH ; R2=H
60b: R1=H ; R2=OH

71: R3=R6=H; R4=R5=OH
72: R3=R5=H; R4=R6=OH
73: R3=R5=OH; R4=R6=H
67: R3=R6=OH; R4=R5=H

Entrée	Electrophile	Nucléophile	Température	Rdt
1	60b	71	-78°C	90 %
2		72	-40°C	91%
3		73	-20°C	62%
4		67	-20°C	90%
5	59c	71	-78°C	47%
6		72	-78°C	44%
7		73	-78°C	100%
8		67	-78°C	0%

Figure II.18

Bien que dans ce cas, l'oligomérisation, la régiosélectivité et la stéréosélectivité, soient contrôlées, l'inconvénient de cette méthode réside dans l'utilisation d'un grand excès de nucléophile (4,5 équivalents) aussi bien pour la synthèse du dimère précurseur que pour la synthèse du trimère lui-même. En 2008, Kondo[132] a proposé à peu près la même voie de synthèse, excepté que la position 3 de l'unité électrophile **62c** est protégée par un acétate et que dans son cas c'est l'unité électrophile **62c** qui est utilisée en excès (1,5 équivalents). Le précurseur protégé du trimère *C1* **74** est alors obtenu avec un rendement de 70% (Figure II.19).

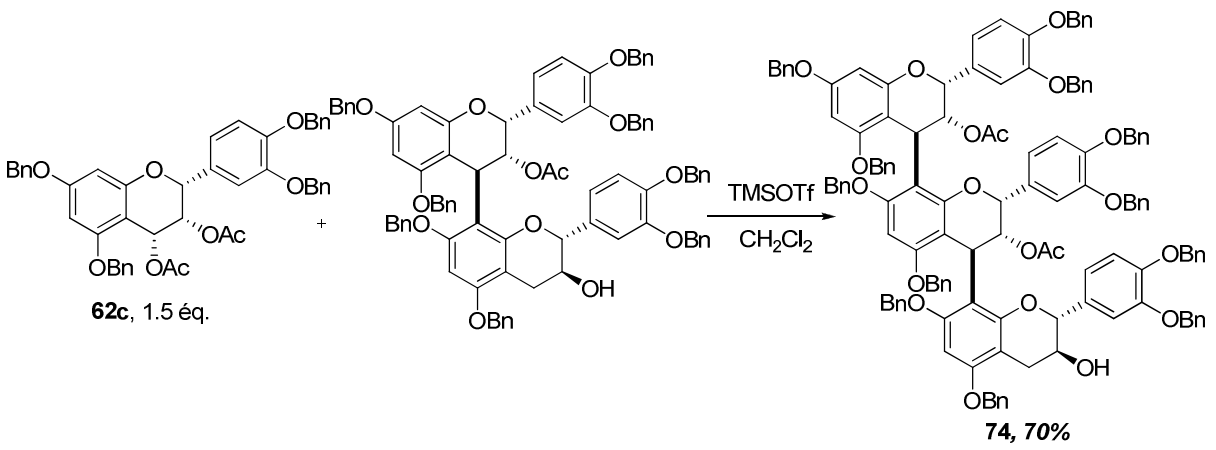


Figure II.19

En utilisant un autre acide de Lewis, $B(C_6F_5)_3$ en condition catalytique (10%), il a réalisé la polymérisation en chaine de la 4-acétoxy-3-acétylcatéchine benzylée **62c**. Il a obtenu, *via* cette voie, un mélange d'oligomères avec un degré moyen de polymérisation de 15 et un rendement supérieur à 93%. Cette méthodologie présente néanmoins les mêmes inconvénients que les synthèses de Kawamoto et Kozikowski décrites plus haut.

Au laboratoire, Isabelle Tarascou a, durant sa thèse, mis au point une méthode itérative de synthèse des procyanidines qui permet de contrôler la régiochimie et la stéréochimie des liaisons interflavanes et d'obtenir sélectivement des oligomères dans des conditions de réactions stœchiométriques. Comme montré dans le tableau II.1, la méthode permet l'obtention des quatre dimères de régiochimie 4-8 avec une totale stéréosélectivité et un complet contrôle de l'oligomérisation. Les dimères ainsi obtenus sont, après déprotection quantitative du brome avec du butyllithium, engagés à nouveau dans une réaction avec une unité électrophile de catéchine ou d'épicatéchine activée et bromée en présence de $TiCl_4$, afin de générer un trimère. Une autre possibilité de cette méthode itérative est de réaliser l'oxydation du dimère obtenu et de réaliser le couplage de cette unité activée avec une catéchine ou une épicatéchine benzylée. De même, plusieurs voies permettent d'obtenir un tétramère ; les trois voies envisageables sont décrites sur la figure II.20.

Cette méthodologie a été appliquée à la synthèse du trimère C2 **32** et du trimère cat-(4a-8)-cat-(4a-8)-épi. En procédant de même avec un trimère et une nouvelle unité

électrophile, le tétramère cat-(4a-8)-cat-(4a-8)-cat-(4a-8)-cat a également été synthétisé.

Cette méthode itérative peut être adaptée à la synthèse des différents trimères et oligomères supérieurs. A ce jour elle est la seule qui permette l'obtention d'oligomères dans des conditions stéréo- et régiosélectives, avec un complet contrôle de l'oligomérisation tout en effectuant le couplage dans des conditions quasi stœchiométriques.

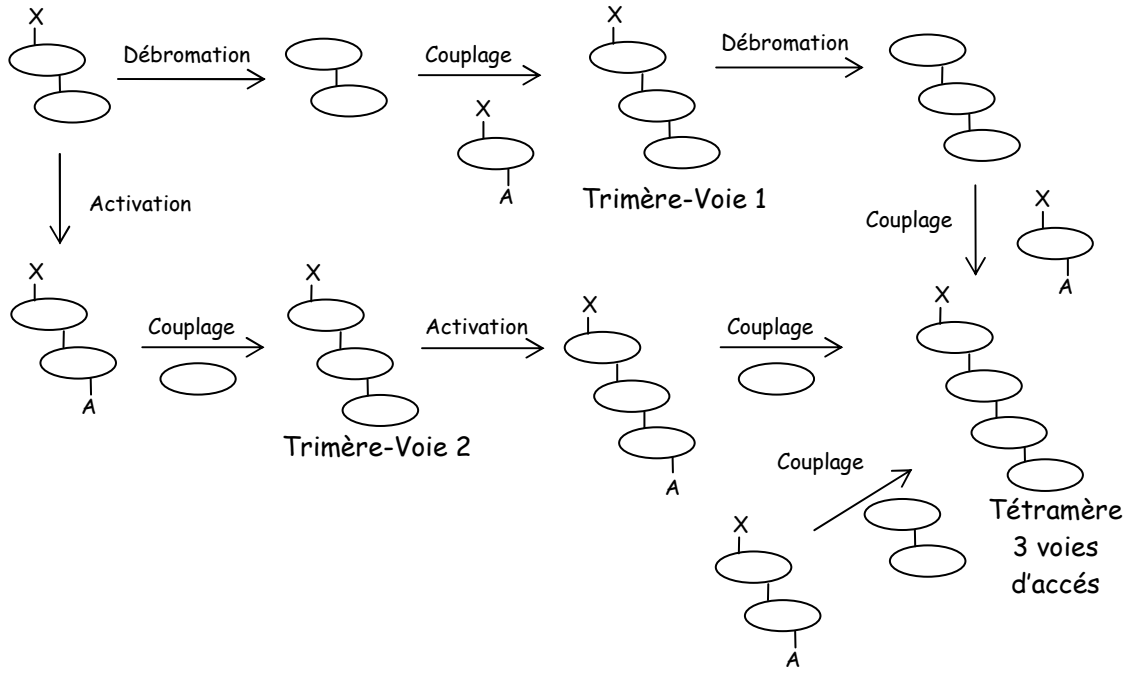


Figure II.20

II.1.4. **Synthèse des dimères gallates**

Dès 1999, Tückmantel *et al.*[123] ont proposé une voie d'accès au dimère B2 bisgallate **75**, à partir du dimère B2 benzylé **72** obtenu *via* leur méthode décrite précédemment (voir II.1.2.1). L'acide tri-*O*-benzylgallique converti *in-situ* en son chlorure d'acyle **76** permet l'estérification du dimère **72** dans une solution de pyridine en présence de DMAP. Le diester **77** est obtenu presque quantitativement, et l'hydrogénation catalysée avec $Pd(OH)_2/C$ permet d'accéder à l'hydrate **75** avec un rendement de 90% (Figure II.21). Cette voie de synthèse qui nécessite 5 équivalents d'acide tri-*O*-benzylgallique, ne permet l'accès qu'à ce dimère bisgallate. Les dimères monogallates ne peuvent pas être synthétisés sélectivement par cette voie.

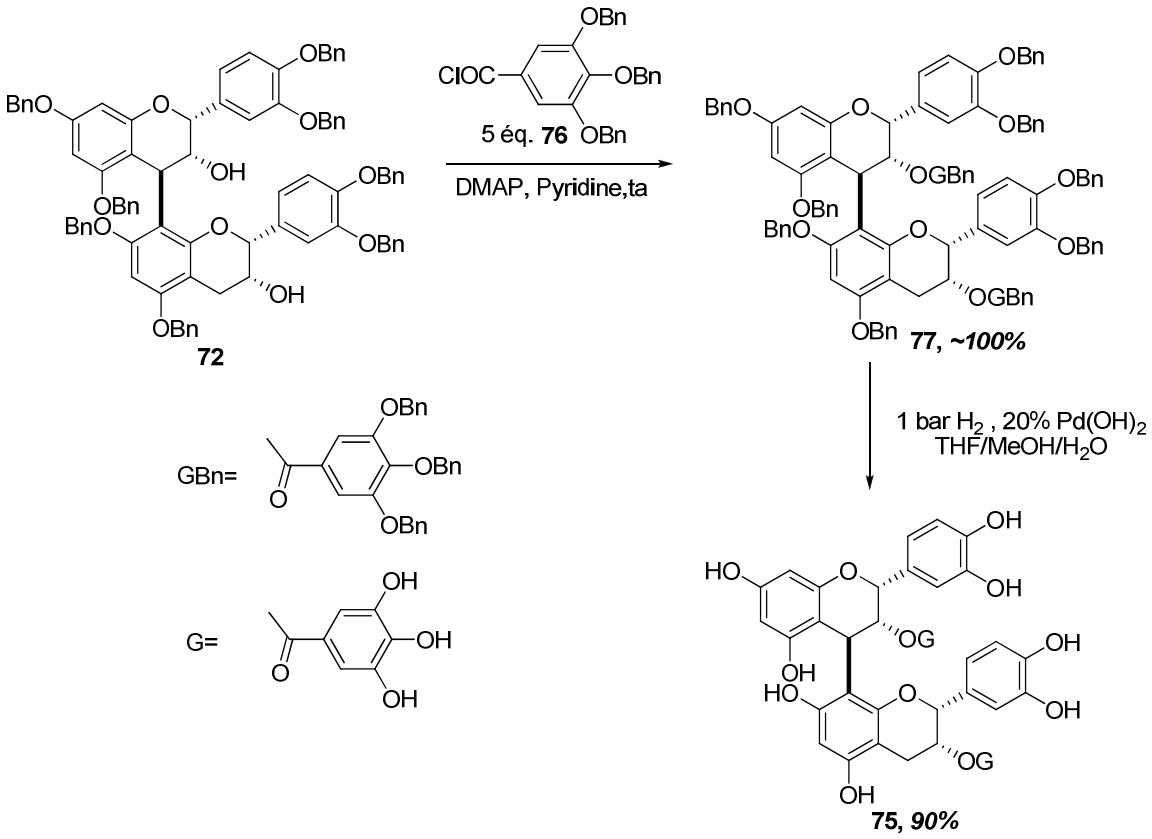


Figure II.21

Plus récemment en 2004, Saito *et al.*[151] ont proposé une synthèse stéréosélective des procyanidines B3-3-*O*-gallate et B3-3,3''-di-*O*-gallate. Bien qu'intéressante, nous ne détaillerons pas cette synthèse ici, car il s'agit de produits non naturels. En effet comme nous l'avons vu précédemment, le groupement gallate est exclusivement porté par des unités épicatéchines. En 2005, la même équipe[152] a présenté une voie générale pour l'obtention des procyanidines B1 et B2 gallates. Six procyanidines gallates sont synthétisées selon leur méthode mais seules quatre d'entre elles correspondent à des procyanidines naturelles : la B2-3-*O*-gallate, la B2-3''-*O*-gallate, la B2-3,3''-*O*-gallate (déjà synthétisé par Tückmantel[123]) et la B1-3-*O*-gallate.

L'étape de condensation est identique à celle développée par cette même équipe pour l'obtention des dimères B1, B2, B3 et B4 (voir II.1.2.1). Suivant la procyanidine gallate désirée, l'unité nucléophile et/ou électrophile est initialement estérifiée avec l'acide tri-*O*-benzylgallique **78** avant le couplage, avec un rendement de 85% pour l'unité électrophile **79** et un rendement de 96% pour l'unité nucléophile **80** (Figure II.22).

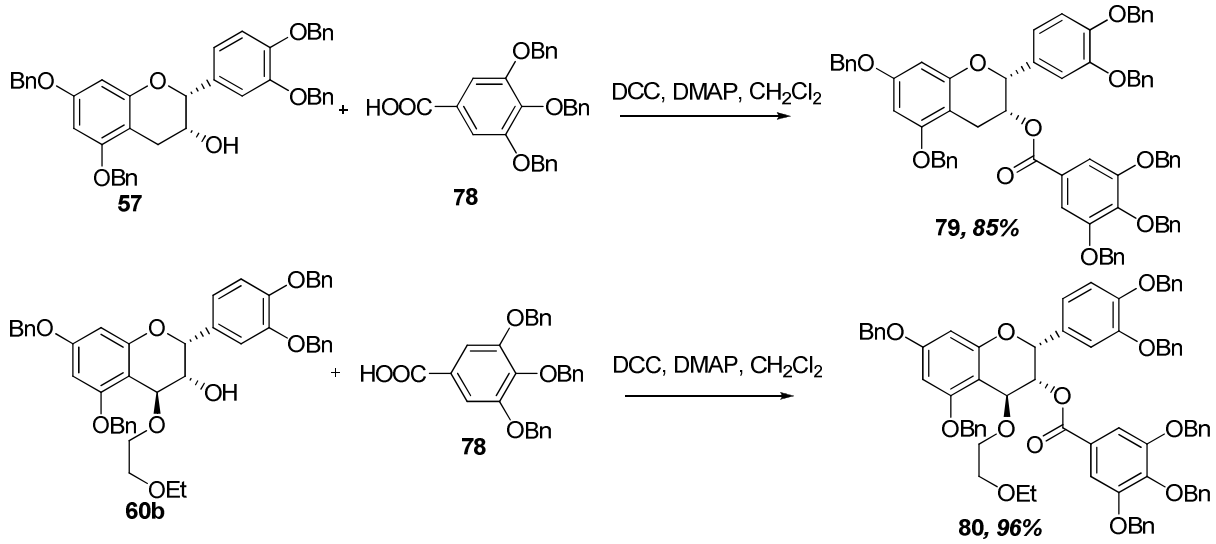


Figure II.22

Les précurseurs ainsi obtenus peuvent être couplés en présence de TMSOTf pour donner les différents dimères benzylés avec des rendements variant de moyens (46% pour B2-3''-*O*-gallate **81**) à très bons (99% pour le bisgallate **77**) (Figure II.23). La déprotection des dimères benzylés obtenus est réalisée par hydrogénolyse avec des rendements compris entre 60 et 78%.

Bien que permettant l'accès à quatre dimères gallates différents avec de bons rendements lors du couplage, l'inconvénient de cette méthode réside toujours dans l'utilisation d'un grand excès (4 équivalents) d'unité électrophile.

En 1996, la même équipe[153] a décrit une synthèse du dimère B4 gallate mais le problème du large excès d'électrophile est conservé.

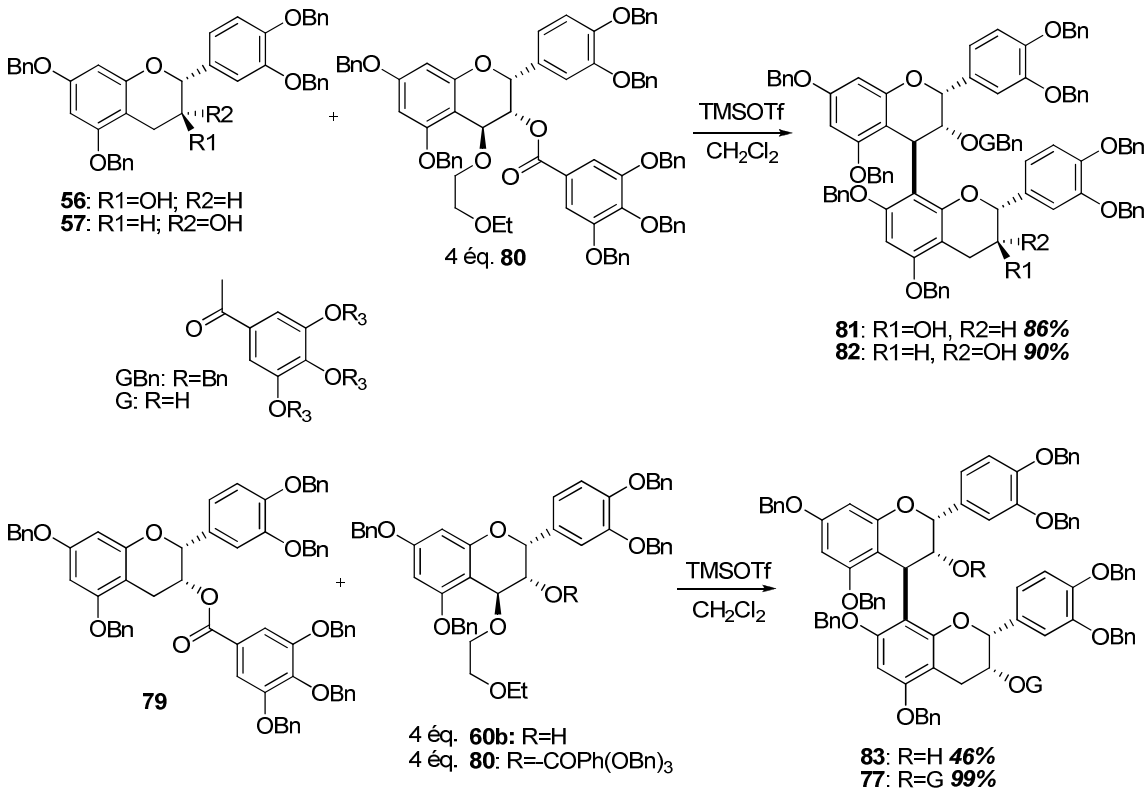

56: R1=OH; R2=H
57: R1=H; R2=OH
4 éq. 80
TMSOTf
CH2Cl2
81: R1=OH, R2=H 86%
82: R1=H, R2=OH 90%
GBn: R=Bn
G: R=H
79
4 éq. 60b: R=H
4 éq. 80: R=–COPh(OBn)3
TMSOTf
CH2Cl2
83: R=H 46%
77: R=G 99%

Figure II.23

II.2 **Voie de synthèse utilisée pour la synthèse des standards**

La voie choisie pour la synthèse des procyanidines, utilisées comme standards pour la quantification dans les baies de raisins et le vin, est celle développée au laboratoire.[130,137] En effet, elle a permis d'obtenir des procyanidines dimères mais aussi des trimères et un tétramère en respectant les conditions de contrôle de l'oligomérisation, de régio- et stéréosélectivité, ceci tout en utilisant les précurseurs en quantités stœchiométriques (Figure II.24).

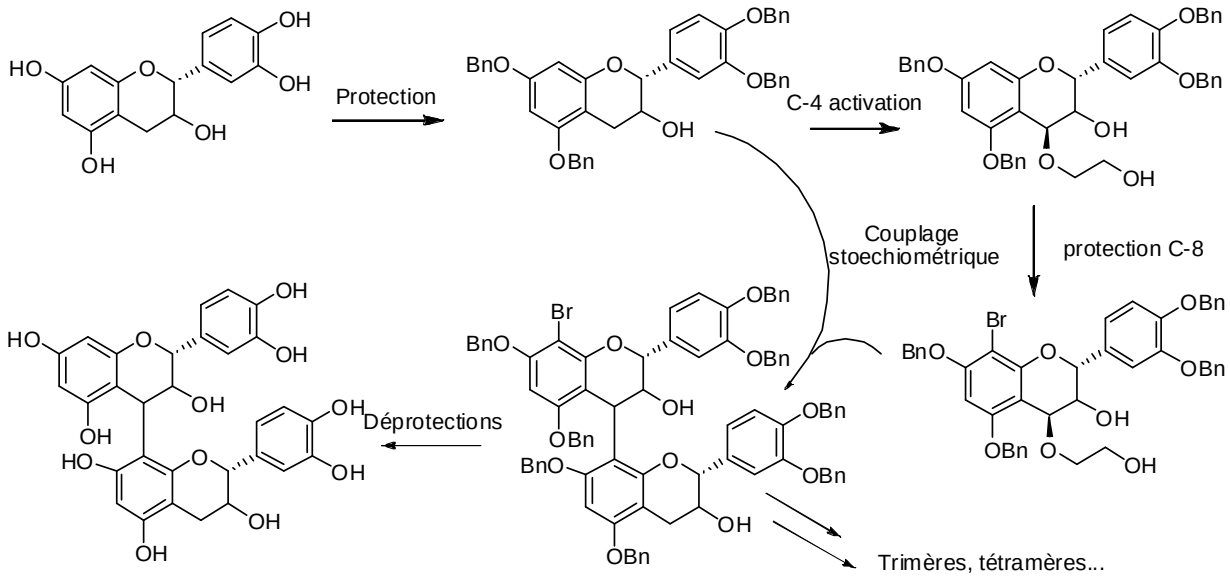


Figure II.24

Les différents dimères 4-8 sont ainsi synthétisés en 5 étapes, les trimères en 7 étapes et le tétramère en 9 étapes. Les différentes étapes ainsi que les conditions de synthèse appliquées sont détaillées ci-après.

II.2.2. **Préparation des dimères**

La synthèse des dimères repose sur un couplage cationique entre une unité électrophile et une unité nucléophile. L'unité nucléophile **56,57** est préparée par simple protection des fonctions phénols de la catéchine **1** ou de l'épicatéchine **2**. En ce qui concerne l'unité électrophile **59d,60c**, la première étape est identique mais le flavanol protégé **56,57** est ensuite activé en position 4 avant d'être protégé en position 8 par bromation (Figure II.25).

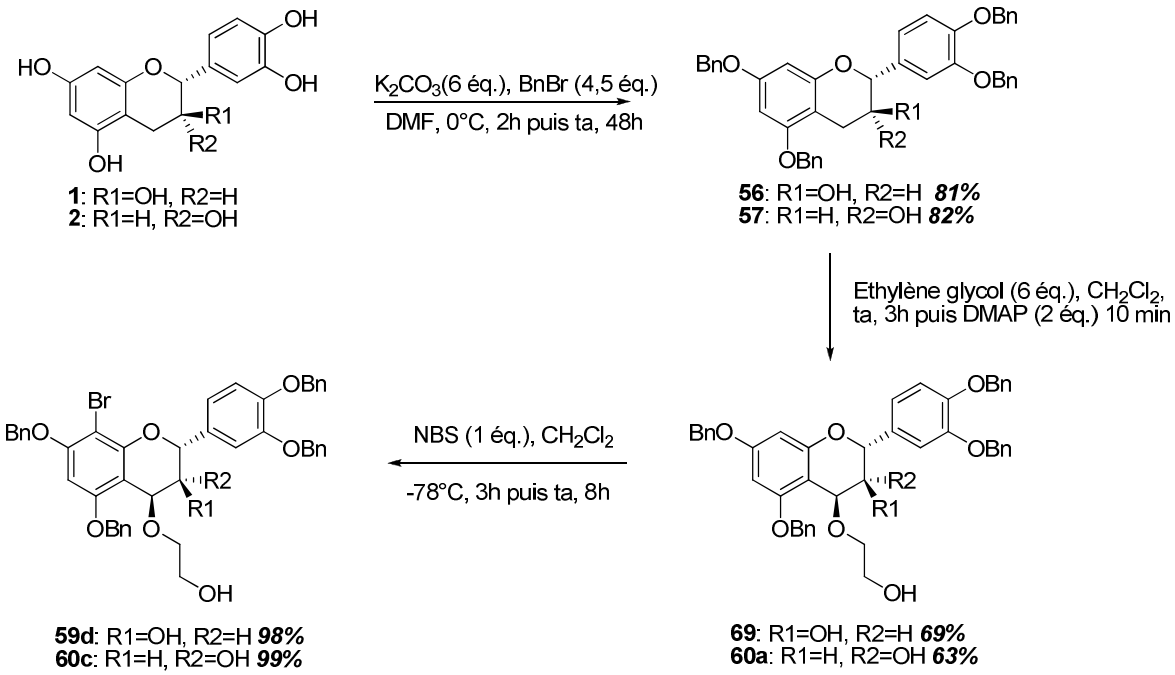


Figure II.25

Les précurseurs ainsi obtenus peuvent alors être couplés en présence de $TiCl_4$ afin d'obtenir les quatre dimères B1, B2, B3 et B4 sous leurs formes protégées **84-87** (Figure II.26).

La dernière étape de la synthèse consiste à déprotéger les fonctions phénols et la position 8 de l'unité supérieure. Ces deux déprotections peuvent se faire en une seule étape (Figure II.16). Le processus de débenzylation nécessite seulement une filtration sur célite® pour retirer le palladium mais le bromhydrate de triéthylamine formé lors de la débromation nous oblige à effectuer une rapide filtration sur silice en utilisant un mélange de solvant très polaire (MeOH/acétone) pour éviter que le produit ne se dégrade sur la colonne. Les dimères natifs **30,37,53,68** ainsi obtenus sont prêts à être utilisés comme standards en CLHP après avoir été préalablement lyophilisés.

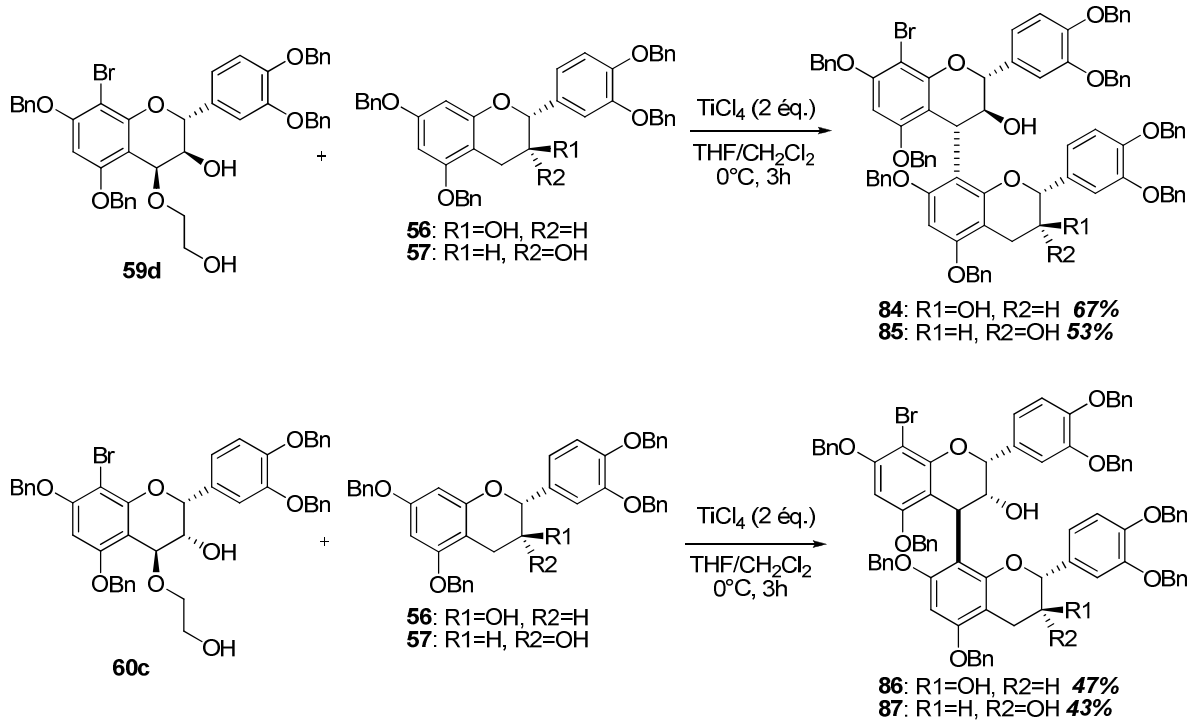


Figure II.26

II.2.3. **Préparation des trimères et du tétramère**

Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique, la méthode itérative développée au laboratoire permet l'accès aux trimères suivant deux voies différentes et aux tétramères suivant trois voies différentes. Le choix de la voie d'accès peut se faire suivant les précurseurs disponibles ainsi que les rendements engendrés. Nous avons utilisé pour ces synthèses les voies ayant présenté les meilleurs rendements.

Les trimères C2 **32** et Cat-Cat-Epi **88** sont préparés en trois étapes à partir des dimères B3BnBr **84** ou B4BnBr **85** initialement synthétisés comme indiqué ci-dessus. La position 8 de **84** ou **85** est déprotégée par une réaction d'échange halogène-métal à l'aide de butyllithium suivie d'une hydrolyse. Le dimère **73,67** obtenu est engagé dans une réaction de couplage catalysée avec la même unité nucléophile **59d** que dans le cas de la synthèse des dimères. Les trimères natifs **32,88** sont obtenus après hydrogénolyse à l'aide du catalyseur de Pearlman (Figure II.27).

Le tétramère **91** est synthétisé suivant un processus similaire en trois étapes à partir du trimère C2 benzylé et bromé **89** (Figure II.28).

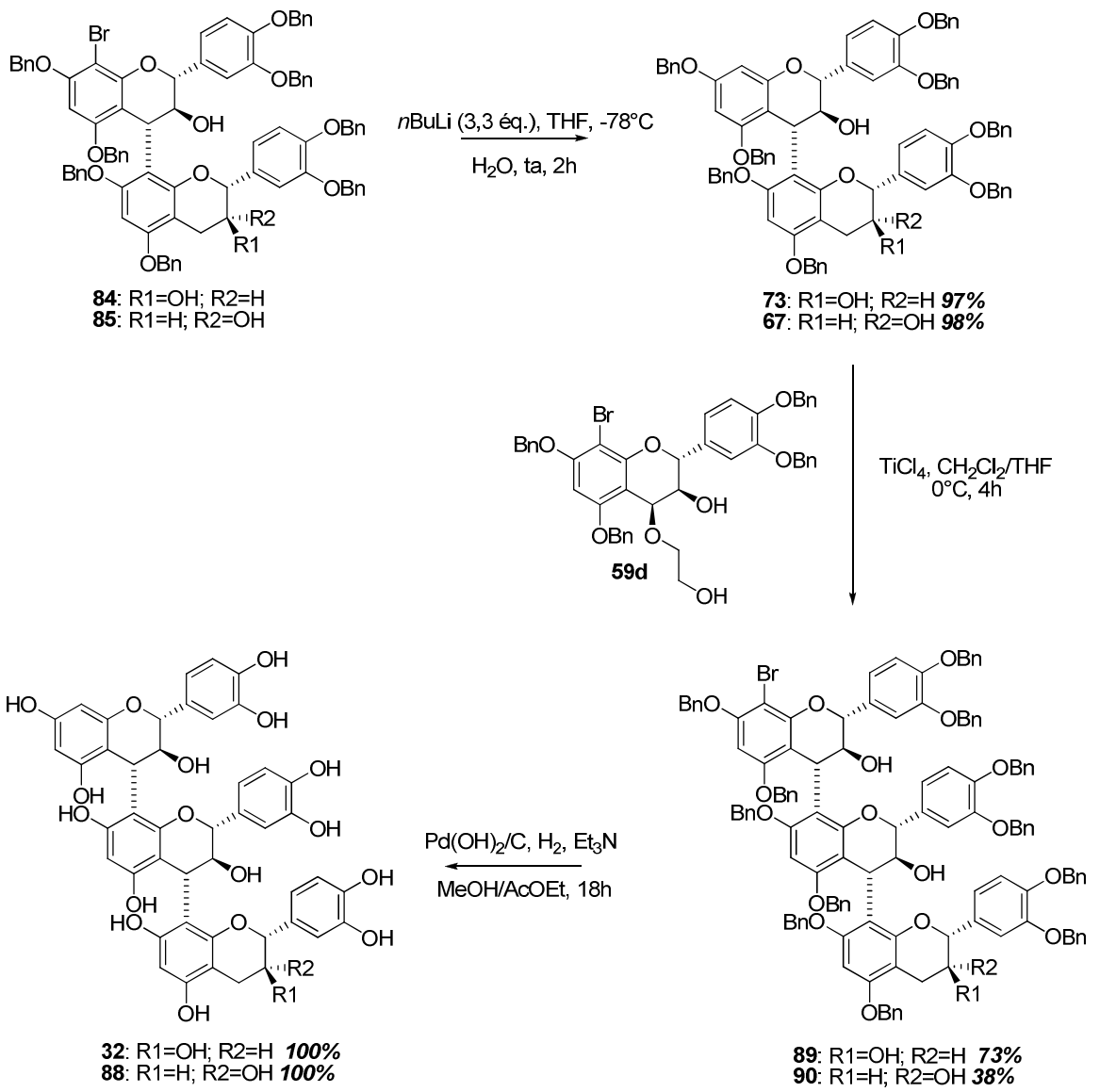


Figure II.27

Avec cette voie de synthèse les quatre dimères B1 **37**, B2 **53**, B3 **30** et B4 **42** de régiochimie 4-8 ont pu être synthétisés en 5 étapes à partir de la catéchine **1** ou de l'épicatéchine **2** commerciales avec des rendements globaux respectifs de 24%, 22%, 36% et 29%. Les trimères C2 **32** et Cat-Cat-Epi **88** ont été synthétisés en 7 étapes avec des rendements globaux respectifs de 26% et de 11%. Quant au tétramère **91** il a été synthétisé en 9 étapes avec un rendement global de 10%.

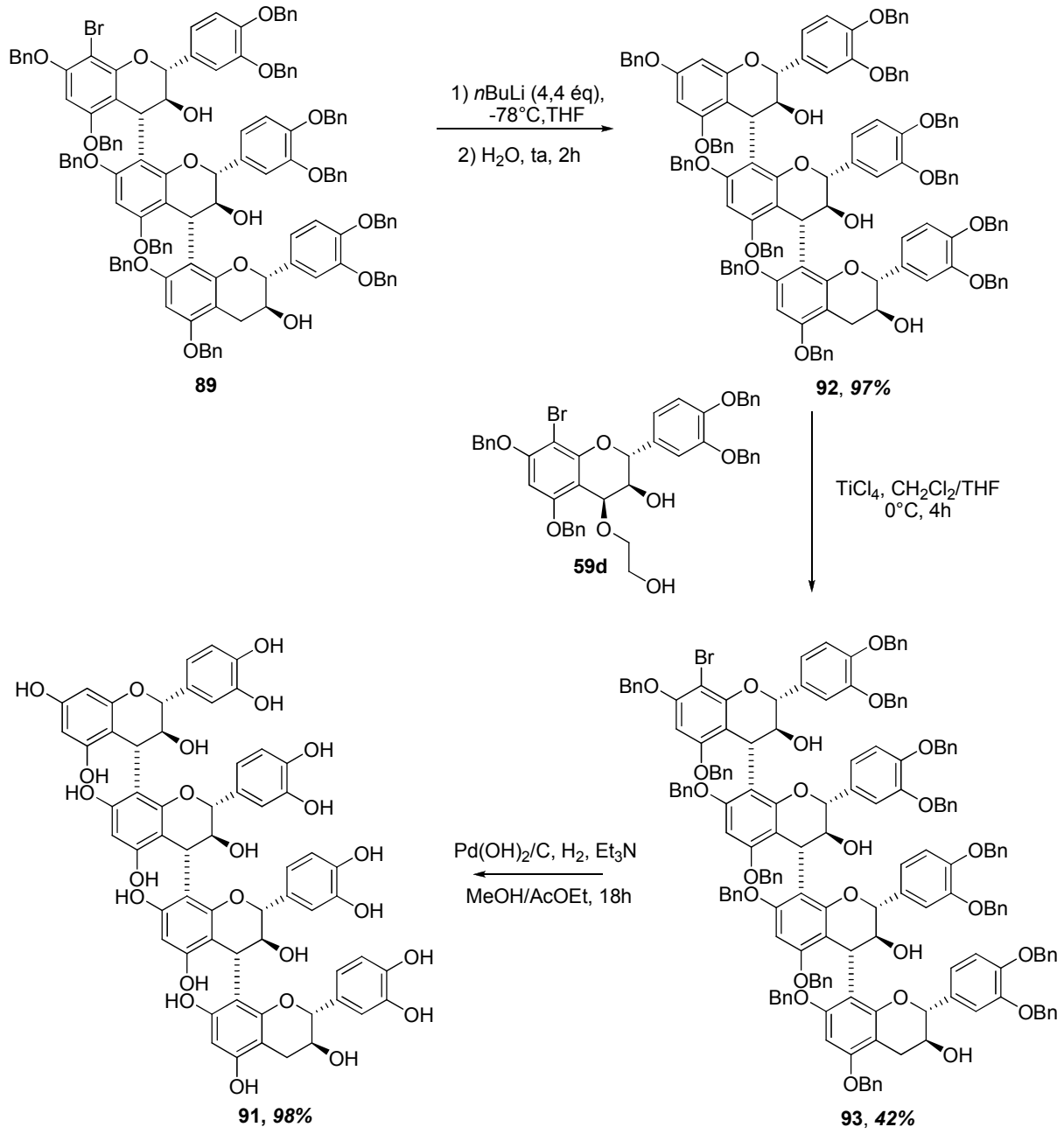


Figure II.28

II.2.4. **Etape de déprotection**

Le laboratoire a récemment fait l'acquisition d'un système H-Cube® qui permet de faire des réactions en flux continu. Cet équipement est constitué d'un générateur de dihydrogène par électrolyse de l'eau et d'un système de cartouches de catalyseurs permettant d'effectuer des hydrogénations de manière plus pratique, plus efficace et dans des temps réactionnels raccourcis.

Des premiers essais de débenzylation et de débromation ont été effectués sur nos produits et les résultats sont probants. Nous avons testé, entre autre, la débenzylation et la débromation du dimère B3BnBr **84**.

Conditions et mode opératoire :

- Température ; 20°C, Pression H_2 ; 40 Bars, Débit ; 1ml/min, Solvant ; MeOH/AcOEt 50/50, cartouche ; $Pd(OH)_2/C$ (20%).
- 20 mg de dimère B3BnBr **84** sont dissous dans 2ml de solvant auxquels sont additionnés 10 équivalents de triéthylamine. La solution ainsi préparée est injectée et après 10 min de flux continu et évaporation des solvants, le dimère B3 est obtenu quantitativement.

Cette méthodologie présente pour nous différents avantages par rapport à l'hydrogénation classique en ballon avec comme source d'hydrogène des ballons de baudruche remplis d'hydrogène. Premièrement, le temps de réaction est considérablement raccourci (quelques minutes contre 18 heures), deuxièmement il n'est pas utile dans ce cas de travailler avec des solvants secs. Enfin l'étape de filtration sur Célite® n'est plus nécessaire. Ces premiers essais encourageants nous incitent à généraliser cette méthodologie pour les futures déprotections des procyanidines.

II.3 Une nouvelle synthèse des procyanidines gallates

Comme nous l'avons vu précédemment, deux stratégies peuvent être utilisées pour la synthèse de dimères gallates : soit par galloylation d'un dimère protégé,[123] soit par couplage d'unités monomères initialement galloylées.[151,152,153]

C'est cette deuxième stratégie que nous avons décidé de mettre en œuvre pour synthétiser des gallates dimères. La première étape consiste donc à synthétiser les précurseurs gallates avant l'étape de couplage qui reprendra les conditions utilisées dans le laboratoire pour la synthèse des autres procyanidines.

II.3.1. Synthèse du précurseur

Au cours de notre étude nous nous sommes intéressés uniquement à la synthèse des dimères ayant leur unité inférieure galloylée. Seul le précurseur épicatéchine galloylée a donc été préparé. Tückmantel *et al.*[123] ont réalisé la galloylation par estérification *in situ* de l'hydroxyle en position 3 avec le chlorure d'acyle de l'acide gallique alors que Saito *et al.*[151,152,153] ont réalisé l'estérification avec le couple DCC/DMAP. Les deux voies (Figure II.29) ont été testées au laboratoire et la voie avec le DCC a donné de meilleurs rendements. En utilisant 2 équivalents d'acide gallique benzylé **78** et de DCC et 0,05 équivalent de DMAP, l'épicatéchine benzylée galloylée **79** a été obtenue avec un rendement de 82%.

Afin de réaliser cette synthèse, l'utilisation de l'acide gallique tri-*O*-benzylé **78** est essentielle. Ce produit est commercial mais le coût excessif de ce précurseur nous a conduit à en réaliser la préparation.

La bibliographie présente diverses voies d'accès à ce précurseur.[154,155,156,157] L'acide gallique tri-*O*-benzylé **78** peut être obtenu en deux étapes soit par tétra-benzylation de l'acide gallique[155] **94** suivie d'une saponification soit par tri-benzylation[154,156,157] de l'ester méthylique de l'acide gallique **95** suivie d'une saponification de l'ester **96**. Les réactions de benzylation peuvent être conduites dans l'acétone ou le DMF et donnent des rendements compris entre 45% et 95%.

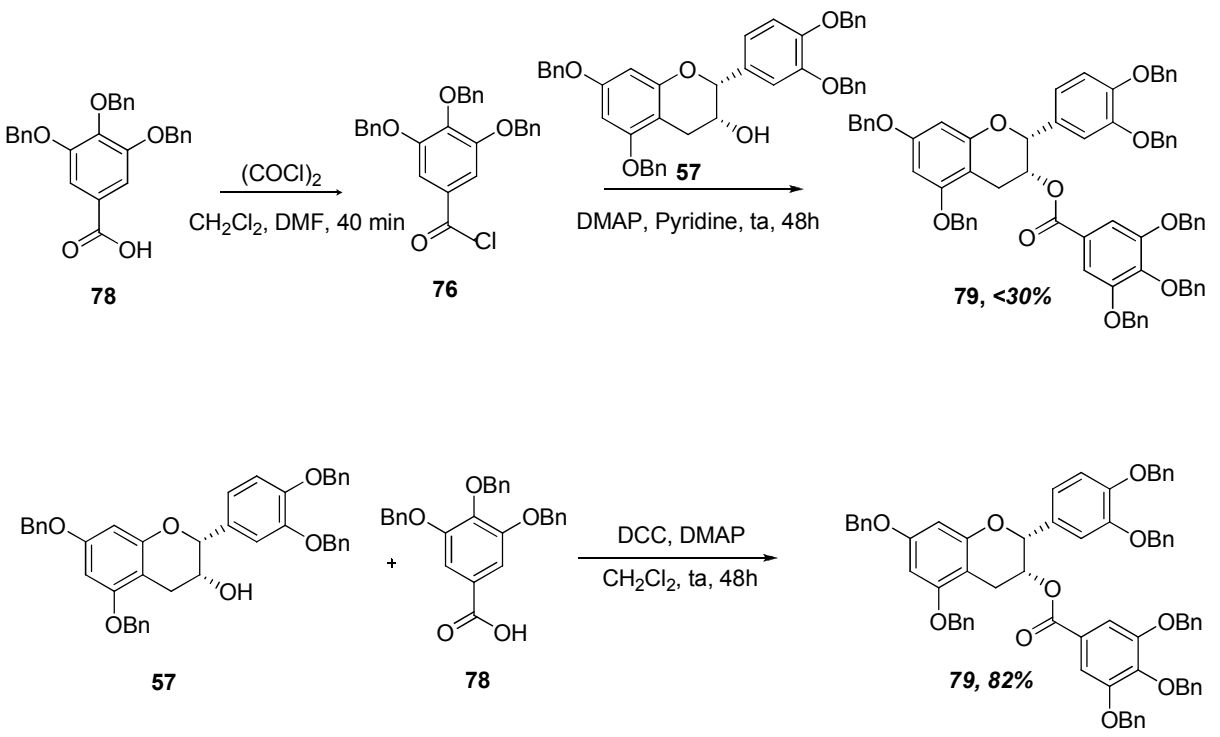


Figure II.29

Les meilleurs rendements ont été obtenus en partant de l'ester méthylique de l'acide gallique **95**. En réalisant la benzylation à partir de l'acide gallique **94**, un mélange de produits diversement benzylés a été obtenu nécessitant une purification par chromatographie sur colonne contraignante et limitant le rendement.

La benzylation de l'ester de l'acide gallique **95** a été réalisée dans le DMF avec du bromure de benzyle. Une filtration sur silice nous permet d'éliminer le bromure de benzyle en excès et d'obtenir l'ester benzylé avec un excellent rendement de 95%. L'ester **96** a alors été hydrolysé puis après acidification et recristallisation, l'acide gallique tribenzylé **78** a été obtenu avec un rendement de 74% (Figure II.30).

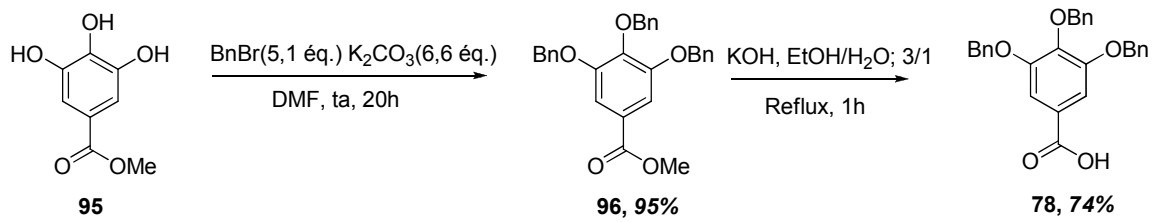


Figure II.30

Ces deux étapes nous ont donné accès à l'épicatéchine benzylée gallate **79** qui nous a servi ultérieurement comme précurseur lors du couplage cationique pour l'obtention de dimères gallates. Ce composé nous a également permis d'accéder à l'épicatéchine gallate native **3**. En vue d'études réalisées sur le comportement colloïdal des procyanidines gallates, nous avons réalisé dès cette étape la déprotection des fonctions gallates.

Devant la faible solubilité de l'épicatéchine gallate benzylée **79** dans le système de solvant habituel (acétate d'éthyle/méthanol) nous avons préféré opter pour un système de solvant THF/MeOH. Après 20 h d'hydrogénation, l'épicatéchine gallate **3** a été obtenue avec un excellent rendement de 95%.

II.3.2. **Synthèse des dimères : couplage catalysé**

La nouveauté de cette synthèse ne repose pas dans la préparation des précurseurs déjà rapportée par plusieurs équipes mais dans l'étape de couplage qui se fait dans des conditions stœchiométriques, contrairement aux synthèses précédemment décrites.[123,151,152,153]

L'épicatéchine gallate benzylée **79**, obtenue comme précédemment décrit, est couplée, en présence de deux équivalents de $TiCl_4$, soit avec la catéchine benzylée activée bromée **59d** pour la synthèse du précurseur **97** du dimère B4 gallate soit avec l'épicatéchine benzylée activée bromée **60c** pour celle du précurseur **98** du dimère B2 gallate (Figure II.31). Le dimère B4BnBr gallate **97** a été synthétisé avec un rendement de 50% et le dimère B2BnBr gallate **98** avec un rendement de 30%.

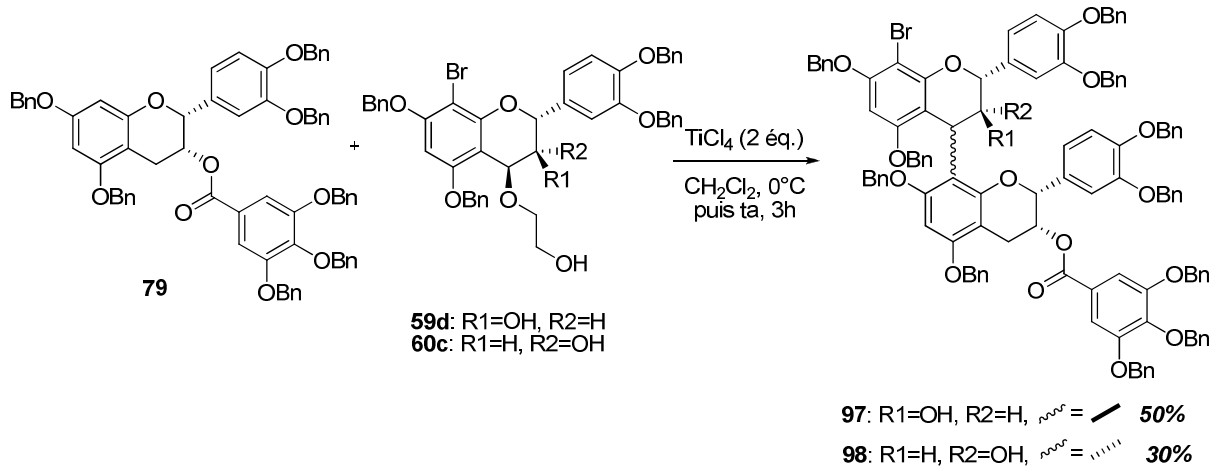


Figure II.31

Les rendements ne sont pas optimisés, les réactions n'ayant été réalisées qu'une seule fois et plutôt dans le but de vérifier la régio- et stéréosélectivité de la réaction. Aucune optimisation n'a été néanmoins prévue au laboratoire car la mise au point d'une autre méthode de couplage, discutée dans la partie II.5, a permis entre temps d'augmenter considérablement les rendements.

Malgré les rendements moyens notamment pour le B2BnBr gallate **98**, nous avons pu confirmer le contrôle de la stéréosélectivité et de la régiosélectivité de ces deux couplages. La synthèse du B4 gallate **99** sous sa forme native a pu être réalisée après une déprotection par hydrogénolyse (Figure II.32).

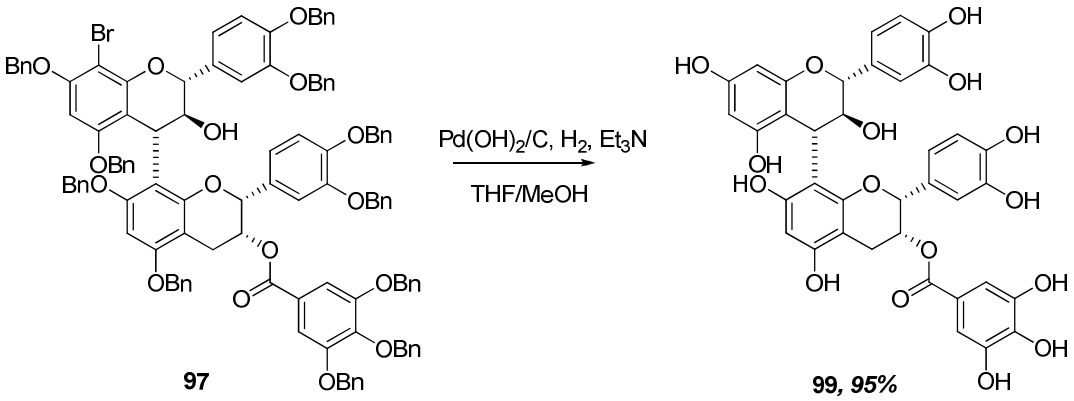


Figure II.32

II.4 **Vers la synthèse de procyanidines 4-6**

Comme nous avons pu voir lors des parties précédentes, le couplage de deux unités flavanols conduit presque exclusivement à la formation d'une liaison en C4-C8. En vue d'élargir la bibliothèque de standards, nous nous sommes intéressés à la synthèse de procyanidines dimères présentant une liaison en C4-C6. Ces derniers ont en effet été isolés dans les raisins mais jusqu'à ce jour aucune voie de synthèse n'a été décrite pour l'obtention de ces dimères. Quatre rétrosynthèses peuvent être envisagées (Figure II.33).

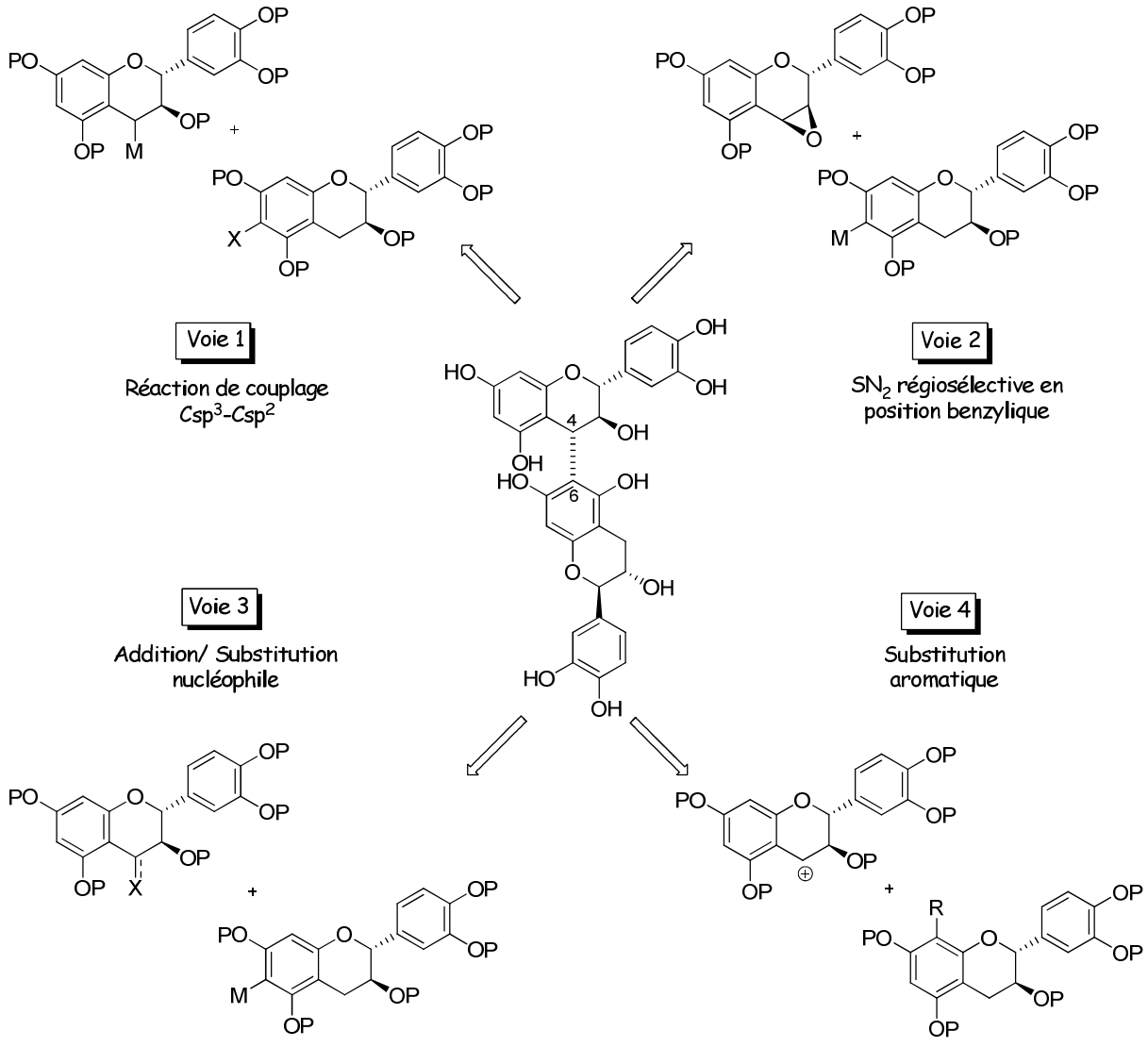


Figure II.33

La voie 1 a été étudiée au cours de la thèse de Karine Barathieu[138] dans le cadre de la synthèse de dimère 4-8. Elle consiste à effectuer un couplage organométallique de type

Stille entre un halogéné aromatique et un organoétain benzylique. Un monomère catéchine dont la position 8 est rendue active par halogénation effectue une addition oxydante sur un complexe de palladium (0) puis est mis à réagir avec un monoorganoétain en position benzylique obtenu *via* la catéchine protégée, bromé en position 4. Devant l'échec de la réaction, une étude modèle a été menée, montrant que la réaction d'un benzylétain sur des dérivés aromatiques ortho-ortho disubstitués, n'était possible qu'avec des benzylétains eux-mêmes non substitués en a. Cette voie d'accès a donc été momentanément abandonnée.

L'approche de la voie 2 par ouverture régiosélective et stéréocontrolée de l'époxyde **100** est également initiée au laboratoire. L'époxyde **100** pourrait être obtenu à partir du benzopyrane chiral **101** lui même synthétisé à partir de produits de départ simples *via* une cascade organocatalysée (Figure II.34). A l'état actuel, seuls des essais préliminaires ont été effectués sur des cycles benzopyranes non substitués.

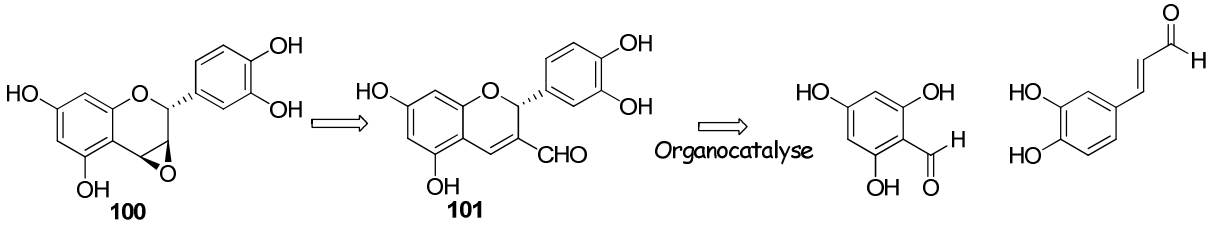
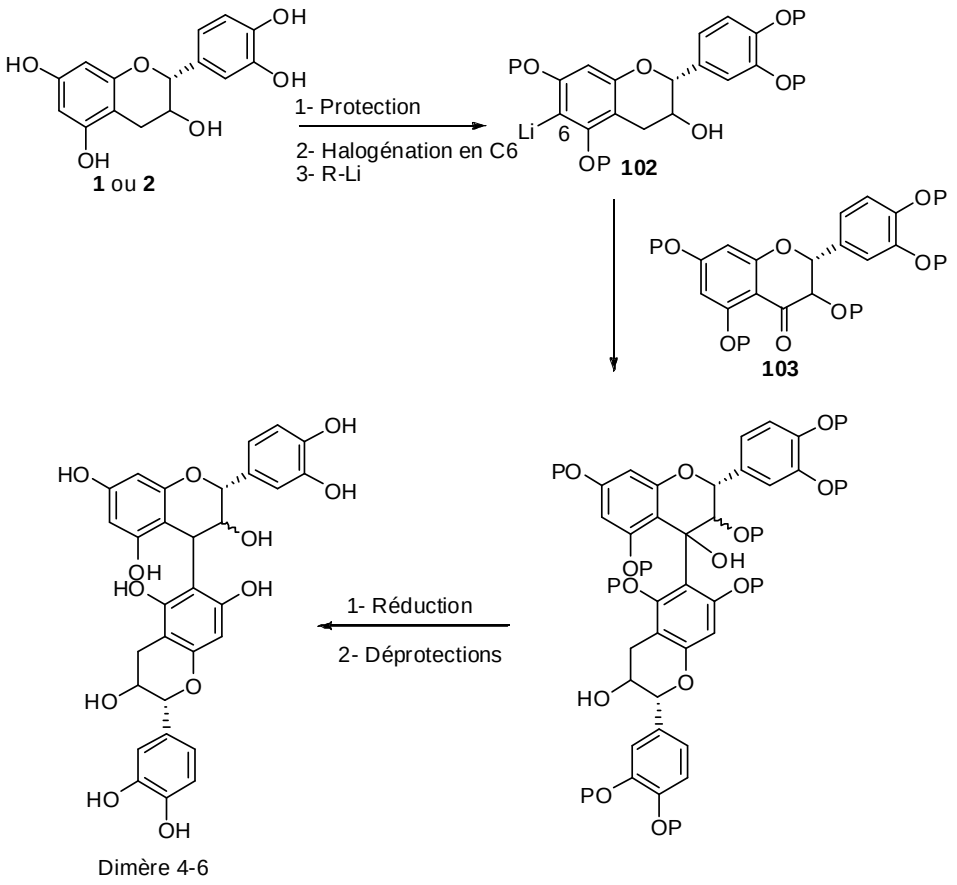


Figure II.34

Concernant les deux autres voies, les différents essais réalisés seront détaillés dans les parties suivantes. La voie 3, correspondant à la voie de synthèse de Weinges[120] et Tückmantel,[121] n'a permis jusqu'à présent que la synthèse d'un dimère 4-8 non naturel. Nous espérons pouvoir adapter cette voie à la synthèse de procyanidines comportant une liaison 4-6. En ce qui concerne la voie 4, elle a été appliquée avec succès à la synthèse des dimères 4-8 et nous avons donc essayé de la transposer à la synthèse des dimères 4-6.

II.4.2. **Couplage par addition nucléophile**

Le couplage par addition nucléophile implique le couplage entre une unité nucléophile **102** et une unité électrophile **103**. Après protection des fonctions phénols, on utilise la position 4 rendue électrophile par oxydation et la position 6 rendue nucléophile par lithiation via un échange halogène/métal (Figure II.35).



1 ou **2**

102

103

Figure II.35

II.4.2.2. ***Préparation de l'unité électrophile***

L'unité électrophile est commerciale sous sa forme native (Taxifoline) mais devant le prix excessif (1900 euros / 1 g, Aldrich), nous avons décidé de la synthétiser à partir de la catéchine. La préparation, inspirée des travaux de Tückmantel[121] et de Suzuki,[128] se déroule en quatre étapes. Après protection des fonctions phénols de la catéchine **1**, l'alcool en position 3 est protégé et la position 4 est activée puis oxydée (Figure II.36). Les fonctions phénols sont protégées par benzylation. Concernant la protection de l'alcool en position 3, il est possible d'utiliser un groupement benzyle comme dans le cas des phénols ou bien d'utiliser un dérivé silylé. L'utilisation d'un groupement silylé permet un meilleur stéréocontrôle lors de l'addition nucléophile, grâce à un encombrement stérique plus important de la face supérieure par rapport à un groupe benzyle, ce qui permet d'obtenir de meilleurs rendements.[121] La position 4 est ensuite activée à l'aide de DDQ et d'H_2O. Lors

de cette étape, deux produits majoritaires sont obtenus : l'alcool intermédiaire **104** (35%) et la cétone **105** (37%) qui est le produit final attendu.

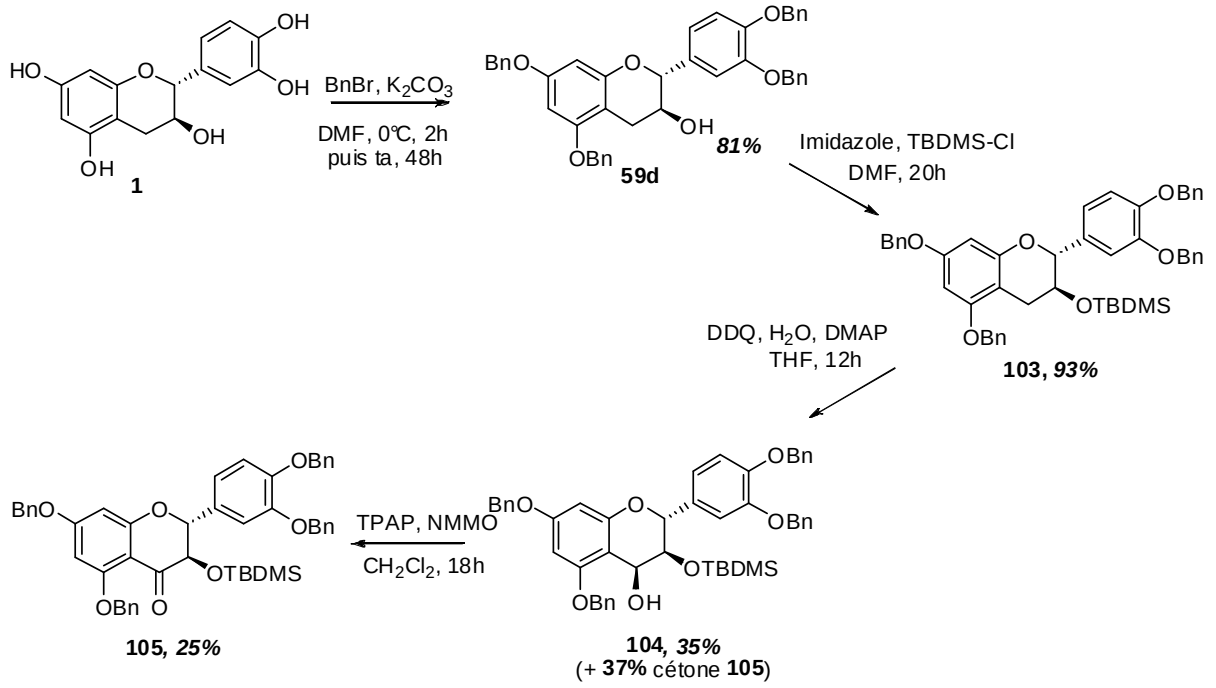


Figure II.36

Il est possible à cette étape de purifier les deux produits obtenus. L'alcool obtenu **104** est alors oxydé par le TPAP et le NMO[158] ce qui nous permet d'accéder à la cétone **105** avec un faible rendement. Les rendements concernant l'oxydation en cétone **105** de la catéchine benzylée **59d** mériteraient d'être optimisés, mais à ce point de la synthèse nous disposions de suffisamment de produit pour poursuivre notre étude. L'unité électrophile **105** étant synthétisée, il ne nous reste plus qu'à synthétiser l'unité nucléophile **106**.

II.4.2.3. ***Préparation de l'unité nucléophile***

L'unité nucléophile **106** consiste en une unité catéchine dont les fonctions phénols sont protégées et dont la position 6 est halogénée afin de permettre l'échange halogène-métal.

La première étape consiste donc à obtenir une catéchine protégée portant un halogène sur la position 6 **107**. Deux voies d'accès à ce précurseur peuvent être envisagées : soit l'halogénation de la catéchine préalablement protégée **108**, soit

l'halogénation de la catéchine native **1** suivie de la protection de ses fonctions phénols (Figure II.37).

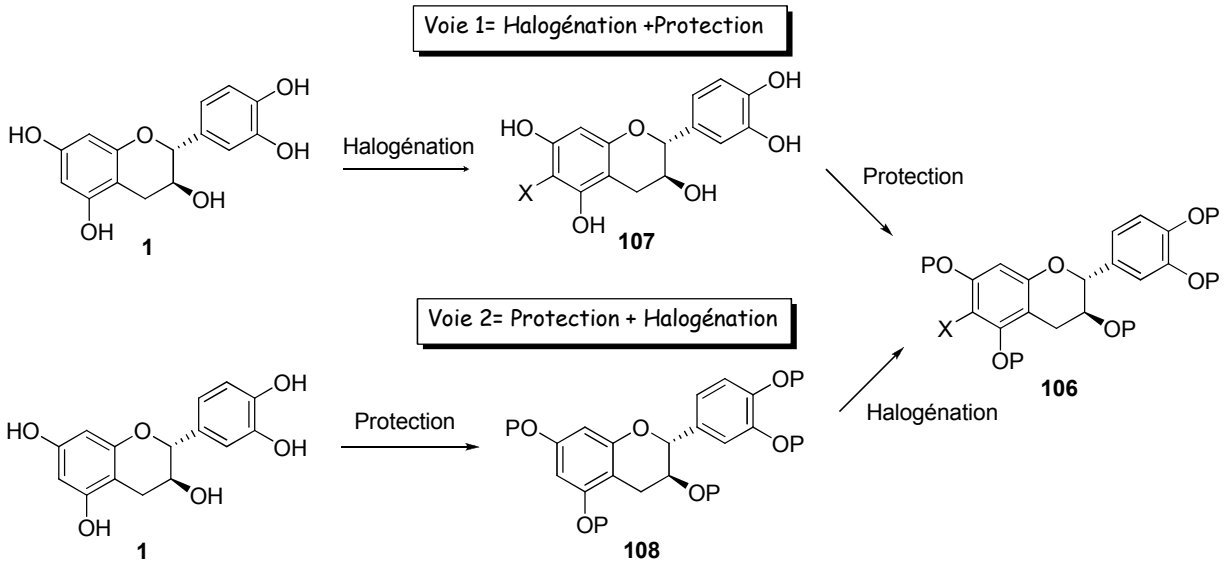


Figure II.37

En définitive, dans le cadre d'une halogénation en position 6, seule la voie 1 est envisageable car l'halogénation (iode ou brome) de la catéchine protégée **108** conduit invariablement à une halogénation régiospécifique en position 8, quelles que soient les conditions opératoires utilisées.

Néanmoins la bromation de la catéchine **1** n'est pas régiosélective, un mélange de produits non séparables, bromé en 6 et/ou 8 et non bromé, est obtenu. L'utilisation de l'iode comme halogène semble plus judicieuse. En effet dans les années 1980 Kielhmann[115,139,140,141] a étudié l'halogénation des catéchines et a décrit comment ioder la catéchine **1** sélectivement en C6 ou en C8, suivant le solvant utilisé. L'utilisation de l'acétone comme solvant permettrait une iodation exclusive en position 6 alors que l'iodation dans le DMF sera préférentielle en position 8.

La première étape a donc consisté à ioder la catéchine **1** dans l'acétone avec le NIS comme agent d'halogénation (Figure II.38). Cette étape ne nécessite aucune purification et est quantitative. Le produit iodé **109** obtenu n'est pas très stable et nécessite un stockage sous atmosphère inerte à froid en attendant son utilisation ultérieure.

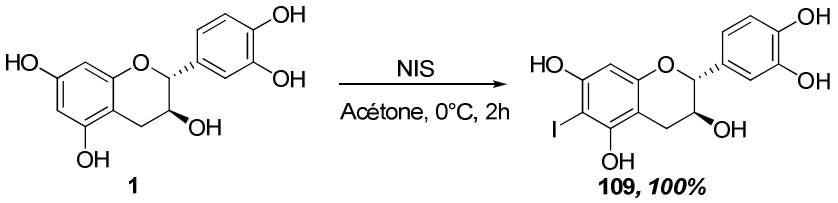


Figure II.38

Nous avons ensuite tenté de protéger les fonctions phénols en utilisant la méthode de protection par benzylation décrite précédemment. Or un mélange non séparable de catéchine benzylée iodée en 6 et/ou 8 et non iodée, a été obtenu. Malgré, le fait que la catéchine soit initialement exclusivement iodée en position 6, une migration partielle de l'iode est constatée au cours de cette étape.

Afin de limiter la formation de produits de C-benzylation, Kawamoto[159] a proposé de synthétiser la catéchine benzylée à partir de la catéchine acétylée en obtenant des rendements comparables. Même si notre souci n'est pas un problème de C-benzylation, nous avons donc décidé d'acétyler la catéchine iodée en 6 avant l'étape de benzylation, afin d'obtenir un précurseur plus stable. L'étape d'acétylation (Figure II.39), comme décrite par Kiehlmann[115] et Kawamoto[159] s'effectue dans la pyridine en présence d'anhydride acétique et permet d'obtenir un rendement de 87% (**110**) dont seulement 6% de catéchine acétylée iodée en 8 **110b**.

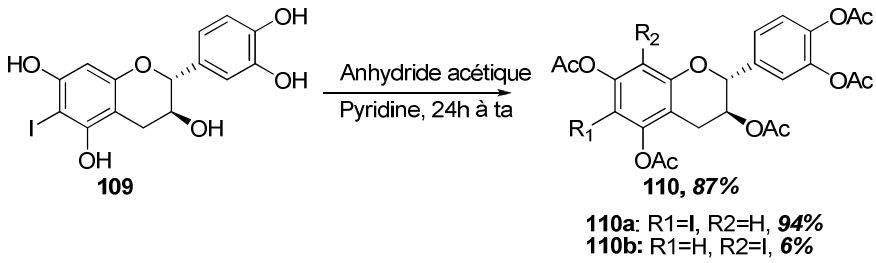
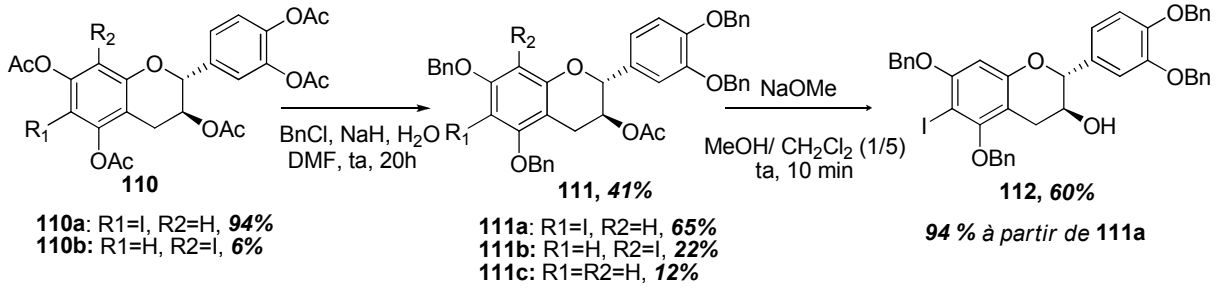


Figure II.39

La benzylation de la catéchine acétylée **110** est ensuite réalisée comme décrit par Kawamoto en utilisant l'hydrure de sodium comme base et le chlorure de benzyle comme agent de benzylation (Figure II.40). Après déprotection de l'alcool en position 3, la catéchine benzylée iodée **112** est prête à être utilisée pour l'échange halogène-métal.



110

110a: R1=I, R2=H, ***94%***
110b: R1=H, R2=I, ***6%***

111, *41%*

111a: R1=I, R2=H, ***65%***
111b: R1=H, R2=I, ***22%***
111c: R1=R2=H, ***12%***

112, *60%*

94 % *à partir de* **111a**

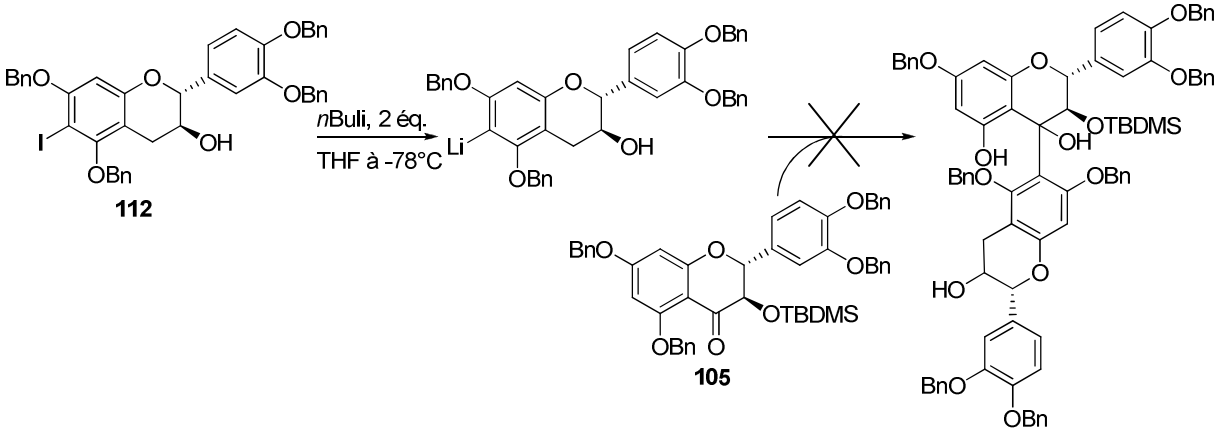
Figure II.40

Après l'étape d'acétylation, un mélange de catéchine benzylée acétylée iodée en 6 **110a** et en 8 **110b** est obtenu. L'étape de benzylation a également entrainé une migration partielle de l'iode (65% de produit iodé en position 6 **111a**, 22% en position 8 **111b** et 12% de produit non iodé **111c**) mais après déprotection de l'hydroxyle en position 3, les produits sont séparables et la catéchine benzylée iodée en 6 **112** est obtenue avec un rendement global de 60% (le rendement de l'étape de déacétylation est de 94% si l'on ne considère que la catéchine iodée en 6 **111a** présente au début de la réaction).

II.4.2.4. ***Couplage des deux unités***

Le couplage est effectué avec les deux unités en conditions stœchiométriques, dans du THF après échange halogène /métal sur l'unité nucléophile **112** (Figure II.41).

Ce couplage n'a été tenté qu'une seule fois mais n'a pas donné les résultats escomptés. L'échange halogène/lithium semble avoir eu lieu, car la catéchine benzylée **59d** est récupérée après réaction mais le couplage n'a pas eu lieu. Le produit benzylé activé en 4 **105** est également récupéré en fin de réaction.



112

105

Figure II.41

La catéchine benzylée iodée en position 8 **113**, beaucoup plus simple à obtenir, a été utilisée comme unité nucléophile pour optimiser l'étape de couplage. Ces essais ont été réalisés dans le cadre d'un couplage en position 8, qui pourrait par la suite être transposé au couplage en position 6.

Nous avons premièrement tenté de coupler la catéchine benzylée iodée **113** avec la 2-méthoxyacétophénone **114** commerciale (Figure II.42).

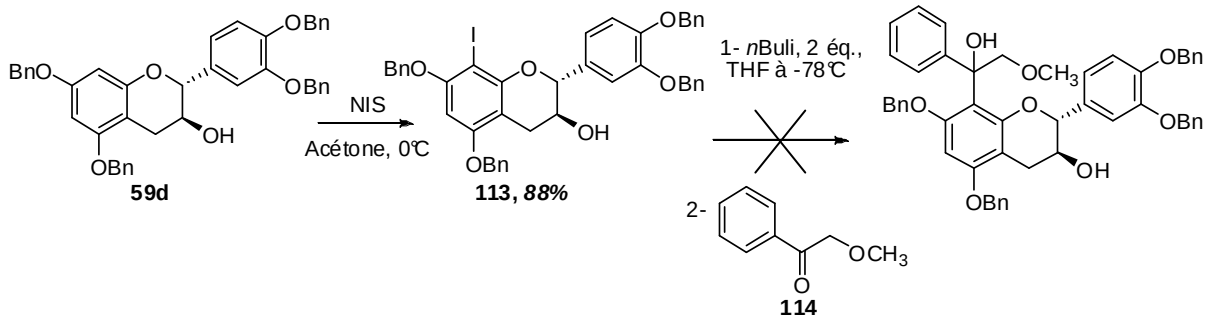


Figure II.42

L'analyse RMN du produit brut nous indique que le couplage n'a pas eu lieu et que nous sommes en présence en fin de réaction de la catéchine benzylée non iodée **59d** et de la 2-méthoxyacétophénone **114**, intacte. Il semblerait également que l'échange iode/lithium ait eu lieu car l'iode n'est plus présent en fin de réaction.

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons réalisé deux réactions en parallèle :

- d'un coté la même réaction, mais en effectuant une remontée en température plus progressive à partir de -78°C pour augmenter la réactivité.

- de l'autre un échange iode/lithium, suivi d'une addition d'iodométhane comme électrophile pour donner la 8-méthyl-tétrabenzylcatéchine.

La réaction de couplage donne lieu au même résultat, et de manière surprenante, le piégeage du lithien par l'iodométhane a également échoué, alors que des travaux antérieurs réalisés au laboratoire[138] avaient conduit à la méthylation de la position 8 avec un rendement de 90% mais en partant de la catéchine pentabenzylée iodée.

Nous avons alors envisagé de réaliser cette réaction en suivant le mode opératoire de Tückmantel,[121] en réalisant l'échange halogène/métal en utilisant le *tert*-butyllithium sur l'épicatéchine pentabenzylée bromée **50a**.

Des essais ont été réalisés à partir de la catéchine pentabenzylée bromée **116** synthétisée en deux étapes à partir de la catéchine benzylée **59d** (bromation quantitative et perbenzylation) et la 2,4-dihydroxyacétophénone protégée par des groupements méthyles **117** ou benzyles **118** (Figure II.43).

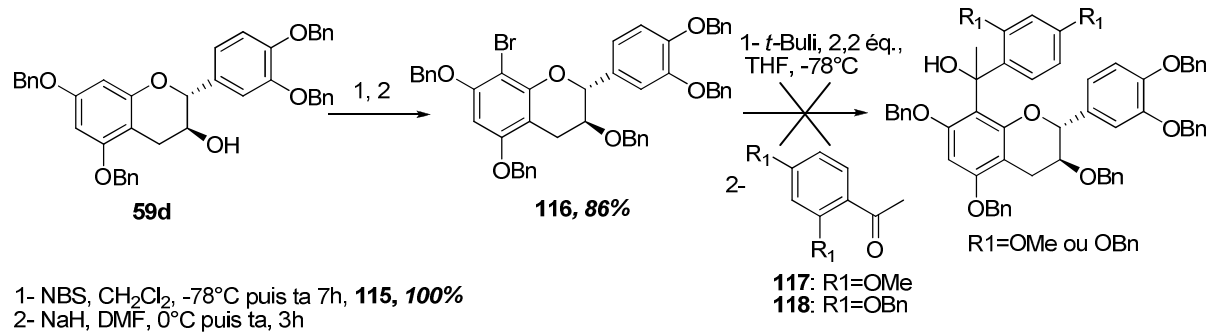


Figure II.43

Dans ce cas là également le couplage n'a pas eu lieu et nous récupérons les acétophénones **117** et **118** et la catéchine perbenzylée non bromée **119**. Devant les résultats non encourageants du couplage organométallique et le faible rendement obtenu pour la synthèse des précurseurs, la voie de l'addition nucléophile C4 a été abandonnée.

II.4.3. **Couplage par substitution nucléophile**

Pour l'approche par substitution nucléophile, un schéma similaire à la synthèse des dimères et oligomères de type 4-8 (Figure II.44) peut être envisagé. Néanmoins il sera nécessaire de protéger préalablement la position 8 de l'unité nucléophile **120** pour éviter la substitution en 8 plus favorable que celle en 6.

Ainsi après protection des fonctions phénols et de la position C8 puis activation de la position benzylique 4 de la catéchine **1** ou de l'épicatéchine **2**, pour obtenir l'unité électrophile **121**, la réaction de couplage sera effectuée. Une étape de déprotection permettrait alors d'obtenir les procyanidines à l'état natif.

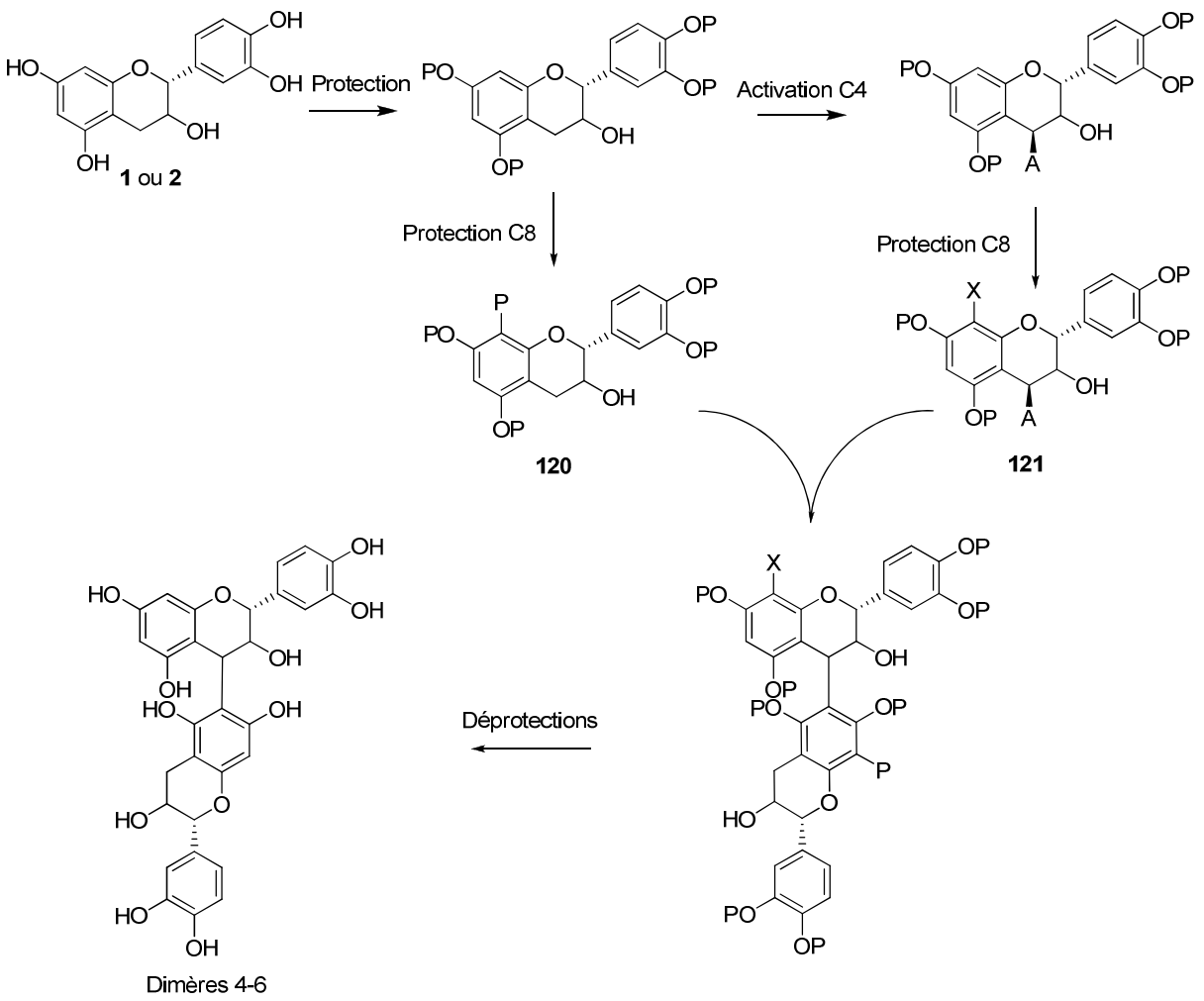


Figure II.44

Initialement nous avons voulu reprendre le schéma de synthèse des dimères 4-8, et procéder seulement à la protection supplémentaire de la position 8 de l'unité nucléophile **56**. La préparation de l'unité électrophile **59d** se fait comme dans le cas de la synthèse des dimères 4-8 et des oligomères (cf. II.2.2). Après protection des fonctions phénols par benzylation, la catéchine protégée **56** est activée en position 4 à l'aide de l'éthylène glycol en présence de DDQ. Puis la position 8 est bromée afin d'éviter la réaction ultérieure du dimère avec une unité activée et ainsi éviter l'obtention d'oligomères d'ordres supérieurs. La position 8 de l'unité nucléophile **56** a été bromée afin d'éviter le couplage 4-8 préférentiel. Notre choix initial s'est porté sur le brome car il résiste aux conditions de couplage et qu'il est possible de déprotéger la position quantitativement lors de l'étape

d'hydrogénolyse. Le couplage des deux unités est réalisé en présence de $TiCl_4$ dans les conditions classiques utilisées précédemment (Figure II.45).

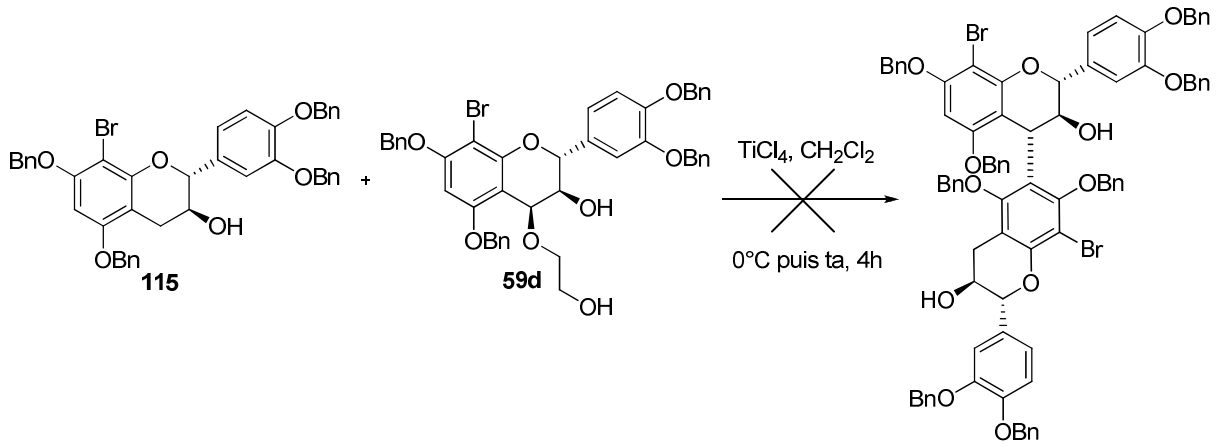


Figure II.45

Néanmoins, le couplage n'a pas lieu et l'unité nucléophile **115** ainsi que l'unité nucléophile **59d** dégradée sont obtenues en fin de réaction. L'encombrement stérique dû aux groupements benzyles rend peut être le couplage en position 6 de l'unité nucléophile **115** plus difficile. Deux stratégies ont donc été envisagées : tenter le couplage à partir d'une unité nucléophile protégée en position 8 mais possédant ses fonctions phénols libres ou bien utiliser d'autres groupements protecteurs tels que des groupements méthoxyles, moins encombrants.

II.4.3.2. ***Couplage avec des unités méthylées***

L'autre stratégie envisagée pour la synthèse de dimère 4-6 est de coupler des unités catéchines protégées par des méthyles, groupes protecteurs moins encombrants que les benzyles et qui pourraient donc permettre un couplage en position 6. En parallèle, la synthèse d'un dimère 4-8 protégé par des méthoxyles est réalisée.

Dans les deux cas l'unité électrophile sera la même, c'est-à-dire une catéchine aux fonctions phénols méthylées, bromée en position 8 et activée par l'éthylène glycol en position 4. La seule différence réside dans l'unité nucléophile qui sera protégée en position 8 dans le cas du dimère 4-6 afin d'éviter le couplage en 8 plus favorable.

a) Protection des fonctions phénols

Dans tous les cas, la première étape consiste à protéger les fonctions phénols par méthylation. Le mode opératoire utilisé (Figure II.46) est inspiré de la publication de Rolando *et al.*[160] Cette étape, réalisée au reflux dans l'acétone en présence de sulfate de diméthyle et de carbonate de potassium permet d'obtenir la catéchine tétraméthylée **122** avec un très bon rendement de 97%.

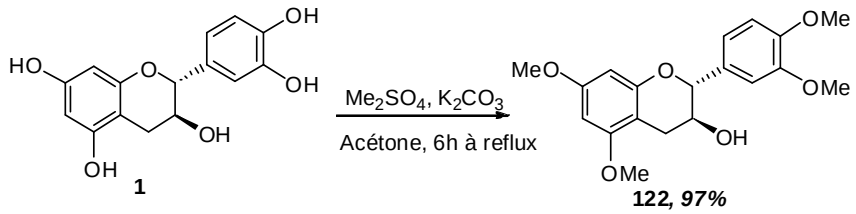


Figure II.46

b) Activation de la position 4

L'activation de la position benzylique de la catéchine méthylée **122** est essentielle car elle permet à la fois de renforcer le caractère électrophile du carbone C4 et de contrôler la stéréochimie de la liaison interflavane lors de la réaction de couplage. Cette activation est réalisée avec 2 équivalents de DDQ en présence de 6 équivalents d'éthylène glycol dans le dichlorométhane avec un rendement de 74% (Figure II.47).

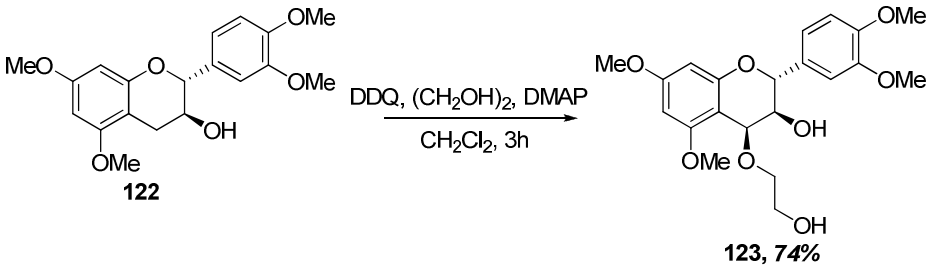


Figure II.47

c) Protection du carbone 8 par bromation

La protection de la position 8 de la catéchine méthylée activée **123** est indispensable afin de contrôler, comme il a été mentionné précédemment, le degré

d'oligomérisation lors du couplage. Dans le cas des essais de synthèse de dimères 4-6, l'unité nucléophile sera également protégée par bromation en position 8 afin d'orienter le couplage en C6. Cette bromation est réalisée dans les mêmes conditions dans les deux cas : en présence d'un équivalent de NBS dans du dichlorométhane à basse température. La catéchine tétraméthylée bromée activée **124** ou non **125** est obtenue avec des rendements quantitatifs ne nécessitant aucune purification (Figure II.48).

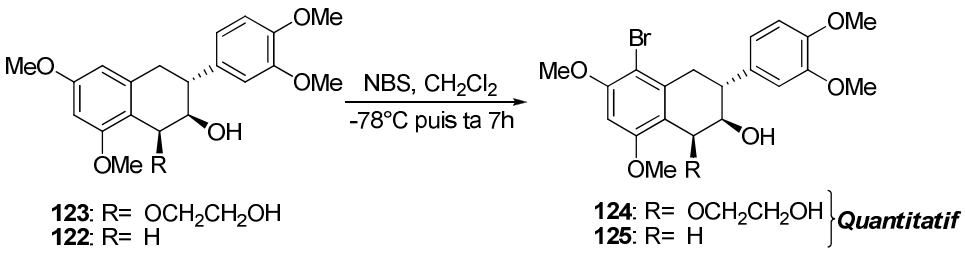


Figure II.48

d) Couplages des deux unités

Les trois unités **122,124,125** étant préparées, la dernière étape correspond au couplage. Les conditions de couplage sont identiques à celles mises en œuvre pour la synthèse des dimères 4-8. Les deux unités sont utilisées en proportions stœchiométriques et le couplage est effectué en présence d'un acide de Lewis : $TiCl_4$. Ces deux stratégies ainsi que les résultats obtenus sont présentés ci-dessous (Figure II.49).

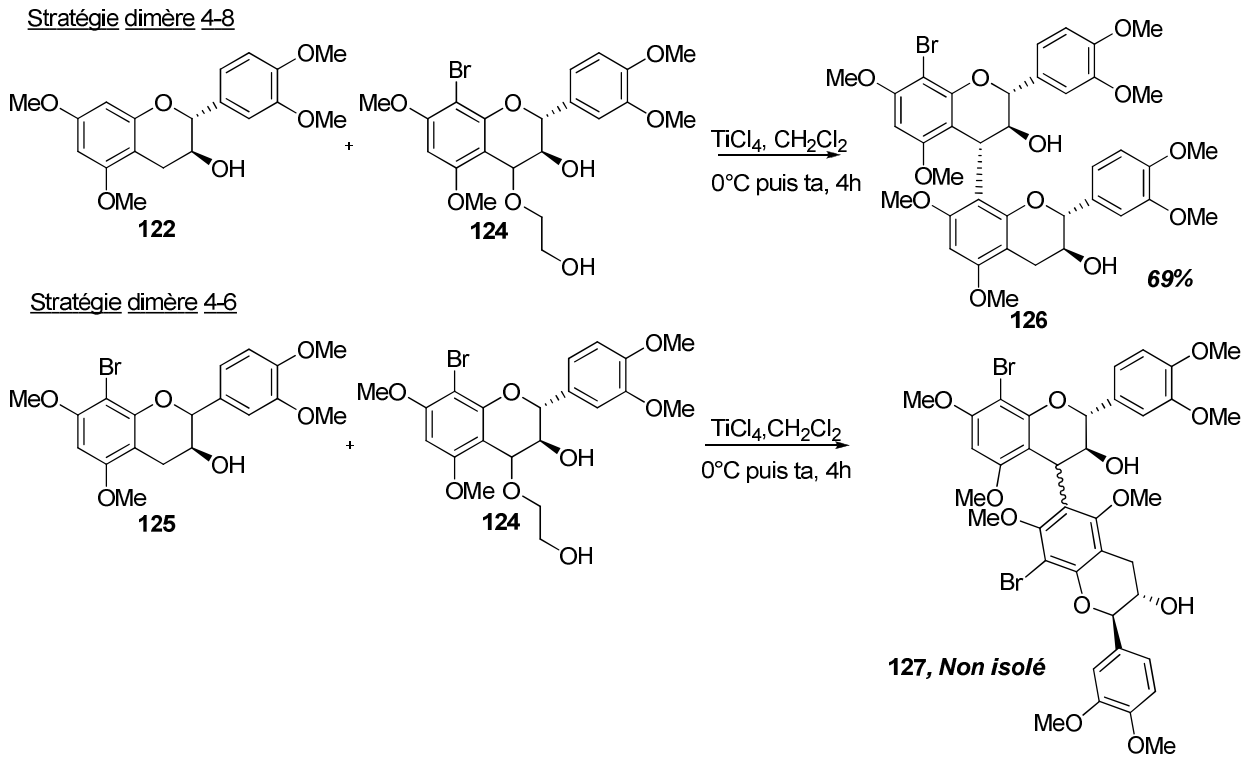


Figure II.49

Ces synthèses reprennent les modes opératoires utilisés pour la synthèse de dimères benzylés. Les rendements globaux obtenus dans le cas de la stratégie 4-8 sont légèrement supérieurs à ceux obtenus avec les benzyles. Pour le dimère 4-8 **126**, un rendement global de 47% sur 5 étapes a été obtenu (contre 30% en 5 étapes pour le précurseur benzylé). A titre de comparaison, une publication récente[161] de 2008, rapporte la synthèse de dimères méthylés avec une méthode de couplage oxydant. Leur étape de couplage conduit aux deux diastéréoisomères, et les rendements globaux sont de 6% pour le diastéréoisomère naturel et de 34% pour le non naturel.

En ce qui concerne la formation du dimère 4-6 **127**, bien que nous n'ayons pas pu l'isoler, nous avons pu détecter sa présence par spectrométrie de masse dans une fraction de mélange. Ce premier résultat est encourageant car il montre qu'une baisse de l'encombrement stérique des fonctions phénols protégées autorise le couplage espéré. Mais le gros problème de la méthode réside dans le fait que la déprotection des groupements méthoxyles reste à ce jour particulièrement délicate pour des composés de type flavanol, compte tenu de la fragilité des produits natifs dans les conditions de déprotections utilisées.

II.4.3.3. ***Couplage avec une unité nucléophile déprotégée***

Le couplage de l'unité électrophile **59d** avec une unité nucléophile aux fonctions phénols libres devrait nous affranchir du problème de l'encombrement stérique dû aux groupements benzyles ou méthyles. De plus, les positions 4 et 6 présentent une meilleure réactivité lorsque les fonctions phénols sont libres.

La préparation de l'unité électrophile **59d** se fait comme dans le cas du dimère 4-8 et comme nous l'avons décrit précédemment (Figure II.25). La préparation de l'unité nucléophile consiste à protéger la position 8 de la catéchine. La protection de C8 par un brome est un mode de protection efficace et résistant aux conditions de couplage utilisées, comme cela a été mis en évidence lors des précédentes synthèses. Néanmoins, bien que la bromation de la position 8 de la catéchine soit complètement régiocontrôlée dans le cas de la catéchine benzylée **56**, elle ne l'est pas avec la catéchine non protégée **1**; un mélange de produits non bromé et bromé en C6 et/ou C8 non séparables a été obtenu.

D'après Khielmann,[139,140,141] l'iodation de la catéchine **1** peut être régiocontrôlée en position 8 si la réaction est conduite dans le DMF mais comme il a été démontré préalablement au laboratoire, l'iode ne résiste pas aux conditions de couplage. Nous avons donc préféré procéder à une protection initiale de la catéchine par benzylation des fonctions phénols suivie d'une bromation régiocontrolée en C8. Une étape de déprotection des fonctions phénols nous permettrait alors d'obtenir l'unité nucléophile.

La méthode couramment utilisée pour la déprotection des phénols benzylés est une hydrogénolyse catalysée au palladium. Néanmoins dans notre cas cette méthode n'est pas envisageable car, comme Isabelle Tarascou l'a mis en évidence lors de sa thèse, cette hydrogénation provoque une débromation plus ou moins complète en plus de la débenzylation. L'utilisation d'un autre catalyseur présentant une réactivité inférieure au catalyseur de Pearlman, le palladium(0) sur charbon a été testée. En utilisant ce catalyseur, nous avons également constaté une débromation partielle de la catéchine (Figure II.50).

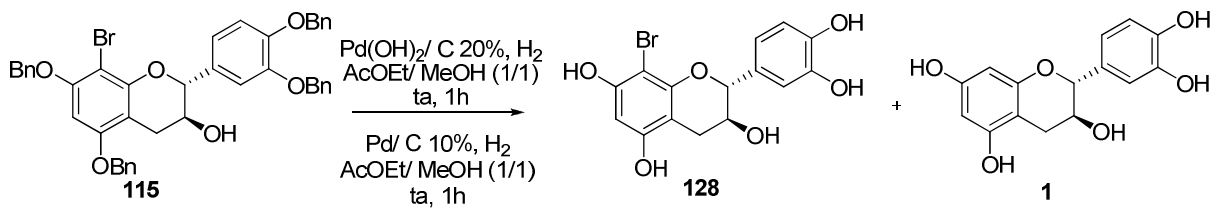


Figure II.50

Un groupe protecteur autre que le brome a donc dû être envisagé. Un thiophényle a été substitué au brome en position 8 après un échange halogène/lithium sur la catéchine perbenzylée et bromée. Trois étapes sont nécessaires pour obtenir l'unité avec un thiol en position 8. Néanmoins lors de l'étape d'hydrogénolyse, nous constatons également une déprotection partielle de la position 8, tout comme dans le cas du composé bromé (Figure II.51).

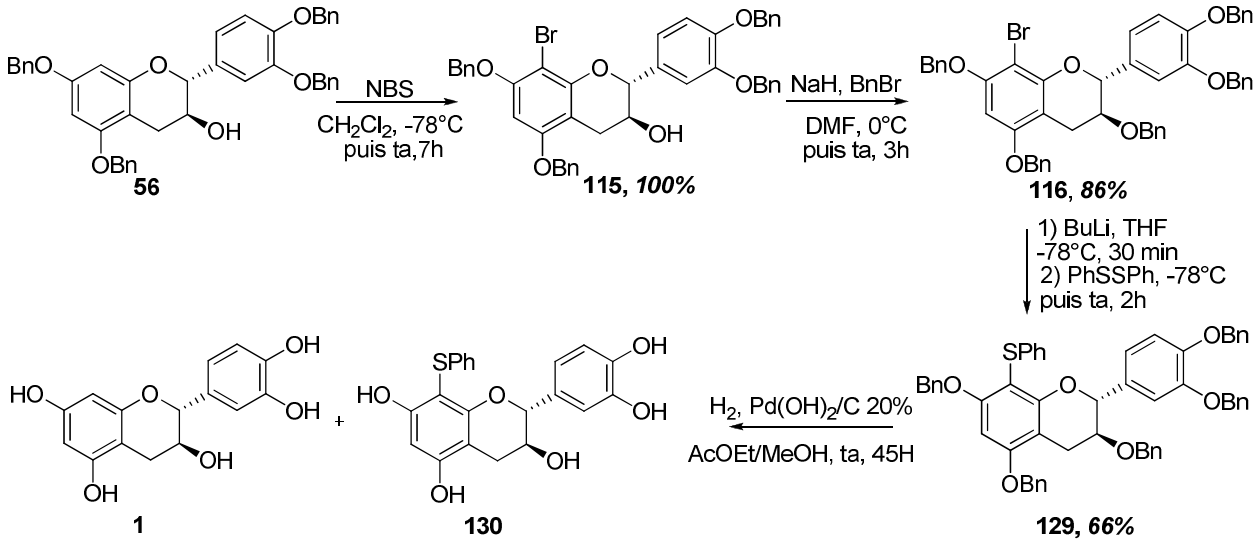


Figure II.51

Deux alternatives peuvent alors être envisagées : trouver un autre groupe protecteur résistant aux conditions de déprotection ou bien envisager une autre méthode de déprotection des benzyles. Malheureusement, nous n'avons pas eu le temps d'approfondir ces deux perspectives qui pourraient permettre l'accès aux dimères 4-6.

II.5 **Nouvelle approche de couplage : la catalyse à l'or**

La méthode de synthèse itérative des tanins catéchiques, développée au laboratoire, et utilisée dans le cadre de la préparation des divers standards, ne possède pas d'équivalent dans la littérature. Elle répond en effet aux critères de régio- et stéréosélectivité ainsi qu'au contrôle du degré d'oligomérisation. Par ailleurs, dans le cadre de cette thèse, l'étape finale de déprotection a été optimisée et simplifiée ce qui permettra un « scale-up » plus aisé des synthèses de procyanidines. Ainsi, la seule limitation de la méthode réside encore dans l'étape clé, qui nécessite l'usage de 2 équivalents de l'acide de Lewis $TiCl_4$ nécessaire à la création du centre électrophile. Ces conditions, relativement dures, sont vraisemblablement la cause des rendements limités de cette étape de couplage (38 à 73%). Aussi dans le cadre du travail de synthèse nous avons cherché à développer, en parallèle de la préparation des divers standards, une nouvelle méthode de *C*-benzylation d'aromatiques qui permettrait de s'affranchir de l'utilisation d'un excès de l'acide de Lewis. Des avancées récentes, dans le domaine de la catalyse homogène utilisant des sels d'or pour la création de liaisons carbone-carbone, nous ont paru potentiellement applicables à la synthèse des polyphénols.

II.5.1. **La catalyse à l'or : Introduction**

L'or possède depuis de nombreuses années une chimie organométallique et de coordination très développée, mais était réputé être un pauvre catalyseur jusqu'aux travaux de Bond qui établirent dans les années 70 sa capacité à effectuer des réactions d'hydrogénation.[162] Son utilisation en catalyse a alors augmenté de manière exponentielle, jusqu'à atteindre plus de 1200 publications et brevets pour la seule année 2007.[163] Les domaines d'applications sont variés[164,165] et l'on peut citer par exemple :

- Les réactions de réductions (hydrogénations d'alcynes, d'alcènes, de diènes, de cétones α-β insaturées, de liaisons N-O, réductions asymétriques)

- Les réactions d'oxydations (réaction d'époxydation, oxydation sélective d'alcools, oxydation d'alcanes par activation de liaisons C-H, formation directe de peroxydes)

- Les réactions faisant intervenir le monoxyde de carbone (oxydation à basse température du CO, utilisation du CO comme nucléophile)

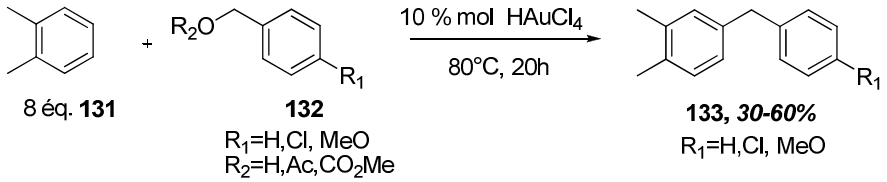
- Les additions nucléophiles sur des systèmes insaturés (alcynes, alcènes, énynes, allènes, arènes) en version inter- ou intramoléculaire.

- L'activation d'alcools et de groupes carbonylés (réactions d'aldol asymétrique, réactions de condensations avec des amines des alcools ou des thiols, réactions multicomposants…).

Il faut distinguer deux types de catalyse, la catalyse homogène et la catalyse hétérogène. Cette dernière, qui utilise en particulier les propriétés des nanoparticules d'or, est très largement prépondérante (plus de 90% des publications). Cependant, la catalyse homogène utilisant des sels d'or, connaît également un développement important depuis le début de cette décennie et de nombreuses études ont été consacrées à la variation des ligands utilisés afin d'optimiser les sélectivités de ces réactions.[166,167] Les applications en synthèse totale et plus largement en chimie organique ont récemment fait l'objet de plusieurs revues.[168,169,170]

II.5.2. **Etude préliminaire : Benzylation de dérivés aromatiques**

L'utilisation de la catalyse homogène à l'or pour la création de liaisons C-C s'est majoritairement tournée vers l'utilisation de liaisons π C-C comme substrats (alcènes, alcynes, énynes) du fait de la « carbophilie » attribuée aux acides de Lewis à base d'or. Les travaux consacrés à l'activation de substrats benzyliques sont beaucoup plus rares. On peut citer les travaux de Beller[171] qui a réalisé la première benzylation d'arènes **131** à partir d'alcools benzyliques ou de leurs acétates et méthylcarbonates **132** (Figure II.52), en présence de $HAuCl_4$. La réaction procède classiquement à 80°C avec de bons rendements et des régiosélectivités qui peuvent être excellentes selon les substitutions respectives des deux unités.



8 éq. **131** — **132** R_1=H,Cl, MeO; R_2=H,Ac,CO_2Me — **133, *30-60%*** R_1=H,Cl, MeO

Figure II.52

Récemment l'équipe de Campagne *et al.* [172] a décrit une méthode permettant de réaliser une substitution nucléophile sur des alcools propargyliques **134** catalysée par de l'or (Figure II.53). Le mécanisme réactionnel est supposé passer par un intermédiaire **135** où l'or serait doublement complexé par le doublet de l'oxygène et par la triple liaison.

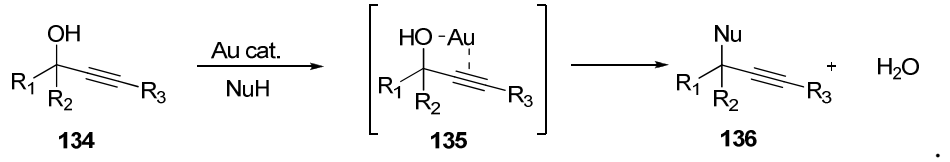


Figure II.53

Les meilleurs résultats ont été observés lorsqu'un sel d'or III est utilisé : $NaAuCl_4.2H_2O$. Suivant les substituants R_1, R_2 et R_3, la substitution de l'alcool avec un allyltriméthylsilane **137** présente des rendements compris entre 33 et 97%. Le meilleur rendement est obtenu lorsque l'alcool est à la fois benzylique et propargylique **138** (Figure II.54). L'avantage de cette réaction est qu'elle est réalisée dans des conditions douces (dichlorométhane, température ambiante) avec un catalyseur commercial.

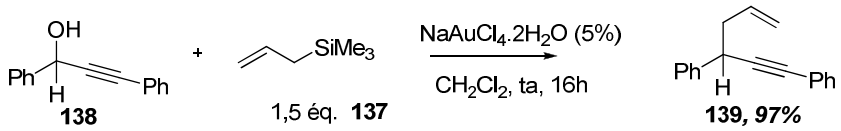


Figure II.54

Ces travaux viennent d'être repris par Liu *et al.*[173] En utilisant des alcools benzyliques de type ényne **140**, ils ont réalisé des réactions dominos couplant une Friedel-Crafts intermoléculaire suivie par une hydroarylation intramoléculaire. Le catalyseur utilisé est ici un sel d'or au degré d'oxydation (I), $(PPh_3)AuCl$, moins réactif que les sels d'or (III), mais donnant par association avec $AgSbF_6$ un catalyseur $(PPh_3)AuSbF_6$ suffisamment efficace pour créer le carbocation benzylique. Ici encore, une double complexation **141** de l'or, par l'oxygène et la triple liaison est envisagée (Figure II.55).

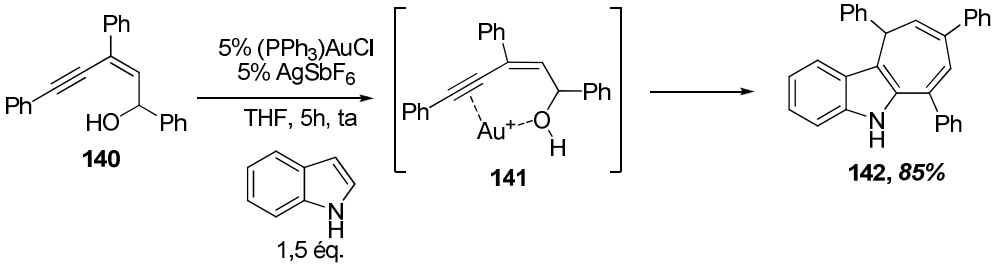


Figure II.55

Nous avons pensé que cette réaction pourrait être appliquée aux alcools benzyliques dans le cadre de la formation de liaisons C-C. Nos substrats possèdent en effet certains avantages (l'aromatique utilisé est particulièrement nucléophile, le carbocation benzylique intermédiaire, fortement stabilisé, est facilement accessible) qui pourraient compenser l'absence de la triple liaison. D'ailleurs, Campagne *et al.* viennent très récemment de décrire la substitution nucléophile d'alcools benzyliques par des amines.[174] Ils émettent l'hypothèse que le catalyseur peut agir comme un acide de Lewis et donc que la présence de la triple liaison n'est pas nécessaire. Pour appuyer cette hypothèse ils ont étudié la réaction d'alcools benzyliques avec divers nucléophiles azotés. La substitution du 1-phényl-éthanol **143** par le *p*-toluène sulfonamide **144** en présence du catalyseur est réalisée avec un rendement de 87% (Figure II.56).[174,175] Nous avons donc décidé de tenter ce type de couplage sur nos composés.

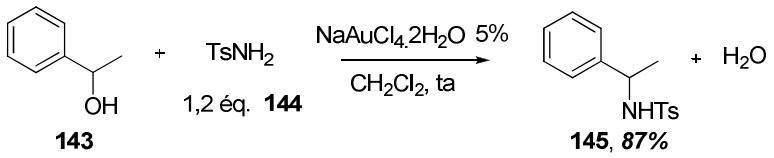


Figure II.56

II.5.3. **Etudes préliminaires : substitution d'alcool benzylique**

Plusieurs essais préliminaires ont été effectués afin d'étudier la réaction de substitution d'alcool benzylique à partir de composés modèles. Le 1-phényl éthanol **143** a été utilisé comme alcool benzylique et les essais de substitution ont été réalisés avec le 1,3-diméthoxybenzène **146** et le 1,3,5-triméthoxybenzène **147** dans des conditions opératoires similaires à celles décrites par Campagne *et al.*[172,174] (Figure II.57).

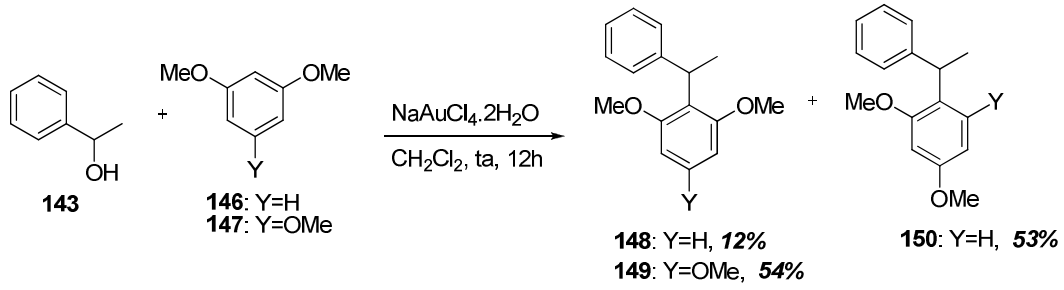


Figure II.57

La substitution de l'alcool benzylique **143** par le diméthoxybenzène **146** conduit au produit de couplage **150** avec un rendement de 53%. Le produit de substitution ortho-ortho **148** est également obtenu avec un rendement de 12%. L'utilisation du triméthoxybenzène **147** comme nucléophile conduit à un rendement de 54% (**149**). Des produits secondaires de bi-substitution nucléophile (2 molécules d'alcools pour une molécule de nucléophile) et d'homo-substitution de l'alcool par une autre molécule d'alcool ont également été isolés en très faibles proportions. L'introduction du nucléophile en excès pour limiter la formation des produits secondaires n'a pas amené d'amélioration notable en terme de rendement.

Lors des essais suivants nous avons réalisé les réactions de substitution à partir de précurseurs catéchiques en utilisant toujours des nucléophiles modèles. Premièrement, nous avons testé la substitution nucléophile de la catéchine méthylée diol **151** avec le 1,3-diméthoxybenzène **146**. Les conditions opératoires restent les mêmes (dichlorométhane, température ambiante et 5% de catalyseur) et le nucléophile est utilisé en excès (Figure II.58).

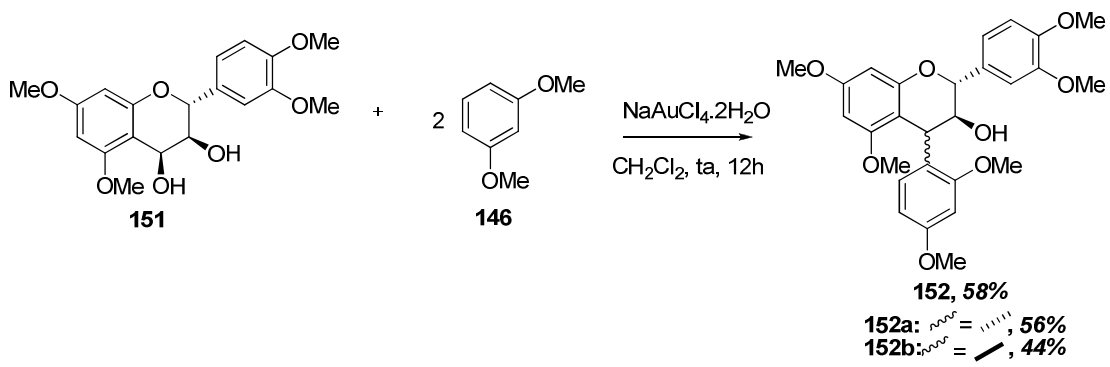


Figure II.58

Le couplage a bien lieu et après purification un mélange de diastéréoisomères **152** dans un rapport 56/44 est obtenu avec un rendement global de 58 %. L'hypothèse de la formation d'un seul produit avec la présence de rotamère a été envisagée. Mais l'expérience de RMN 2D ROESY nous a permis d'éliminer cette hypothèse. D'après les effets NOE entre les protons H4, H3 et H2 et les constantes de couplage entre ces différents protons, la stéréochimie des deux diastéréoisomères a pu être déterminée. Le diastéréoisomère majoritaire **152a** (56%), dont les protons H3 et H4 possèdent une constance de couplage ^3J de 8,5 Hz, possède une liaison interflavane de type a, ce qui correspond dans le cas des procyanidines aux isomères naturels. Néanmoins le contrôle de la stéréochimie reste médiocre dans ce cas-là, le rapport des deux diastéréoisomères **152a et b** étant de 56/44.

Nous avons donc décidé d'étendre cette réaction à des éthers benzyliques comme substrats. Bien que n'ayant pas été développée pour des réactions catalysées à l'or, nous anticipons qu'une catéchine activée avec de l'éthylène glycol permettrait d'améliorer la stéréochimie de la même manière que dans le cas du couplage réalisé avec du $TiCl_4$ comme acide de Lewis.

La substitution a donc été réalisée à partir de la catéchine benzylée activée bromée **59d** en utilisant le diméthoxybenzène **146** comme nucléophile (Figure II.59).

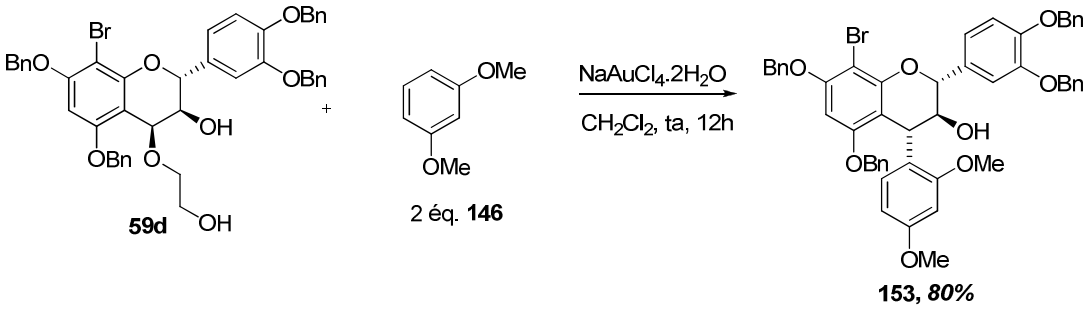


Figure II.59

Dans ce cas un seul diastéréoisomère **153** est obtenu, l'utilisation d'un ligand bidentate semble permettre, comme dans le cas du couplage activé avec $TiCl_4$ un contrôle total de la diastéréosélectivité de la réaction. Le produit de couplage **153** est obtenu avec un excellent rendement de 80%. Contrairement aux essais préliminaires, le produit de

substitution ortho-ortho n'est pas isolé, semblant confirmer une certaine sensibilité de la réaction à l'encombrement stérique.

En vue d'étudier l'effet dû à l'encombrement stérique, le couplage a été réalisé également avec le 1,3,5-triméthoxybenzène **147** (Figure II.60).

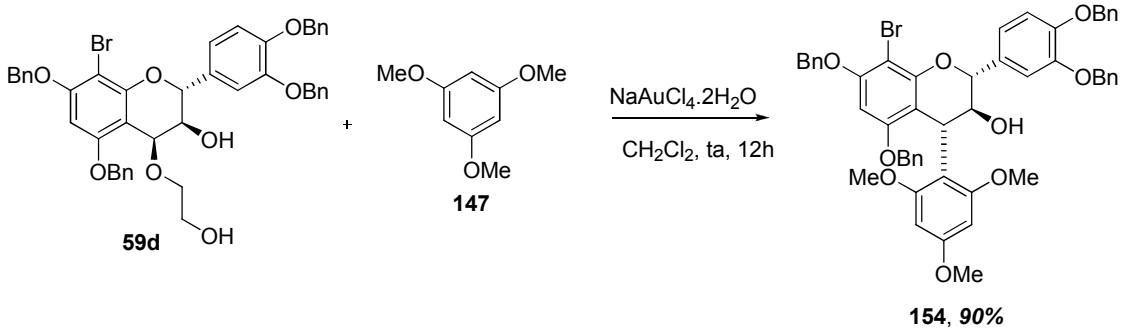


Figure II.60

En réalisant la réaction avec le triméthoxybenzène **147**, le rendement est supérieur et atteint 90%. L'encombrement ortho-ortho est compensé par l'augmentation de la réactivité du nucléophile **147** lié à l'enrichissement électronique du cycle aromatique par les groupements méthoxyles.

II.5.4. **Synthèse des dimères :**

Etant donnés les résultats encourageants obtenus lors de ces premiers essais, les synthèses de dimères catéchiques 4-8 et d'un dimère gallate ont été tentées. Les réactions ont été réalisées en utilisant des quantités stœchiométriques de substrats en présence de 5% de catalyseur avec les mêmes précurseurs que pour le couplage avec $TiCl_4$ (un monomère tétrabenzylé et un monomère benzylé, bromé et activé avec l'éthylène glycol). Notre premier essai a consisté en la synthèse du dimère protégé B3 **84**, qui dans le cadre du couplage avec $TiCl_4$ présente le meilleur rendement (67%). En utilisant l'or comme catalyseur, le rendement a été augmenté jusqu'à 74% et toutes les conditions de régiosélectivité, de stéréréosélectivité et de contrôle de l'oligomérisation ont également été respectées (Figure II.61).

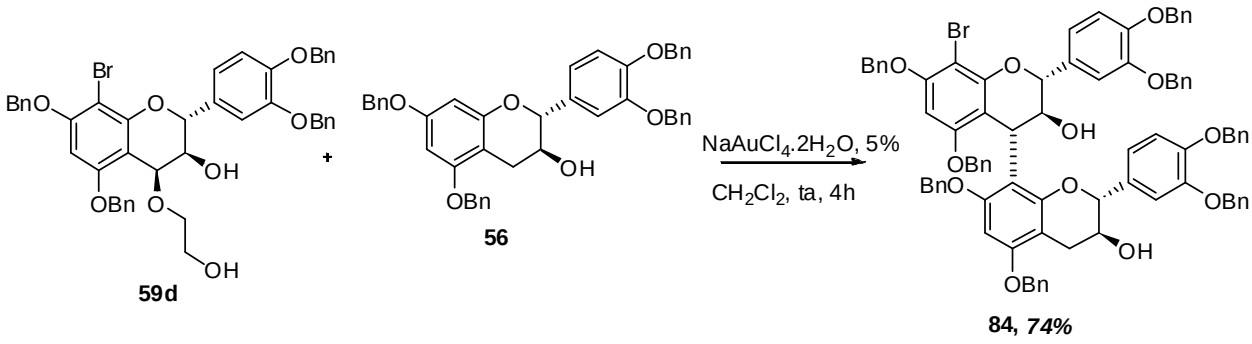


Figure II.61

Dans le cadre du couplage avec $TiCl_4$, nous pouvions constater une diminution des rendements lors de l'utilisation de précurseurs épicatéchiques. Pour la synthèse du dimère protégé B4BnBr **85**, qui varie par rapport au B3BnBr **84** uniquement par la nature de l'unité inférieure, le rendement était de 53%. Lorsque l'unité supérieure est un dérivé de l'épicatechine, les rendements sont encore plus faibles (47% pour B1BnBr **86** et 43% pour B2BnBr **87**). Par ailleurs, lors de la synthèse des dimères gallates avec $TiCl_4$ nous avions également constaté une diminution du rendement notamment dans le cadre du dimère B2BnBr gallate **98** où le rendement était seulement de 30%. Il nous a donc paru intéressant de synthétiser des dimères à partir d'unités épicatéchiques en utilisant le catalyseur à l'or (Figure II.62).

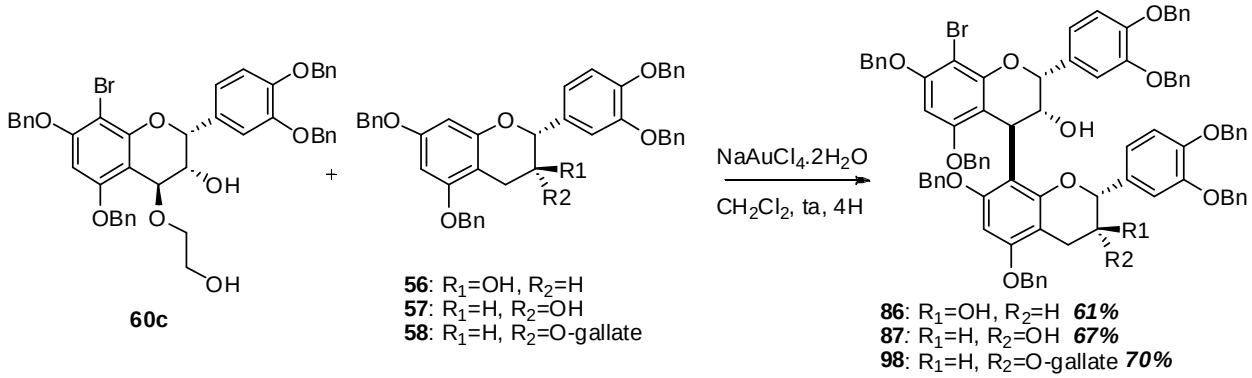


Figure II.62

Même si les synthèses de B1BnBr **86** et de B2BnBr **87** présentent un rendement inférieur à celle de B3BnBr **84**, les rendements respectifs de 61% et de 67% restent acceptables et sont dans tous les cas supérieurs à ceux obtenus avec $TiCl_4$ (47% et 43%).

Concernant la synthèse du dimère gallate **98**, l'utilisation du catalyseur à l'or permet une considérable augmentation du rendement. Alors que le couplage avec $TiCl_4$ ne permettait qu'un rendement de 30%, il est dans ce cas de 70%.

D'après ces quelques essais non optimisés, il apparaît clairement que l'utilisation de la catalyse à l'or permet d'augmenter significativement les rendements du couplage. Les résultats sont encore plus encourageants lors de l'utilisation d'unité épicatéchique et/ou gallate qui entrainaient avec $TiCl_4$ une nette diminution des rendements.

II.5.5. **Catalyse à l'or, une voie d'accès aux liaisons 4-6**

Comme nous avons vu dans la partie précédente, l'accès aux dimères présentant une liaison 4-6 peut être envisagé lors d'une réaction de substitution avec comme nucléophile une catéchine aux fonctions phénols protégées et à la position 8 bloquée temporairement. Néanmoins dans le cadre du couplage avec $TiCl_4$, aucun résultat probant n'a été obtenu.

Etant donné que les réactions catalysées avec l'or présentent de meilleurs rendements, il nous a semblé intéressant de tester cette méthodologie dans l'optique d'un couplage en 4-6. Les premiers essais de substitutions ont été réalisés avec des nucléophiles modèles. Comme nous l'avons vu précédemment, le couplage de la catéchine benzylée activée bromée **59d** avec le nucléophile 1,3,5-triméthoxybenzène **147** permet d'obtenir le produit de substitution **154** avec un rendement de 90% (Figure II.60). Nous avons donc décidé d'utiliser ce même nucléophile en substituant préalablement un des protons aromatiques par un groupement protecteur.

Le premier essai a été réalisé avec le 2-bromo-1,3,5-triméthoxybenzène **155**. Après bromation du triméthoxybenzène **147**, le produit obtenu **155** est engagé, sans purification préalable, dans un couplage avec la catéchine benzylée bromée activée **59d** (Figure II.63).

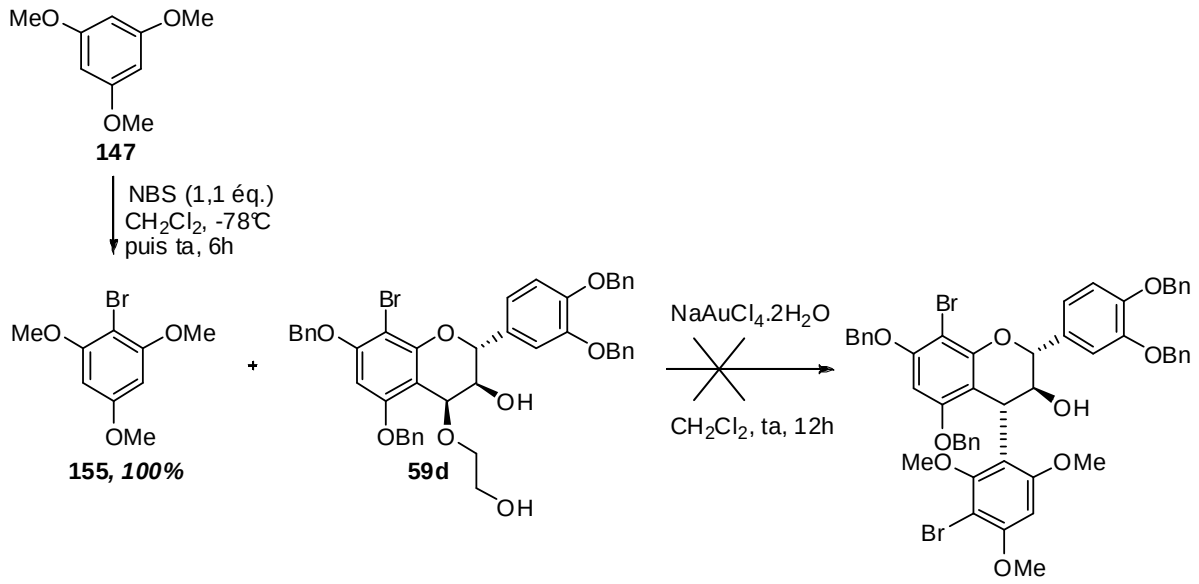


Figure II.63

L'introduction du brome sur le cycle benzylique conduit à l'absence de réaction de substitution. Ceci est sans doute dû à l'effet désactivant du brome. Nous avons donc tenté le couplage en utilisant un groupe protecteur non désactivant : le thiophénol. A partir du 2-bromo-1,3,5-triméthoxybenzène **155**, le 2-phénylthiyl-1,3,5-triméthoxy-benzène **156** est préparé à partir du dérivé lithié correspondant. Dans ce cas également, nous retrouvons les deux produits de départ **156** et **59d** en fin de réaction. Contrairement au brome, ce groupement protecteur n'est pas censé désactiver le cycle mais il est possible que l'atome de soufre interagisse avec le catalyseur en l'empoisonnant.

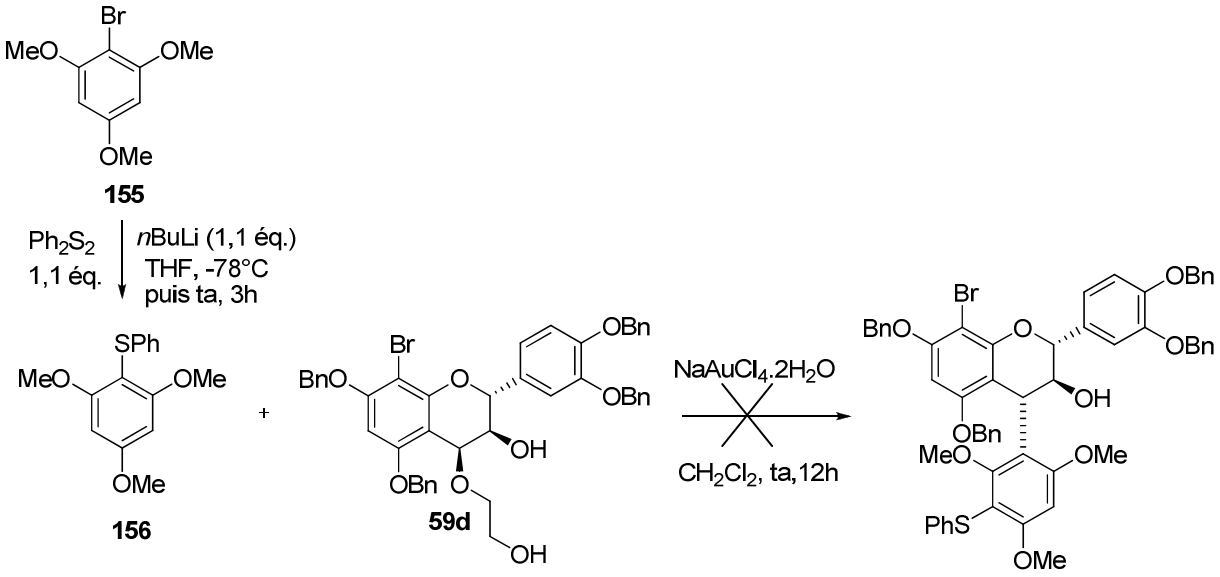


Figure II.64

Nous avons également tenté la substitution avec un nucléophile silylé **157**, obtenu également *via* le 2-bromo-1,3,5-triméthoxybenzène **155**. Dans ce cas, un produit de couplage **154** est observé mais le produit isolé ne comporte plus de groupement silyle. A ce stade de l'étude et compte tenu de la nature symétrique du nucléophile désilylé, nous ne pouvions pas conclure si le groupe protecteur avait été éliminé au cours de la réaction ou lors du traitement (Figure II.65).

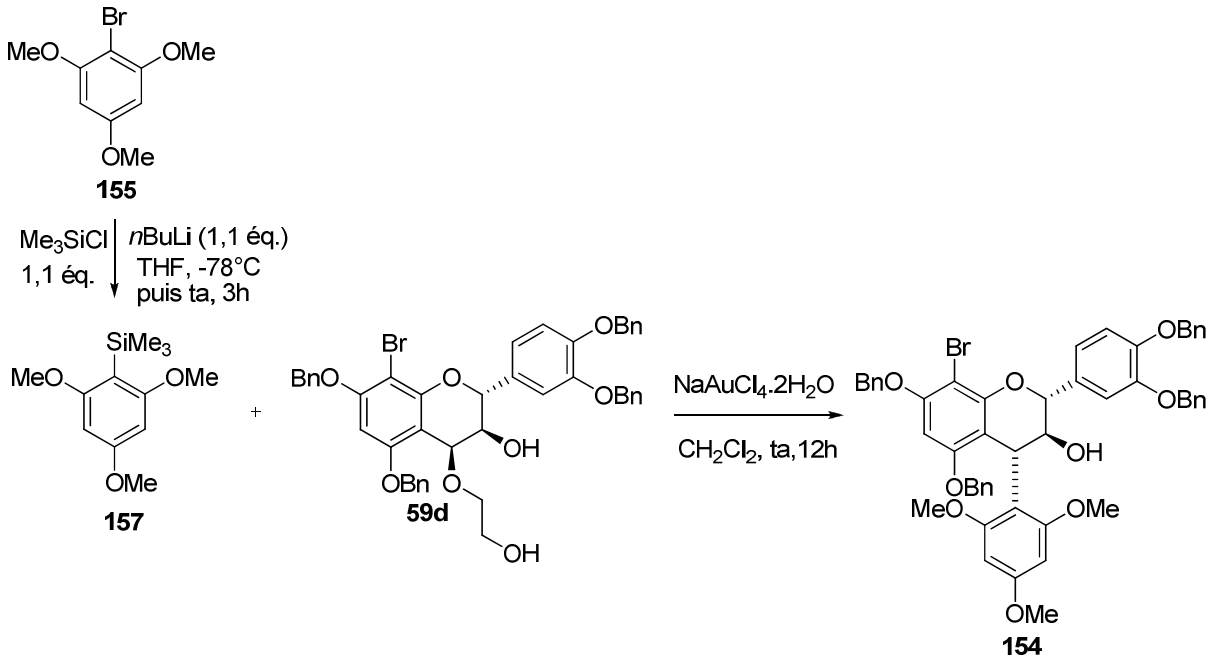


Figure II.65

Pour élucider ce point, nous avons décidé de réaliser ce couplage à partir de la catéchine benzylée et protégée en position 8 par un groupement silylé **158**. Dans ce cas également, un produit de couplage non silylé **84** est observé et isolé. Néanmoins, ce produit correspond au produit de substitution 4-8 obtenu lorsque la position 8 n'est pas protégée. Le groupement silyle semble donc être éliminé avant que la réaction de couplage n'ait lieu (Figure II.66).

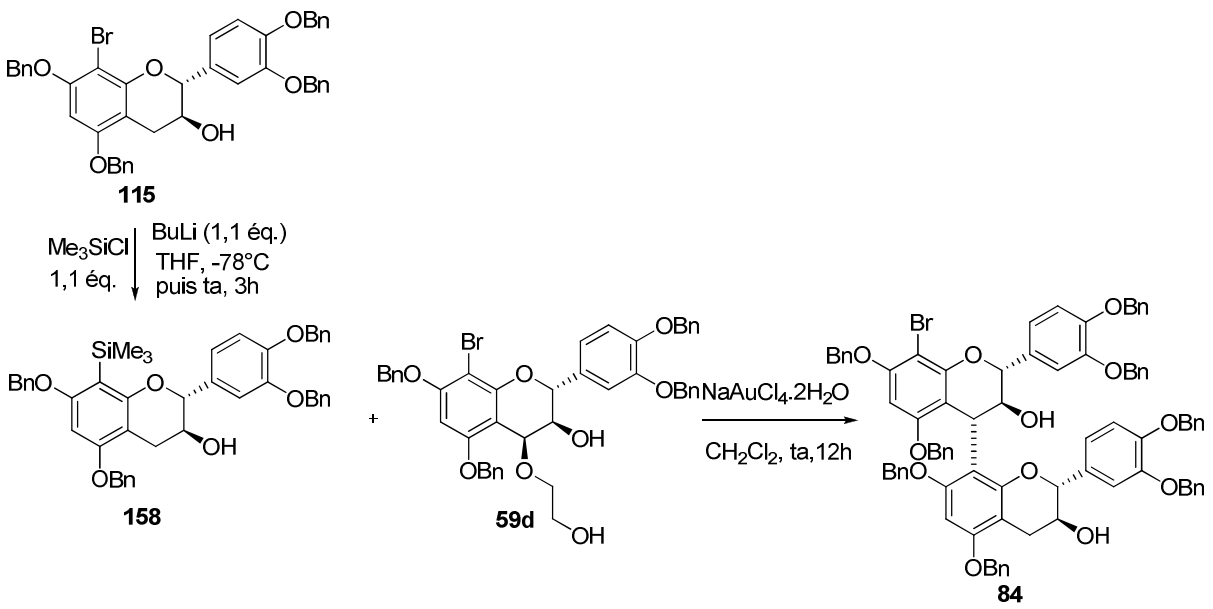


Figure II.66

A ce stade de l'étude, nous n'avons pas réussi à développer une méthode pour la synthèse des dimères 4-6 en utilisant la catalyse à l'or. L'utilisation de ce catalyseur, qui permet d'augmenter la réactivité du couplage pourrait être envisagée, en raison de la douceur des conditions de réactions, dans le couplage d'unités non protégées plus réactives. De même l'utilisation d'un meilleur nucléophile, par exemple par la formation *in situ* d'un carbanion en position 6, pourrait également permettre le couplage d'unités protégées.

II.6 **Partie expérimentale**

II.6.1. **Remarques générales**

Toutes les réactions ont été réalisées sous atmosphère d'argon avec des solvants anhydres fraichement distillés (dichlorométhane, acétate d'éthyle, triéthylamine et méthanol distillés sur CaH_2, DMF sur MgSO4, THF sur sodium en présence de benzophénone et acétone sur $CaSO_4$) Seuls les réactions de catalyse à l'or ont été réalisés sous des conditions non anhydres.

Les spectres de RMN ^1H et ^{13}C ont été enregistrés sur les appareils Brüker DPX-200 FT (^1H: 200 MHz, ^{13}C: 50.2 MHz), Brüker AC-250 FT (^1H: 250 MHz, ^{13}C: 63 MHz), Brüker Avance-300 FT (^1H: 300 MHz, ^{13}C: 75 MHz) et Brüker DPX-400 FT (^1H: 400 MHz, ^{13}C: 100,6 MHz). Les solvants utilisés sont précisés pour chaque produit. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par millions (ppm) parpport à la référence interne, le tétraméthylsilane (TMS). Les constantes de couplage (J) sont

exprimées en Hertz. Les multiplicités sont désignées par les abréviations suivantes : singulet(s), doublet (d), doublet de doublets (dd), multiplet (m).

Les spectres de masse basse et haute résolutions ont été enregistrés sur un spectromètre Micromass autospec–Q. en mode LSIMS, un spectromètre Qstar – Applied Biosystems équipé d'un analyseur quadripôle-temps de vol (QTOF) et d'une source Electrospray (ESI) et un spectromètre Voyager - Applied Biosystems en mode MALDI.

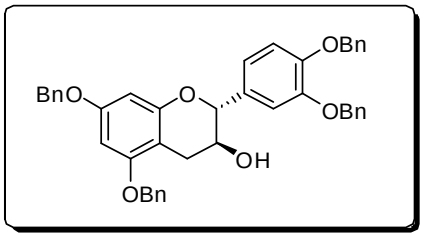
Les points de fusion ont été mesurés dans des tubes capillaires sur un appareil Stuart Scientific SMP3.

Les spectres IR ont été enregistrés sur un spectromètre Perkin Elmer IR-TF Paragon 1000. Les échantillons ont été analysés sous forme de pastille de KBr.

Les mesures des pouvoirs rotatoires ont été effectuées sur un polarimètre Perkin Elmer 241. Les concentrations sont en gramme pour 100 ml de solution.

II.6.2. **Caractérisation des produits synthétisés**

☙ 3',4',5,7-tétra-*O*-benzylcatéchine **56**



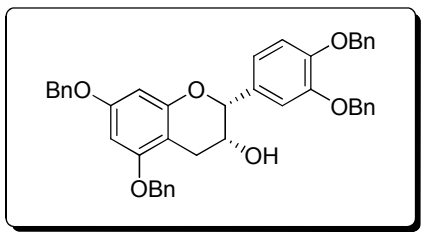
Protocole général *A* :

- Benzylation des fonctions phénols

Après dissolution de 2 g de catéchine **1** (6,89 mmol) dans 35 mL de DMF anhydre, 5,71 g de carbonate de potassium (41,3 mmol, 6 éq.) puis 3,7 ml de bromure de benzyle (31 mmol, 4,5 éq.) sont ajoutés. La solution est agitée à 0°C pendant 2 heures puis à température ambiante pendant 48 heures. Le milieu réactionnel est dilué dans 100 ml d'acétate d'éthyle. La solution est lavée avec de la saumure. Après séparation, la phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et le solvant est évaporé. Un solide de couleur marron clair est obtenu.
La purification est réalisée par chromatographie sur gel de silice (100% dichlorométhane). La catéchine benzylée **56** apparaît alors sous forme d'un solide blanc.
Rendement : 81%

Point de fusion : 124-126 °C
IR (cm^{-1}) : 3465 ; 3417 ; 1618 ; 1592 ; 1513 ; 1498 ; 1454 ; 1378 ; 1263 ; 1143 ; 1217 ; 1116 ; 1026 ; 735 ; 696
RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 7,48-7,28 ($H_{aromatiques}$ Bn, m, 20H) ; 7,05 (H2', *s*, 1H) ; 6,98 (H5' et H6', *s*, 2H) ; 6,29 et 6,23 (H6 et H8, d, 2H, $J_{6,8}$ = 2,3 Hz) ; 5,20 (CH_2Bn, *s*, 2H) ; 5,19 (CH_2Bn, *s*, 2H) ; 5,05 (CH_2Bn, *s*, 2H) ; 5,01 (CH_2Bn, *s*, 2H) ; 4,65 (H2, d, 1H, $J_{2,3}$ = 8,3 Hz) ; 4,03 (H3, m, 1H) ; 3,13 et 2,67 (H4α et H4β, ABX, 2H, $J_{4\alpha,4\beta}$ = 16,4 Hz, $J_{4\alpha,3}$ = 5,6 Hz et $J_{4\beta,3}$ = 8,9 Hz)
RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 158,8 (*C*7) ; 157,8 (*C*5) ; 155,3 (*C*8a) ; 149,4 et 149,1 (*C*4' et *C*3') ; 137,2 (*C*qBn) ; 137,0 (*C*qBn) ; 136,9 (*C*qBn) ; 136,9 (*C*qBn) ; 130,9 (*C*1') ; 128,6 (2 *C*HBn) ; 128,5 (4 *C*HBn) ; 128,5 (2 *C*HBn) ; 128,0 (*C*HBn) ; 127,9 (*C*HBn) ; 127,8 (2 *C*HBn) ; 127,5 (2 *C*HBn) ; 127,5 (2 *C*HBn) ; 127,2 (2 *C*HBn) ; 127,1 (2 *C*HBn) ; 120,6 (*C*6') ; 115,0 (*C*5') ; 113,9 (*C*2') ; 102,3 (*C*4a) ; 94,4 (*C*8) ; 93,9 (*C*6) ; 81,6 (*C*2) ; 71,3 (CH_2Bn) ; 71,2 (CH_2Bn) ; 70,1 (CH_2Bn) ; 69,9 (CH_2Bn) ; 68,2 (*C*3) ; 27,6 (*C*4)
MS (LSIMS, m/z (intensité relative %)) : 651 (42 ; $[M+H]^+$) ; 530 (30) ; 441 (90) ; 409 (31) ; 332 (19) ; 319 (100) ; 229 (40) ; 219 (52)
HRMS : $[M+H]^+$ = 651,2748 (calculée pour $C_{43}H_{39}O_6$: 651,2747)

☙ 3',4',5,7-tétra-*O*-benzylépicatéchine **57**



Protocole général *A* :

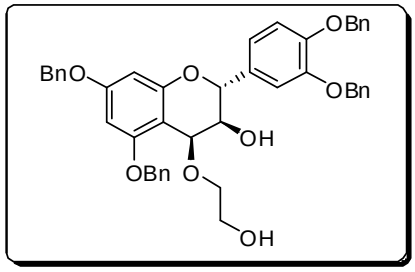
- Benzylation des fonctions phénols

Quantités : Epicatéchine **2** : 1g, 3,5 mmol ; K_2CO_3 : 2,86 g, 20,7 mmol, 6éq. ; BnBr : 1,8 ml, 15,5 mmol, 6éq. ; DMF : 15 ml.
La purification est réalisée par chromatographie sur gel de silice (100% dichlorométhane). **57** apparaît alors sous forme d'un solide blanc.
Rendement : 82%

Point de fusion : 125-126 °C

IR (cm^{-1}) : 3440 ; 1618 ; 1592 ; 1512 ; 1498 ; 1454 ; 1378 ; 1263 ; 1142 ; 1217 ; 1113 ; 1026 ; 735 ; 696
RMN ^1H (300 MHz, CDCl3, ppm) : δ = 7,47-7,35 ($H_{aromatiques}$ Bn, m, 20H) ; 7,18 (H2', d, 1H, $J_{2',6'}$= 1,2 Hz) ; 7,02 (H6', dd, 1H, $J_{6',5'}$ = 8,4 Hz, $J_{6'2'}$= = 1,2 Hz) ; 6,99 (H5', d, 1H, $J_{5',6'}$ = 8,4 Hz) ; 6,30 (H6 et H8, s, 2H) ; 5,21 (CH_2Bn, s, 2H) ; 5,17 (CH_2Bn, s, 2H) ; 5,07 (CH_2Bn, s, 2H) ; 5,03 (CH_2Bn, s, 2H) ; 4,93 (H2, s, 1H) ; 4,23 (H3, m, 1H) ; 3,02 et 2,95 (H4α et H4β, ABX, 2H, $J_{4α,4β}$ = 17,2 Hz, $J_{4α,3}$ = 1,5 Hz et $J_{4β,3}$ = 4,3 Hz)
RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 159,2 (C7) ; 158,7 (C5) ; 155,7 (C8a) ; 149,5 (C3') ; 149,3 (C4') ; 137,7 (CqBn) ; 137,6 (CqBn) ; 137,4 (CqBn) ; 137,3 (CqBn) ; 131,9 (C1') ; 129,0 (2 CHBn) ; 128,9 (2 CHBn) ; 128,9 (2 CHBn) ; 128,9 (2 CHBn) ; 128,4 (CHBn) ; 128,3 (CHBn) ; 128,3 (CHBn) ; 128,23 (CHBn) ; 127,96 (2 CHBn) ; 127,93 (2 CHBn) ; 127,69 (2 CHBn) ; 127,63 (2 CHBn) ; 119,9 (C6') ; 115,5 (C5') ; 113,9 (C2') ; 101,4 (C4a) ; 95,1 (C8) ; 94,5 (C6) ; 78,8 (C2) ; 71,8 (2 CH_2Bn) ; 70,6 (CH_2Bn) ; 70,4 (CH_2Bn) ; 66,8 (C3) ; 28,6 (C4)
MS (LSIMS, m/z (intensité relative %)) : 673 (31 ; $[M+Na]^+$) ; 651 (65 ; $[M+H]^+$) ; 409 (47) ; 332 (17) ; 319 (100) ; 229 (18)
HRMS : $[M+H]^+$ = 651,2739 (calculée pour $C_{43}H_{39}O_6$: 651,2747)

☙ 3',4',5,7-tétra-O-benzyl-4β-(2-hydroxyéthyloxy)catéchine **69**



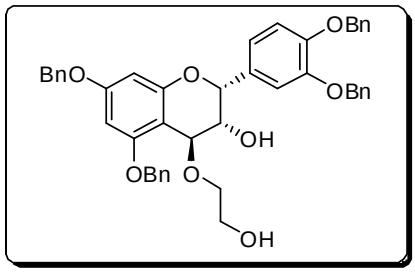
Protocole général B :

- Activation avec l'éthylène glycol de la position 4

2 g de catéchine benzylée **56** (3,07 mmol) sont dissous dans 40 mL de dichlorométhane puis 1 mL d'éthylène glycol distillé (6 éq, 18,04 mmol) et 1,5 g de DDQ (2 éq, 6,15 mmol) sont additionnés. Un précipité de couleur verte apparaît instantanément et la solution est agitée pendant 3 heures à température ambiante. 753 mg (2 éq, 6,15 mmol) de DMAP sont alors ajoutés et l'agitation est poursuivie pendant 10 minutes.
La purification est réalisée par chromatographie sur colonne de silice (éther de pétrole/acétate d'éthyle 50/50). Le composé **69** apparaît sous forme d'une poudre rose-orangée.
Rendement : 69%

Point de fusion : 120-122 °C
IR (cm^{-1}) : 3583 ; 3063 ; 3031 ; 2908 ; 1635 ; 1604 ; 1513 ; 1499 ; 1454 ; 1423 ; 1380 ; 1320 ; 1263 ; 1216 ; 1179 ; 1128 ; 1027 ; 735 ; 696
RMN ^1H (300 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 7,62-7,30 ($H_{aromatiques}$ Bn, m, 20H) ; 7,21 (H2', d, 1H, $J_{2',6'}$ = 1,5 Hz) ; 7,09 (H6', dd, 1H, $J_{6',5'}$ = 8,3 Hz, $J_{6',2'}$ = 1,5 Hz) ; 6,97 (H5', d, 1H, $J_{5',6'}$ = 8,3 Hz) ; 6,37 (H6, d, 1H, $J_{6,8}$ = 1,9 Hz) ; 6,27 (H8, d, 1H, $J_{8,6}$ = 1,9 Hz) ; 5,27 (CH_2Bn, s, 2H) ; 5,19 (CH_2Bn, s, 2H) ; 5,12 (CH_2Bn, s, 2H) ; 5,03 (CH_2Bn, s, 2H) ; 4,96 (H2, d, 1H, $J_{2,3}$ = 12 Hz) ; 4,86 (H4, d, 1H, $J_{4,3}$ = 3,4 Hz) ; 3,98-3,83 (H9 et H3, m, 3H) ; 3,76-3,58 (H10, m, 2H)
RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 161,4 (C7) ; 159,1 (C5) ; 156,6 (C8a) ; 149,9 (C4') ; 149,6 (C3') ; 137,8 (4'-CqBn) ; 137,8 (3'-CqBn) ; 137,2 (7-CqBn) ; 137,0 (5-CqBn) ; 132,0 (C1') ; 130,1 (2 CHBn) ; 129,2 (2 CHBn) ; 129,2 (2 CHBn) ; 129,0 (2 CHBn) ; 129,0 (CHBn) ; 128,8 (CHBn) ; 128,6 (CHBn) ; 128,3 (CHBn) ; 128,2 (2 CHBn) ; 128,1 (4 CHBn) ; 127,8 (2 CHBn) ; 122,0 (C6') ; 115,3 (C2') ; 115,2 (C5') ; 104,6 (C4a) ; 94,9 (C8) ; 94,2 (C6) ; 77,4 (C2) ; 73,6 (C9) ; 71,9 (CH_2Bn) ; 71,8 (C3) ; 71,7 (CH_2Bn) ; 71,0 (CH_2Bn) ; 70,6 (C4) ; 70,6 (CH_2Bn) ; 62,7 (C10)
MS (LSIMS, m/z (intensité relative %)) : 710 (3 ; $[M]^{+\bullet}$) ; 374 (9) ; 181 (7) ; 91 (100) ; 65 (8)
HRMS : $[M]^{+\bullet}$ = 710,2876 (calculée pour $C_{45}H_{42}O_8$: 710,2880)

☙ 3',4',5,7-tétra-O-benzyl-4β-(2-hydroxyéthyloxy)épicatéchine **60a**



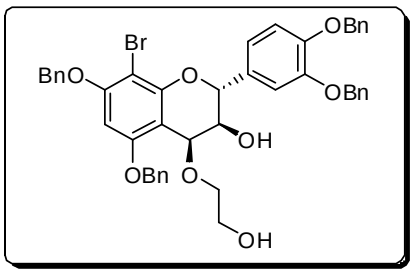
Protocole général B :

- Activation avec l'éthylène glycol de la position 4

Quantités : Epicatéchine benzylée **57**: 800 mg, 1,23 mmol ; Dichlorométhane : 40 mL ; Ethylène glycol : 1,22 ml, 22 mmol, 20 éq. ; DDQ : 558 mg, 2,46 mmol, 2 éq. ; DMAP : 600 mg, 4,91 mmol, 4 éq.
Rendement : 63% (solide rose pâle)

IR (cm^{-1}) : 3583 ; 1615 ; 1591 ; 1511 ; 1497 ; 1453 ; 1377 ; 1265 ; 1214 ; 1151 ; 1115 ; 1026 ; 736 ; 696
RMN ^1H (300 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 7,50–7,20 ($H_{aromatiques}$ Bn, m, 20H) ; 7,19 (H2', d, 1 H, $J_{2',6'}$ = 1,5 Hz) ; 7,08 (H6', dd, 1H, $J_{6',5'}$= 8,3 Hz, $J_{6',2'}$ = 1,5 Hz) ; 6,97 (H5', d, 1H, $J_{5',6'}$ = 8,3 Hz) ; 6,33 (H6, d, 1H, $J_{6,8}$ = 2,3 Hz) ; 6,30 (H8, d, 1H, $J_{8,6}$ = 2,3 Hz) ; 5,23 (CH_2Bn, s, 2H) ; 5,21 (CH_2Bn, s, 2H) ; 5,14 (CH_2Bn, s, 2H) ; 5,09 (H2, d, 1H, $J_{2,3}$ = 6,8 Hz) ; 4,96 (CH_2Bn, s, 2H) ; 4,63 (H4, d, 1H, $J_{4,3}$ = 2,6 Hz) ; 4,00 (H3, dd, 1H, $J_{3,4}$ = 2,6 Hz, $J_{3,2}$ =5,3 Hz) ; 3,98–3,65 (H9 et H10, m, 4H)
RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 160,7 (C7) ; 159,7 (C5) ; 156,1 (C8a) ; 149,1 (C4') ; 149,0 (C3') ; 137,3 (4'-CqBn) ; 137,2 (3'-CqBn) ; 136,7 (7-CqBn) ; 136,5 (5-CqBn) ; 130,9 (C1') ; 128,7 (2 CHBn) ; 128,5 (4 CHBn) ; 128,2 (2 CHBn) ; 128,1 (2 CHBn) ; 127,9 (2 CHBn) ; 127,8 (2 CHBn) ; 127,6 (2 CHBn) ; 127,3 (4 CHBn) ; 119,8 (C6') ; 115,2 (C5') ; 113,9 (C2') ; 101,9 (C4a) ; 94,7 (C8) ; 94,5 (C6) ; 74,8 (C2) ; 71,5 (CH_2Bn) ; 71,4 (CH_2Bn) ; 70,7 (C4) ; 70,6 (CH_2Bn) ; 70,6 (C9) ; 70,1 (CH_2Bn) ; 68,2 (C3) ; 62,0 (C10)
MS (LSIMS, m/z (intensité relative %)) : 710 (4 ; $[M]^{+\bullet}$), 374 (7) ; 181 (5) ; 91 (100) ; 65 (9)
HRMS : $[M]^{+\bullet}$ = 710,2996 (calculée pour $C_{45}H_{42}O_8$: 710,2880)

☙ 3',4',5,7-tétra-O-benzyl-4β-(2-hydroxyéthyloxy)-8-bromo-catéchine **59d**



Protocole général C :

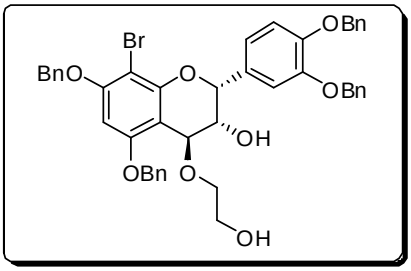
- Bromation de la position 8

2 g de **69** (2,81 mmol) sont dissous dans 20 mL de dichlorométhane. A -78°C, 501 mg de NBS (2,81 mmol, 1 éq.) préalablement recristallisé et dissous dans 15 ml de dichlorométhane sont ajoutés à l'aide d'une ampoule d'addition en 5 minutes. On laisse revenir le milieu réactionnel à température ambiante et l'agitation est maintenue pendant 7 heures.
Le mélange réactionnel est alors dilué dans 100 ml d'acétate d'éthyle et lavé trois fois avec 100 ml de saumure. Après séparation, la phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis le solvant est évaporé.Le composé **60c** est obtenu sous forme d'un solide beige.
Rendement : 98%

Point de fusion : 149-151°C
IR (cm^{-1}) : 3385 ; 3063 ; 3031 ; 2924 ; 2868 ; 1604 ; 1578 ; 1516 ; 1498 ; 1454 ; 1421 ; 1380 ; 1346 ; 1265 ; 1216 ; 1185 ; 1126 ; 1069 ; 1028 ; 885 ; 855 ; 812 ; 782 ; 735 ; 696
RMN ^1H (300 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 7,53-7,23 ($H_{aromatiques}$ Bn, m, 20H) ; 7,17 (H2', d, 1H, $J_{2',6'}$= 1,9 Hz) ; 7,05 (H6', dd, 1H, $J_{6',5'}$ = 8,3 Hz, $J_{6',2'}$= 1,9 Hz) ; 6,96 (H5', d, 1H, $J_{5',6'}$ = 8,3 Hz) ; 6,28 (H6, s, 1H) ; 5,23-4,99 (4 CH_2Bn, m, 8H) ; 5,09 (H2, d, 1H, $J_{2,3}$ = 10,6 Hz) ; 4,82 (H4, d, 1H, $J_{4,3}$ = 3,4 Hz) ; 3,86 (H9, m, 2H) ; 3,77 (H3, m, 1H) ; 3,66 (H10, m, 2H)

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 156,9 (*C*5) ; 156,6 (*C*7) ; 152,2 (*C*8a) ; 149,0 (*C*4') ; 148,7 (*C*3') ; 137,1 (*C*qBn) ; 137,0 (*C*qBn) ; 136,2 (*C*qBn) ; 135,8 (*C*qBn) ; 130,7 (*C*1') ; 128,5 (2 *C*HBn) ; 128,4 (2 *C*HBn) ; 128,3 (2 *C*HBn) ; 128,2 (2 *C*HBn) ; 128,1 (*C*HBn) ; 127,8 (*C*HBn) ; 127,5 (2 *C*HBn) ; 127,4 (2 *C*HBn) ; 127,3 (2 *C*HBn) ; 127,0 (2 *C*HBn) ; 126,7 (2 *C*HBn) ; 120,8 (*C*6') ; 114,4 (*C*5') ; 114,0 (*C*2') ; 105,2 (*C*4a) ; 92,5 (*C*8) ; 91,9 (*C*6) ; 76,7 (*C*2) ; 72,9 (*C*9) ; 71,4 (*C*3) ; 71,1 (CH_2Bn) ; 71,0 (CH_2Bn) ; 70,9 (CH_2Bn) ; 70,5 (CH_2Bn) ; 69,6 (*C*4) ; 62,0 (*C*10)
MS (LSIMS, m/z (intensité relative %)) 813 (100 ; $[M+Na]^+$) ; 790 (16, $[M+H]^+$) ; 729 (24) ; 721 (11) ; 571 (46) ; 549 (25) ; 457 (20) ; 329 (65) ; 307 (43) ; 289 (27)
HRMS : $[M+Na]^+$ = 811,1893 (calculée pour $C_{45}H_{41}BrO_8Na$: 811,1883)

☙ 3',4',5,7-tétra-*O*-benzyl-4β-(2-hydroxyéthyloxy)-8-bromo-épicatéchine **60c**



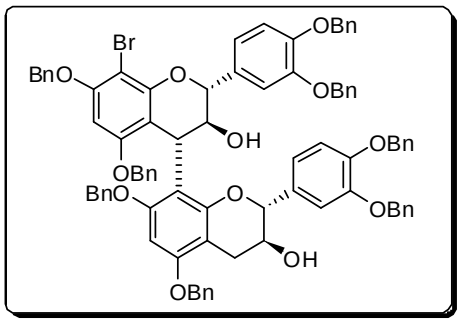
Protocole général *C* :

- Bromation de la position 8

Quantités : Epicatéchine benzylée activée **60a** : 902 mg, 1,27 mmol ; NBS : 226 mg, 1,27 mmol, 1 éq. ; dichlorométhane : 10 ml
Rendement : 99% (Solide beige)

Point de fusion : 110-111 °*C*
RMN ^1H (300 MHz, CDCl3, ppm) : δ = 7,53–7,26 ($H_{aromatique}$, m, 20H) ; 7,24 (2'H, d, 1H, $J_{2',6'}$ = 1,5 Hz) ; 7,05 (H6', dd, 1H, $J_{6',5'}$ = 8,3 Hz, $J_{6',2'}$ = 1,5 Hz) ; 6,99 (H5', d, 1H, $J_{5',6'}$= 8,3Hz) ; 6,29 (H6, s, 1H) ; 5,24–5,05 (4 CH_2Bn, m, 8H) ; 5,03 (H2, d, 1H, $J_{2,3}$ = 6,8 Hz) ; 4,65 (H4, d, 1H, $J_{4,3}$ = 2,6 Hz) ; 4,05 (H3, m, 1H) ; 3,84–3,66 (H9 et H10, m, 4H)
RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 158,7 (*C*7) ; 157,0 (*C*5) ; 152,6 (*C*8a) ; 149,4 (*C*4') ; 149,0 (*C*3') ; 137,5 (4'-*C*qBn) ; 137,4 (3'-*C*qBn) ; 136,7 (7-*C*qBn) ; 136,4 (5-*C*qBn) ; 130,6 (*C*1') ; 129,0–127,3 (*C*HBn) ; 119,4 (*C*6') ; 115,5 (*C*5') ; 113,7 (*C*2') ; 103,8 (*C*4a) ; 93,1 (*C*8) ; 93,0 (*C*6) ; 75,5 (*C*2) ; 71,6–71,0 (*C*H2Bn) ; 70,6 (*C*9) ; 68.1 (*C*3) ; 62.2 (*C*10) ; 29.8 (*C*4)
MS (LSIMS, m/z (intensité relative %)) : 813 (100) $[M+Na]^+$; 790 (45) $[M+H]^+$; 727 (52) ; 637 (15) ; 547 (19) ; 479 (10) ; 457 (83) ; 413 (28) ; 381 (38) ; 361 (41) ; 329 (60) ; 289 (53)
HRMS : $[M+Na]^+$ = 811,1878. (calculée pour $C_{45}H_{41}BrO_8Na$: 811,1883)

☙ Dimère B3BnBr **84**



Voie 1 : Protocole général D :

- Couplage cationique catalysé avec $TiCl_4$

824 mg de 3',4',5,7-tétra-*O*-benzylcatéchine **56** (1,27 mmol) et 1 g de 3',4',5,7-tétra-*O*-benzyl-4β-(2-hydroxyethoxy)-8-bromocatéchine **59d** (1,27 mmol, 1 éq.) sont dissous dans 10 ml de THF et 10 ml de dichlorométhane. 2,54 ml de $TiCl_4$ (2,54 mmol, 2 éq.), 1M dans CH_2Cl_2, sont alors additionnés goutte à goutte à 0°C. La solution rouge sombre obtenue est agitée 3 heures à température ambiante. 15 ml d'une solution saturée en $NaHCO_3$ puis 10 ml d'eau sont additionnés lentement au milieu réactionnel. Le précipité de $TiO_2.xH_2O$ est éliminé par filtration et rincé avec du dichlorométhane et de l'eau. La phase organique est lavée avec de la saumure et la phase aqueuse est extraite avec du dichlorométhane. Les phases organiques sont séchées sur $MgSO_4$ puis après évaporation du solvant une huile rouge foncée est obtenue.

La purification est réalisée sur colonne de gel de silice (pentane/acétate d'éthyle 80/20). Un solide beige est alors obtenu.
Rendement : 67%

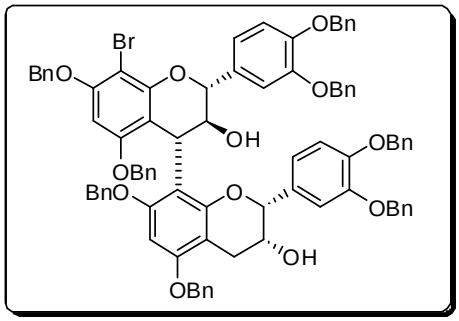
Voie 2 : Protocole général E :

- Couplage catalysé à l'or

79 mg de 3',4',5,7-tétra-*O*-benzylcatéchine **56** (0,1 mmol, 1 éq.) et 65 mg de 3',4',5,7-tétra-*O*-benzyl-4β-(2-hydroxyethoxy)-8-bromocatéchine **59d** (0,1 mmol, 1 éq.) sont dissous dans 1 ml de dichlorométhane. Le catalyseur $NaAuCl_4.2H_2O$ (2 mg, 5 µmol, 0,05 éq.) est additionné puis le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 4h. Après évaporation du solvant, le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éther de pétrole/acétate d'éthyle 80/20).
Rendement : 74%

Point de fusion : 73-76 °C
IR (cm^{-1}) : 3568 ; 3062 ; 3029 ; 2865 ; 1600 ; 1509 ; 1498 ; 1454 ; 1419 ; 1380 ; 1339 ; 1263 ; 1213 ; 1172 ; 1114 ; 1026 ; 909 ; 847 ; 808 ; 734 ; 695
RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$, ppm, mélange de deux rotamères,63/37) : δ = 7,56-7,24 ($H_{aromatiques}$Bn, m); 7,19-7,04 (H2'B et H2'E, min et Maj) ; 6,99-6,83 (H5'B, min et Maj, H5'E Maj) ; 6,93-6,83 (H6'B, min et Maj) ; 6,78 (H5'E, min, d, $J_{5',6'Emin}$ = 1,5 Hz) ; 6,32 (H6D, Maj, s) ; 6,29 (H6'E, min, d, $J_{6',5'Emin}$ = 1,5 Hz) ; 6,26 (H6A, min et H6'E, Maj) ; 6,24 (H6A, Maj, s) ; 6,15 (H6D, min, s) ; 5,34-4,49 (CH_2Bn, min et Maj, m) ; 4,88 (H4C, min, d, $J_{4,3Cmin}$ = 8,3 Hz) ; 4,80 (H4C, Maj, d, $J_{4,3CMaj}$ = 9,03 Hz) ; 4,62 (H2C, min et Maj, d, $J_{2,3C}$ = 9,8 Hz) ; 4,44 (H2F, min, d, $J_{2,3Fmin}$ = 8,7 Hz) ; 4,32 (H3C, Maj, m) ; 4,19 (H3C, min, m) ; 3,73 (H3F, min et Maj, m) ; 3,72 (H2F, Maj, d, $J_{2,3F\ Maj}$ = 12,1 Hz) ; 3,26 et 2,70 (H4Fα et H4Fβ, min, ABX, $J_{4Fα,4Fβ\ min}$ = 16,6 Hz avec $J_{4Fα,3F\ min}$ = 5,8 Hz et $J_{4Fβ,3F\ min}$ = 9,4 Hz) ; 3,11 et 2,46 (H4Fα et H4Fβ, Maj, ABX, $J_{4Fα,4Fβ\ Maj}$ = 16,2 Hz avec $J_{4Fα,3F\ Maj}$ = 4,9 Hz et $J_{4Fβ,3F\ Maj}$ = 8,5 Hz)
RMN ^{13}C (100,6 MHz, $CDCl_3$, ppm, mélange de deux rotamères, 63/37) : δ = 157,6 (C7A, min) ; 156,9 (C7A, Maj) ; 156,8 (C7D, min) ; 156,2 (C7D, Maj) ; 156,2 (C5D, min) ; 156,1 (C5D, Maj) ; 154,7 (C5A, Maj) ; 154,7 (C5A, min) ; 154,5 (C8aA, Maj) ; 154,2 (C8aA, min) ; 154,0 (C8aD, Maj) ; 153,4 (C8aD, min) ; 149,8-148,6 (C3'B, C3'E, C4'B, C4'E, min et Maj) ; 137,2-137,0 (CqBn, min et Maj) ; 132,3 (C1'E, Maj) ; 132,2 (C1'B, min) ; 132,1 (C1'B, Maj) ; 130,6 (C1'E, min) ; 130,2-127,5 (CHBn, min et Maj); 121,6 (C6'B, Maj); 121,1 (C6'B, min); 120,7 (C6'E, Maj) ; 120,3 (C6'E, min) ; 116,1 (C5'B, min) ; 115,4 et 115,2 (C5'B et C5'E, Maj) ; 115,1 (C5'E, min) ; 114,5 (C2'B et C2'E, min) ; 114,1 (C2'B et C2'E, Maj) ; 112,2 (C8D, min) ; 111,9 (C8D, Maj) ; 111,2 (C4aA, Maj) ; 111,1 (C4aA, min) ; 104,0 (C4aD, min) ; 103,0 (C4aD, Maj) ; 94,4 (C8A, min) ; 94,3 (C8A, Maj) ; 94,1 (C6A, Maj) ; 93,8 (C6A, min) ; 92,3 (C6D, min) ; 91,8 (C6D, Maj) ; 82,7 (C2C, Maj) ; 82,3 (C2C, min) ; 81,9 (C2F, min) ; 81,3 (C2F, Maj) ; 73,8 (C3C, min) ; 73,6 (C3C, Maj) ; 71,9-70,5 (CH_2Bn, min et Maj) ; 69,3 (C3F, min) ; 69,0 (C3F, Maj) ; 38,0 (C4C, min) ; 37,9 (C4C, Maj) ; 29,1 (C4F, min) ; 28,6 (C4F, Maj)
MS (LSIMS, m/z (intensité relative %)) : 1401 (87 ; $[M+Na]^+$) ; 1378 (58 ; $[M+H]^+$) ; 1309 (16) ; 1045 (25) ; 937 (26) ; 727 (35) ; 647 (21) ; 395 (64) ; 307 (42) ; 211 (100)
HRMS : $[M+Na]^+$ = 1399,4160 (calculée pour $C_{86}H_{73}BrO_{12}Na$: 1399,4183)

☙ Dimère B4BnBr **85**



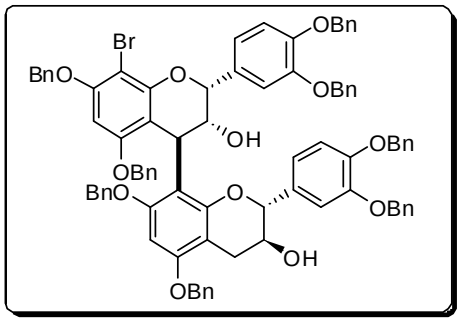
Protocole général D :

- Couplage cationique catalysé avec $TiCl_4$

Quantité : 3',4',5,7-tétra-*O*-benzylépicatéchine **57** : 400 mg, 0,62 mmol ; 3',4',5,7-tétra-*O*-benzyl-4β-(2-hydroxyethoxy)-8-bromocatéchine **59d**: 582 mg, 0,74 mmol, 1,2 éq. ; $TiCl_4$: 1,23 ml, 1,23 mmol, 2 éq. ; THF : 4 ml ; dichlorométhane : 4 ml.
Purification : Chromatographie sur gel de silice, pentane/acétate d'éthyle 80/20
Rendement : 53% (solide beige)

Point de fusion : 73-75 °C
IR (cm^{-1}) : 3422 ; 3062 ; 3030 ; 2925 ; 2856 ; 1600 ; 1512 ; 1498 ; 1454 ; 1418 ; 1382 ; 1340 ; 1265 ; 1216 ; 1173 ; 1116 ; 1027 ; 910 ; 848 ; 786 ; 735 ; 696 ; 620
RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$, ppm, mélange de deux rotamères 85/15) : δ = 7,49-6,80 ($H_{aromatiques}$Bn, m, 40H) ; 7,22-6,67 (H2'B, H5'B, H6'B, H2'E, H5'E, H6'E, m, 6H) ; 6,22 (H6D, s, 1H) ; 6,18 (H6A, s, 1H) ; 5,24-4,38 (8 CH_2Bn, m, 16H) ; 4,83 (H4C, d, 1H, $J_{4,3C}$ = 8,28 Hz) ; 4,58 (H2C, d, 1H, $J_{2,3C}$ = 9,6 Hz) ; 4,19 (H3C, m, 1H) ; 3,88 (H3F, m, 1H) ; 3,78 (H2F, s, 1H) ; 2,88 et 2,57 (H4Fα, et H4Fβ, ABX, 2H, $J_{4F\alpha,4F\beta}$ = 17,1 Hz avec $J_{4F\alpha,3F}$ = 4,4 Hz et $J_{4F\beta,3F}$ < 1 Hz) (Seuls les déplacements chimiques du dimère Majoritaire sont présentés)
RMN ^{13}C (100,6 MHz, $CDCl_3$, ppm, mélange de deux rotamères 85/15) : δ = 156,6 (C5A) ; 156,5 (C5D) ; 155,6 (C7D) ; 154,4 (C7A) ; 153,9 (C8aD) ; 153,7 (C8aA) ; 149,2 ; 149,1 ; 148,8 ; 148,6 (C3'B, C3'E, C4'B, C4'E) ; 138,2-136,5 (CqBn) ; 132,3 (C1'E) ; 131,6 (C1'B) ; 129,1-127,0 (CHBn) ; 121,3 (C6'B) ; 119,0 (C6'E) ; 115,4 ; 114,8 (C5'B, C5'E) ; 113,6 (C2'B) ; 113,2 (C2'E) ; 111,5 (C8D) ; 111,0 (C4aA) ; 101,0 (C4aD) ; 94,0 (C8A) ; 93,9 (C6A) ; 91,4 (C6D) ; 82,4 (C2C) ; 77,5 (C2F) ; 73,1 (C3C) ; 71,9-69,8 (CH_2Bn) ; 66,2 (C3F) ; 37,4 (C4C); 28,4 (C4F) (Seuls les déplacements chimiques du dimère Majoritaire sont présentés)
MS (LSIMS, m/z (intensité relative %)) : 1401 (100 ; $[M+Na]^+$) ; 1379 (38 ; $[M+H]^+$) ; 1309 (18) ; 1045 (13) ; 727 (7) ; 647 (21) ; 381 (30) ; 353 (14) ; 329 (24) ; 307 (16) ; 289 (15) ; 211 (7)
HRMS : $[M+Na]^+$ = 1399,4215 (calculée pour $C_{86}H_{73}BrO_{12}Na$: 1399,4183)

☙ Dimère B1BnBr **86**



Voie 1 : Protocole général D :

- Couplage cationique catalysé avec $TiCl_4$

Quantité : 3',4',5,7-tétra-*O*-benzylcatéchine **56** : 321 mg, 0,493 mmol ; 3',4',5,7-tétra-*O*-benzyl-4β-(2-hydroxyethoxy)-8-bromoépicatéchine **60c** : 467 mg, 0,591 mmol, 1,2 éq. ; $TiCl_4$: 0,986 ml, 0,986 mmol, 2 éq. ; THF : 3 ml ; dichlorométhane : 3 ml.
Purification : Chromatographie sur gel de silice, pentane/acétate d'éthyle 70/30
Rendement : 47% (solide beige)

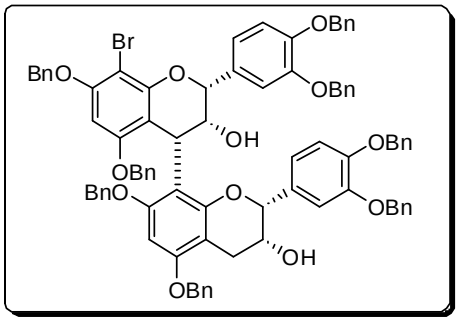
Voie 2 : Protocole général E :

- Couplage catalysé à l'or

Quantité : 3',4',5,7-tétra-*O*-benzylcatéchine **56** : 79 mg, 0,1 mmol ; 3',4',5,7-tétra-*O*-benzyl-4β-(2-hydroxyethoxy)-8-bromoépicatéchine **60c** : 65 mg, 0,1 mmol, 1 éq. $NaAuCl_4.2H_2O$: 3 mg, 5 µmol, 0,05 éq. ; dichlorométhane : 1 ml, Temps de réaction : 4h
Purification : Chromatographie sur gel de silice, pentane/acétate d'éthyle 70/30
Rendement : 61%

RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$, ppm, mélange de deux rotamères 77/23) δ = 7,50–7,26 ($H_{aromatiques}$, m) ; 7,21–6,80 (H2'B/E, H5'B, H6'B/E, 5'EH, Maj et min) ; 6,64 (H2'E/B, Maj, d, $J_{2',6'}$ = 1,5 Hz) ; 6,35 (H6D, Maj, s) ; 6.32 (H6'E/B, Maj ; dd, $J_{6',5'}$ = 8,3 Hz, $J_{6',2'}$ =1,9 Hz) ; 6,20 (H6A, min, s) ; 6,17 (H6D, min, s) ; 6,05 (H6A, Maj, s) ; 5,45 (H2C, Maj, s) ; 5,38 (H2C, min, s) ; 4,85 (H4C, Maj, d, $J_{3C,4CMaj}$ = 1,1 Hz) ; 4,73 (H4C, min, d, J< 1 Hz) ; 4,62 (H2F, min, d, $J_{2F,3F\ min}$ = 8,5 Hz) ; 4,07 (H3C, Maj, d, $J_{3C,4CMaj}$ = 1,1 Hz) ; 3,93 (H3C, min, m) ; 3,69 (H3F, Maj, m) ; 3,58 (H2F, Maj, d, $J_{2F,3FMaj}$ = 11,3 Hz) ; 3,23 et 2,55 (H4Fα et H4Fβ, Maj, ABX, $J_{4F\alpha,4F\beta\ Maj}$ = 16,7 Hz avec $J_{4F\alpha,3F\ Maj}$ = 6,4 Hz et $J_{4F\beta,3F\ Maj}$ = 9,8 Hz)3,14 et 2,68 (H4Fα et H4Fβ, min, ABX, $J_{4F\alpha,4F\beta\ min}$ = 16,2 Hz avec $J_{4F\alpha,3F\ min}$ = 5,3 Hz et $J_{4F\beta,3F\ min}$ = 9,0 Hz)
RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, ppm, mélange de deux rotamères 77/23) : δ = 156,0 (C5D) ; 155,8 (C7D) ; 155,6 (C5A) ; 154,3 (C7A and C8aD) ; 151,4 (C8aA) ; 149,8 ; 149,4 ; 149,2 ; 148,6 (C3'B, C3'E, C4'B, C4'E) ; 137,6–136,9 (CqBn) ; 131,8 ; 129,5 (C1'B, C1'E) ; 128,6–126,8 (CHBn) ; 120,3 ; 119,1 (C6'B, C6'E) ; 115,2 ; 114,3 (C5'B, C5'E) ; 113,1 ; 111,3 (C2'E, C2'B) ; 110,8 (C8D) ; 106,8 (C4aA) ; 104,3 (C4aD) ; 93,4 (C8A) ; 92,5 (C6D) ; 92,4 (C6A) ; 81,6 (C2F, Maj) ; 81,4 (C2F, min) ; 77,2 (C2C, min) ; 75,9 (C2C, Maj) ; 72,1–69,5 (CH_2Bn, C3C, Maj et min) ; 68,5 (C3F, Maj) ; 68,2 (C3F, min) ; 35,8 (C4C, Maj et min) ; 29,7 (C4F, Maj) ; 28,9 (C4F, min)
MS (LSIMS, m/z (intensité relative %)) : 1417 (14) $[M+K]^+$; 1401 (100) $[M+Na]^+$; 712 (5)
HRMS : [M] = 1399,4234 (calculée pour $C_{86}H_{73}BrO_{12}Na$: 1399.4183)

- Dimère B2BnBr **87**



Voie 1 : Protocole général D :

- Couplage cationique catalysé avec $TiCl_4$

Quantité : 3',4',5,7-tétra-*O*-benzylépicatéchine **57**: 345 mg, 0,53 mmol ; 3',4',5,7-tétra-*O*-benzyl-4β-(2-hydroxyethoxy)-8-bromoépicatéchine **60c**: 502 mg, 0,636 mmol, 1,2 éq. ; $TiCl_4$: 1,06 ml, 1,06 mmol, 2 éq. ; THF : 3 ml ; dichlorométhane : 3 ml.
Purification : Chromatographie sur gel de silice, pentane/acétate d'éthyle 80/20
Rendement : 43% (solide beige)

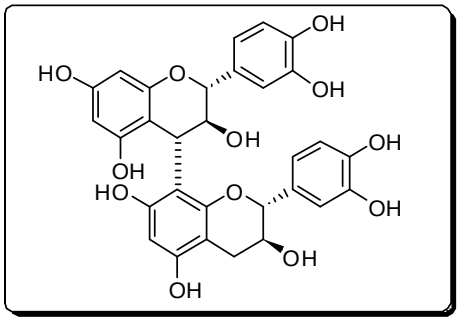
Voie 2 : Protocole général E :

- Couplage catalysé à l'or

Quantité : 3',4',5,7-tétra-*O*-benzylépicatéchine **57** : 79 mg, 0,1 mmol ; 3',4',5,7-tétra-*O*-benzyl-4β-(2-hydroxyethoxy)-8-bromoépicatéchine **60c** : 65 mg, 0,1 mmol, 1 éq. $NaAuCl_4.2H_2O$: 2 mg, 5 µmol, 0,05 éq. ; dichlorométhane : 1 ml, Temps de réaction : 4h
Purification : Chromatographie sur gel de silice, pentane/acétate d'éthyle 70/30
Rendement : 67%

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, ppm, mélange de deux rotamères 67/33) : δ = 7,52–7,25 ($H_{aromatiques}$, m) ; 7,22–6,74 (H2'B, H2'E, H5'B, H5'E, H6'E/B, m) ; 6,35 (H6D, Maj, s) ; 6,28 (H6'B/E, d, $J_{2',6'}$ = 8,3 Hz) ; 6,23 (H6A, min, s) ; 6,20 (H6D, min, s) ; 6,13 (H6A, Maj, s) ; 5,57 (H2F, Maj, s) ; 5,37 (H2F, min, s) ; 5,25–4,96 (CH_2Bn, H2F, min, m) ; 4,89 (H2F, Maj, s) ; 4,33 (H3F, Maj, m) ; 4,12 (H3C, min, s) ; 4,00 (H3C, Maj, s) ; 3,81 (H3F, min, d, J= 3,6 Hz) ; 3,00–2,84 (H4Fα et H4Fβ, Maj et min, m)
RMN ^{13}C (100,6 MHz, $CDCl_3$, ppm, mélange de deux rotamères 67/33) : δ = 156,8 (C5D) ; 156,1 (C7D) ; 155,9 (C5A) ; 154,6 (C7A) ; 154,5 (C8aA) ; 151,7 (C8aD) ; 149,5 ; 149,3 ; 148,8 ; 148,7 (C3'B, C3'E, C4'B, C4'E) ; 137,9–136,7 (CqPh) ; 132,0 ; 130,9 (C1'B, C1'E) ; 128,9–127,0 (CHPh) ; 119,5 ; 118,4 (C6'B, C6'E) ; 115,4 (C5'B and C5'E) ; 113,3 (C2'E et C2'B) ; 111,5 (C8D) ; 107,4 (C4aA) ; 102,5 (C4aD) ; 93,3 (C6D) ; 93,0 (C8A) ; 91,8 (C6A) ; 79,1 (C2F, Maj) ; 78,4 (C2F, min) ; 76,4 (C2C, Maj) ; 76,3 (C2C, min) ; 72,5–69,6 (CH2Bn, C3C, Maj et min) ; 66,7 (C3F, Maj) ; 65,4 (C3F, min) ; 36,1 (C4C, Maj) ; 35,9 (C4C, min) ; 28,9 (C4F, min) ; 28,7 (C4F,Maj)
MS (LSIMS, m/z (intensité relative %)) : 1417 (14 ; $[M+K]^+$) ; 1401 (100 ; $[M+Na]^+$) ; 712 (5)
HRMS : $[M+Na]^+$ = 1399,4234 (calculée pour $C_{86}H_{73}BrO_{12}Na$: 1399,4183)

☙ Dimère B3 **30**



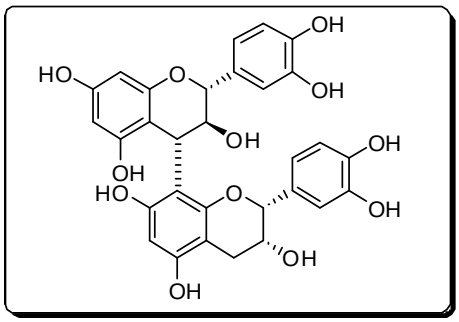
Protocole général F :

- Débenzylation et débromation

40 mg de dimère octabenzylé B3BnBr **84** (29 µmol) sont dissous dans 2 ml d'acétate d'éthyle et 2 ml de MeOH. 40 mg de catalyseur de Pearlman $Pd(OH)_2/C$ à 20% et 40 µl de triéthylamine sont alors ajoutés. La solution est agitée pendant 19 heures à température ambiante sous H_2.
Après filtration du milieu réactionnel sur célite et lavage avec de l'acétate d'éthyle, le solvant est évaporé. Après filtration très rapide sur silice (acétone/méthanol 96/4), le dimère B3 est obtenu sous forme d'un solide rosé.
Rendement : 100%

Point de fusion : 218-220°C (dec.)
IR (cm^{-1}) :3375 ; 1610 ; 1522 ; 1451 ; 1375 ; 1283 ; 1207 ; 1144 ; 1106 ; 1092 ; 1061 ; 870 ; 818 ; 780 ; 668 ; 621
RMN ^{1}H (400 MHz, H2O/10% D_2O, ppm) : δ = 6,87 (H5'B, d, 1H, $J_{5',6'B}$ = 8,2 Hz) ; 6,83 (H5'E, d, 1H, $J_{5',6'E}$ = 8,2 Hz) ; 6,80 (H2'B, d, 1H, $J_{2',6'B}$ < 1 Hz) ; 6,61 (H2'E, d, 1H, $J_{2',6'E}$ < 1Hz) ; 6,61 (H6'B, dd, 1H, $J_{6',2'B}$ < 1 Hz, $J_{6',5'B}$ = 8,2 Hz) ; 6,46 (H6'E, dd, 1H, $J_{2',6'E}$ < 1Hz, $J_{5',6'E}$ = 8,2 Hz) ; 6,15 (H6D, s, 1H) ; 6,00 (H6A, s, 1H) ; 5,71 (H8A, s, 1H) ; 4,58 (H2F, d, 1H, $J_{2,3F}$ = 7,9 Hz) ; 4,39 (H2C, d, 1H, $J_{2,3C}$ = 10,0 Hz) ; 4,36 (H4C, d, 1H, $J_{4,3C}$ = 10,5 Hz) ; 4,29 (H3C, m, 1H) ; 3,92 (H3F, m, 1H) ; 2,85 et 2,49 (H4Fα et H4Fβ, ABX, 2H, $J_{4Fα,4Fβ}$ = 15,8 Hz, $J_{4Fα,3F}$ = 5,6 Hz et $J_{4Fβ,3F}$ = 8,5 Hz)
RMN ^{13}C (100,6 MHz, H2O/10% D_2O, ppm) : δ = 156,8 (C8aA) ; 155,2 (C5A) ; 154,7 (C7A) ; 154,1 (C7D) ; 153,2 (C8aD) ; 153,0 (C5D) ; 144,7 ; 144,1 ; 144,0 et 143,9 (C4'B, C3'E, C4'E et C3'B) ; 130,8 (C1'E) ; 130,7 (C1'B) ; 120,5 (C6'B) ; 120,2 (C6'E) ; 116,4 (C5'B) ; 116,0 (C2'B) ; 115,8 (C5'E) ; 115,2 (C2'E) ; 109,3 (C8D) ; 107,3 (C4aA) ; 101,5 (C4aD) ; 96,9 (C6A) ; 95,7 (C6D) ; 95,6 (C8A) ; 82,0 (C2C) ; 80,6 (C2F) ; 72,9 (C3C) ; 67,3 (C3F) ; 37,1 (C4C) ; 27,5 (C4F)
MS (LSIMS, m/z (intensité relative %)) : 579 (15 ; $[M+H]^+$) ; 473 (13) ; 449 (22) ; 433 (14) ; 413(21) ; 329 (30) ; 306 (23) ; 289 (27) ; 284 (100) ; 247 (27)
HRMS : $[M+Na]^+$ = 601,1319 (calculée pour $C_{30}H_{26}O_{12}Na$: 601,1322)

☙ Dimère B4 **42**



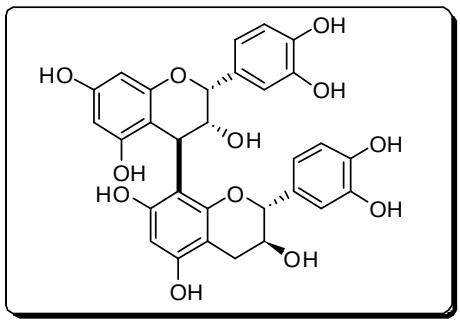
Protocole général F :

- Débenzylation et débromation

Quantité : B4BnBr **85** (40 mg, 29 µmol, 1 éq.) ; Triéthylamine (40 µl, 0,286 mmol, 10 éq.) ; $Pd(OH)_2/C$ à 20% : 40 mg, 75 µmol, 2,6 éq.
Rendement : 100% (solide beige)

Point de fusion : 177-180 °C (dec.)
IR (cm^{-1}) : 3385 ; 1617 ; 1602 ; 1522 ; 1458 ; 1450 ; 1384 ; 1283 ; 1205 ; 1145 ; 1095 ; 1062 ; 819 ; 783
RMN ^1H (400 MHz, D_2O/éthanol-d6, 88/12, ppm) : δ = 6,68 (H5'E, d, 1H, $J_{5',6'E}$ = 8,2 Hz) ; 6,63 (H5'B, d, 1H, $J_{5',6'B}$ = 8,2 Hz) ; 6,57 (H2'B, d, 1H, $J_{2',6'B}$ = 1,6 Hz) ; 6,55 (H2'E, d, 1H, $J_{2',6'E}$ = 1,8 Hz) ; 6,34 (H6'B, dd, 1H, $J_{6',5'B}$ = 8,2 Hz, $J_{6',2'B}$ = 1,6 Hz) ; 6,29 (H6'E, dd, 1H) ; 6,02 (H6D, s, 1H) ; 5,89 et 5,82 (H6A et H8A, d, 2H, $J_{6,8A}$ = 2,0 Hz) ; 4,70 (H2F, d, 1H, $J_{2,3F}$ ~ 0 Hz) ; 4,31 (H2C, d, 1H, $J_{2,3C}$ = 9,7 Hz) ; 4,28 (H4C, d, 1H, $J_{4,3C}$ = 8,5 Hz) ; 4,13 (H3C, dd, 1H, $J_{3,2C}$ = 9,7 Hz, $J_{3,4C}$= 8,5 Hz,) ; 4,00 (H3F, m, 1H) ; 2,78 et 2,55 (H4αF et H4βF, ABX, 2H, $J_{4\alpha F,4\beta F}$ = 17,2 Hz avec $J_{4\alpha F,3F}$ = 4,7 Hz et $J_{4\beta F,3F}$ < 1 Hz)
(Seuls les déplacements chimiques du dimère Majoritaire sont représentés)
RMN ^{13}C (100,6 MHz, D_2O/éthanol-d6, 88/12, ppm) : δ = 156,9 (C5A) ; 155,5 (C7A) ; 155,0 (C5D) ; 154,3 (C7D) ; 153,8 (C8aA) ; 153,5 (C8aD) ; 144,7 (C4'B) ; 144,1 (C3'B) ; 143,8 (C3'E et C4'E) ; 131,2 (C1'E) ; 130,9 (C1'B) ; 120,4 (C6'B) ; 119,8 (C6'E) ; 116,4 (C5'B) ; 116,3 (C2'B) ; 115,6 (C5'E) ; 114,8 (C2'E) ; 109,1 (C4aA) ; 107,5 (C8D) ; 100,8 (C4aD) ; 97,2 (C6A) ; 96,3 (C8A) ; 96,0 (C6D) ; 82,3 (C2C) ; 78,3 (C2F) ; 72,7 (C3C) ; 66,2 (C3F) ; 37,3 (C4C) ; 28,0 (C4F)
(Seuls les déplacements chimiques du dimère Majoritaire sont représentés)
MS (LSIMS, m/z (intensité relative %)) : 601 (4) $[M+Na]^+$; 413 (15) ; 376 (7) ; 357 (10) ; 329(58) ; 306 (19) ; 301 (16) ; 289 (13) ; 241 (53) ; 219 (100) ; 212 (33)
HRMS : $[M+Na]^+$ = 601,1324 (calculée pour $C_{30}H_{26}O_{12}Na$: 601,1322)

☙ Dimère B1 **37**



Protocole général F :

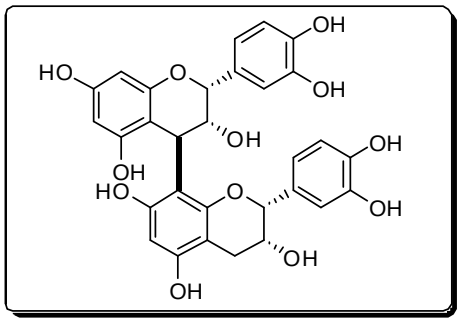
- Débenzylation et débromation

Quantité : B1BnBr **86** (60 mg, 43,5 µmol, 1 éq.) ; Triéthylamine (60 µl, 0,43 mmol, 10 éq.) ; $Pd(OH)_2/C$ à 20% : 60 mg, 113 µmol, 2,6 éq.
Rendement : 100% (solide beige)

Point de fusion : 204–205 °C (dec.).
RMN ^1H (400 MHz, H_2O/D_20 90/10, ppm, mélange de deux rotamères 95/5) : δ = 7,01 (H2'B, d, 1H, $J_{2',6'B}$=1,4 Hz) ; 6,89 (H5'B, d, 1H, $J_{5',6'B}$ = 8,2 Hz) ; 6,80 (H5'B et H6'E, m, 2H) ; 6,66 (H2'E, d, 1H, $J_{2',6'E}$ = 2,3 Hz) ; 6,56 (H6'E, d, 1H, $J_{6',2'E}$ = 2,3 Hz) ; 6,24 (H6D, s) ; 5,86 (H6, s, 1H) ; 5,37 (H8A, s, 1H) ; 5,18 (H2C, d, 1H, $J_{2C,3C}$ = 1,1 Hz) ; 4,40 (H4C, m, 1H) ; 4,01 (H3F, m, 1H) ; 3,97 (H3C, m, 1H) ; 3,92 (H2F, d, 1H, $J_{2F,3F}$ = 9,1 Hz) ; 3,07 et 2,46 (H4Fα et H4Fβ, ABX, 2H, $J_{4F\alpha,4F\beta}$ = 16,2 Hz, $J_{4F\alpha,3F}$ = 5,6 Hz , $J_{4F\beta,3F}$= 9,8 Hz)
(Seuls les déplacements chimiques du dimère majoritaire sont représentés)

RMN ^{13}C (100,6 MHz, H_2O/D_20 90/10, ppm, mélange de deux rotamères 95/5) : δ = 155,3 (C8aA) ; 154,5 (C7A) ; 154,2 (C5A) ; 153,1 (C8aD) ; 153,1 (C5D) ; 153,1 (C7D) ; 143,9 (C4'E) ; 143,8 (C3'B) ; 143,6 (C4'B) ; 143,5 (C3'E) ; 131,2 (C1'B) ; 130,0 (C1'E) ; 120,7 (C6'E) ; 119,1 (C6'B) ; 115,9 (C5'B) ; 115,5 (C5'E) ; 115,0 (C2'E) ; 114,5 (C2'B) ; 107,7 (C8D) ; 102,9 (C4aA) ; 101,7 (C4aD) ; 95,8 (C6D) ; 94,8 (C6A) ; 94,6 (C8A) ; 81,2 (C2F) ; 75,2 (C2C) ; 71,4(C3C) ; 67,4 (C3F) ; 35,5 (C4C) ; 28,8 (C4F)
(Seuls les déplacements chimiques du dimère majoritaire sont représentés)
MS (LSIMS, m/z (intensité relative %)) : 601 (2) $[M+Na]^+$; 409 (4) ; 381 (12) ; 353 (15) ; 329 (48) ; 311 (5) ; 242 (100) ; 212 (14)
HRMS : $[M+Na]^+$ = 601,1318 (calculée pour $C_{30}H_{26}O_{12}Na$: 601,1322)

☙ Dimère B2 **53**



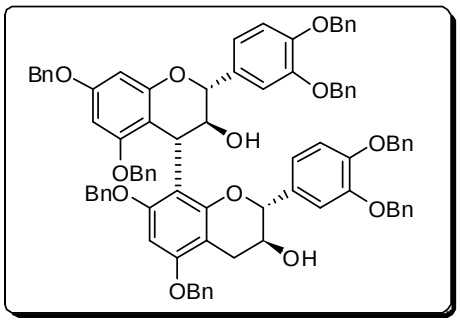
Protocole général F :

- Débenzylation et débromation

Quantité : B2BnBr **87** (60 mg, 43,5 µmol, 1 éq.) ; Triéthylamine (60 µl, 0,43 mmol, 10 éq.) ; $Pd(OH)_2/C$ à 20% : 60 mg, 113 µmol, 2,6 éq.
Rendement : 100% (solide beige)

Point de fusion : 197–198 °C (dec.)
Forme compacte (55%) : RMN ^1H (500 MHz, /D_20 90/10, 5 °C, ppm) : δ = 7,08 (H2'B, d, $J_{2'B,6'B}$ < 1 Hz) ; 6,93 (H6'B, m) ; 6,92 (H5'B et H5'E, m) ; 6,72 (H2'E,d , $J_{2'E,6'E}$ < 1 Hz) ; 6,52 (H6'E, m) ; 6,26 (H6D, s) ; 5,82 (H6A, s) ; 5,67 (H8A, s) ; 5,42 (H2C, d, $J_{2C,3C}$ = 1,1 Hz) ; 4,47 (H4C, m) ; 4,32 (H2F, d, $J_{3F,2F}$ < 1 Hz) ; 4,06 (H3C, m) ; 4,02 (H3F, m) ; 2,86 et 2,71 (H4Fα et H4Fβ, ABX, $J_{4Fα,4Fβ}$ = 16,9 Hz, $J_{3F,4Fα}$ = 4,5 Hz $J_{3F,4Fβ}$ < 1 H)
RMN ^{13}C (125,7 MHz, H_2O/D_20 90/10, 5 °C, ppm): δ = 158,0 (C7D) ; 157,7 (C8aA) ; 157,0 (C8aD) ; 156,9 (C5D) ; 156,5 (C7A) ; 156,1 (C5A) ; 146,7 (C4'B) ; 146,5 (C3'B) ; 146,0 (C4'E) ; 145,8 (C3'E) ; 134,2 (C1'E) ; 133,5 (C1'B) ; 122,2 (C6'E) ; 122,1 (C6'B) ; 118,7 (C5'B) ; 118,7 (C5'E) ; 118,0 (C2'E) ; 117,4 (C2'B) ; 110,6 (C8D) ; 105,9 (C4aA) ; 103,0 (C4aD) ; 98,6 (C6D) ; 97,8 (C8A) ; 97,7 (C6A) ; 81,3 (C2F) ; 78,1 (C2C) ; 74,6 (C3C) ; 68,4 (C3F) ; 38,7 (C4C) ; 31,1 (C4F)
Forme étendue (45 %) : RMN ^1H (500 MHz, H_2O/D_20 90/10, 5 °C, ppm) : δ = 7,14 (H2'E) ; 6,98 (H2'B) ; 6,89 (H6'E) ; 6,77 (H5'B et H5'E) ; 6,60 (H6'B) ; 6,15 (H8A, s) ; 6,12 (H6A, s) ; 6,06 (H6D, s) ; 5,20 (H2C,m) ; 4,82 (H2F, m) ; 4,67 (H4C, m) ; 4,30 (H3F, m) ; 3,98 (H3C, m) ; 2,84 et 2,76 (H4Fβ et H4Fα, m)
RMN ^{13}C (125,7 MHz, H_2O/D_20 90/10, 5 °C, ppm): δ = 158,6 (C8aD) ; 158,5 (C5A) ; 157,8 (C5D) ; 157,7 (C8aA) ; 157,2 (C7A) ; 155,9 (C7D) ; 146,8 (C4'E) ; 146,6 (C3'E) ; 146,4 (C4'B) ; 146,3 (C3'B) ; 133,8 (C1'E) ; 133,6 (C1'B) ; 121,8 (C6'B) ; 121,2 (C6'E) ; 117,7 (C5'E) ; 117,7 (C5'B) ; 117,2 (C2'B) ; 116,9 (C2'E) ; 109,7 (C8D) ; 105,0 (C4aA) ; 102,3 (C4aD) ; 99,7(C6D) ; 98,2 (C6A) ; 97,6 (C8A) ; 80,5 (C2F) ; 78,4 (C2C) ; 74,2 (C3C) ; 68,1 (C3F) ; 37,9 (C4C) ; 30,8 (C4F)
MS (LSIMS, m/z (intensité relative %)) : 601 (18 ; $[M+Na]^+$) ; 578 (100, $[M]^{+\cdot}$) ; 426 (17) ; 408 (11) ; 290 (15).
HRMS : $[M+Na]^+$ = 601,1317 (calculée pour $C_{30}H_{26}O_{12}Na$: 601,1322)

☙ Dimère B3Bn **73**



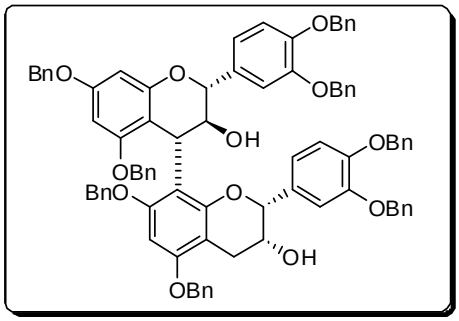
Protocole général *G* :

- Débromation de la position 8

600 mg de dimère B3BnBr8 **84** (0,44 mmol) sont dissous dans 5 ml de THF. La solution est placée à -78°C et 0,69 ml de *n*-BuLi (3,3 éq., 1,44 mmol), 2,1 M dans l'hexane, sont ajoutés goutte à goutte. L'agitation est maintenue à -78°C pendant 30 minutes puis 78 µl d'eau (10 éq., 4,4 mmol) sont alors additionnés. Le milieu réactionnel est laissé revenir à température ambiante et l'agitation magnétique est poursuivie pendant 3 heures. Le milieu réactionnel est dilué dans de l'eau et dans une solution saturée en NaCl puis il est extrait avec du dichlorométhane. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$. Après filtration et évaporation du solvant, le dimère B3Bn **73** est obtenu sous forme d'un solide beige.
Rendement : 97%

Point de fusion : 68-70 °C
IR (cm^{-1}) : 3582 ; 3062 ; 3030 ; 2930 ; 1606 ; 1589 ; 1511 ; 1497 ; 1454 ; 1425 ; 1378 ; 1264 ; 1215 ; 1112 ; 1027 ; 736 ; 696
RMN ^1H (300 MHz, $CDCl_3$, ppm, mélange de deux rotamères 70/30) : δ = 7,52-7,26 ($H_{aromatiques}$, m) ; 7,03-6,82 (H2'B, H2'E, H5'B, H5'E, H6'B, H6'E, Maj et H2'B, H5'B, H6'B, min) ; 6,73 (H5'E, min, d, $J_{5',6'Emin}$ = 8,3 Hz) ; 6,62 (H2'E, min, d, $J_{2'6'Emin}$ = 1,6 Hz) ; 6,47 (H6'E, min, dd, $J_{6',5'Emin}$ = 8,3 Hz, $J_{2'6'Emin}$ = 1,6 Hz) ; 6,26 (H6D, Maj, s) ; 6,22 et 6,02 (H6A et H8A min, d, $J_{6,8Amin}$ = 2,1 Hz) ; 6,19 et 6,12 (H6A et H8A, Maj, d, $J_{6,8AMaj}$ = 2,3 Hz) ; 6,11 (H6D, min, s) ; 5,22-4,53 (CH2Bn, min et Maj, m) ; 4,79 (H4C, min, d, $J_{4,3Cmin}$ = 8,7 Hz) ; 4,68 (H4C, Maj, d, $J_{4,3CMaj}$ = 8,9 Hz) ; 4,51 (H2C, min et Maj, d, $J_{2,3Cmin}$ = $J_{2,3CMaj}$ = 9,7 Hz) ; 4,47 (H2F, min, d, $J_{2,3Fmin}$ = 8,4 Hz) ; 4,31 (H3C, Maj, m) ; 4,19 (H3C, min, m) ; 3,68 (H3F, min et Maj, m) ; 3,60 (H2F, Maj, d, $J_{2,3FMaj}$ = 8,5 Hz) ; 3,19 et 2,66 (H4Fα et H4Fβ, min, ABX, $J_{4Fα4Fβmin}$ = 16,3 Hz avec $J_{4Fα3Fmin}$ = 5,8 Hz et $J_{4Fβ3Fmin}$ =9,5 Hz) ; 3,07 et 2,40 (H4Fα et H4Fβ, Maj, ABX, $J_{4Fα4Fβ\ Maj}$ = 16,2 Hz avec $J_{4Fα3FMaj}$ = 5,7 Hz et $J_{4Fβ3FMaj}$ =9,3 Hz)
RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, ppm, mélange de deux rotamères 70/30) : δ = 158,4 ; 158,2 (C7A, min et Maj, C5A, Maj) ; 158,0 (C5A, min) ; 157,4 (C8aA, Maj) ; 157,2 (C8aA, min) ; 156,0 (C5D ou C8aD, min et Maj) ; 155,9 (C7D, Maj) ; 155,9 (C7D, min) ; 154,3 (C8aD ou C5D, Maj) ; 153,3 (C8aD ou C5D, min) ; 149,6-149,0 (C3'B, C3'E, C4'B, C4'E, min et Maj) ; 138,1-137,1 (CqBn, min et Maj) ; 132,4 (C1'B, min) ; 132,2 (C1'B, Maj) ; 132,1 (C1'E, Maj) ; 131,0 (C1'E, min) ; 130,4-128,9 (CHBn, min et Maj) ; 121,7 et 120,5 (C6'B et C6'E, Maj) ; 121,2 et 121,1 (C6'B et C6'E, min) ; 115,5 et 114,9 (C5'B et C5'E, min) ; 115,3 et 115,2 (C5'B et C5'E, Maj) ; 114,5 et 114,2 (C2'B et C2'E, min) ; 114,1 et 114,0 (C2'B et C2'E, Maj) ; 112,5 (C8D, min) ; 112,4 (C8D, Maj) ; 109,1 (C4aA, Maj); 108,9 (C4aA, min) ; 103,7 (C4aD, min) ; 102,9 (C4aD, Maj) ; 95,3 (C8A, min) ; 95,2 (C8A, Maj) ; 94,5 (C6A, min et Maj) ; 92,2 (C6D, min) ; 91,9 (C6D, Maj) ; 82,5 (C2C, Maj) ; 82,2 (C2C, min) ; 81,7 (C2F, min) ; 81,0 (C2F, Maj) ; 73,8 (C3C, min) ; 73,7 (C3C, Maj) ; 71,7-70,3 (CH2Bn, min et Maj) ; 68,9 (C3F, min) ; 68,8 (C3F, Maj) ; 37,7 (C4C, min) ; 37,7 (C4C, Maj) ; 28,6 (C4F, min) ; 28,5 (C4F, Maj)
MS (LSIMS, m/z (intensité relative %)) : 1320 (26 ; $[M+Na]^+$) ; 1298 (47 ; $[M]^{+\bullet}$) ; 967 (19) ; 859 (14) ; 649 (37) ; 317 (100) ; 306 (21) ; 211 (32)
HRMS : $[M+H]^+$ = 1299,5215 (calculée pour $C_{86}H_{75}O_{12}$: 1299,5259)

☙ Dimère B4Bn **67**



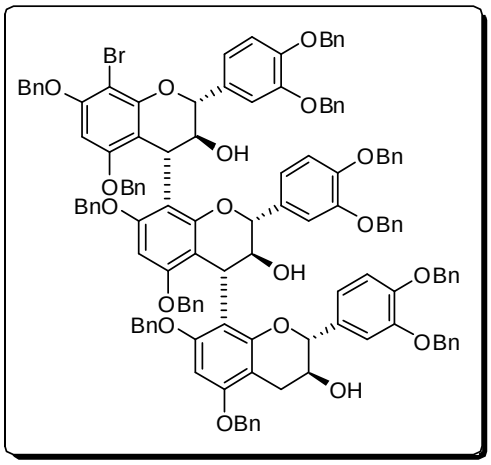
Protocole général G :

- Débromation de la position 8

Quantité : B4BnBr **85** : 200 mg, 0,15 mmol ; *n*BuLi : 0,19 ml, 0,48 mmol, 3,3 éq. ; H_2O : 26 µl, 1,5 mmol, 10 éq. ; THF : 3 ml
Rendement : 98%

Point de fusion : 61-62 °C
IR (cm^{-1}) : 1606 ; 1589 ; 1511 ; 1497 ; 1453 ; 1378 ; 1265 ; 1108 ; 1026 ; 736 ; 696
RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 7,52-7,10 ($H_{aromatiques}$, m, 40H) ; 7,23-6,76 (H2'B,H5'B, H6'B, H2'E, H5'E, H6'E, m, 6H) ; 6,25 (H6D, s, 1H) ; 6,22 et 6,14 (H6A et H8A, d,2H, $J_{6,8A}$ = 2,3 Hz) ; 5,30-4,45 (CH_2Bn, m, 16H) ; 4,82 (H4C, d, 1H, $J_{4,3C}$ = 9,0 Hz) ; 4,56(H2C, d, 1H, $J_{2,3C}$ = 9,8 Hz) ; 4,31 (H3C, m, 1H) ; 3,91 (H3F, m, 1H) ; 3,79 (H2F, s, 1H) ;2,91 et 2,62 (H4Fα et H4Fβ, ABX, 2H, $J_{4Fα,4Fβ}$ = 17,0 Hz avec $J_{4Fα,3F}$ = 4,3 Hz et $J_{4Fβ,3F}$ < 1 Hz)
(Seuls les déplacements chimiques du dimère majoritaire sont représentés)
RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 158,4, 158,2, 157,3, 156,5, 155,9, 154,1 (C5A, C5D, C7A, C7D, C8aD, C8aA) ; 149,6, 149,5, 149,4, 148,7 (C3'B, C3'E, C4'B,C4'E) ; 138,1-137,1 (CqBn) ; 132,6 (C1'E) ; 132,3 (C1'B) ; 129,0-127,0 (CHBn) ;121,8 (C6'B) ; 119,2 (C6'E) ; 115,6, 115,3 (C5'B, C5'E) ; 114,17 (C2'B) ; 113,5 (C2'E) ;112,5 (C8D) ; 109,3 (C4aA) ; 101,3 (C4aD) ; 95,3 (C8A) ; 94,6 (C6A) ; 92,0 (C6D) ;82,6 (C2C) ; 78,8 (C2F) ; 73,6 (C3C) ; 72,3-70,0 (CH2Bn) ; 66,4 (C3F) ; 37,5 (C4C) ; 28,8 (C4F)
(Seuls les déplacements chimiques du dimère majoritaire sont représentés)
SM (LSIMS, m/z (intensité relative %)) : 1320 (42 ; $[M+Na]^+$) ; 1298 (12 ; $[M]^{+\bullet}$); 967 (12) ; 859 (22) ; 649 (25) ; 317 (100) ; 306 (14) ; 211 (50)
SMHR : $[M+H]^+$ = 1321, 5197 (calculée pour $C_{86}H_{75}O_{12}$: 1299,5259)

☙ Trimère C2BnBr **89**



Protocole général D :

- Couplage cationique catalysé avec $TiCl_4$

Quantité : B3Bn **73**: 202 mg, 0,155 mmol ; Catéchine benzylée activée bromée **59d**: 0,147 mg, 0,187 mmol, 1,2 éq. ; $TiCl_4$: 0,31 ml, 0,31 mmol, 2 éq. ; THF : 3 ml ; dichlorométhane : 3 ml
Purification : Chromatographie sur gel de silice, pentane/acétate d'éthyle 80/20.
Rendement : 73%

Point de fusion : 76-79 °C
IR (cm-1) : 3447 ; 3029 ; 2865 ; 1600 ; 1509 ; 1454 ; 1420 ; 1382 ; 1339 ; 1263 ; 1214 ; 1174 ; 1114 ; 1026 ; 909 ; 849 ; 808 ; 734 ; 696
RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$, ppm,) : δ = 7,51-6,98 ($H_{aromatiques}$Bn, m, 60H) ; 6,98-6,62 (H2'B, H5'B, H6'B, H2'E, H5'E, H6'E, H2'H, H5'H, H6'H, m, 11H) ; 6,19 (H6D, s, 1H) ; 6,17 (H6A, s, 1H) ; 6,10 (H6G, s, 1H) ; 5,28-4,32 (CH_2Bn, m, 24H) ; 4,58 (H4C, d, 1H, $J_{4,3C}$ = 9,4 Hz) ; 4,47 (H2C, d, 1H, $J_{2,3C}$ = 9,8 Hz) ; 4,27 (H4F, d, 1H, $J_{4,3F}$ = 9,0 Hz) ; 3,98-3,84 (H3F et H3C, m, 2H) ; 3,76 (H3I, m, 1H) ; 3,62

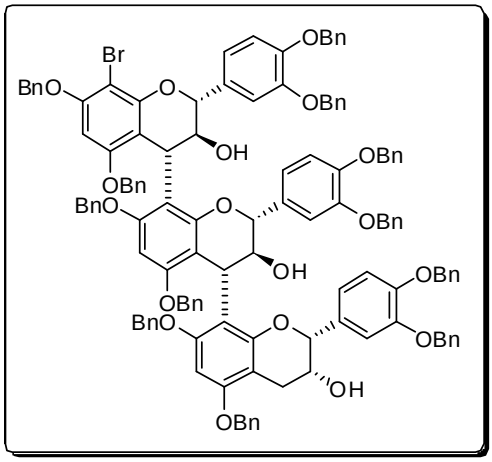
(H2I, d, 1H, $J_{2,3I}$ = 9,0 Hz) ; 3,11 et 2,36 (H4Iα et H4Iβ, ABX, 2H, $J_{4Iα,4Iβ}$ = 16,2 Hz, $J_{4Iα,3I}$ = 5,8 Hz et $J_{4Iβ,3I}$ = 9,8 Hz) ; 2,99 (H2F, d, 1H, $J_{2,3F}$ = 9,8 Hz)

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 156,8 (*C*5A) ; 155,9 (*C*5D) ; 155,8 (*C*8aD) ; 155,6 et 155,6 (*C*7G, *C*5G) ; 155,2 (*C*7D) ; 154,4 (*C*7A) ; 154,2 (*C*8aG) ; 153,6 (*C*8aA) ; 149,7-148,9 (*C*3'B, *C*3'E, *C*3'H, *C*4'B, *C*4'E, *C*4'H) ; 138,0-136,0 (*Cq*Bn) ; 132,8 (*C*1'E) ; 132,5 (*C*1'B) ; 132,2 (*C*1'H) ; 129,3-126,9 (*CH*Bn) ; 121,3 (*C*6'B) ; 121,2 (*C*6'H) ; 121,1 (*C*6'E) ; 115,4 ; 115,1 ; 114,9 ; 114,5 ; 114,4 et 113,9 (*C*2'B, *C*2'E, *C*2'H, *C*5'B, *C*5'E, *C*5'H) ; 112,8 (*C*8G) ; 112,2 (*C*8D) ; 111,2 (*C*4aA) ; 109,7 (*C*4aD) ; 102,9 (*C*4aG) ; 101,5 (*C*8A) ; 93,4 (*C*6A) ; 92,4 (*C*6G) ; 91,9 (*C*6D) ; 82,2 (*C*2C) ; 81,5 (*C*2I) ; 80,8 (*C*2F) ; 73,5 (*C*3F) ; 73,2 (*C*3C) ; 71,9-70,1 (CH_2Bn) ; 68,9 (*C*3I) ; 37,9 (*C*4C, *C*4F) ; 30,1 (*C*4I)

MS (LSIMS, m/z (intensité relative %)) : 2050 (42 ; $[M+Na]^+$) ; 1587 (10) ; 739 (15) ; 407 (13) ; 317 (33) ; 301(20) ; 211 (100)

HRMS : $[M+Na]^+$ = 2047,6702 (calculée pour $C_{129}H_{109}BrO_{18}Na$: 2047,6695)

- Trimère CatCatEpiBnBr **90**



Protocole général D :

- Couplage cationique catalysé avec $TiCl_4$

Quantité : B4Bn **67**: 201 mg, 0,155 mmol ; Catéchine benzylée activée bromée **59d** : 0,147 mg, 0,186 mmol, 1,2 éq. ; $TiCl_4$: 0,31 ml, 0,31 mmol, 2 éq. ; THF : 3 ml ; dichlorométhane : 3 ml

Purification : Chromatographie sur gel de silice, pentane/acétate d'éthyle 80/20.

Rendement : 38%

Point de fusion : 80-82 °C

IR (cm^{-1}) : 3447 ; 3029 ; 2926 ; 1599 ; 1508 ; 1498 ; 1453 ; 1420 ; 1383 ; 1264 ; 1215 ; 1172 ; 1113 ; 1026 ; 909 ; 850 ; 734 ; 696 ; 620

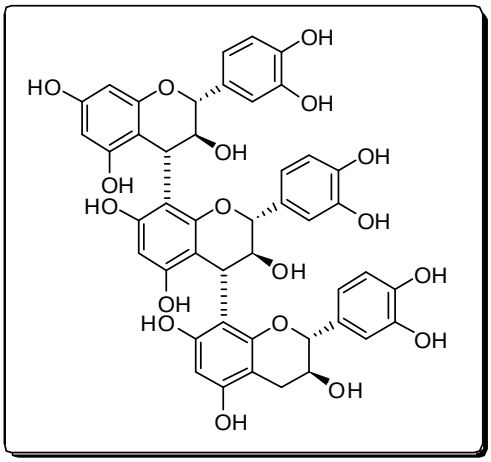
RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 7,40-6,61 ($H_{aromatiques}$Bn, m, 60H) ; 7,06-6,91 (H2'B, H5'B, H6'B, H2'E, H5'E, H6'E, H2'H, H5'H, H6'H, m, 9H) ; 6,20 (H6D, s, 1H) ; 6,19 (H6A, s, 1H) ; 6,11 (H8A, d, 1H, $J_{8,6A}$ = 2,6 Hz) ; 6,09 (H6G, s, 1H) ; 5,09-4,28 (CH_2Bn, m, 24H) ; 4,58 (H4C, d, 1H, $J_{4,3C}$ = 9,5 Hz) ; 4,49 (H2C, d, 1H, $J_{2,3C}$ = 10,3 Hz) ; 4,31 (H4F, d, 1H, $J_{4,3F}$ = 8,8 Hz) ; 4,23 (H3F et H3C, m, 2H) ; 3,88 (H3I, m, 1H) ; 3,78 (H2I, d, 1H, $J_{2,3I}$ = 8,9 Hz) ; 2,99 et 2,25 (H4Iα et H4Iβ, ABX, 2H, $J_{4Iα,4Iβ}$ = 16,1 Hz, $J_{4Iα,3I}$ = 5,8 Hz et $J_{4Iβ,3I}$ = 9,8 Hz) ; 2,85 (H2F, d, 1H, $J_{2,3F}$ = 9,6 Hz)

RMN ^{13}C (100,6 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 158,4 (*C*5A) ; 158,2 (*C*7A) ; 157,1 (*C*8aA) ; 155,9 (*C*5G) ; 155,8 (*C*7D) ; 155,6 (*C*7G) ; 155,5 (*C*5D) ; 155,4 (*C*8aD) ; 154,2 (*C*8aG) ; 149,6 ; 149,6 ; 149,5 ; 149,2 et 149,0 (*C*3'B, *C*3'E, *C*3'H, *C*4'B, *C*4'E, *C*4'H) ; 138,1-136,4 (*Cq*Bn) ; 132,8 (*C*1'B) ; 132,8 (*C*1'E) ; 132,1 (*C*1'H) ; 128,9-127,3 (*CH*Bn) ; 121,5 (*C*6'B) ; 121,1 (*C*6'H) ; 121,0 (*C*6'E) ; 115,5 ; 115,3 ; 115,0 ; 114,6 et 114,1 (*C*2'B, *C*2'E, *C*2'H, *C*5'B, *C*5'E, *C*5'H) ; 112,8 (*C*8D, *C*8G) ; 109,8 (*C*4aD) ; 109,2 (*C*4aA) ; 102,9 (*C*4aG) ; 95,1 (*C*8A) ; 94,2 (*C*6A) ; 92,5 (*C*6G) ; 92,2 (*C*6D) ; 82,2 (*C*2C) ; 81,4 (*C*2I) ; 80,8 (*C*2F) ; 73,5 (*C*3C) ; 73,4 (*C*3F) ; 71,8-70,2 (CH_2Bn) ; 68,8 (*C*3I) ; 38,0 (*C*4F) ; 37,9 (*C*4C) ; 28,8 (*C*4I)

MS (LSIMS, m/z (intensité relative %)) : 1971 (5 ; $[M+Na]^+$) ; 1948 (9 ; $[M]^{+\bullet}$) ; 650 (22) ; 359 (8) ; 329 (13) ; 317(21) ; 307 (15) ; 289 (11) ; 219 (18) ; 211 (25) ; 181 (100) ; 176 (41) (100) ; 176 (41)

HRMS : $[M]^{+\bullet}$= 1946,7621 (calculée pour $C_{129}H_{110}O_{18}$: 1946,7692)

☙ Trimère C2 **32**



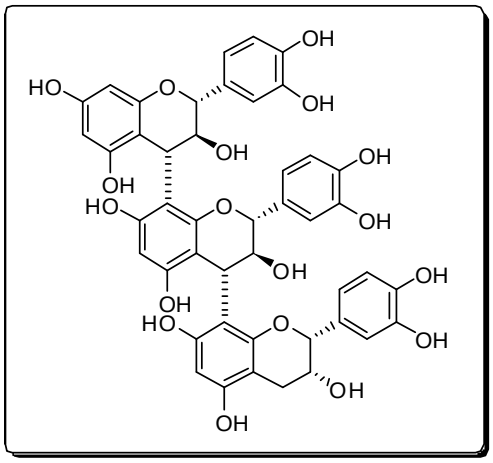
Protocole général F :

- Débenzylation et débromation

Quantité : C2BnBr **89** (101 mg, 52 µmol, 1 éq.) ; Triéthylamine (106 µl, 0,78 mmol, 15 éq.) ; $Pd(OH)_2/C$ à 20% : 187 mg, 351 µmol, 6,75 éq.
Rendement : 100% (solide beige)

Point de fusion : 174-176 °C (dec.)
IR (cm^{-1}) : 3385 ; 1610 ; 1522 ; 1458 ; 1446 ; 1384 ; 1284 ; 1208 ; 1147 ; 1074 ; 818
RMN ^1H (800 MHz, H_2O/10% D_2O, ppm) : δ = 6,84 (H5'E, d, 1H, $J_{5',6'E}$ = 7,8 Hz) ; 6,70 (H5'B, d, 1H, $J_{6',5'B}$ = 8,0 Hz) ; 6,70 (H2'E, d, 1H, $J_{2,'6'E}$ < 1 Hz) ; 6,69 (H6'E, dd, 1H, $J_{6',5'E}$ = 7,8 Hz, $J_{6,'2'E}$ < 1 Hz) ; 6,54 (H2'B, d, 1H, $J_{2',6'B}$ < 1 Hz) ; 6,52 (H5'H, d, 1H, $J_{5',6'H}$ = 8,3 Hz) ; 6,33 (H2'H, d, 1H, $J_{2',6'H}$ < 1 Hz) ; 6,14 (H6'B, dd, 1H, $J_{6',5'B}$ = 8,0 Hz et $J_{2',6'B}$ < 1 Hz) ; 6,04 (H6D, s, 1H) ; 5,96 (H6G, s, 1H) ; 5,77 (H6'H, dd, 1H, $J_{6',5'H}$ = 8,3 Hz, $J_{6',2'H}$ < 1 Hz) ; 5,69 et 5,57 (H6A et H8A, d, 2H, $J_{6,8A}$ = 1,8 Hz) ; 4,85 (H2I, d, 1H, $J_{2,3I}$ < 1Hz) ; 4,34 (H2F, d, 1H, $J_{2,3F}$ = 8,9 Hz) ; 4,33 (H4F, d, 1H, $J_{4,3F}$ = 7,1 Hz) ; 4,31 (H3I, m, 1H) ; 4,20 (H3F, m, 1H) ; 4,14 (H2C, d, 1H, $J_{2,3C}$ = 8,9 Hz) ; 4,05 (H4C, d, 1H, $J_{4,3C}$ = 7,4 Hz) ; 4,00 (H3C, m, 1H) ; 2,37 et 2,02 (H4Iα et H4Iβ, ABX, 2H, $J_{4I\alpha,4I\beta}$ = 16,8 Hz, $J_{4I\alpha,3I}$ < 2 Hz et $J_{4I\beta,3I}$ =4,1 Hz)
(Seuls les déplacements chimiques du trimère Majoritaire sont représentés)
RMN ^{13}C (201 MHz, H_2O/10% D_2O, ppm) : δ = 156,6 (C5A ou C8aA) ; 155,8 (C8aD) ; 154,7 (C8aA ou C5A) ; 154,3 (C7A) ; 153,6 (C5D) ; 153,3 (C7G et C7D) ; 153,1 (C5G) ; 151,2 (C8aG) ; 144,4 ; 144,1 ; 143,7 ; 143,6 ; 143,50 et 142,9 (C3'B, C3'E, C3'H, C4'B, C4'E, C4'H) ; 131,6 (C1'H) ; 131,3 (C1'E) ; 130,5 (C1'B) ; 120,7 (C6'E) ; 119,8 (C6'B) ; 117,4 (C6'H) ; 116,2 et 116,2 (C2'B, C5'B) ; 115,6 ; 115,6 et 115,5 (C2'E, C5'E, C5'H) ; 112,6 (C2'H) ; 108,6 (C8D) ; 108,3 (C8G) ; 108,1 (C4aD) ; 107,4 (C4aA) ; 99,2 (C4aG) ; 96,6 (C8A ou C6A) ; 96,5 (C6D) ; 95,2 (C6A ou C8A) ; 95,0 (C6G) ; 81,9 (C2C) ; 81,6 (C2F) ; 77,8 (C2I) ; 73,2 et 73,1 (C3C, C3F) ; 64,9 (C3I) ; 37,2 (C4F) ; 36,6 (C4C) ; 21,7 (C4I)
(Seuls les déplacements chimiques du trimère Majoritaire sont représentés)
MS (LSIMS, m/z (intensité relative %)) : 889 (14 ; $[M+Na]^+$) ; 737 (14) ; 689 (15) ; 633 (20) ; 601 (26) ; 585 (55) ; 569 (41) ; 541 (36) ; 491 (37) ; 481 (100) ; 465 (74) ; 449 (72)
HRMS : $[M+Na]^+$ = 889, 1935 (calculée pour $C_{45}H_{38}O_{18}Na$: 889,1956)

☙ Trimère CatCatEpi **88**



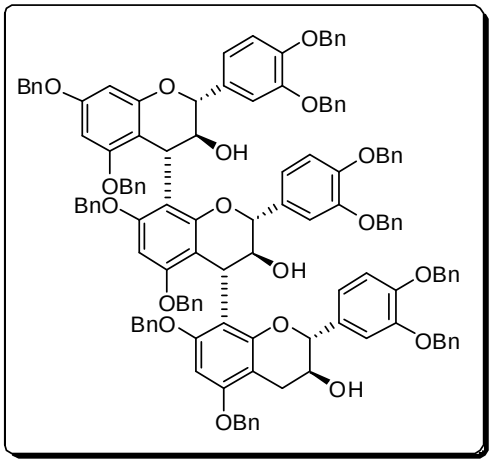
Protocole général F :

- Débenzylation et débromation

Quantité : CatCatEpiBnBr **90** (32 mg, 16 µmol, 1 éq.) ; Triéthylamine (33,41 µl, 240 mmol, 15 éq.) ; $Pd(OH)_2/C$ à 20% : 60 mg, 113 µmol, 7 éq.
Rendement : 100% (solide beige)

Point de fusion : 190-192 °C (dec.)
IR (cm^{-1}) : 3385 ; 2926 ; 1654 ; 1618 ; 1610 ; 1522 ; 1458 ; 1449 ; 1385 ; 1284 ; 1197 ; 1145 ; 1071 ; 818
RMN ^{1}H (400 MHz, H_2O/10% D_2O, ppm) : δ = 6,98 (H2'H, d, 1H, $J_{2',6'H}$ < 2 Hz) ; 6,81-6,74 (H5'E, H6'H, m, 2H) ; 6,68 (H5'B et H5'H, m, 2H) ; 6,62 (H2'E, d, 1H, $J_{2',6'E}$ < 2 Hz) ; 6,59 (H6'E, dd, 1H, $J_{5',6'E}$ = 8,0 Hz et $J_{2',6'E}$ < 2 Hz) ; 6,53 (H2'B, d, 1H, $J_{2',6'B}$ <2 Hz) ; 6,18 (H6'B, dd, 1H, $J_{5',6'B}$ = = 8,2 Hz, $J_{2',6'B}$ <2 Hz) ; 5,90 (H6A ou H8A, d, 1H, $J_{6,8A}$ < 2 Hz) ; 5,87 (H6G, s, 1H) ; 5,83 (H6D, s, 1H) ; 5,67 (H8A ou H6A, d, 1H, $J_{6,8A}$ < 2 Hz) ; 4,84 (H2I, d, 1H, $J_{2,3I}$ < 2 Hz) ; 4,47 (H4F, d, 1H, $J_{4,3F}$ = 7,9 Hz) ; 4,27 (H2F, d, 1H, $J_{2,3F}$ = 9,9 Hz) ; 4,21 (H2C, d, 1H, $J_{2,3C}$ = 10,0 Hz) ; 4,17 (H3I, m, 1H) ; 4,16 (H4C, d, 1H, $J_{4,3C}$ = 9,0 Hz) ; 4,06 (H3F, m, 1H) ; 3,95 (H3C, m, 1H) ; 2,79 et 2,64 (H4Iα et H4Iβ, ABX, 2H, $J_{4I\alpha,4I\beta}$ = 17,0 Hz, $J_{4I\alpha,3I}$ = 4,4 Hz et $J_{4I\beta,3I}$< 2 Hz)
(Seuls les déplacements chimiques du trimère Majoritaire sont représentés)
RMN ^{13}C (100,6 MHz, H_2O/10% D_2O, ppm) : δ = 156,9 (C5A ou C8aA) ; 155,6 (C8aD) ; 155,5 (C8aA ou C5A) ; 154,7 (C7A) ; 153,9 (C8aG, C7D) ; 153,7 (C5G) ; 153,3 (C5D) ; 152,9 (C7G) ; 144,7 ; 144,5 ; 144,2 ; 144,1 ; 143,9 ; 143,7 (C3'B, C3'E, C3'H, C4'B, C4'E, C4'H) ; 131,8 (C1'H) ; 131,1 (C1'E) ; 130,9 (C1'B) ; 121,8 (C6'E) ; 120,2 (C6'B) ; 118,8 (C6'H) ; 117,4 ; 116,6 ; 116,5 (C2'B, C5'B, C5'H) ; 115,9 ; 115,8 (C2'E, C5'E) ; 114,4 (C2'H) ; 110,5 (C8G) ; 109,7 (C8D) ; 108,1 (C4aD) ; 107,7 (C4aA) ; 99,6 (C4aG) ; 97,8 (C6G) ; 97,1 (C6D) ; 96,9 (C8A ou C6A) ; 95,6 (C6A ou C8A) ; 81,8 (C2C, C2F) ; 78,1 (C2I) ; 73,7 (C3F) ; 73,3 (C3C) ; 66,0 (C3I) ; 37,5 (C4F) ; 37,2 (C4C) ; 28,1 (C4I)
(Seuls les déplacements chimiques du trimère Majoritaire sont représentés)
MS (LSIMS, m/z (intensité relative %)) 889 (14 ; $[M+Na]^+$) ; 663 (30) ; 647 (34) ; 619 (24) ; 607 (21) ; 591 (25); 575 (27) ; 559 (31) ; 547 (67) ; 531 (68) ; 525 (89) ; 519 (61) ; 503 (57) ; 497 (100) ; 481(63) ; 459 (50)
HRMS : $[M+Na]^+$ = 889,1997 (calculée pour $C_{45}H_{38}O_{18}Na$: 889,1956)

☙ Trimère C2Bn **92**



Protocole général G :

- Débromation de la position 8

Quantité : C2BnBr **89** : 120 mg, 59 µmol ; *n*BuLi : 0,12 ml, 0,26 mmol, 4,44 éq. ; H_2O : 11 µl, 0,59 mmol, 10éq. ; THF : 4 ml
Rendement : 97%

Point de fusion : 70-72 °C
IR (cm-1) : 3448 ; 3030 ; 2925 ; 1596 ; 1508 ; 1498 ; 1453 ; 1424 ; 1383 ; 1264 ; 1215 ; 1107 ;1026 ; 809 ; 734 ; 696 ; 619

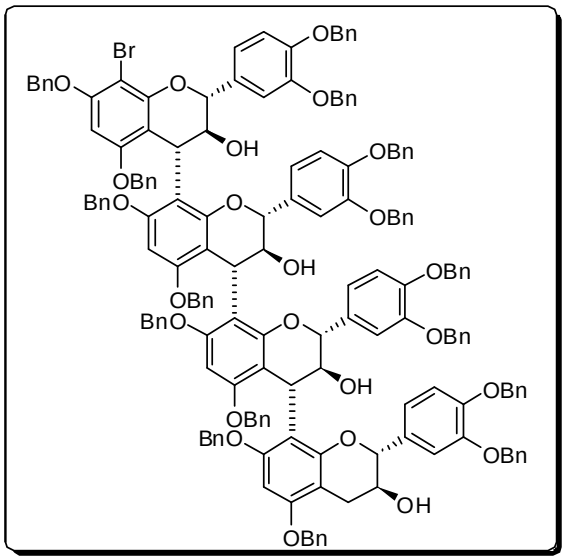
RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, ppm,) : δ = 7,40-6,61 ($H_{aromatiques}$, m, 60H) ; 7,06-6,91 (H2'B,H5'B, H6'B, H2'E, H5'E, H6'E, H2'H, H5'H, H6'H, m, 9H) ; 6,20 (H6D, s, 1H) ; 6,19 (H6A, s,1H) ; 6,11 (H8A, d, 1H, $J_{8,6A}$ = 2,6 Hz) ; 6,09 (H6G, s, 1H) ; 5,09-4,28 (CH_2Bn, m, 24H) ;4,58 (H4C, d, 1H, $J_{4,3C}$ = 9,5 Hz) ; 4,49 (H2C, d, 1H, $J_{2,3C}$ = 10,3 Hz) ; 4,31 (H4F, d, 1H, $J_{4,3F}$ =8,8 Hz) ; 4,23 (H3F et H3C, m, 2H) ; 3,88 (H3I, m, 1H) ; 3,78 (H2I, d, 1H, $J_{2,3I}$ = 8,9 Hz) ;2,99 et 2,25 (H4Iα et H4Iβ, ABX, 2H, $J_{4Iα,4Iβ}$ = 16,1 Hz, $J_{4Iα,3I}$ = 5,8 Hz et $J_{4Iβ,3I}$ = 9,8 Hz) ; 2,85 (H2F, d, 1H, $J_{2,3F}$ = 9,6 Hz)

RMN ^{13}C (100,6 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 158,4 (C5A) ; 158,22 (C7A) ; 157,1 (C8aA) ;155,9 (C5G) ; 155,8 (C7D) ; 155,6 (C7G) ; 155,5 (C5D) ; 155,4 (C8aD) ; 154,2 (C8aG) ; 149,6, 149,6, 149,5, 149,2, 149,0 (C3'B, C3'E, C3'H, C4'B, C4'E, C4'H) ; 138,1-136,4 (CqBn) ; 132,8 (C1'B) ; 132,8 (C1'E) ; 132,1 (C1'H) ; 128,9-127,3 (CHBn) ; 121,5 (C6'B) ; 121,1 (C6'H) ; 121,0 (C6'E) ; 115,5, 115,3, 115,0, 114,5, 114,1 (C2'B, C2'E, C2'H, C5'B, C5'E, C5'H) ; 112,8 (C8D, C8G) ; 109,8 (C4aD) ; 109,2 (C4aA) ; 102,8 (C4aG) ; 95,1 (C8A) ; 94,2 (C6A) ; 92,4 (C6G) ; 92,2 (C6D) ; 82,2 (C2C) ; 81,4 (C2I) ; 80,8 (C2F) ; 73,5 (C3C) ; 73,4 (C3F) ; 71,7-70,2 (CH2Bn) ; 68,8 (C3I) ; 38,0 (C4F) ; 37,9 (C4C) ; 28,9 (C4I)

MS (LSIMS, m/z (intensité relative %)) : 1972 (5 ; $[M+Na]^+$) ; 1948 (9) $[M]^{+\bullet}$); 650 (22) ; 359 (8) ; 329 (13) ; 317(21) ; 307 (15) ; 289 (11) ; 219 (18) ; 211 (25) ; 181 (100) ; 176 (41)

HRMS : $[M+Na]^+$ = 1946,7621 (calculée pour $C_{129}H_{110}O_{18}Na$: 1946,7692)

☙ Tétramère CatCatCatCatBnBr **93**



Protocole général D :

- Couplage cationique catalysé avec $TiCl_4$

Quantité : C2Bn **92**: 216 mg, 0,17 mmol ; CatBnActBr **69**: 287 mg, 0,2 mmol, 1,2 éq. ; $TiCl_4$: 0,33 ml, 0,33 mmol, 2 éq. ; THF : 3 ml ; dichlorométhane : 3 ml

Purification : Chromatographie sur gel de silice, pentane/acétate d'éthyle 80/20.

Rendement : 42%

Point de fusion : 67-69 °C

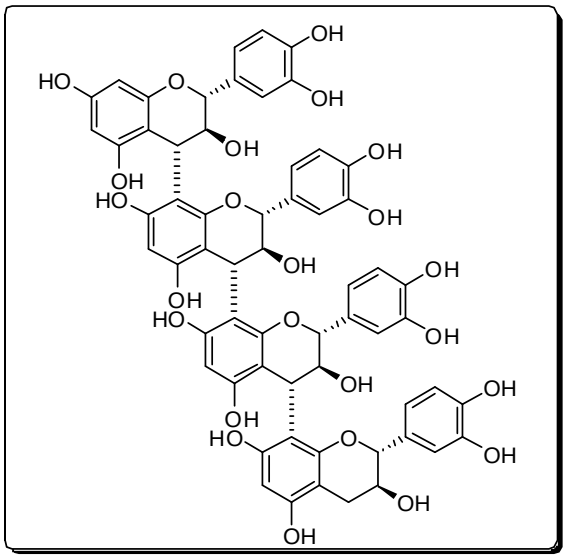
IR (cm^{-1}) : 3438 ; 3059 ; 3030 ; 2925 ; 2857 ; 1599 ; 1508 ; 1498 ; 1454 ; 1424 ; 1383 ; 1264 ; 1216 ; 1108 ; 1026 ; 910 ; 849 ; 809 ; 735 ; 696 ; 668 ; 620

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 7,50-6,50 ($H_{aromatiques}$Bn, m, 80H) ; 7,10-6,60 (H2'B, H5'B, H6'B, H2'E, H5'E, H6'E, H2'H, H5'H, H6'H, H2'K, H5'K, H6'K, m, 12H) ; 6,23 (H6D, s, 1H) ; 6,18 (H6A, s, 1H) ; 6,09 (H6J, s, 1H) ; 6,05 (H6G, s, 1H) ; 5,28-4,33 (CH2Bn, m, 32H) ; 4,56 (H4C, d, 1H, $J_{4,3C}$ = 9,0 Hz) ; 4,47 (H2C, d, 1H, $J_{2,3C}$ = 9,0 Hz) ; 4,30 (H4I, d, 1H, $J_{4,3I}$ = 8,8 Hz) ; 4,17 (H4F, d, 1H, $J_{4,3F}$ = 8,9 Hz) ; 4,11 (H3I, m, 1H) ; 3,88 (H3C, m, 1H) ; 3,78 (H3L, m, 1H) ; 3,68 (H3F, m, 1H) ; 3,65 (H2L, d, 1H, $J_{2,3L}$ = 8,9 Hz) ; 3,12 (H2I, d, 1H, $J_{2,3I}$ = 9,8 Hz) ; 2,85 (H2F, d, 1H, $J_{2,3F}$ = 9,7 Hz) ; 3,10 et 2,36 (H4Lα et H4Lβ, ABX, 2H, $J_{4Lα4Lβ}$ = 16,0 Hz, $J_{4Lα,3L}$ = 6,0 Hz et $J_{4Lβ,3L}$ = 10,0 Hz

RMN ^{13}C (100,6 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 156,3 (C5A) ; 155,6 (C5D) ; 155,4 (C8aG) ;155,3 (C8aD) ; 155,2 (C5G, C5J) ; 155,1 (C7J) ; 154,7 (C7D) ; 154,6 (C7G) ; 154,0 (C7A) ; 153,7 (C8aJ) ; 153,1 (C8aA) ; 149,1 ; 149,1 ; 149,0 ; 148,9 ; 148,8 ; 148,7 ; 148,6 ; 148,3 (C3'B, C3'E, C3'H, C3'K, C4'B, C4'E, C4'H, C4'K) ; 137,9-135,3 (CqBn) ; 132,8 (C1'E) ; 132,6 (C1'H) ; 132,1 (C1'B) ; 131,7 (C1'K) ; 128,8-126,6 (CHBn) ; 121,00 (C6'H) ; 120,9 (C6'B) ; 120,6 (C6'E) ; 120,5 (C6'K) ; 115,0 ; 114,5 ; 114,5 ; 114,4 (C5'B, C5'E, C5'H, C5'K, C2'H) ; 114,1 (C2'K) ; 113,9 (C2'E) ; 113,4 (C2'B) ; 113,0 (C8G) ; 112,3 (C8J) ; 111,6 (C8D) ; 110,7 (C4aA) ; 109,5 (C4aD) ; 109,3 (C4aG) ; 102,3 (C4aJ) ; 93,6 (C8A) ; 92,9 (C6A) ; 92,6 (C6G) ; 92,0 (C6J) ; 91,1 (C6D) ; 81,8 (C2C) ; 81,1 (C2I) ; 81,0 (C2L) ; 80,1 (C2F) ; 73,2 (C3I) ; 72,9 (C3C, C3F) ; 71,4-69,7 (CH_2Bn) ; 68,5 (C3L) ; 37,6 (C4F, C4I) ; 37,5 (C4C) ; 28,4 (C4L)

MS (LSIMS, m/z (intensité relative %)) : 2698 (100 ; $[M+Na]^+$) ; 2676 (34 ; $[M]^{+\cdot}$) ; 2607 (29) ; 2566 (12) ; 2515 (10) ; 2343 (11) ; 2336 (13) ; 1388 (22) ; 1378 (12) ; 1348 (15) ; 1326 (22) ; 1199 (28)
HRMS : $[M+Na]^+$ = 2695,9363 (calculée pour $C_{172}H_{145}BrO_{24}Na$: 2695, 9207)

☙ Tétramère CatCatCatCat **91**



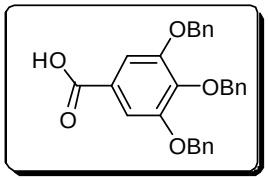
Protocole général F :

- Débenzylation et débromation

Quantité : Tétramère benzylé bromé **92** (20 mg, 7,5 µmol, 1 éq.) ; Triéthylamine (26 µl, 187 µmol, 25 éq.) ; $Pd(OH)_2/C$ à 20% : 20 mg, 37 µmol, 6 éq.
Rendement : 100% (solide beige)

Point de fusion : 188-190 °C (dec.)
IR (cm^{-1}) : 3422 ; 1618 ; 1560 ; 1508 ; 1498 ; 1458 ; 1384 ; 1259 ; 1115 ; 1068 ; 818
RMN ^1H (600 MHz, $CDCl_3$, ppm,) : δ = 6,84 ; 6,45 et 6,25 (H6' B, E et K) ; 5,61 (H6'L) ; 6,97 ; 6,84 ; 6,73 ; 6,58 ; 6,54 ; 6,45 ; 6,44 ; 6,12 (H2' et H5' B, E, H et K) ; 6,04 (C6J) ; 5,94 et 5,68 (C6A et C8A) ; 5,88 ; 5,84 (C6 D et G) ; 4,96 ; 4,26 ; 4,44 (H2 C, F et I) ; 4,06 (H2L) ; 4,58 ; 4,35 ; 4,20 (H3 C, F et I) ; 4,14 (H3L) ; 4,44 ; 4,18 ; 4,14 (H4 C, F et I) ; 2,46 et 2,11 (H4La et H4Lβ)
RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$,ppm) : δ = 156,5 ; 156,4 ; 155,1 ; 155,2 ; 154,3 ; 154,3 ; 153,7 ; 153.5 ; 153,1 ; 153,4 ; 152. 9 ; 152. 5 ; (C8a, C7D et C5D A, D, G et J) ; 144,6 ; 144,3 ; 144,1 ; 143,9 ; 143,7 ; 143,5 ; 143,4 ; 143,1 (C3' et C4' B, E, H et K) ; 131,0 ; 130,1 ; 130,6 ; 130,5 (C1' B, E, H et K) ; 120,6 ; 120,5 ; 119,8 (C6' B, E et H) ; 117,0 (C6'K) ; 116,1 ; 116,1 ; 116,1 ; 115,6 ; 115,5 ; 115,4 ; 115,1 ; 112.0 (C2' et C5' B, E, H et K) ; 109,5 ; 109,4 ; 108,8 ; 107,1 . 107,1 ; 107,0 ; 107, 0 (C4a A, D, G et J et C8 D G et J) ; 98,2 ; 94,9 (C6 D et G) ; 95,1 (C6J) ; 96,6 et 95,2 (C6A et C8A) ; 81,5 (C2L) ; 82,7 ; 81,7 ; 78,8 (C2 C, F et I) ; 73,9 ; 72,4 ; 63,2 (C3 C, F et I) ; 65,6 (C3L) ; 37,3 ; 36,8 ; 36,7 (C4 C,F et I), 22,0 (C4L)
MS (LSIMS, m/z (intensité relative %)) : 1178 (100) $[M+Na]^+$
HRMS : $[M+Na]^+$ = 1177,2654 (calculé pour $C_{60}H_{50}NaO_{24}$: 1177,2590)

☙ Acide gallique benzylé **78**

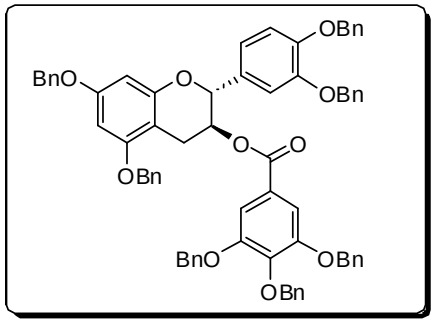


Après dissolution de 2,4 g de l'ester méthylique de l'acide gallique **95** (13,2 mmol) dans 50 ml de DMF sec, 12 g de carbonate de potassium (6,6 éq., 87 mmol) sont ajoutés puis 8 ml de bromure de benzyle (5,1 éq., 67,3 mmol). La solution est laissée sous agitation à température ambiante pendant 20 heures. Le milieu réactionnel est dilué dans 100 ml d'H_2O. La solution est extraite avec de l'éther diéthylique. Après séparation, la phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et le solvant est évaporé. Après filtration sur colonne de silice pour éliminer le bromure de benzyle en excès, **96** est obtenu sous forme d'un solide de couleur blanche est obtenu avec un rendement de 95 %.**96** est alors engagé dans une réaction de saponification. 5,7 g de **96** (12,55 mmol) sont dissous dans une solution d'éthanol et d'eau (300 ml/100 ml) puis 15 g d'hydroxyde de potassium (20,5 éq., 257 mmol) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est mis à reflux pendant 1h puis l'éthanol est évaporé. La phase aqueuse obtenue

est alors acidifiée avec de l'acide sulfurique 37%. Le précipité formé est filtré, lavé à neutralité puis séché. Après recristallisation dans l'éthanol, **78** sous forme d'un solide blanc ayant un aspect cotonneux est obtenu.
Rendement : 74% (70 % sur les deux étapes)

RMN ^{1}H (200 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 7,47-7,26 ($H_{aromatique}$, m, 17H) ; 5,15 (CH_2Bn,s, 4H) ; 5,04 (CH_2Bn,s, 2H)
RMN ^{13}C (50,33 MHz, $CDCl_3$,ppm) : δ =167,3 (C1') ; 152,4 (C3, C5) ; 141,3 (C4) ; 137,7 (C1) ; 137,2 (3 CqBn) ; 128,8 (4 CHBn); 128,5 (2 CHBn) ; 128,4 (2 CHBn) ; 128,3 (2 CHBn) ; 127,8 (4 CHBn) ; 126,4 (CHBn) ; 108,5 (C2, C6) ; 74,6 (CH_2Bn) ; 70,5 (2 CH_2Bn)
HRMS : $[M-H]^-$ = 439,1594 (calculée pour $C_{28}H_{23}O_5$: 439,1545)

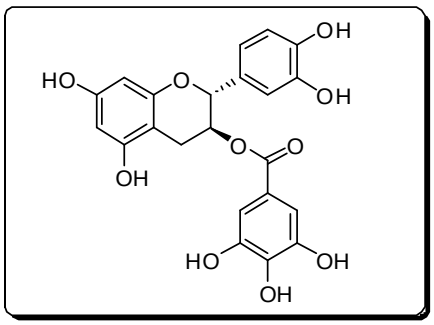
☙ Epicatéchine benzylée gallate **79**



728 mg d'épicatéchine benzylée **57** (1,12 mmol) sont dissous dans 120 ml de dichlorométhane. 860 mg d'acide gallique benzylé **78** (2 éq., 2,24 mmol) sont ajoutés, puis 462 mg de DCC (2 éq., 2,24 mmol) et 13,7 mg de DMAP (0,1 éq., 0,112 mmol) sont additionnés. Le milieu est laissé 72h sous agitation à température ambiante puis le milieu réactionnel est lavée avec de la saumure. Après séparation, la phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et le solvant est évaporé. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane/pentane 50/50). L'épicatéchine gallate benzylée apparaît alors sous forme d'un solide beige.
Rendement : 82%

RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 7,46-7,18 ($H_{aromatiques}$, m, 35H) ; 7,16 (H2', d, 1H, $J_{2',6'}$= 1,5 Hz) ; 7,07 (H2'' ou H6'', s, 1H) ; 7,00 (H6', dd, 1H, $J_{6',2'}$= 1,5 Hz, $J_{6',5'}$= 3,39 Hz) ; 6,92 (H2'' ou H6'', s, 1H) ; 6,86 (H5', d, 1H, $J_{5',6'}$= 3,39 Hz) ; 6,28 (H6 et H8, s, 2H) ; 5,20 (CH_2Bn, s, 2H) ; 5,17 (CH_2Bn, s, 2H) ; 5,11 (CH_2Bn, s, 2H) ; 5,03 (2 CH_2Bn, s, 4H) ; 5,00 (2 CH_2Bn, s, 4H) ; 4,93 (H2, s, 1H ; $J_{2,3}$= 5,85 Hz) ; 4,28 (H3, m, 1H) ; 3,01 et 2,94 (H4α et H4β, ABX, 2H, $J_{4\alpha,4\beta}$= 17,71 Hz, $J_{4\alpha,3}$= 2,26 Hz, $J_{4\beta,3}$= 4,14 Hz)
RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 164,8 (CO) ; 158,8 (C7) ; 158,3 (C5) ; 155,3 (C8a) ; 152,8 (C4') ; 149,7 et 148,9 (C3'' et C5'') ; 148,5 (C3') ; 142,2 (C4'') ;137,3 (CqBn) ; 137,3 (CqBn) ; 137,3 (CqBn) ; 137,2 (CqBn) ; 137,2 (CqBn) ; 137,0 (CqBn) ; 137,0 (CqBn) ; 136,6 (C1'') ; 131,5 (C1') ; 128,6-127,2 (35 CHBn) ; 119,5 (C2') ; 115,1 (C6') ; 113,5 . 113,0 (C2'' et C6'') ; 106,3 (C5') ; 101,0 (C4a) ; 94,7 (C8) ; 94,1 (C6) ; 78,4 (C2) ; 71,4 (CH_2Bn) ; 71,2 (CH_2Bn) ; 70,1 (CH_2Bn) ; 70,2 (2 CH_2Bn) ; 69,9 (2 CH_2Bn) ; 66,4 (C3) ; 28,2 (C4)
MS (ESI, m/z) : 1073,40 ($[M-H]^+$)
HRMS : $[M-H]^+$= 1073,4224 (calculée pour $C_{71}H_{61}O_{10}$: 1073,4592)

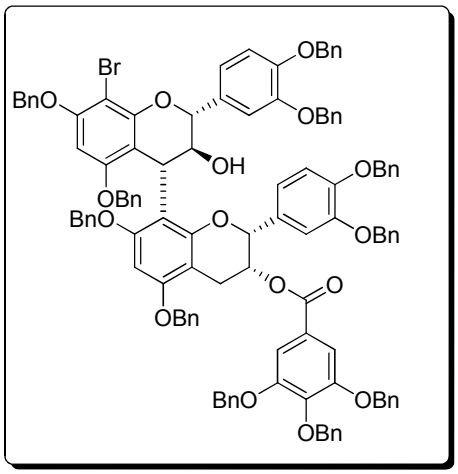
☙ Epicatéchine gallate **3**



92 mg d'épicatéchine gallate benzylée **79** (85 µmol) sont dissous dans 2 ml de THF et 2 ml de MeOH. 100 mg de catalyseur de Pearlman $Pd(OH)_2/C$ à 20% sont alors ajoutés. La solution est agitée pendant 20 heures à température ambiante sous H_2. Après filtration du milieu réactionnel sur filtre-seringue de 0,45 µm, le solvant est évaporé. L'épicatéchine gallate est alors obtenue sous forme d'un solide beige.
Rendement : 95%

RMN ^{1}H (400 MHz, D2O, ppm) : δ = 6,86 (H2'' et H6'', s, 2H) ; 6,78 (H2', s, 1H) ; 6,69 (H5' et H6', m, 2H) ; 5,96 (H6 et H8, s, 2H) ; 5,31 (H3, s, 1H) ; 4,71 (H3, s, 1H) ; 2,78 (H4α, s, 1H) ; 2,65 (H4β, s, 1H)
RMN ^{13}C (100,6 MHz, D20, ppm) : δ = 167,1 (*C*O) ; 155,4 (*C*7) ; 155,3 (*C*5) ; 155,2 (*C*8a) ; 144,5 (*C*4' et *C*3') ; 143,9 ; 143,9 (*C*3'' et *C*5'') ; 138,28 (*C*4'') ; 130,0 (*C*1') ; 120,3 (*C*1'') ; 119,1 (*C*6') ; 115,9 (*C*5') ; 114,4 (*C*2') ; 109,9 (*C*2'' et *C*5'') ; 99,2 (*C*4a) ; 96,3 (*C*6 et *C*8) ; 76,2 (*C*2) ; 69,1 (*C*3) ; 25,1 (*C*4)
HRMS : $[M-H]^-$= 441,0824 (calculée pour $C_{22}H_{17}O_{10}$: 441,0827)

☙ Dimère B4BnBr Gallate **97**



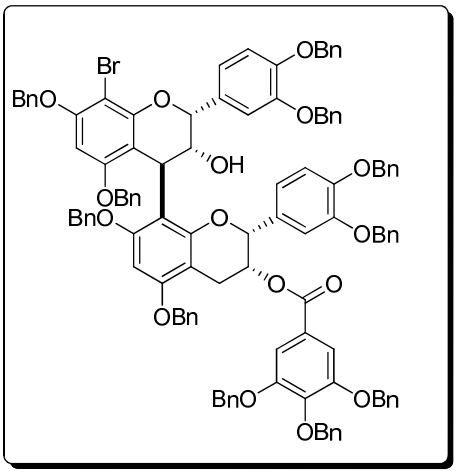
Protocole général D :

- Couplage cationique catalysé avec $TiCl_4$

Quantité : Epicatéchine benzylée gallate **79** (100 mg, 93 µmol, 1 éq.) ; Catéchine benzylée activée bromée **59d** (81 mg, 103 µmol, 1,1 éq.) ; $TiCl_4$ (0,19 ml, 186 µmol, 2 éq.) ; THF (2 ml) ; MeOH (2 ml)
Purification : Chromatographie sur gel de silice (pentane/acétate d'éthyle 80/20).
Rendement : 50%

RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 7,36-7,12 ($H_{aromatiques}$, m, 55H) ; 7,15 (H2'B, s, 1H) ; 7,14 (H5'B, s, 1H, $J_{5'B,6'B}$ = 6,78 Hz) ; 7,08 (H2'E, d, 1H, $J_{2'E,6E'}$ = 1,5 Hz) ; 6,93 (H6'B, d, 1H, $J_{5'B,6'B}$ = 6,78 Hz) ; 6,87 (H2''E et H6''E, s, 2H) 6,73 (H6'E, dd, 1H, $J_{6'E,5E'}$ = 8,29 Hz, $J_{6'E,2E'}$ = 1,5 Hz) ; 6,58 (H5'E, d, 1H, $J_{5'E,6'E}$ = 8,29 Hz) ; 6,34 (H6D, s, 1H) ; 6,26 (H6A, s, 1H) ; 5,37 (H3F, m, 1H); 5,15 (2 CH_2Bn, s, 4H) ; 5,13 (2 CH_2Bn, s, 4H) ; 5,09 (CH_2Bn, m, 2H) ; 5,03 (CH_2Bn, m, 2H) 4,95-4,93 (H4C et 3 CH_2Bn, m, 7H) ; 4,85 (CH_2Bn, m, 2H) ; 4,67 et 4,52 (Ha et Hb -CH_2Bn, d, 2H, J = 10,18 Hz) ; 4,65 (H2C, d, 1H, $J_{2,3C}$ = 9,42 Hz) ; 4,31 (H3C, dd, 1H, $J_{3,2C}$ = 9,42 Hz, $J_{3,4C}$= 9,2 Hz,) ; 3,92 (H2F, s ,1H) ; 3,04 et 2,82 (H4αF et H4βF, ABX, 2H, $J_{4\alpha F,4\beta F}$ = 17,1 Hz avec $J_{4\alpha F,3F}$ < 1 Hz et $J_{4\beta F,3F}$ = 4,52 Hz)
RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 165,1 (*C*O) ; 156,4 (*C*8aA) ; 155,9 (*C*8aD) ;155,5 ; 154,2; 153,9; 153,4 (*C*7D, *C*7B, *C*5D, *C*5B) ; 152,32 (*C*3'', *C*4'', *C*5'') ; 149,0 et 148,9 (*C*4'B et *C*3'B) ; 148,8 et 144,4 (*C*3'E et *C*4'E) ; 142,7 (*C*1'') ; 137,4-136,4 (11 *C*qBn) ; 131,6 (*C*1'B) ; 131,3 (*C*1'E) ; 129,6-126,8 (55 *C*HBn) ; 121,0 (*C*5'E) ; 119,2 (*C*6'' et *C*2'') ; 114,7 (*C*2'E) ; 114,2 (*C*6'E) ; 113,2 (*C*2'B) ; 113,0 (*C*5'B) ; 111,3 (*C*4aA) ; 110,5 (*C*8D) ; 109,3 (*C*6'B) ; 100,7 (*C*4aD) ; 93,8 (*C*8A) ; 93,26 (*C*6A) ; 91,1 (*C*6D) ; 82,2 (*C*2C) ; 75,0 (*C*2F) ; 72,8 (*C*3C) ; 71,4 (CH_2Bn) ; 71,3 (CH_2Bn) ; 71,2 (CH_2Bn); 71,1 (CH_2Bn) ; 71,1 (CH_2Bn) ; 70,9 (2 CH_2Bn) ; 70,9 (CH_2Bn) ; 70,4 (CH_2Bn) ; 70,2 (CH_2Bn) ; 70,1 (CH_2Bn) ; 68,2 (*C*3F) ; 37,5 (*C*4C) ; 26,3 (*C*4F)
MS (MALDI, m/z) : $[M-Na]^+$= 1821,60 (calculée pour $C_{114}H_{95}BrNaO_{16}$: 1821,5701)

☙ Dimère B2BnBr Gallate **98**



Voie 1 : Protocole général D :

- Couplage cationique catalysé avec $TiCl_4$

Quantité : Epicatéchine benzylée gallate **79** (100 mg, 93 µmol, 1 éq.) ; épicatéchine benzylée activée bromée **60c** (81 mg, 103 µmol, 1,1 éq.) ; $TiCl_4$ (0,19 ml, 186 µmol, 2 éq.) ; THF (2 ml) ; MeOH (2 ml)
Purification : Chromatographie sur gel de silice (pentane/acétate d'éthyle 80/20).
Rendement : 30%

Voie 2 : Protocole général E :

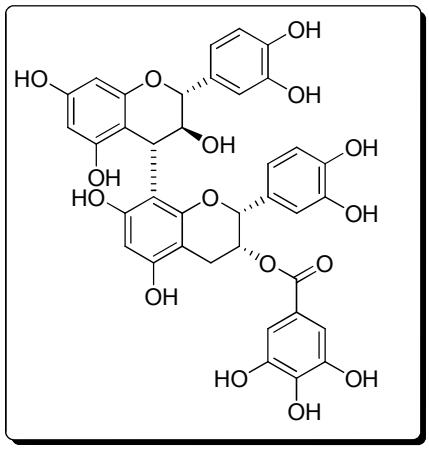
- Couplage catalysé à l'or

Quantité : Epicatéchine gallate benzylée **79**: 100 mg, 93 µmol ; 3',4',5,7-tétra-*O*-benzyl-4β-(2-hydroxyethoxy)-8-bromoépicatéchine **60c** : 73 mg, 93 µmol, 1 éq. $NaAuCl_4.2H_2O$: 1,85 mg, 4,6 µmol, 0,05 éq. ; dichlorométhane : 1 ml, Temps de réaction : 4h
Purification : Chromatographie sur gel de silice, éther de pétrole/acétate d'éthyle 95/5
Rendement : 70%

RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 7,36-7,12 ($H_{aromatiques}$, m, 55H) ; 7,15 (H2'B, s, 1H) ; 7,14 (H5'B, s, 1H, $J_{5'B,6'B}$ = 6,78 Hz) ; 7,08 (H2'E, d, 1H, $J_{2'E,6E'}$ = 1,5 Hz) ; 6,93 (H6'B, d, 1H, $J_{5'B,6'B}$ = 6,78 Hz) ; 6,87 (H2''E et H6''E, s, 1H) 6,73 (H6'E, dd, 1H, $J_{6'E,5E'}$ = 8,29 Hz, $J_{6'E,2E'}$ = 1,5 Hz) ; 6,58 (H5'E, d, 1H, $J_{5'E,6'E}$ = 8,29 Hz) ; 6,34 (H6D, s, 1H) ; 6,26 (H6A, s, 1H) ; 5,37 (H3F, m, 1H); 5,15 (2 CH_2Bn, s, 4H) ; 5,13 (2 CH_2Bn, s, 4H) ; 5,09 (CH_2Bn, m, 2H) ; 5,03 (CH_2Bn, m, 2H) 4,95-4,93 (H4C et 3 CH_2Bn, m, 7H) ; 4,85 (CH_2Bn, m, 2H) ; 4,67 et 4,52 (Ha et Hb -CH_2Bn, d, 2H, J = 10,18 Hz) ; 4,65 (H2C, d, 1H, $J_{2,3C}$ = 9,42 Hz) ; 4,31 (H3C, dd, 1H, $J_{3,2C}$ = 9,42 Hz, $J_{3,4C}$= 9,2 Hz,) ; 3,92 (H2F, s ,1H) ; 3,04 et 2,82 (H4αF et H4βF, ABX, 2H, $J_{4\alpha F,4\beta F}$ = 17,1 Hz avec $J_{4\alpha F,3F}$ < 1 Hz et $J_{4\beta F,3F}$ = 4,52 Hz)
RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 165,1 (CO) ; 156,4 (C8aA) ; 155,9 (C8aD) ;155,5 ; 154,2; 153,9; 153,4 (C7D, C7B, C5D, C5B) ; 152,32 (C3'', C4'', C5'') ; 149,0 et 148,9 (C4'B et C3'B) ; 148,8 et 144,4 (C3'E et C4'E) ; 142,7 (C1'') ; 137,4-136,4 (11 CqBn) ; 131,6 (C1'B) ; 131,3 (C1'E) ; 129,6-126,8 (55 CHBn) ; 121,0 (C5'E) ; 119,2 (C6'' et C2'') ; 114,7 (C2'E) ; 114,2 (C6'E) ; 113,2 (C2'B) ; 113,0 (C5'B) ; 111,3 (C4aA) ; 110,5 (C8D) ; 109,3 (C6'B) ; 100,7 (C4aD) ; 93,8 (C8A) ; 93,26 (C6A) ; 91,1 (C6D) ; 82,2 (C2C) ; 75,0 (C2F) ; 72,8 (C3C) ; 71,4 (CH_2Bn) ; 71,3 (CH_2Bn) ; 71,2 (CH_2Bn); 71,1 (CH_2Bn) ; 71,1 (CH_2Bn) ; 70,9 (2 CH_2Bn) ; 70,9 (CH_2Bn) ; 70,4 (CH_2Bn) ; 70,2 (CH_2Bn) ; 70,1 (CH_2Bn) ; 68,2 (C3F) ; 37,5 (C4C) ; 26,3 (C4F)

MS (MALDI, m/z) : $[M-Na]^+$= 1821,51 (calculée pour $C_{114}H_{95}BrNaO_{16}$: 1821,5701)

☙ Dimère B4 Gallate **99**



Protocole général F :

- Débenzylation et débromation

Quantité : B4 gallate benzylée bromée **97** (38 mg, 21 µmol, 1 éq.) ; Triéthylamine (40 µl, 0,286 mmol, 13,6 éq.) ; $Pd(OH)_2/C$ à 20%

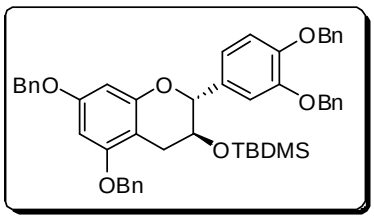
Rendement : 95%

RMN ^{1}H (400 MHz, H_20/D_2O, 90/10, ppm) : δ = 6,70 (H2'' et H6'', s 1H) ; 6,68 (H5'B, s, 1H) ; 6,62 (H2'B, s, 1H) ; 6,54 (H2'E, s, 1H,) ; 6,52 (H5'E, s, 1H) ; 6,44 (H6'B, s, 1H) ; 6,10 (H6'E, s, 1H) ; 6,09 (H6D, s, 1H) ; 6,05 (H6A, s, 1H) ; 5,76 (H8A°, s, 1H) ; 5,35 (H3F, m, 1H); 4,95 (H2F, m, 1H) ; 4,40 (H2C, d, 1H, $J_{2,3C}$ = 8,5 Hz) ; 4,37 (H4C, d, 1H, $J_{4,3C}$ = 9,5 Hz) ; 4,19 (H3C, dd, 1H, $J_{3,2C}$ = 8,5 Hz, $J_{3,4C}$= 9,5 Hz,) ; 2,90 et 2,73 (H4αF et H4βF, ABX, 2H, $J_{4\alpha F,4\beta F}$ = 17,1 Hz avec $J_{4\alpha F,3F}$ = 4,7 Hz et $J_{4\beta F,3F}$ < 1 Hz)

RMN ^{13}C (100,6 MHz, H_20/D_2O, 90/10, ppm) : δ =167,1 (CO) ; 156,4 (C8aA) ; 155,5 ; 154,7 ; 154,3 (C5A, C7A, C5D) ; 153,7 (C8aD) ; 153,4 (C7D) ; 153,7 (C8aD) ; 144,65 (C3'', C4'', C5'') ; 144,4 (C4'B) ; 143,8 (C3'B) ; 143,6 et 144, 0 (C3'E et C4'E) ; 138;6 (C1'') 130,7 (C1'E) ; 130,5 (C1'B) ; 120,6 (C6'B) ; 120,4 (C6'E) ; 116,4 (C5'B) ; 116,0 (C2'B) ; 115,5 (C5'E) ; 114,8 (C2'E) ; 110,1 (C2'' et C6'') ; 107,1 (C4aA) ; 108,8 (C8D) ; 99,7 (C4aD) ; 97,3 (C6A) ; 96,0 (C8A) ; 95,8 (C6D) ; 81,9 (C2C) ; 76,9 (C2F) ; 72,3 (C3C) ; 69,1 (C3F) ; 37,2 (C4C) ; 25,6 (C4F)

HRMS: $[M-H]^-$= 729,1527 (calculée pour $C_{37}H_{29}O_{16}$: 729,1456)

☙ 3', 4', 5, 7-tétra-O-benzyl-3-(*tert*-butyl)diméthylsilane-catéchine **103**



2 g de catéchine benzylée **56** (3,07 mmol, 1 éq.) sont dissous dans 12 ml de DMF. 314 mg d'imidazole (4,61 mmol, 1,5 éq.) et 648 mg de *tert*-butylchlorodimethylsilane (4,3 mmol, 1,4 éq.) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 22h. De l'eau est additionnée et la phase aqueuse est alors extraite au dichlorométhane. Les phases organiques combinées sont lavées à l'eau puis avec de la saumure, séchées sur sulfate de magnésium et le solvant est évaporé. Après purification par chromatographie sur gel de silice (pentane/acétate d'éthyle 80/20), une huile jaune est obtenue.

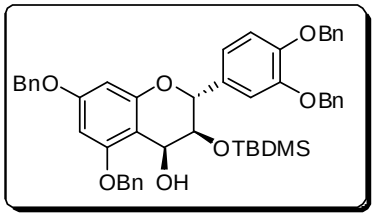
Rendement : 93%

RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 7,51-7,36 ($H_{aromatiques}$ Bn, m, 20H) ; 7,17 (H2', s, 1H) ; 7,02 (H5' et H6', s, 2H) ; 6,34 et 6,31 (H6 et H8, d, 2H, $J_{6,8}$ = 2,2 Hz) ; 5,26 (2 CH_2Bn, s, 4H) ; 5,14 (CH_2Bn, s, 2H) ; 5,05 (CH_2Bn, s, 2H) ; 4,66 (H2, d, 1H, $J_{2,3}$ = 8,85 Hz) ; 4,20 (H3, m, 1H) ; 3,21 et 2,73 (H4α et H4β, ABX, 2H, $J_{4\alpha,4\beta}$ = 16,2 Hz, $J_{4\alpha,3}$ = 5,79 Hz et $J_{4\beta,3}$ = 9,2 Hz) ; 1,11 (3 CH_3, s, 9H) ; 0,25 (CH_3, s, 3H), 0,09 (CH_3 s, 3H)

RMN ^{13}C (63 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 159,1 (C7) ; 157,9 (C5) ; 156,0 (C8a) ; 149,4 et 149,1 (C4' et C3') ; 137,7 (CqBn) ; 137,7 (CqBn) ; 137,6 (CqBn) ; 137,3 (CqBn) ; 133,1 (C1') ; 129,0 (CHBn) ; 128,9 (CHBn) ; 128,9 (2 CHBn) ; 128,8 (2 CHBn) ; 128,4 (CHBn) ; 128,2 (CHBn) ; 128,2 (2 CHBn) ; 128,1 (2 CHBn) ; 128,0 (2 CHBn) ; 127,8 (2 CHBn) ; 127,6 (2 CHBn) ; 127,2 (2 CHBn) ; 121,5 (C6') ; 114,5 (C5') ; 114,6 (C2') ; 103,3 (C4a) ; 94,7 (C8) ; 94,2 (C6) ; 82,5 (C2) ; 71,8 (CH_2Bn) ; 71,6 (CH_2Bn) ; 70,5 (CH_2Bn) ; 70,3 (CH_2Bn) ; 69,8 (C3) ; 30,73 (C4) ; 26,1 (3 CH_3) ; 18,3 (Cq-Si) ; -4,4 (CH_3-Si) ; -5,1 (CH_3-Si)

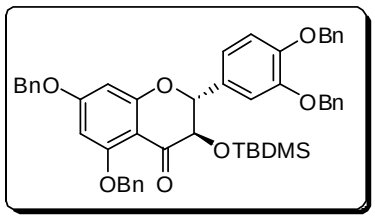
HRMS: $[M-H]^+$= 765,3594 (calculée pour $C_{49}H_{53}O_6Si$: 765,3605)

☙ 3',4',5,7-tétra-*O*-benzyl-3-(*tert*-butyl)diméthylsilane-4-hydroxyle-catéchine **104**



463 mg de catéchine benzylée silane **103** (0,6 mmol) sont dissous dans 5 ml de THF. 30 µl d'eau (1,712 mmol, 2,83 éq.) et 412 mg de DDQ (1,815 mmol, 3 éq.) sont ajoutés, puis la solution est laissée sous agitation pendant 12 heures. 186 mg de DMAP (1,52 mmol, 2,5 éq.) sont alors additionnés, puis après 15 min le solvant est évaporé. Après purification par chromatographie sur gel silice (pentane/acétate d'éthyle 80/20), deux produits sont isolés : le produit hydroxylé attendu **104** et le produit sous forme de cétone **105**.
Rendements : Hydroxyle **104**: 35% (+ cétone **105** 37%)
RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 7,49-7,29 ($H_{aromatiques}$ Bn, m, 20H) ; 7,09 (H2', *s*, 1H) ; 6,95 (H5' et H6', *s*, 2H) ; 6,25 et 6,18 (H6 et H8, *s*, 2H) ; 5,19 (CH_2Bn, *s*, 2H) ; 5,18 (CH_2Bn, *s*, 2H) ; 5,14 (CH_2Bn, *s*, 2H) ; 5,11 (H2, d, 1H, $J_{2,3}$ = 9,8 Hz) ; 4,99 (CH_2Bn, *s*, 2H) ; 4,96 (H4, d, 1H, $J_{4,3}$ = 3,4 Hz) ; 3,97 (H3, dd, 1H, $J_{3,4}$ = 3,4 Hz, $J_{3,2}$ = 9,8 Hz) ; 0,77 (3CH_3, *s*, 9H) ; -0,12 (CH_3, *s*, 3H), -0,54 (CH_3, *s*, 3H)
RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ =; 160,8 (*C*7) ; 158,9 (*C*5) ; 156,1 (*C*8a) ; 149,1 et 148,9 (*C*4' et *C*3') ; 137,3 (*Cq*Bn) ; 137,2 (*Cq*Bn) ; 137,1 (*Cq*Bn) ; 136,7 (*Cq*Bn) ; 132,1 (*C*1') ; 128,6 (2 *C*HBn) ; 128,5 (2 *C*HBn) ; 128,5 (2 *C*HBn) ; 128,4 (2 *C*HBn) ; 128,0 (*C*HBn) ; 127,8 (*C*HBn) ; 127,7 (*C*HBn) ; 127,6 (*C*HBn) ; 127,5 (2 *C*HBn) ; 127,4 (2 *C*HBn) ; 127,3 (2 *C*HBn) ; 126,8 (2 *C*HBn) ; 121,5 (*C*6') ; 115,3 (*C*5') ; 114,5 (*C*2') ; 104,5 (*C*4a) ; 94,4 (*C*8 et *C*6) ; 75,8 (*C*2) ; 72,8 (*C*3) ; 71,4 (CH_2Bn) ; 71,3 (CH_2Bn) ; 70,2 (CH_2Bn) ; 70,1 (CH_2Bn) ; 62,4 (*C*4) . 25,7 (3 CH_3) ; 17,9 (*Cq*-Si) ; -5,0 (CH_3-Si) ; -5,6 (CH_3-Si)
HRMS: $[M-Na]^+$= 803,3355 (calculée pour $C_{49}H_{52}O_7NaSi$: 803,3374)

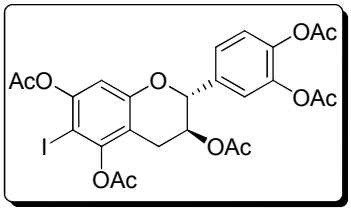
☙ 3',4',5,7-tétra-*O*-benzyl-3-(*tert*-butyl)diméthylsilane-4-one-catéchine **105**



82 mg de catéchine benzylée-4-hydroxyle **104** (0,10 mmol) sont dissous dans 2 ml de dichlorométhane. 20 mg de tamis moléculaire sont ajoutés puis 20 mg de NMO (0,17 mmol, 1,6 éq.) et 8 mg de TPAP (0,02 mmol, 0,2 éq.) sont additionnés. Après 30 h sous agitation, le milieu réactionnel est filtré sur célite puis purifié par chromatographie sur gel de silice (pentane/acétate d'éthyle 95/5).
Rendement : 25%

RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 7,53-7,30 ($H_{aromatiques}$ Bn, m, 20H) ; 7,11 (H2', *s*, 1H) ; 6,96 (H5' et H6', *s*, 2H) ; 6,20 et 6,17 (H6 et H8, d, 2H, $J_{6,7}$ = 2,3 Hz) ; 5,22 (2CH_2Bn, *s*, 4H) ; 5,20 (CH_2Bn, *s*, 2H) ; 5,04 (H2, d, 1H, $J_{2,3}$ = 11,3 Hz) ; 5,00 (CH_2Bn, *s*, 2H) ; 4,31 (H3, d, 1H, $J_{3,2}$ = 11,3 Hz) ; 0,63 (3CH_3, *s*, 9H) ; -0,14 (CH_3, *s*, 3H), -0,19 (CH_3, *s*, 3H)
RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 189,6 (*C*4) ; 164,7 (*C*7) ; 164,1 (*C*5) ; 161,0 (*C*8a) ; 149,4 et 149,1 (*C*4' et *C*3') ; 137,2 (*Cq*Bn) ; 137,6 (*Cq*Bn) ; 135,8 (*Cq*Bn) ; 135,8 (*Cq*Bn) ; 131,9 (*C*1') ; 128,7 (2 *C*HBn) ; 128,5 (4 *C*HBn) ; 128,5 (2 *C*HBn) ; 128,3 (*C*HBn) ; 127,8 (*C*HBn) ; 127,8 (*C*HBn) ; 127,6 (*C*HBn) ; 127,5 (2 *C*HBn) ; 127,4 (2 *C*HBn) ; 127,2 (2 *C*HBn) ; 127,4 (2 *C*HBn) ; 121,2 (*C*6') ; 115,1 (*C*5') ; 114,3 (*C*2') ; 105,1 (*C*4a) ; 95,7 (*C*8) ; 94,7 (*C*6) ; 83,7 (*C*2) ; 71,4 (*C*3) ;. 71,4 (CH_2Bn) ; 71,3 (CH_2Bn) ; 70,4 (CH_2Bn) ; 70,3 (CH_2Bn) ; 25,4 (3 CH_3) ; 18,3 (*Cq*-Si) ; -4,2 (CH_3-Si) ; -6,0 (CH_3-Si)
HRMS: $[M-H]^+$= 779,3401 (calculée pour $C_{49}H_{51}O_7Si$: 779,3398)

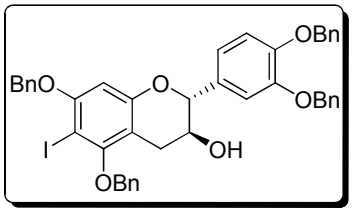
☙ 3',4',3,5,7-penta-*O*-acétyl-6-iodo-catéchine **110a**



165 mg de catéchine **1** (0,566 mmol) sont dissous dans 2 ml d'acétone distillée. Après dissolution dans 1 ml d'acétone, 127 mg de NIS (0,566 mmol, 1 éq.) sont additionnée à 0°C au goutte à goutte à l'aide d'une ampoule d'addition. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 2 heures à 0°C puis le solvant est évaporé. Le produit obtenu **109** est alors engagé directement dans la réaction d'acétylation. 235 mg de **109** (0,566 mmol, 1 éq.) sont dissous dans 5 ml de pyridine, puis 1 ml d'anhydride acétique (10,5 mmol, 18,5 éq.) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est laissé 48 heures sous agitation puis est versé sur de l'eau glacée acidifié à un pH égal à 5. Un précipité est formé et le milieu est extrait au dichlorométhane. Les phases organiques combinées sont lavées à l'eau puis avec de la saumure, séchées sur sulfate de magnésium et le solvant est évaporé. Après purification par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane/acétate d'éthyle 98/2), une huile jaune est obtenue
Rendement : **110 :** 87% (**110a** : 94%, **110b** : 6%)

RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 7,24 (H2', s, 1 H,) ; 7,20 (H6', s, 1H) ; 7,14 (H5', s, 1H) ; 6,74 (H8, s, 1 H) ; 5,24 (H3, m, 1 H,) ; 5,16 (H2, d, 1 H, $J_{2,3}$ = 5,65 Hz,) ; 3,95 (H3, m, 1 H,) ; 2,85 et 2,69 (H4α et H4β, ABX, 2 H, $J_{4\alpha,4\beta}$ = 16,2 Hz, $J_{4\alpha,3}$ = 5,28 Hz, $J_{4\beta,3}$ = 6,02 Hz) ; 2,36 (CH_3, s, 3H) ; 2,35 (CH_3, s, 3H) ; 2,28 ($2CH_3$, s, 6H) ; 2,00 (CH_3, s, 3H)
RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 170,1 (*C*O) ; 168,2 (*C*O) ; 168,0 (2 *C*O) ; 167,4 (*C*O) ; 154,8 (*C*8a) ; 150,9 (*C*7 et *C*5) ; 142,2 (*C*3') ; 142,1 (*C*4') ; 135,8 (*C*1') ; 124,3 (*C*6') ; 123,8 (*C*5') ; 121,6 (*C*2') ; 112,3 (*C*4a) ; 109,4 (*C*8) ; 77,8 (*C*6) ; 77,2 (*C*2) ; 68,0 (*C*3) ; 21,2 (*C*4) ; 20,9 (2 CH_3) ; 20,6 (3 CH_3)
HRMS: $[M\text{-}Na]^+$= 649,0200 (calculée pour $C_{25}H_{23}O_{11}NaI$: 649,0177)

☙ 3',4',5,7-tétra-*O*-benzyl-6-iodo-catéchine **112**

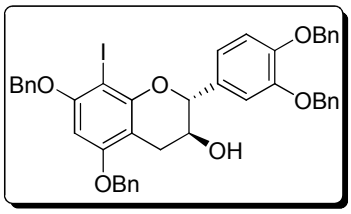


775 mg de catéchine acétylée iodée **110** (1,24 mmol) sont dissous dans 10 ml de DMF. 475 mg d'hydrure de sodium dispersé à 40% dans de l'huile (11,9 mmol, 9,6 éq.) sont additionnés à 0°C. Puis après 10 min, 0,68 ml de bromure de benzyle (5,94 mmol, 4,8 éq.) et 90 µl d'eau (4,85 mmol, 4 éq.) sont additionnés. La solution est agitée à 0°C pendant 2 heures puis à température ambiante pendant 20 heures. Le milieu réactionnel est dilué dans 50 ml d'acétate d'éthyle. La solution est lavée avec de la saumure. Après séparation, la phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et le solvant est évaporé. Une huile de couleur brune est obtenue. Après purification par chromatographie sur gel de silice (pentane/acétate d'éthyle 90/10). **111** (41 %, **111a :** 65 %, **111b :** 22%, **111c** : 12%) est obtenu sous forme de solide blanc rosé.
147 mg de **111** (0,18 mmol) sont dissous dans 1 ml de méthanol et 5 ml de dichlorométhane. 97 mg de méthoxyde de sodium (1,8 mmol, 10 éq.) sont ajoutés puis après 10 min sous agitation et addition d'eau la phase organique est extraite au dichlorométhane. Les phases organiques combinées sont lavées à l'eau puis avec de la saumure, séchées sur sulfate de magnésium et le solvant est évaporé. Après purification par chromatographie sur gel de silice (pentane/acétate d'éthyle 90/10), une huile jaune est obtenue.
Rendement : 60% (94% par rapport à **111a**)

RMN ^{1}H (250 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 7,61–7,32 ($H_{aromatiques}$, m, 20H) ; 6,99 (H2', s, 1 H,) ; 6,93 (H5' et H6', m, 2 H) ; 6,38 (H8, s, 1 H) ; 5,19 (CH_2Bn, s, 2 H) ; 5,17 (CH_2Bn, s, 2 H) ; 5,10 (CH_2Bn, s, 2 H) ;

4,94 (CH_2Bn, s, 2 H), 4,66 (H2, d, 1 H, $J_{2,3}$ = 8,3 Hz,) ; 3,95 (H3, m, 1 H,) ; 3,12 et 2,71 (H4α et H4β, ABX, 2 H, $J_{4\alpha,4\beta}$ = 16,18 Hz, $J_{4\alpha,3}$ = 4,59 Hz, $J_{4\beta,3}$ = 8,85 Hz)
RMN ^{13}C (63 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 157,5 (C5) ; 156,8 (C7) ; 155,8 (C8a) ; 149,1 (C3') ; 149,7 (C4') ; 136,7 (CqBn) ; 136,6 (CqBn) ; 136,2 (CqBn) ;136,1 (CqBn) ; 131,7 (C1') ; 128,3 (6 CHBn) ; 128,2 (2 CHBn) ; 127,6 (2 CHBn) ; 127,1 (2 CHBn) ; 126,9 (2 CHBn) ; 126,6 (4 CHBn) ; 126,5 (2 CHBn) ; 120,2 (C6') ; 114,5 (C5') ; 113,3 (C2') ; 108,0 (C4a) ; 97,5 (C8) ; 81,4 (C2) ; 74,1 (CH_2Bn) ; 71,1 (2 CH_2Bn) ; 70,8 (CH_2Bn) ; 74,7 (C6) ; 67,4 (C3) ; 28,1 (C4)
MS (MALDI): $[M\text{-}Na]^+$= 798,9 (calculée pour $C_{43}H_{37}O_6NaI$: 799,1532)

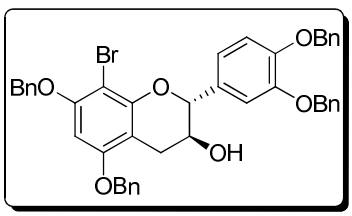
☙ 3',4',5,7-tétra-O-benzyl-8-iodo-catéchine **113**



400 mg de catéchine benzyléé **56** (0,61 mmol) sont dissous dans 10 ml d'acétone. A 0°C, 138 mg de NIS (0,61 mmol) préalablement recristallisés et dissous dans 2,5 ml d'acétone sont ajoutés à l'aide d'une ampoule d'addition en 5 minutes. Le milieu réactionnel est laissé 2 heures sous agitation à 0°C puis 2 heures supplémentaires à température ambiante. Le mélange réactionnel est alors dilué dans 50 ml d'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée à l'eau puis avec de la saumure, séchée sur sulfate de magnésium et le solvant est évaporé.
La 3',4',5,7-tétra-O-benzyl-8-iodocatéchine est obtenue sous forme d'un solide rouge orangé.
Rendement : 100%

RMN ^1H (300 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 7,41–7,22 ($H_{aromatiques}$, m, 20H) ; 6,99 (H2', s, 1 H,) ; 6,85 (H5' et H6', s, 2 H) ; 6,15 (H6, s, 1 H) ; 5,10 (CH_2Bn, s, 2 H) ; 5,06 (CH_2Bn, s, 2 H) ; 5,03 (CH_2Bn, s, 2 H) ; 4,91 (CH_2Bn, s, 2 H), 4,75 (H2, d, 1 H, $J_{2,3}$ = 7,3 Hz,) ; 3,88 (H3, m, 1 H,) ; 2,89 et 2,57 (H4α et H4β, ABX, 2 H, $J_{4\alpha,4\beta}$ = 16,6 Hz, $J_{4\alpha,3}$ = 5,3 Hz, $J_{4\beta,3}$ = 8,0 Hz)
RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 158,4 (C8a) ; 157,6 (C7) ; 154,2 (C5) ; 149,4 (C3') ; 149,35 (C4') ; 137,7 (CqBn) ; 137,5 (CqBn) ; 137,1 (CqBn) ;137,0 (CqBn) ; 131,3 (C1') ; 129,0 (2 CHBn) ; 129,0 (2 CHBn) ; 128,9 (2 CHBn) ; 128,9 (2 CHBn) ; 128,5 (CHBn) ; 128,3 (CHBn) ; 128,3 (2 CHBn) ; 127,9 (2 CHBn), 127,7 (2 CHBn) ; 127,6 (2 CHBn) ; 127,5 (2 CHBn) ; 120,2 (C6') ; 115,2 (C5') ; 113,8 (C2') ; 103,9 (C4a) ; 92,6 (C6) ; 82,2 (C2) ; 71,7 (CH_2Bn) ; 71,7 (CH_2Bn) ; 71,6 (CH_2Bn) ; 70,6 (CH_2Bn) ; 68,4 (C8) ; 67,8 (C3) ; 27,7 (C4)
MS (LSIMS, m/z (intensité relative %)) = 800 (10) $[M\text{-}Na]^+$; 777 (59) $[M\text{-}H]^+$; 650(13) ; 445 (100) ; 319 (50)
MS (MALDI): $[M\text{-}Na]^+$= 799,0 (calculée pour $C_{43}H_{37}O_6NaI$: 799,15325)

☙ 3',4',5,7-tetra-O-benzyl-8-bromo-catéchine **115**



Protocole général C :

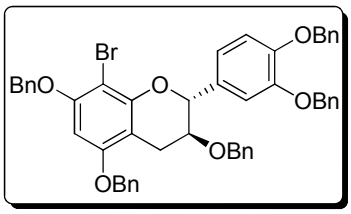
- Bromation de la position 8

Quantité: Catéchine benzylée **56**: 1,57 g, 2,41 mmol ; NBS : 430 mg, 2,41 mmol, 1 éq., dichlorométhane : 40 ml
Rendement : 100% (mousse jaunâtre)

Point de fusion : 121,7–122,5 °C
RMN ^1H (300 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ =7,56–7,29 ($H_{Aromatiques}$, m, 20H) ; 7,07 (H2', s, 1H) ; 6,96 (H5' et H6', s, 2H) ; 6,28 (H6, s, 1 H) ; 5,19 (2 CH_2Bn, s, 4 H) ; 5,14 (CH_2Bn, s, 2 H), 5,01 (CH_2Bn, s, 2 H) ;

4,84 (H2, d, 1 H, $J_{2,3}$ = 7,5 Hz) ; 4,00 (H3, m, 1 H) ; 3,02 et 2,71 (H4a et H4β, ABX, 2H, $J_{4\alpha,4\beta}$ = 16,6 Hz, $J_{4\alpha,3}$= 5,6 Hz, $J_{4\beta,3}$ = 8,3 Hz)
RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 156,3 (C7) ; 154,8 (C5) ; 151,7 (C8a) ; 149,2 (C4';) ; 149,0 (C3') ; 137,2 (CqPh) ; 137,0 (CqPh) ; 136,7 (CqPh) ; 136,6 (CqPh) ; 130,7 (C1') ; 128,6 (4 CHPh) ; 128,5 (2 CHPh) ; 128,5 (2 CHPh) ; 128,0 (CHPh) ; 128,0 (CHPh) ; 127.8 (2 CHPh) ; 127,5 (2 CHPh) ; 127,2 (2 CHPh) ; 127,1 (2 CHPh) ; 127,1 (2 CHPh) ; 119,9 (C6') ; 114,9 (C5') ; 113,5 (C2') ; 104,0 (C4a) ; 92,9 (C6) ; 92,8 (C8) ; 81,6 (C2) ; 71,4 (CH_2Bn) ; 71,3 (CH_2Bn) ; 71,2 (CH_2Bn) ; 70,2 (CH_2Bn) ; 67,8 (C3) ; 27,2 (C4)
MS (LSIMS, m/z (intensité relative %)) : 753 (100) $[M+Na]^+$; 730 (63) $[M+H]^+$; 661 (16) ; 421 (16) ; 409 (18) ; 397(72) ; 329 (40) ; 307 (39) ; 289 (27)
HRMS : $[M]^{+\bullet}$ = 728.1781 (calculée pour $C_{43}H_{37}BrO_6$: 728.1774)

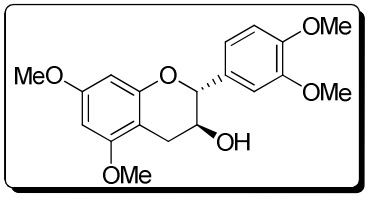
☙ 3',4',3,5,7-penta-O-benzyl-8-bromo-catéchine **116**



2,5 g de catéchine benzylée bromée **115** (3,43 mmol) dissous dans 10 ml de DMF sont additionnés goutte à goutte à 206 mg d'hydrure de sodium 60 % dans l'huile. Après 20 minutes sous agitation, 0,645 ml de bromure de benzyle (5,48 mmol, 1,6 éq.) sont ajoutés à 0°C. Après 3 heures, la réaction est stoppée par addition d'eau et la phase organique est extraite au toluène. Les phases organiques combinées sont lavées à l'eau puis avec de la saumure, séchées sur sulfate de magnésium et le solvant est évaporé.
Après purification par chromatographie sur gel de silice (pentane/dichlorométhane 50/50), un solide blanc est obtenu.
Rendement : 86%

RMN ^1H (300 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 7,49-7,12 ($H_{aromatiques}$ Bn, m, 25H) ; 7,02 (H2', s, 1H) ; 6,93 (H5' et H6', s, 2H) ; 6,25 (H6, s, 1H) ; 5,20 (CH_2Bn, s, 2H) ; 5,17 (2 CH_2Bn, s, 4H) ; 5,12 (CH_2Bn, s, 2H) ; 5,02 (H2, d, 1H, $J_{2,3}$ = 7,16 Hz) ; 4,37 et 4,25 (Ha et Hb -CH_2Bn, d, 2H, J = 12,6 Hz) ; 3,75 (H3, m, 1H) ; 2,91 et 2,75 (H4α et H4β, ABX, 2H, $J_{4\alpha,4\beta}$ = 16,58 Hz, $J_{4\alpha,3}$ = 5,28 Hz et $J_{4\beta,3}$ = 7,91 Hz)
RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 156,5 (C7) ; 155,0 (C5) ; 152,1 (C8a) ; 148,9 (C4' et C3') ; 138,3 (CqBn) ; 137,6 (CqBn) ; 137,4 (CqBn) ; 137,2 (CqBn) ; 136,9 (CqBn) ;132,1 (C1') ; 127,9 (2 CHBn) ; 127,6 (2 CHBn) ; 127,5 (4 CHBn) ; 127,3 (2 CHBn) ; 128,4 (4 CHBn) ; 128,0 (2 CHBn) ; 127,5 (2 CHBn) ; 127,5 (3 CHBn) ; 127,2 (2 CHBn) ; 127,1 (2 CHBn) ; 120,5 (C6') ; 114,9 (C5') ; 113,8 (C2') ; 104,7 (C4a) ; 92,9 (C8) ; 92,8 (C6) ; 80,0 (C2) ; 74,4 (C3) ; 71,7 (CH_2Bn) ; 71,4 (2 CH_2Bn) ; 71,2 (CH_2Bn) ; 70,4 (CH_2Bn) ; 25,9 (C4)
SM (MALDI): $[M-Na]^+$= 841,1 (calculée pour $C_{50}H_{43}O_6BrNa$: 841,2141)

☙ 3',4',5,7-tétraméthoxy -catéchine **122**



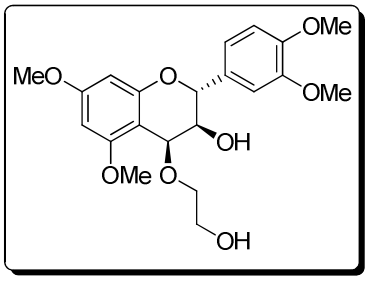
2 g de catéchine **1** (6,89 mmol) sont dissous dans 50 ml d'acétone distillée puis 8,2 mg de carbonate de potassium (58,77 mmol, 7,9 éq.) sont ajoutés. Après 1 heure sous agitation, 5,7 ml de dimethyl sulfate (58,77 mmol, 7,9 éq.) sont additionnés goutte à goutte en .30 minutes. Le milieu réactionnel est mis à reflux et laissé sous agitation pendant 12 heures. Le milieu réactionnel est alors filtré et 20 ml d'une solution d'ammoniaque à 25% sont rajoutés. Après extraction à l'acétate d'éthyle, les phases organiques combinées sont lavées à l'eau puis avec de la

saumure, séchées sur sulfate de magnésium et le solvant est évaporé. Un solide blanc est alors obtenu.
Rendement : 97%

RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 6,96 (H6', d, 1H, $J_{6'5'}$ =7,93 Hz) ; 6,94 (H2', s, 1H) ; 6,84 (H5', d, 1H ; $J_{6'5'}$ = 7,93 Hz) ; 6,11 et 6,08 (H6 et H8, d, 2H, $J_{6,8}$= 2,18 Hz) ; 4,62 (H2, d, 1H, $J_{2,3}$= 8,32 Hz) ; 4,01 (H3, m, 1H,) ; 3,85 (CH_3, s, 3H) ; 3,84 (CH_3, s, 3H) ; 3,77 (CH_3, s, 3H) ; 3,71 (CH_3, s, 3H) ; 3,03 et 2,54 (H4α et H4β, ABX, 2H, $J_{4α,4β}$ = 16,45 Hz, $J_{4α,3}$= 5,74 Hz, $J_{4β,3}$ = 8,92 Hz)
RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 160,1 (C7) ; 159,8 (C5) ; 155,9 (C8a) ; 149,6 (C3' et C4') ; 130,8 (C1') ; 120,3 (C6') ; 111,5 (C5') ; 110,3 (C2') ; 103,0 (C4a) ; 93,4 (C8) ; 92,2 (C6) ; 82,1 (C2) ; 68,5 (C3) ; 56,3 (CH_3) ; 56,3 (CH_3) ; 58,9 (CH_3) ; 56,7 (CH_3) ; 28,1 (C4)
HRMS: $[M-Na]^+$= 369,1310 (calculée pour $C_{19}H_{22}O_6Na$: 369,1308)

☙ 3',4',5,7-tétraméthoxy-4β-(2-hydroxyéthyloxy)-catéchine **123**

Protocole général B :
Activation avec l'éthylène glycol de la position 4



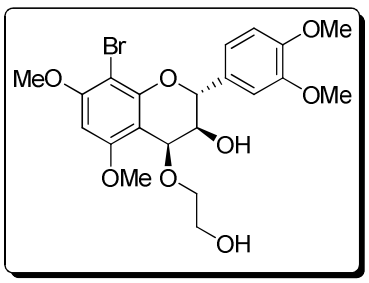
Quantités : Catéchine méthylée **122**: 800 mg, 2,31 mmol ; Ethylène glycol : 0,77 ml, 13,86 mmol, 6 éq. ; DDQ : 1,05 g, 4,62 mmol, 2 éq. ; DMAP : 566 mg, 4,62 mmol, 2 éq.
Purification : Chromatographie sur gel de silice (pentane/acétate 50/50).
Rendement : 74% (Solide jaune)

RMN ^{1}H (200 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 7,02 (H6', d, 1H, $J_{6'5'}$ =8,1 Hz) ; 6,98 (H2', s, 1H) ; 6,85 (H5', d, 1H ; $J_{6'5'}$ = 8,1 Hz) ; 6,07 et 6,06 (H6 et H8, d, 2H, $J_{6,8}$= 2,39 Hz) ; 5,0 (H2, d, 1H, $J_{2,3}$= 10,49 Hz) ; 4,75 (H4, d, 1H, $J_{4,3}$= 3,34 Hz) ; 3,90 (H3, m, 1H,) ; 3,89 (CH_3, s, 3H) ; 3,86 (CH_3, s, 3H) ; 3,83 (CH_3, s, 3H) ; 3,73 (CH_3, s, 3H) ; 3,62 (2 CH_2, m, 4H)
RMN ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 160,5 (C7) ; 159,8 (C5) ; 154,3 (C8a) ; 149,9 (C4') ; 149,6 (C3') ; 130,7 (C1') ; 122,2 (C6') ; 111,6 (C5') ; 110,9 (C2') ; 105,0 (C4a) ; 92,1 (C8) ; 89,3 (C6) ; 74,6 (C2) ; 74,8 (C3) ; 72,7 (C4) ;70,2 (C9) ; 66,7 (C10) ; 57,5 (CH_3) ; 56,2 (CH_3) ; 55,9 (CH_3) ; 55,7 (CH_3)
HRMS: $[M-Na]^+$= 429,1532 (calculée pour $C_{21}H_{26}O_8NaO_8$: 429,1525)

☙ 3',4',5,7-tétraméthoxy-4β-(2-hydroxyéthyloxy)-8-bromocatéchine **124**

Protocole général C :

- Bromation de la position 8

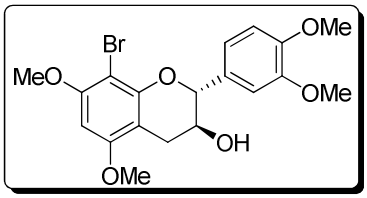


Quantité: Catéchine méthylée activée **123** : 197,4 mg, 0,48 mmol ; NBS : 85,4 mg, 0,48 mmol, 1 éq., dichlorométhane : 10 ml
Rendement : 100%

RMN ^{1}H (200 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 7,04 (H6', d, 1H, $J_{6'5'}$ =8,13 Hz). ; 7,03 (H2', s, 1H) ; 6,86 (H5', d, 1H ; $J_{6'5'}$ = 8,13 Hz) ; 6,16 (H6, s, 1H) ; 5,08 (H2, d, 1H, $J_{2,3}$= 10,5 Hz) ; 4,76 (H4, d, 1H, $J_{4,3}$= 3,37 Hz) ; 3,94 (H3, m, 1H,) ; 3,93 (CH_3, s, 3H) ; 3,90 (CH_3, s, 3H) ; 3,88 (CH_3, s, 3H) ; 3,86 (CH_3, s, 3H) ; 3,78 (CH_2, m, 2H) ; 3,75 (CH_2, m, 2H)

RMN ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 158,2 (*C*7) ; 157,8 (*C*5) ; 152,2 (*C*8a) ; 149,2 (*C*4') ; 149,0 (*C*3') ; 130,0 (*C*1') ; 120,2 (*C*6') ; 110,9 (*C*5') ; 110,3 (*C*2') ; 104,6 (*C*4a) ; 91,4 (*C*8) ; 88,6 (*C*6) ; 73,9 (*C*2) ; 71,6 (*C*3) ; 70,5 (*C*4) ; 69,8 (*C*9) ; 63,6 (*C*10) ; 56,4 (CH_3) ; 55,8 (2 CH_3) ; 55,0 (CH_3)
HRMS: $[M-Na]^+$= 507,0638 (calculée pour $C_{21}H_{25}0_8NaBr$: 507,0625)

- 3',4',5,7-tétraméthoxy-8-bromocatéchine **125**



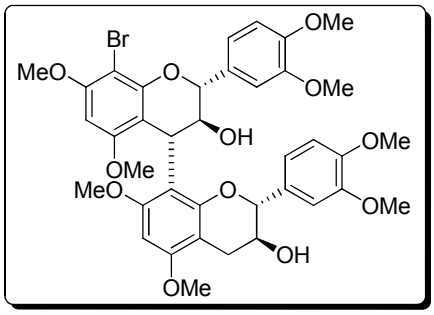
Protocole général *C* :

- Bromation de la position 8

Quantité: Catéchine méthylée **122**: 500 mg, 1,45 mmol ; NBS : 262 mg, 0,58 mmol, 1 éq., dichlorométhane : 2 ml
Rendement : 100% (poudre blanche)

RMN ^1H (300 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ =. 6,97 (H2', *s*, 1H) ; 6,94 (H6', d, 1H, $J_{6'5'}$ =7,93 Hz) ; 6,88 (H5', d, 1H ; $J_{6'5'}$ = 7,93 Hz) ; 6,15 (H6, *s*, 2H) ; 4,87 (H2, d, 1H, $J_{2,3}$=7,32 Hz) ; 4,08 (H3, m, 1H,) ; 3,94 (CH_3, *s*, 3H) ; 3,89 (2CH_3, *s*, 6H) ; 3,82 (CH_3, *s*, 3H) ; 2,93 et 2,67 (H4α et H4β, ABX, 2H, $J_{4\alpha,4\beta}$ = 16,48 Hz, $J_{4\alpha,3}$= 5,24 Hz, $J_{4\beta,3}$ = 7,94 Hz)
RMN ^{13}C (100,6 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 158,9 (*C*7) ; 156,21 (*C*5) ; 155,0 (*C*8a) ; 149,5 (*C*3' et *C*4') ; 130,0 (*C*1') ; 119,4 (*C*6') ; 111,6 (*C*5') ; 110,1 (*C*2') ; 103,4 (*C*4a) ; 91,2 (*C*8) ; 89,6 (*C*6) ; 82,1 (*C*2) ; 68,1 (*C*3) ; 56,9 (CH_3) ; 56,3 (2 CH_3) ; 56,0 (CH_3) ; 27,4 (*C*4)
HRMS: $[M-Na]^+$= 447,0433 (calculée pour $C_{19}H_{21}0_6NaBr$: 447,0413)

- 3',4',5,7-tétraméthoxy-8-bromocatéchine-4a-8-(3',4',5,7-tétra-*O*-méthylcatéchine **126**



Protocole général D :

- Couplage cationique catalysé avec $TiCl_4$

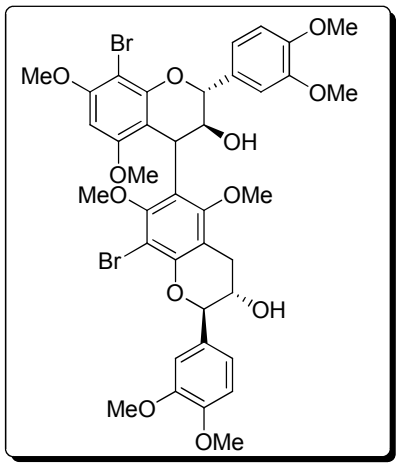
Quantité : Catéchine méthylée **122**: 61,8 mg, 0,1786 mmol ; Catéchine méthylée activée bromée **124**: 87 mg, 0,1786 mmol, 1 éq. ; $TiCl_4$: 0,37 ml, 0,3573 mmol, 2 éq. ; dichlorométhane : 1,5 ml ; THF : 1,5 ml.
Purification : Chromatographie sur gel de silice (pentane/acétate d'éthyle 30/70)
Rendement : 69% (poudre rosée)

RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$, ppm, mélange de deux rotamères 70/30) δ = 7,16-6,52 (H2'B et E, H5'B et E, H6'E Maj et min, H6'B min, m, 5,3H) ; 6.31 (H6'B Maj , d, 0,7H, $J_{6',5'}$ = 7,9 Hz) ; 6,23 (H6D Maj, *s*, 0,7H) ; 6,12 (H6A Maj ; *s*, 0,7H) ; 6,05 (H6A et H6D min, *s*, 0,6H) ; 4,84 (H3F min, m, 0,3H); 4,68 (H4C Maj et min, d, 1H, $J_{3C,4C}$ = 8,56 Hz) ; 4,55 (H2C Maj et min, d, 1H, $J_{2C,4C}$ = 9,6 Hz) ; 4,35 (H3F Maj, m, 0,7H) ; 4,29 (H3C min, m, 0,3H) ; 4,10 (H3C Maj, m, 0,7H) ; 3,98-3,41 (4 CH_3 Maj et min, H2F Maj et min, m, 25H) ; 3,05 et 2,52 (H4Fα et H4Fβ Maj, ABX, 1,4H, $J_{4F\alpha,4F\beta\ Maj}$ = 16,26 Hz , $J_{4F\alpha,3F\ Maj}$ = 5,58 Hz et $J_{4F\beta,3F\ Maj}$ = 9,91 Hz) ; 2,98 et 2,70 (H4Fα et H4Fβ min, m, 0,6H)
RMN ^{13}C (100,6 MHz, $CDCl_3$, ppm, mélange de deux rotamères 77/23) : δ = 159,2 ; 158,7 ; 157,5 ; 156,1 ; 154,3 ; 153,7 (*C*5D, *C*7D, *C*5A, *C*7A, *C*8aD, *C*8Aa Maj et min) ; 150-149,2 (*C*3'B, *C*3'E, *C*4'B, *C*4'E Maj et min) ; 131,8 (*C*1'B min); 131,7 (*C*1'B Maj) ;130,4 (*C*1'E Maj) 129,8 (*C*1'E min) ; 120,6 ; 119,7 (*C*6'B, *C*6'E Maj et min) ; 113,3 ; 112,0 (*C*5'B, *C*5'E Maj et min) ; 111,7; 111,3 (*C*2'E, *C*2'B Maj et min) ; 110,6 (*C*8D Maj et min) ; 110,5 (*C*4aA Maj et min) ; 104,1 (*C*4aD Maj et min) ; 90,9 (*C*6A et

C8A Maj et min) ; 90,0 (C6D Maj et min) ;,6 (C2C, min) ; 82,9 (C2C, Maj) ; 82,4 (C2F, Maj et min) ; 74,8 (C3C, min) ; 73,6 (C3C, Maj) ; 69,9 (C2F, Maj) ; 69,9 (C2F, min) ; 58,0 (CH_3 min) ; 57,4 (CH_3 Maj) ; 57,2 (CH_3 Maj et min) ; 57,1 (CH_3 min) ; 56,9 (2 CH_3 Maj et min) ; 56,8 (CH_3 Maj) ; 56,7 (CH_3 Maj) ; 56,6 (CH_3 min) ; 56,5 (CH_3 Maj et min) ;. 56,3 (CH_3 Maj et min) ; 38,3 (C4C min) ; 37,8 (C4C, Maj) ; 30,6 (C4F, min) ; 29,7 (C4F, Maj)

SM (MALDI): $[M-H]^-$= 767,17 (calculée pour $C_{38}H_{40}O_{12}Br$: 769,1860)

☙ 3',4',5,7-tétraméthoxy-8-bromocatéchine-4α-6-(3',4',5,7-tétra-O-méthylcatéchine) **127**



Protocole général D :

- Couplage cationique catalysé avec $TiCl_4$

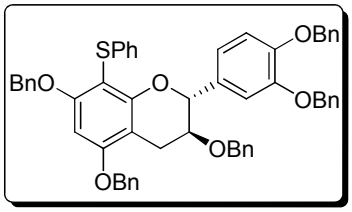
Quantité : Catéchine méthylée bromée **125**: 21,5 mg, 0,05 mmol ; Catéchine méthylée activée bromée **124** : 253 mg, 0,253 mmol, 5 éq. ; $TiCl_4$: 0,5 ml, 0,506 mmol, 10 éq. ; dichlorométhane : 2 ml ; THF : 2 ml.

Purification : Chromatographie sur gel de silice (pentane/acétate d'éthyle 30/70).

Rendement : Pas de produit isolé mais détection du produit en spectrométrie de masse.

SM (MALDI): $[M-H]^-$= 845,05 (calculée pour $C_{38}H_{39}O_{12}Br_2$: 845,0808)

☙ 3',4',3,5,7-penta-O-benzyl-8-thiol-catéchine **129**



0,688 mg de penta-O-benzyl-8-bromo-catéchine **116** (0,839 mmol) sont dissous dans 20 ml de THF. 0,64 ml de butyllithium (1,091 mmol, 1,3 éq.) sont alors ajoutés goutte à goutte à -78°C. Après 30 minutes d'agitation à -78°C, 256 mg de diphényl disulfide (1,175 mmol, 1,4 éq.) sont ajoutés puis le milieu réactionnel est laissé revenir à température ambiante et l'agitation magnétique est poursuivie pendant 2 heures.

Le milieu réactionnel est dilué dans de l'eau et dans une solution saturée en NaCl puis il est extrait avec du dichlorométhane. Les phases organiques combinées sont lavées à l'eau puis avec de la saumure, séchées sur sulfate de magnésium et le solvant est évaporé.

Après purification par chromatographie sur gel de silice (pentane/acétate d'éthyle 90/10). Un solide blanc est obtenu.

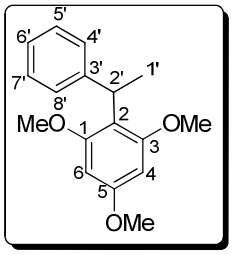
Rendement : 66%

RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 7,44-7,01 ($H_{aromatiques}$ Bn et Ph, m, 30H) ; 6,82 (H2', s, 1H) ; 6,80 (H5', d, 1H, $J_{5',6'}$ = 8,29 Hz) ; 6,67 (H6', d, 1H, $J_{6',5'}$ = 8,29 Hz) ; 6,27 (H6, s, 1H) ; 5,13 (CH_2Bn, s, 2H) ; 5,08 (CH_2Bn, s, 2H) ; 5,01 (CH_2Bn, s, 2H) ; 4,94 (H2, d, 1H, $J_{2,3}$ = 6,78 Hz) ; 4,88 (CH_2Bn, s, 2H) ; 4,30 et 4,19 (Ha et Hb -CH_2Bn, d, 2H, J = 12,05 Hz) ; 3,66 (H3, m, 1H) ; 2,92 et 2,75 (H4α et H4β, ABX, 2H, $J_{4\alpha,4\beta}$ = 16,58 Hz, $J_{4\alpha,3}$ = 5,28 Hz et $J_{4\beta,3}$ = 7,53 Hz)

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 159,6 (C7) ; 158,6 (C5) ; 156,3 (C8a) ; 148,8 (C4') ; 148,6 (C3') ; 139,3 (CqBn) ; 138,1 (CqBn) ; 137,4 (CqBn) ; 137,3 (CqBn) ; 137,0 (CqBn) ; 136,7 (CqPh) ; 132,2 (C1') ; 128,7 (3 CHBn) ; 128,5 (4 CHBn) ; 128,4 (2 CHBn) ; 128,3 (3 CHBn) ; 128,1 (CHBn) ; 127,8 (4 CHBn) ; 127,6 (2 CHBn) ; 127,5 (2 CHBn) ; 127,3(4 CHBn) ; 127,1 (2 CHPh) ; 126,6 (2 CHPh) ; 124,6

(CHPh) ; 120,0 (C6') ; 114,9 (C5') ; 113,3 (C2') ; 103,4 (C4a) ; 100,1 (C8) ; 92,22 (C6) ; 79,5 (C2) ; 74,4 (C3) ; 71,5 (CH_2Bn) ; 71,3 (CH_2Bn) ; 71,2 (CH_2Bn) ; 71,1 (CH_2Bn) ; 70,2 (CH_2Bn) ; 25,6 (C4)
SM (MALDI): $[M-H]^+$= 849,0 (calculée pour $C_{56}H_{49}O_6S$: 849,3250)

- 1,3,5-triméthoxy-2-phényléthyl-benzène **149**



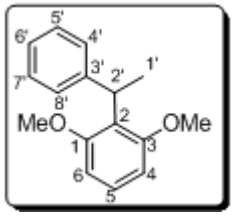
Protocole général F :

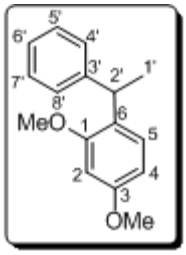
- Couplage catalysé à l'or

Quantité : Triméthoxybenzène **147**: 84,35 mg, 0,5 mmol ; 1-phényléthanol **143** : 60 µl, 0,5 mmol, 1 éq., $NaAuCl_4.2H_2O$: 10 mg, 25 µmol, 0,05 éq. ; dichlorométhane : 2,5 ml, Temps de réaction : 12h
Rendement : 35%

RMN ^{1}H (200 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 7,34-7,29 ($H_{aromatiques}$, m, 5H) ; 6,17 (H4 et H6, s, 2H) ; 4,80 (CH, q, 1H, J = 7,27 Hz) ; 3,83 (CH_3, s, 3H) ; 3,73 ($2CH_3$, s, 6H) ; 1,69 (CH_3, d, J = 7,27 Hz)
RMN ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 161,5 (C5) ; 159,3, 158,9 (C3, C1) ; 146,5 (C3') ; 127,4 (C5', C7'), 127,2 (C8', C4'), 124,8 (C6') ;; 115,7 (C1) ; 92,8, 91,3 (C4, C6) ; 55,6, 55,3, 55,2 ($3CH_3O$) ; 32,8 (C2') ; 17,7 (C1')
HRMS: $[M-H]^+$= 273,1486 (calculée pour $C_{17}H_{21}O_3$: 273,1485)

- 1,3-diméthoxy-2-phényléthyl-benzène **148**
- 1,3-diméthoxy-6-phényléthyl-benzène **150**





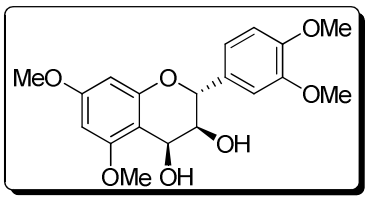
Protocole général E :

- Couplage catalysé à l'or

Quantité : 1-phényléthanol **143**: 60 µl, 0,5 mmol ; 1,3-diméthoxybenzène **146**: 68,7 µl, 0,5 mmol ; 1 éq., $NaAuCl_4.2H_2O$: 10 mg, 25 µmol, 0,05 éq. ; dichlorométhane : 2,5 ml, Temps de réaction : 12h
Rendements : 1,3 -diméthoxy-2-phényléthyl-benzène **148** : 19%
1,3 -diméthoxy-6-phényléthyl-benzène **150** : 53%

Composé 148 :
RMN ^{1}H (250 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 7,31-7,19 ($H_{aromatiques}$, m, 5H) ; 7,14 (H5, t, 1H, $J_{5,4et6}$ = 8,33 Hz) ; 6,55 (H4 et H6, d, 2H, $J_{6et4,5}$ = 8,33 Hz) ; 4,87 (CH, q, 1H, J = 7,13 Hz) ; 3,71 (CH_3, s, 6H) ; 1,68 (CH_3, d, J = 7,13 Hz)
RMN ^{13}C (63 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 159,4 (C3, C1) ; 146,5 (C3') ; 127,8 (C5', C7'), 127,4 (C8', C4') ; 130,6 (C5) ; 125,2(C6') ; 117,2 (C2) ; 95,8 (C6, C4) ; 56,2 ($2CH_3O$) ; 31,6 (C2') ; 18,1 (C1')
HRMS: $[M-H]^+$= 227,1378 (calculée pour $C_{16}H_{21}O_3$: 243,1379)
Composé 150 :
RMN ^{1}H (250 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 7,29-7,17 ($H_{aromatiques}$, m, 5H) ; 7,07 (H5, d, 1H, $J_{5,4}$ = 7,5 Hz) ; 6,55 (H2, d, 1H, $J_{2,4}$= 1,4 Hz) ; 6,45 (H4, dd, 1H, $J_{2,4}$= 1,5 Hz, $J_{5,4}$ = 7,5 Hz) ; 4,51 (CH, q, 1H, J = 7,13 Hz) ; 3,80 (CH_3, s, 3H) ; 3,77 (CH_3, s, 3H) ; 1,58 (CH_3, d, J = 7,13 Hz)
RMN ^{13}C (63 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 159,9 (C3) ; 158,8 (C1) ; 146,3 (C3') ; 127,5 (C5', C7'), 127,3 (C8', C4') ; 130,4 (C5) ; 125,1 (C6') ; 117,2 (C6) ; 94,7, 95,6 (C2, C4) ; 56,2, 55,9 ($2CH_3O$) ; 31,4 (C2') ; 18,2 (C1')
HRMS: $[M-H]^+$= 243,1380 (calculée pour $C_{16}H_{19}O_2$: 243,1379)

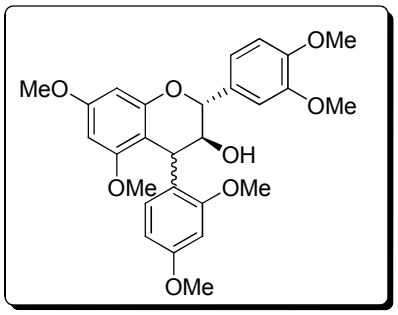
☙ 3',4',5,7-tétraméthoxy-4-hydroxyl-catéchine **151**



843 mg de catéchine méthylée **122** (2,43 mmol) sont dissous dans 20 ml de dichlorométhane. 131 µl d'eau (7,3 mmol, 3 éq.) et 1,66 g de DDQ (7,3 mmol, 3 éq.) sont ajoutés, puis la solution est laissée sous agitation pendant 12 heures. 743 mg de DMAP (6,08 mmol, 2,5 éq.) sont alors additionnés, puis après 15 min le solvant est évaporé. Après purification par chromatographie sur gel silice (pentane/acétate d'éthyle 60/40), le produit **151** est obtenu.
Rendement : 26%

RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 7,04 (H6', d, 1H, $J_{6'5'}$ =7,88 Hz) ; 7,01 (H2', s, 1H) ; 6,92 (H5', d, 1H ; $J_{6'5'}$ = 7,88 Hz) ; 6,12 (H6 et H8, s, 2H) ; 5,04 (H4, d, 1H, $J_{4,3}$ = 4,4 Hz) ; 4,92 (H2, d, 1H, $J_{2,3}$= 10,1 Hz) ; 3,95 (H3, m, 1H,) ; 3,91 (CH_3, s, 3H) ; 3,90 (CH_3, s, 3H) ; 3,86 (CH_3, s, 3H) ; 3,76 (CH_3, s, 3H)
RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 167,3 (C7) ; 165,2 (C5) ; 162,4 (C8a) ; 150,1 (C3') ; 149,4 (C4') ; 129,3 (C1') ; 120,6 (C6') ; 111,5 (C5') ; 111,3 (C2') ; 103,2 (C4a) ; 93,6 (C8) ; 92,4 (C6) ; 83,6 (C2) ; 72,9 (C3) ; 62,5 (C4) ; 56,5 (CH_3) ; 56,3 (CH_3) ; 56,2 (CH_3) ; 56,0 (CH_3)
HRMS: $[M-Na]^+$= 385,1256 (calculée pour $C_{19}H_{22}O_7Na$: 385,1263)

☙ 3',4',5,7-tétraméthoxy-catéchine-4-(2,4-diméthoxybenzène) **152**



Protocole général E :

- Couplage catalysé à l'or

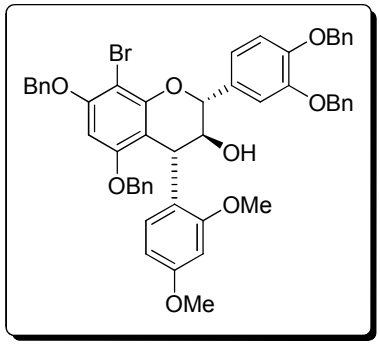
Quantité : catéchine-4-hydroxyle méthylée **151** : 113 mg, 0,311 mmol, 1,3-diméthoxybenzène **146**: 81 µl, 0,623 mmol ; 2 éq. ; $NaAuCl_4.2H_2O$: 6,2 mg, 15 µmol, 0,05 éq. ; dichlorométhane : 3 ml, Temps de réaction : 12h
Purification : Chromatographie sur gel de silice pentane/acétate d'éthyle 80/20.
Rendements : **152** : 58% (**152a (α)** : 56%, **152b (β)** : 44%)

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 7,02-6,84 (H2', H5' et H6' α et β, m, 3H) ; 6,74 (H6Dβ, d, 0,4H, $J_{6Dβ,5Dβ}$ = 8,48 Hz) ; 6,68 (H6Dα, d, 0,6H, $J_{6Dα,5Dα}$ = 8,48 Hz) ; 6,53 (H3Dβ, d, 0,4H, $J_{3Dβ,5Dβ}$ = 2,31 Hz) ; 6,48 (H3Dα, d, 0,6H, $J_{3Dα,5Dα}$ = 2,31 Hz) ; 6,44 (H5Dβ, dd, 0,4H, $J_{5Dβ,6Dβ}$ = 8,48 Hz, $J_{5Dβ,3Dβ}$ = 2,31 Hz) ; 6,34 (H5Dα, dd, 0,6H, $J_{5Dα,6Dα}$ = 8,48 Hz, $J_{5Dα,3Dα}$ = 2,31 Hz) ; 6,23 (H6α, d, 0,6H, $J_{6α,8α}$ = 2,12 Hz) ; 6,20 (H6β, d, 0,4H, $J_{6β,8β}$ = 2,12 Hz) ; 6,08 (H8α et B, d, 1H, $J_{8aβ,6aβ}$ = 2,12 Hz) ; 4,97 (H4β, d, 0,4H, $J_{4β,3β}$ = 5,5 Hz) ; 4,67 (H2α et β, d, 1H, $J_{2aβ,3aβ}$ = 8,7 Hz) ; 4,52 (H4α, d, 0,6H, $J_{4α,3α}$ = 8,5 Hz) ; 4,33 (H3β, dd, 0,4H, $J_{3β,4β}$ = 5,5 Hz, $J_{3β,2β}$ = 8,7 Hz) ; 4,04 (H3α, dd, 0,6H, $J_{3α,4α}$ = 8,5 Hz, $J_{3α,2α}$ = 8,7 Hz) ; 3,89 (OCH_3β, s, 1,3H) ; 3,88 (OCH_3α, s, 1,7H) ; 3,87 (OCH_3α et β, s, 3H) ; 3,85 (OCH_3α et β, s, 3H) ; 3,80 (OCH_3β, s, 1,3H) ; 3,79 (OCH_3β, s, 1,3H) ; 3,77 (2 OCH_3α, s, 3,4H) ; 3,60 (OCH_3β, s, 1,3H) ; 3,43 (OCH_3α, s, 1,7H)
RMN ^{13}C (100,6 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 160,6 (CqDb) ; 160,1 (CqDa) ; 159,7 (CqDb) ; 159,2 (CqDa) ; 159,1 (C7a); 158,6 (C7b) ; 158,3 (C5b) ; 158,0 (C5a) ; 157,9 (C8aa) ; 156,32 (C8ab) ; 149,4-149,1 (C3' et C4' a et b) ; 131,3 (C1'b) ; 130,7 (C1'a) ; 120,8 (C6'b) ; 120,5 (C6'a) ; 111,3 (C5' a et b) ; 111,2 (C2' a et b) ; 110,8 (C1Db) ; 110,3 (C1Da) ; 105,2 (C4aa) ; 105,0 (C4ab) ; 98,8 (C8 et C6 a et b) ; 93,9 (C6Da, C5Da et C3Da) ; 92,8 (C6Db) ; 92,4 (C5Db et C3Db) ; 82,5 (C2 a et b) ; 76,5 (C3 a et b) ; 56,1-55,5 (6 CH_3 a et b) ; 35,2 (C4 a et b)
HRMS: $[M-H]^+$= 483,2026 (calculée pour $C_{27}H_{31}O_8$: 483,2013

☙ 3', 4', 5, 7-tétra-O-benzyl-8-bromocatéchine-4a-(2, 4-diméthoxybenzène) **153**

Protocole général E :

- Couplage catalysé à l'or



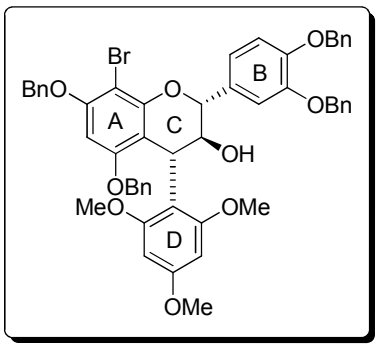
Quantité : catéchine benzylée activée bromée **59d** : 119 mg, 0,15 mmol, 1,3-dimethoxybenzène **146** : 40 mg, 0,30 mmol ; 2 éq. ; $NaAuCl_4.2H_2O$: 3 mg, 7,5 µmol, 0,05 éq. ; dichlorométhane : 1,5 ml, Temps de réaction : 12h
Purification : Chromatographie sur gel de silice pentane/acétate d'éthyle 85/15.
Rendements : 80%

RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 7,47-7,29 ($H_{aromatiques}$ Bn, m, 18H) ; 7,12 (H2', s, 1H,) ; 7,01 (H6', s, 1H) ; 6,95 (H5', s, 1H) ; 6,81 (H2 ou $H6_{aromatique}$OBn-5A, s, 1H) ; 6,79 (H2 ou $H6_{aromatique}$OBn-5A, s, 1H) ; 6,53 (H6D, d, 1H, J = 8,3 Hz) ; 6,37 (H6, s, 1H) ; 6,29 (H5D, d, 1H, J = 8,3 Hz) ; 6,25 (H3D, s, 1H) ; 5,13 (3 CH_2Bn, s, 6H) ; 4,80 et 4,55 (H_a et H_b CH_2Bn-5A, d, 2H, J = 8,5 Hz) ; 4,74 (H4, s, 1H,) ; 4,58 (H2, s, 1H) ; 4,05 (H3, m, 1H) ; 3,76 et 3,67 (2-OCH_3, s, 3H)
RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 160,2 (CqD) ; 159,6 (CqD); 156,6 (C7) ; 154,8 (C5) ; 154,3 (C8a) ; 149,6 (C4') ; 149,3 (C3') ; 137,5 (CqBn) ; 137,7 (CqBn) ; 136,9 (CqBn) ; 136,7 (CqBn) ; 131,5 (C1') ; 128,9 (2 CHBn) ; 128,5 (4 CHBn) ; 128,3 (2 CHBn) ; 128,1 (2 CHBn) ; 127,7 (4 CHBn) ; 127,5 (2 CHBn) ; 127,4 (4 CHBn) ; 121,3 (C6') ; 115,4 (C5') ; 114,5 (C2') ; 112,9 (C1D), 111,4 (C4a) ; 93,9 (C6) ; 93,5 (C8) ; 93,1 (C6D) ; 92,7 (C5D ou C3D) ; 91,9 (C5D ou C3D) ; 82,5 (C2) ; 73,4 (C3) ; 71,8 (CH_2Bn) ; 71,4 (CH_2Bn) ; 71,3 (CH_2Bn) ; 70,9 (CH_2Bn) ; 56,3 (CH_3) ; 55,9 (CH_3) ; 38,4 (C4)
HRMS: $[M-H]^+$= 865,2326 (calculée pour $C_{51}H_{46}Br0_8$: 865,2370)

☙ 3',4',5,7-tétra-O-benzyl-8-bromocatéchine-4-(2,4,6-triméthoxybenzène) **154**

Protocole général E :

- Couplage catalysé à l'or

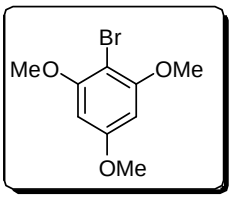


Quantité : catéchine benzylée activée bromée **59d**: 119 mg, 0,15 mmol ; 1,3,5-triméthoxybenzène **147**: 28 mg, 0,15 mmol ; 1 éq. ; $NaAuCl_4.2H_2O$: 3 mg, 7,5 µmol, 0,05 éq. ; dichlorométhane : 1,5 ml, Temps de réaction : 4h
Purification : Chromatographie sur gel de silice dichlorométhane/ pentane 80/20.
Rendements : 90%

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 7,50-7,27 ($H_{aromatiques}$ Bn, m, 18H) ; 7,24 (H2', d, 1H, $J_{2',6'}$ = 2 Hz) ; 7,14 (H6', dd, 1H, $J_{6',5'}$ = 8,4 Hz, $J_{6',2'}$ = 2 Hz) ; 6,98 (H5', d, 1H, $J_{5',6'}$ = 8,4 Hz) ; 6,91 (H2 ou $H6_{aromatique}$OBn-5A, d, 1H, J = 2 Hz) ; 6,92 (H2 ou $H6_{aromatique}$OBn-5A, d, 1H, J = 3,2 Hz) ; 6,16 (H6, s, 1H) ; 6,07 et 5,99 (H3D et H5D, s, 2H) ; 5,21 (CH_2Bn, d, 2H, J = 4,9 Hz) ; 5,18 (CH_2Bn, s, 2H) ; 5,08 (CH_2Bn, d, 2H, J = 2,9 Hz) ; 4,75 et 4,53 (H_a et H_b CH_2Bn-5A, d, 2H, J = 11 Hz) ; 4,69 (H4, d, 1H, $J_{4,3}$ = 8,53 Hz) ; 4,62 (H2, d, 1H, $J_{2,3}$ = 9,68 Hz) ; 4,12 (H3, dd, 1H, $J_{4,3}$ = 8,53 Hz, $J_{2,3}$ = 9,68 Hz) ; 3,80 (CH_3 4D, s, 3H), 3,50 et 3,33 (2 CH_3 2D et 5D, s, 6H)
RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 160,4 (CqD) ; 159,8 (CqD) ; 159,6 (CqD); 156,3 (C7) ; 154,2 (C5) ; 154,1 (C8a) ; 149,3 (C4') ; 149,2 (C3') ; 137,6 (CqBn) ; 137,5 (CqBn) ; 137,1 (CqBn) ; 136,8 (CqBn) ; 131,6 (C1') ; 128,7 (4 CHBn) ; 128,4 (2 CHBn) ; 128,1 (4 CHBn) ; 128,0 (2 CHBn) ; 127,9 (2 CHBn) ; 127,8 (2 CHBn) ; 127,5 (2 CHBn) ; 127,4 (2 CHBn) ; 121,1 (C6') ; 115,0 (C5') ; 114,7 (C2') ;

112,8 (C1D), 111,1 (C4a) ; 93,7 (C6) ; 93,2 (C8) ; 92,5 (C5D ou C3D) ; 91,5 (C5D ou C3D) ; 82,4 (C2) ; 73,9 (C3) ; 71,6 (CH_2Bn) ; 71,5 (CH_2Bn) ; 71,5 (CH_2Bn) ; 70,5 (CH_2Bn-5A) ; 56,1 (2 CH_3) ; 55,5 (CH_3) ; 37,6 (C4)
HRMS: $[M-H]^+$= 917,2256 (calculée pour $C_{52}H_{47}BrO_9Na$: 917,2295)

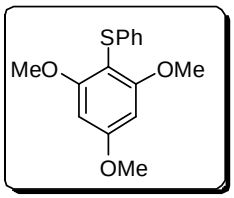
☙ Bromo-2,4,6-triméthoxybenzène **155**



421 mg de 1,3,5-triméthoxybenzène **147** (2,5 mmol) sont dissous dans 20 ml de dichlorométhane. A -78°C, 490 mg de NBS (2,75 mmol, 1,1 éq.) préalablement recristallisés et dissous dans 15 ml de dichlorométhane sont ajoutés à l'aide d'une ampoule d'addition en 5 minutes. On laisse revenir le milieu réactionnel à température ambiante et l'agitation est maintenue pendant 7 heures. De l'eau est additionnée et la phase aqueuse est alors extraite au dichlorométhane. Les phases organiques combinées sont lavées à l'eau puis avec de la saumure, séchées sur sulfate de magnésium et le solvant est évaporé. Un solide blanc est obtenu.
Rendement : 100%

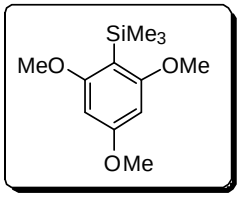
RMN ^{1}H (200 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 6,16 (H3 et H5, s, 2H) ; 3,86 (CH_3O-2, CH_3O-6, s, 6H) ; 3,81 (CH_3O-4, s, 3H)
RMN ^{13}C (63 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 160,4 (C4) ; 157,4 (C2, C6) ; 91,5 (C1, C3, C5), 56,3 (CH_3-2, CH_3-6) ; 55,4 (CH_3-4)
MS (GC, EI): $[M]^{+\bullet}$= 245,8 (calculée pour $C_9H_{11}BrO_3$: 245,9891)

☙ Phenyl(2,4,6-triméthoxyphenyl)sulfane **156**



225 mg de triméthoxybenzène bromé **155** (0,91 mmol) sont dissous dans 10 ml de THF et 0,44 ml de *n*-butyllithium (C= 2,27, 1 mmol, 1,1 éq.) sont ajoutés à -78°C. Après 30 minutes d'agitation à -78°C, 218 mg de diphényl disulfide (1 mmol, 1,1 éq.) sont ajoutés puis le milieu réactionnel est laissé revenir à température ambiante et l'agitation magnétique est poursuivie pendant 2 heures.
Le milieu réactionnel est dilué dans de l'eau et dans une solution saturée en NaCl puis il est extrait avec du dichlorométhane. Les phases organiques combinées sont lavées à l'eau puis avec de la saumure, séchées sur sulfate de magnésium et le solvant est évaporé.
Après purification par chromatographie sur gel de silice (pentane/acétate d'éthyle 98/2), Un solide blanc est obtenu.
Rendement : 85%
RMN ^{1}H (200 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 7,15-7,00 (H_{Ph}, m, 5H) ; 6,21 (H5 et H3, s, 2H) ; 3,87 (CH_3-4, s, 3H); 3,80 (CH_3-2, CH_3-6, s, 6H)
RMN ^{13}C (63 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 162,8 (C4) ; 162,4 (C2, C6) ; 138,6 (Cq Ph) ; 128,4 (2 CH Ph) ; 125,5 (2 CH Ph) ; 124,3 (CH Ph) . 91,1 (C1, C3, C5), 56,2 (CH_3-2, CH_3-6) ; 55,2 (CH_3-4)
MS (GC, EI): $[M]^{+\bullet}$= 276,0 (calculée pour $C_{15}H_{16}O_3S$: 276,0820)

☙ Trimethyl(2,4,6-trimethoxyphenyl)silane **157**

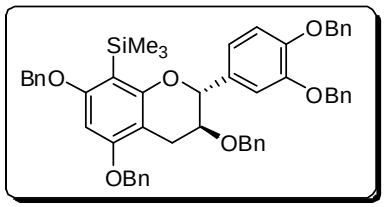


112 mg de triméthoxybenzène bromé **155** (0,45 mmol) sont dissous dans 5 ml de THF et 0,23 ml de butyllithium (0,5 mmol, 1,1 éq.) sont ajoutés à -78°C. Après 30 minutes d'agitation à -78°C, 63,9 µl de chlorure de triméthylsilane (1 mmol, 1,1 éq.) sont ajoutés puis le milieu réactionnel est laissé revenir à température ambiante et l'agitation magnétique est poursuivie pendant 2 heures.

Le milieu réactionnel est dilué dans de l'eau et de la saumure puis il est extrait avec du dichlorométhane. Les phases organiques combinées sont lavées à l'eau puis avec de la saumure, séchées sur sulfate de magnésium et le solvant est évaporé.
Après purification par chromatographie sur gel de silice (éther de pétrole/acétate d'éthyle 98/2), un solide blanc est obtenu.
Rendement : 46%

RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 6,10 (H5 et H3, s, 2H) ; 3,78 (CH_3-2, CH_3-6, s, 6H) ; 3,74 (CH_3-4, s, 3H) ; 0,24 ($3CH_3$-Si, s, 9H)
RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 166,3 (C2, C6) ; 163,0 (C4) ; 105,8 (C1) ; 90,4 (C3, C5), 55,1 ($3CH_3$) ; 1,5 ($3CH_3$-Si)
RMN ^{29}Si (59,6 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = - 6,3
MS (GC, EI): $[M]^{+\bullet}$= 240,3 (calculée pour $C_{15}H_{16}O_3S$: 240,1182)

☙ 3',4',3,5,7-penta-O-benzyl-8- triméthylsilane-catéchine **158**



300 mg de catéchine pentabenzylée bromée **116** (0,37 mmol) sont dissous dans 5 ml de THF et 0,18 ml de butyllithium (0,4 mmol, 1,1 éq.) sont ajoutés à -78°C. Après 30 minutes d'agitation à -78°C, 51,4 µl de chlorure de triméthylsilane (1 mmol, 1,1 éq.) sont ajoutés puis le milieu réactionnel est laissé revenir à température ambiante et l'agitation magnétique est poursuivie pendant 6 heures.
Le milieu réactionnel est dilué dans de l'eau et de la saumure puis il est extrait avec du dichlorométhane. Les phases organiques combinées sont lavées à l'eau puis avec de la saumure, séchées sur sulfate de magnésium et le solvant est évaporé.
Après purification par chromatographie sur gel de silice (éther de pétrole/acétate d'éthyle 98/2), un solide blanc est obtenu.
Rendement : 25%

RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = 7,52-7,23 ($H_{aromatiques}$ Bn, m, 25H) ; 7,07 (H2', s, 1H) ; 6,98 (H5' et H6', s, 2H) ; 6,19 (H6, s, 1H) ; 5,23 (CH_2Bn, s, 2H) ; 5,12 (CH_2Bn, s, 2H) ; 5,04 (CH_2Bn, s, 2H) ; 5,02 (CH_2Bn, s, 2H) ; 4,71 (H2, d, 1H, $J_{2,3}$ = 8,29 Hz) ; 4,37 et 4,25 (Ha et Hb -CH_2Bn, d, 2H, J = 12,05 Hz) ; 3,75 (H3, m, 1H) ; 2,91 et 2,75 (H4α et H4β, ABX, 2H, $J_{4\alpha,4\beta}$ = 16,2 Hz, $J_{4\alpha,3}$ = 5,65 Hz et $J_{4\beta,3}$ = 9,04 Hz)
RMN ^{29}Si (59,6 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ = - 6,58

III. Caractérisation et quantification des procyanidines du vin et des raisins

La grande variété de composés différents présents dans le vin et le raisin rend l'analyse qualitative et quantitative des procyanidines particulièrement complexe. Certaines méthodes comme la méthode de dépolymérisation par thiolyse ou phloroglucinolyse ou encore l'indice de densité optique à 280 nm permettent de quantifier respectivement les proanthocyanidines ou polyphénols totaux dans du vin ou des extraits de raisins. Néanmoins, ces méthodes permettent uniquement des dosages globaux et seules les méthodes chromatographiques permettent de caractériser et quantifier individuellement les différents monomères et procyanidines. Les procyanidines présentent une grande diversité structurale (degré de polymérisation, stéréochimie en positions 3, régio- et stéréochimie de la liaison interflavane) et un grand nombre d'isomères sont rencontrés. L'utilisation de standards parfaitement caractérisés est donc essentielle à une analyse qualitative et quantitative. Peu de procyanidines sont commerciales et les seules disponibles présentent, de plus, un prix prohibitif (dimère B1 **37** : 283 k€ /g, dimère B2 **53** : 98 k€ /g, Sigma-Aldrich). Les monomères constitutifs des procyanidines sont également disponibles commercialement à des prix beaucoup plus modérés à l'exception du monomère gallate (catéchine **1** : 8 € /g, épicatéchine **2** : 129 €/g, épicatéchine gallate **3** : 18 K€/g, Sigma-Aldrich). La méthode de synthèse développée au laboratoire nous a permis d'accéder, non seulement au monomère gallate et aux deux dimères commerciaux, mais également à d'autres procyanidines (3 dimères, 2 trimères et 1 tétramère) à partir des composés catéchine **1** et épicatéchine **2** beaucoup plus abordables. Ces composés vont pouvoir être utilisés comme standards afin de les caractériser et les quantifier dans des extraits de raisins et du vin.

La première étape essentielle avant de quantifier les procyanidines est de réaliser leur extraction à partir des pépins et des pellicules des raisins mais aussi à partir du vin même si l'analyse de ce dernier peut également être effectuée en injection directe.

III.1 Bibliographie

III.1.1. Extraction des procyanidines à partir du raisin et du vin

L'extraction des procyanidines à partir des pépins et des pellicules peut être réalisée avec plusieurs solvants tels que le méthanol,[41,42,59] l'acétone, des combinaisons de ces solvants[57] ou bien des mélanges aqueux tels que eau/acétone,[176] eau/méthanol[55] ou eau/éthanol.[177] Il est possible de rajouter des agents antioxydants à la solution d'extraction ($NaHSO_3$,[177] acide ascorbique[57,41,42]). Une extraction avec du chloroforme peut être réalisée, simultanément ou non à la première extraction, afin d'éliminer les lipides, les chlorophylles et d'autres composés indésirables.[27,39,177,178] Cette étape d'extraction est généralement suivie d'une étape de fractionnement qui peut être réalisée en phase liquide avec des solvants polaires (acétate d'éthyle en particulier[54,178,179]) ou bien en phase solide avec divers supports (Fractogel TSK,[69,70] cartouche C18[57]). Cette étape, qui peut être également appliquée aux vins, permet d'obtenir des fractions avec des DPm différents ou bien d'isoler une classe spécifique de composés. Néanmoins, ces méthodes de fractionnement peuvent modifier la composition initiale en procyanidines (oxydation, hydrolyse, isomérisation),[180] et l'injection directe, notamment des vins, est de plus en plus effectuée.[181,182,183]

III.1.2. Séparation des procyanidines par chromatographie

L'utilisation de la chromatographie liquide haute pression permet de séparer et quantifier les procyanidines dans des extraits et dans le vin. La chromatographie en phase inverse est la technique la plus communément utilisée mais l'analyse en phase normale, permettant une séparation en fonction du degré de polymérisation, est également employée. En 1993, Rigaud *et al.* ont développé une méthode CLHP en phase normale en utilisant un gradient dichlorométhane/méthanol/acide formique/eau comme éluant.[176] Cette méthode, permettant d'isoler les procyanidines oligomères et les polymères d'extraits de raisins, permet également d'identifier individuellement les procyanidines jusqu'au tétramère et peut donc être utilisée en analyse quantitative.

L'utilisation de la chromatographie liquide haute performance en phase inverse est devenue aujourd'hui une méthode de choix pour l'analyse quantitative des procyanidines

dans les vins et les extraits de raisins. En effet, que ce soit pour l'analyse quantitative directe ou après hydrolyse acide (thiolyse ou phloroglucinolyse) la plupart des méthodes sont développées avec des colonnes de type C18.[37,45,54,55,57,63,181,182,183]

Nous ne les développerons pas toutes ici, mais seulement certaines qui ont permis quelques avancées intéressantes comme l'analyse du vin après injection directe ou l'utilisation de détecteur fluorimétrique plus sensible que les détecteurs UV.

En 1994, Waterhouse *et al.* ont décrit une méthode permettant une séparation directe des composés phénoliques du vin par CLHP.[181] Cette méthode est basée sur l'utilisation d'un système de solvant ternaire qui permet de faire évoluer le pH et la polarité durant le gradient. L'utilisation du troisième solvant avec un pH de 1,5 permet une meilleure séparation des anthocyanes et des autres composés phénoliques. Les anthocyanes, alors sous leur forme flavylium, sont mieux séparées et leur détection à 520 nm présente une meilleure sensibilité. Les étapes de pré-purification du vin, qui représentent une perte de temps et de matière première, peuvent alors être évitées.

En 1994, Pezet *et al.*[184] ont introduit l'utilisation de la détection fluorimétrique pour la quantification de polyphénols dans du vin et des baies de raisins. La spécificité et la sensibilité de cette détection leur a permis de quantifier des stilbènes dans du vin sans aucune préparation préalable pouvant causer la dénaturation des échantillons. En 1999, Carando *et al.*[185] ont également utilisé la détection fluorimétrique pour quantifier des procyanidines dimères et trimères dans des vins blancs. La meilleure sensibilité de la fluorimétrie a permis de diminuer les limites de quantification (entre 12 et 16 $\mu g.l^{-1}$ contre 1,1 et 1,8 $mg.l^{-1}$ en UV). Ainsi le dosage des procyanidines dimères et trimères, présentant une bien plus faible concentration dans les vins blancs que dans les vins rouges (plus de 200 fois moins), a pu être réalisée.

Ces deux techniques ont été reprises depuis par d'autres équipes et notamment par Hemozin-Gutiérrez *et al.*[183] qui en combinant l'utilisation du gradient ternaire et de la détection fluorimétrique en plus de la détection par barrette de diodes sont capables de quantifier 48 composés phénoliques après une seule injection directe de vin.

III.2 **Matériel et méthodes**

III.2.1. **Conditions expérimentales générales**

L'acétone, le méthanol, le chloroforme et l'acétate d'éthyle sont tous de qualité CLHP et proviennent de chez Prolabo, (Strasbourg, France). Pour la préparation des solvants utilisés dans l'analyse chromatographique, l'acide orthophosphorique et la solution d'ammoniaque 28% proviennent de chez Merck (Fontenay sous Bois, France), l'acide monobasique de phosphate d'ammonium de chez Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France) et l'acétonitrile de chez Prolabo (Strasbourg, France). L'eau utilisée dans la préparation de toutes solutions est préalablement purifiée par un système de purification milli-Q de Millipore (Millipore Corp. Bedford, MA, USA).

Les monomères catéchine **1** et épicatéchine **2** proviennent de chez Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). L'épicatechine gallate **3**, les dimères B1 **37**, B2 **53**, B3 **30**, B4 **42** et B4 Gallate **99**, le trimère CatCatEpi **88** et le tétramère de catéchine **92** ont été obtenus *via* la méthode de synthèse décrite dans le chapitre précédent. Le dimère B2-Gallate **159**, fourni par Victor de Freitas (Département de Chimie, Université de Porto), a été obtenu par extraction à partir de baies de raisins.

III.2.2. **Echantillons**

Les analyses de suivi de maturité ont été effectuées à partir d'extraits de pépins et de pellicules obtenus à partir de baies entières. Les analyses directes de vin ont été réalisées à partir des vins élaborés avec ces mêmes baies et sur divers échantillons prélevés au cours de la vinification et de l'élevage.

III.2.2.1. ***Parcelles de vignes étudiées***

Cette étude a été menée sur des parcelles de l'AOC Pauillac (1 100 hectares), situé dans le vignoble médocain (13 800 hectares environ), au nord-ouest de Bordeaux, dans l'estuaire de la Gironde. Les parcelles étudiées sont au nombre de cinq, dont deux de Cabernet-Sauvignon et trois de Merlot.

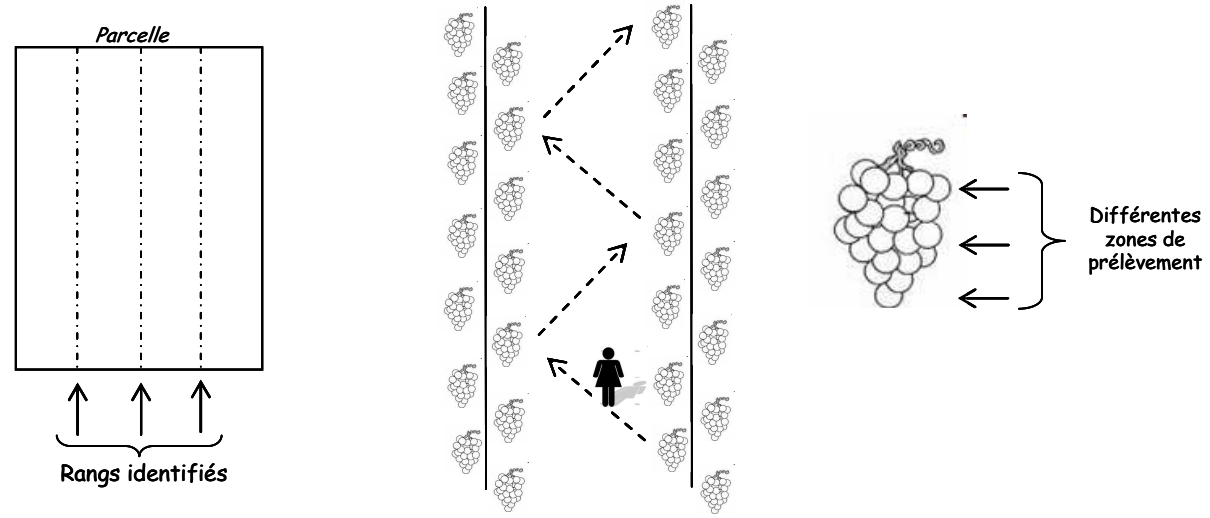
L'orientation des rangs de vignes, la nature des sols et les dates de plantations sont répertoriées dans le tableau III.1 ci-dessous.

Parcelles		Orientation	Nature sol	Date plantation
Cabernet-sauvignon	110	Est/Ouest	sable graveleux	1925
	113	Est/Ouest	sable graveleux	1913
Merlot	105	Sud-Ouest/Nord-Est	sable argileux	1954
	122	Sud-Ouest/Nord-Est	sable graveleux	1980
	115	Est/Ouest	sable graveleux	1991

Tableau III.1

III.2.2.2. ***Baies de raisins***

Les baies de raisins ont été ramassées sur les parcelles à différents stades de maturité au cours des saisons 2006 et 2007. La collecte a été effectuée selon le plan et la méthode de prélèvement (chemin du préleveur et zone de prélèvement) présentés sur la figure III.1.



Plan de prélèvement **Méthode de prélèvement**

Figure III.1

Les baies (864 par parcelles en 2006 et 576 en 2007) ont été récoltées à différentes dates correspondant à quatre stades de maturité : mi-véraison, à mi-maturité, à maturité et enfin le jour des vendanges (Tableau III.2). Une centaine de baies a été prélevée, pesée puis utilisée pour le contrôle de maturité phénolique (CMP). Entre 100 et

150 baies ont été prélevées pour le pressurage et les analyses classiques : poids des baies, sucre, pH, acidité totale, acide malique. Les autres baies ont été congelées à -40°C en attente des extractions pour l'identification et la quantification des tanins.

Année	Parcelles		Mi-véraison	Mi-maturité	Maturité	Vendanges
2006	Cabernet sauvignon	110 113	04/08/2006	04/09/2006	25/09/2006	02/10/2006
	Merlot	105 122 115	31/07/2006	04/09/2006	20/09/2006	20/09/2006
2007	Cabernet sauvignon	110 113	30/07/2007	03/09/2007	01/10/2007	08/10/2007
	Merlot	105 122 115	30/07/2007	28/08/2007	18/09/2007	26/09/2007

Tableau III.2

III.2.2.3. ***Moûts et vins.***

Trois cuves différentes ont été suivies durant la vinification du millésime 2007: une cuve de Merlot contenant un mélange 1/1 des deux parcelles que nous avons suivies (50% de 105 et 50% de 122) et deux cuves de Cabernet–Sauvignon contenant les deux parcelles suivies (110 et 113) en mélange avec une autre parcelle de Cabernet-Sauvignon. Des prélèvements ont été effectués au cours de la fermentation alcoolique, de la macération et de la fermentation malolactique. D'autres prélèvements ont été effectués durant l'élevage en barrique. Les trois cuves que nous avons suivies n'ont pas subi d'assemblage à cette étape afin de poursuivre notre étude (Tableau III.3). Les bouteilles ont été stabilisées avec 1 $g.l^{-1}$ d'acide acétylsalicylique dans l'attente des analyses.

Cuves	Fermentation alcoolique		Macération		Fermentation malolactique		Elevage en barrique	
	Début	Fin	Mi	Fin	Début	Fin	Début	Mi
101 (Merlot)	28/09/07	04/10/07	11/10/07	17/10/07	15/11/07	20/12/07	22/03/08	05/08/08
117 (CS) **119** (CS)	11/10/07	17/10/07		24/10/07				

Tableau III.3

III.2.2.4. ***Préparation des échantillons***

En ce qui concerne les baies de raisins, après séparation des pépins et des pellicules, plusieurs étapes d'extractions et de purifications sont nécessaires afin d'obtenir les échantillons prêts à être injectés en CLHP.

Pour le vin, la méthode développée permet l'analyse du vin en injection directe, mais concernant les échantillons n'ayant pas fini leur fermentation alcoolique, une purification a été nécessaire afin d'enlever les sucres présents en grande quantité et qui auraient pu obstruer la colonne analytique.

a) Extraits de pépins et de pellicules

Les pépins et les pellicules des baies de raisins sont soigneusement séparés avant d'être lyophilisés (Lyophilisateur Alpha 2-4, CHRIST) et réduits en poudre. Chaque échantillon est extrait en deux étapes. 50 ml d'une solution d'eau et d'acétone (30/70 , v/v) sont ajoutés à 5 g de poudre de pépins ou de pellicules et le mélange est laissé sous agitation et sous atmosphère d'azote à 20°C pendant 4 heures. Il est ensuite centrifugé pendant 15 minutes à 5000 g (centrifugeuse Sigma 2.15). Le résidu solide est de nouveau extrait avec une solution d'eau et de méthanol (40/60, v/v) pour trois heures. Après centrifugation, le surnageant obtenu est combiné au premier surnageant et ils sont évaporés. L'extrait brut est alors dilué avec une solution d'eau à 5% d'éthanol, afin de favoriser la solubilisation, pour obtenir un volume final de 250 ml. Cette solution est extraite trois fois avec 250 ml de chloroforme pour enlever les chlorophylles, les lipides et les autres composés indésirables. La phase aqueuse est enfin extraite trois fois avec 250 ml d'acétate d'éthyle pour éliminer les polymères et conserver seulement les procyanidines d'intérêt c'est-à-dire les oligomères et les monomères. L'acétate d'éthyle est alors évaporé, puis l'extrait de procyanidine est concentré dans de l'eau distillé

e avant d'être lyophilisé. Le récapitulatif de ces étapes est présenté sur la figure III.2.

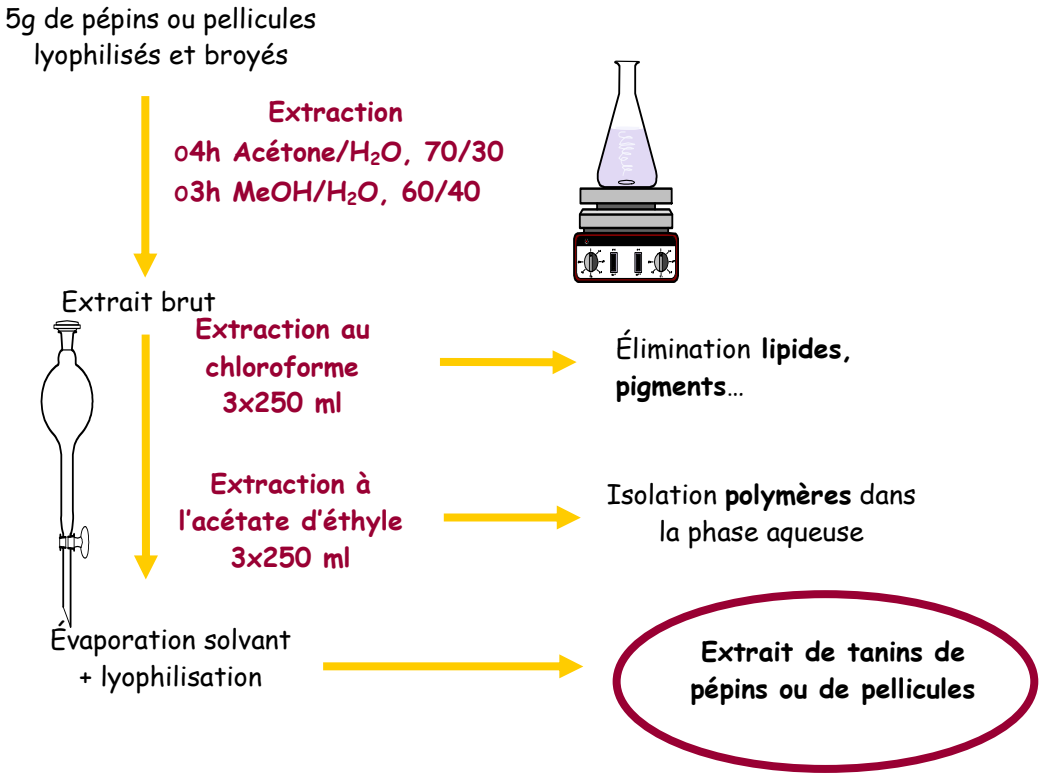


Figure III.2

Avant analyse, le lyophilisat est dissout dans une solution de méthanol et d'eau (50/50, v/v) afin d'obtenir une concentration de 1 $g.l^{-1}$ pour les extraits de pépins et de 5 $g.l^{-1}$ pour les extraits de pellicules. Puis, après filtration sur filtre seringue (minisart RC 25-0,45 µm) les extraits sont prêts à être injectés en CLHP.

III.2.3. Quantifications des procyanidines par CLHP

III.2.3.1. *Méthode CLHP*

La méthode CLHP utilisée correspond à une modification de la méthode développée par Waterhouse *et al.*[181] Basée sur un système de solvants ternaire, elle permet l'analyse des vins par injection directe.

Les standards et les extraits ont été analysés avec un appareil Finnigan Surveyor Plus CLHP System (Thermo Fisher Scientific Inc., San Jose, CA, USA) équipé d'un détecteur à barrette de diodes UV-visible (modèle UV6000), d'un passeur d'échantillon (modèle AS100), d'un détecteur fluorimétrique (Surveyor FL Plus) et d'un système de

pompe quaternaire (modèle P1500). La colonne utilisée est une C18 Nucléosil (250*4mm, 5 µm) d'Agilent, avec un débit de 0,5 ml/min.

Les trois solvants utilisés pour la séparation sont les suivants:

- Solvant A= 50 mM de phosphate d'ammonium dihydrogéne ajusté à un pH=2,6 avec de l'acide orthophosphorique.
- Solvant B= 20% A avec 80% d'acétonitrile
- Solvant C= 0,2 M d'acide d'orthophosphorique ajusté à un pH=1,5 avec de l'ammoniaque.

Le gradient utilisé est présenté sur la Figure III.3. Le volume d'injection est de 20 µL et toutes les injections ont été répétées trois fois.

La détection par la barrette de diodes est conduite entre 190 et 600 nm, et la quantification des monomères et des procyanidines est effectuée à 280 nm. Le logiciel Xcalibur a été utilisé pour la saisie et le traitement des données. La fluorimétrie a été enregistrée après excitation à 280 nm et émission à 320 nm dans le détecteur fluorimétrique. Le logiciel Chromquest a été utilisé pour la saisie et le traitement des données.

Temps (min)	Solvant A	Solvant B	Solvant C
0	97	3	0
5	97	3	0
15	92	8	0
18	0	8	92
30	0	13	87
55	0	20	80
60	0	25	75
70	0	30	70
75	0	80	20
80	0	100	0
82	97	3	0
85	97	3	0

Figure III.3

III.2.3.2. ***Etalonnage***

Une courbe d'étalonnage a été réalisée pour chaque composé à doser *i.e.* les monomères catéchine **1**, épicatéchine **2** et épigallocatéchine gallate **3**, les quatre dimères B1 **37**, B2 **53**, B3 **30** et B4 **42**, les deux dimères galloylés B2 gallate **159** et B4 gallate **99**, le trimère CatCatEpi **88**, le tétramère CatCatCatCat **91**. Le trimère C2 **32**, que nous avons

synthétisé et caractérisé, se décompose en B3 **30** et en catéchine **1** lorsque nous l'injectons en CLHP, nous n'avons donc pas pu l'utiliser pour sa quantification dans les extraits et les vins.

Pour chacun d'entre eux, une solution mère à 1 $g.l^{-1}$ dans le méthanol est préparée. Celle-ci, stockée avant utilisation à -80°C, est utilisée par la suite pour préparer des solutions filles. Cinq solutions par composé sont préparées avec des concentrations de 5, 10, 25, 50 et 150 $mg.l^{-1}$ dans un mélange eau/méthanol 50/50, excepté pour la catéchine **1** où une concentration supplémentaire à 300 $mg.l^{-1}$ est également préparée. Après filtration sur filtre-seringue, elles sont injectées, avec trois répétitions. Les détections UV et fluorimétrique sont réalisées au cours de la même séquence.

III.2.3.3. ***Limites de détection et de quantification***

Les limites de détection et de quantification ont été déterminées en accord avec la méthode proposée par l'OIV (organisation internationale de la vigne et du vin).[186]

III.2.4. **Comportement colloïdal des composés galloylés**

Le comportement des colloïdes en solution peut être étudié à l'aide de la résonnance magnétique nucléaire (RMN). Les expériences de RMN ont été réalisées sur un appareil Bruker DPX 400 équipé d'une sonde de détection inverse multi-noyaux. L'auto-association des différents composés galloylés (le monomère ECG **3**, et deux dimères : B2G **159** et B4G **99**) a été étudiée en suivant les variations de déplacements chimiques du proton ^1H (δH) et du coefficient de diffusion (D) en fonction de leur concentration (entre 0,2 et 20 g/l dans D_2O, *i.e.* de 0,27 à 27 mM pour les dimères galloylés **99,159** et de 0,45 à 45 mM pour le monomère galloylé **3**). Les variations de déplacements chimiques et de coefficient de diffusion ont été mesurées par rapport à une référence interne, le TSP (δ = 0 ppm, D = 1,64 10^{-9} m^2/s).

Les spectres protons ont été enregistrés avec une séquence contenant une impulsion à 90° (8 μs), un temps d'acquisition de 4s, une largeur spectrale de 10 ppm entre -0,1 et 9,9 ppm et un délai de relaxation de 2s. 32 scans ont été enregistrés, et le spectre a été obtenu après transformée de Fourier sans apodisation préalable.

Les spectres DOSY ont été enregistrés en utilisant la séquence proposée par Stejsskal et Tanner[187] appelée également PGSE (pulse gradient spin echo) basée sur un spin

écho dans lequel 2 impulsions de gradient Gr d'une durée p30 et séparées par un délai D20 sont insérées (Figure III.4).

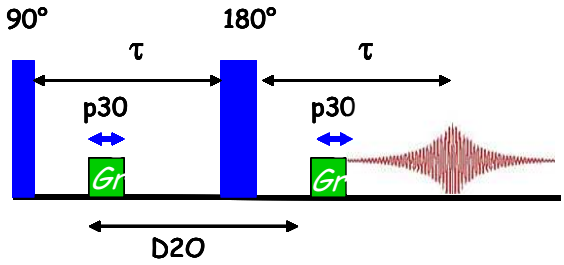


Figure III.4

Dans ce type de séquence, l'impulsion à 180° inverse le signe du premier gradient de sorte que, si les spins observés ne diffusent pas, on se retrouve dans le cas d'une séquence d'écho de spin normale où la totalité du signal se refocalise et où le signal est maximal au niveau de l'écho *i.e.* à τ. En revanche, si les spins diffusent, la refocalisation ne se fera pas totalement et de ce fait l'intensité du signal obtenu après l'écho sera plus faible.

Plus la molécule diffusera vite, plus le signal récolté au niveau de l'écho sera faible. La technique consiste donc à faire disparaître le signal au fur et à mesure de l'augmentation de la puissance des gradients Gr. Le temps d'impulsion des gradients (p30), est calibré de telle sorte qu'entre 1.10^{-4} T/cm et 40.10^{-4} T/cm, 90 à 95 % du signal disparaisse. Dans le cas de notre étude, les valeurs optimales sont les suivantes : D20, 250 ms ; p30, 2,5 ms et 16 valeurs différentes de gradient Gr évoluant linéairement entre 1.10^{-4} T/cm et 40.10^{-4} T/cm. On obtient ainsi 16 spectres RMN du proton dont l'intensité évolue avec la valeur du coefficient de diffusion translationnelle D selon l'équation suivante :

$$I = I_0 \, e^{(-\gamma^2.Gr^2.D.p30^2(D20-p30/3))} \qquad \text{[Equation 1]}$$

Avec γ: rapport gyromagnétique ; Gr : puissance du gradient ; D : coefficient de diffusion ; p30 ; temps d'impulsion des gradients ; D20: délai entre deux gradients.

L'aire des pics spécifiques des protons des tanins est mesurée pour chaque puissance de gradients. Trois zones sont intégrées : 6,5-6,9 ppm correspondant aux protons 2', 5' et 6' du cycle catéchol B, des protons 2' et 5' du cycle catéchol E et des protons 2' et 6' du galloyle ; la zone 6,1-6,3 ppm, correspondant au proton 6' du cycle

catéchol E et des protons 6 des cycles phloroglucinol A et D ; et la zone 5,4-5,6 ppm correspondant au proton 3F. Le lissage des points expérimentaux de la courbe représentant l'aire des zones intégrées en fonction de la puissance des gradients avec l'équation [1] nous donne la valeur de D (Figure III.5).

L'ensemble des valeurs de coefficient de diffusion obtenues pour les différentes concentrations en tanin peut être traité de deux façons différentes :

- La première façon consiste à regarder les variations du coefficient de diffusion en fonction de la concentration en tanins. Cette variation reflète l'auto-association des tanins entre eux, et peut être traitée avec un modèle de type isodesmique. Ce modèle est basé sur l'hypothèse que des molécules peuvent s'associer par empilement et que la constante d'association Ka est la même à chaque nouvelle association. Le traitement des données expérimentales nous permet d'obtenir la valeur de Ka pour chaque tanin. Les variations de déplacements chimiques observées pour certains protons des tanins peuvent également être lissées avec le même type de modèle et donner aussi les valeurs de Ka.

- La deuxième façon consiste à représenter les coefficients de diffusion de chaque tanin en fonction de l'inverse de la concentration en tanin. Dans le cas de comportements colloïdaux, ce type de représentation donne deux droites à l'intersection desquelles on mesure la valeur de la Concentration Micellaire Critique (CMC) ou plus exactement la Concentration d'Agrégation Critique (CAC). Au-delà de cette concentration, les tanins existent préférentiellement à l'état agrégé, et en deçà, les tanins existent préférentiellement sous leur forme libre (Figure III.5).

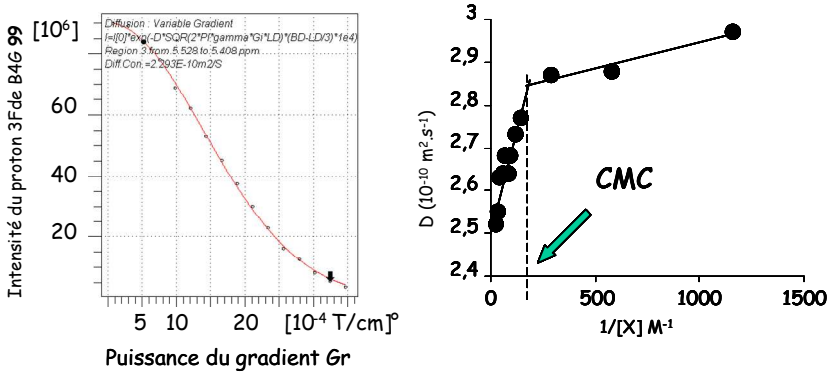


Figure III.5

III.3 **Résultats et discussion.**

Trois études différentes ont été menées à partir des différents standards synthétisés. Les deux premières études ont été réalisées pour étudier l'aspect quantitatif de ces composés dans des baies de raisins puis du vin. Pour ces deux études, la mise au point d'une méthode de quantification par CLHP a, préalablement, été nécessaire.

Au cours de la troisième étude nous nous sommes intéressés aux interactions supramoléculaires des différents composés gallates dont nous disposions, *i.e.* le monomère épicatéchine gallate et deux dimères gallates : le B2-3-*O*'-gallate et le B4-3-*O*'-gallate.

III.3.1. **Extraction des procyanidines des raisins**

Dans la littérature, de nombreuses méthodes d'extraction des polyphénols à partir des pépins ou des pellicules sont décrites. Elles utilisent pour la plupart des solvants organiques tels que l'éthanol, le méthanol ou bien encore l'acétone, en combinaison avec de l'eau pour extraire les composés phénoliques.

Nous avons voulu tester ces trois types de solvants afin d'optimiser la méthode d'extraction. Trois essais ont donc été réalisés avec les trois systèmes de solvants :

- Acétone/eau, 70/30, v/v ; 2x4 h
- Méthanol/eau 60/40, v/v ; 2x2h30
- Éthanol/eau 50/50, v/v ; 2x1h30

Les pépins ou pellicules lyophilisés et broyés ont été laissés sous agitation sous atmosphère inerte (azote) dans les différents mélanges de solvants puis après centrifugation, évaporation des solvants et lyophilisation, ont été analysés par CLHP.

Il est généralement reconnu que l'acétone est le solvant le plus efficace pour l'extraction des proanthocyanidines. Selon nos essais, même si cette hypothèse est généralement vérifiée, notamment au regard des rendements massiques, quelques proanthocyanidines (non identifiées) sont mieux extraites avec les solvants alcooliques, le méthanol étant plus efficace que l'éthanol. Même si une extraction dans un solvant éthanol/eau à 12% serait plus proche des conditions de vinifications, une extraction plus complète permet d'accéder au potentiel phénolique de la grappe.

Au final, une méthode d'extraction en deux étapes a été réalisée : une première extraction dans un mélange d'eau et d'acétone puis une seconde dans un mélange d'eau et de méthanol.

Etant donnée leur composition complexe, ces extraits bruts ont subi une phase de purification avant d'être injectés en CLHP. Ces purifications ont été réalisées par une succession de deux extractions liquide-liquide. Une première extraction réalisée avec du chloroforme permet d'éliminer les chlorophylles, lipides et autres composés indésirables. Puis une extraction avec de l'acétate d'éthyle permet d'éliminer les polymères et de conserver uniquement dans la phase organique les monomères et les procyanidines qui nous intéressent, *i.e.* les oligomères.

III.3.1.1. ***Extraction à partir des pépins***

Comme nous pouvons le voir sur le tableau III.4, qui reprend les différentes masses pour le millésime 2007, la taille des baies augmente largement le premier mois après la véraison (plus de 50% d'augmentation) pour diminuer légèrement jusqu'à la vendange. Cette observation est valable dans le cas des baies de Merlot (M) et de Cabernet–Sauvignon (CS). On notera, que la masse des baies de M est plus importante que celles de CS (environ 40%).

On remarquera une légère diminution de la masse des pépins au niveau du dernier prélèvement. Néanmoins, lorsque l'on s'intéresse aux pépins lyophilisés, leur masse augmente entre les deux premiers prélèvements pour ensuite rester stable jusqu'à la vendange. Dans les deux cas, les pépins des M présentent une masse supérieure à ceux des CS (entre 50 et 66 % pour les pépins lyophilisés).

En ce qui concerne les extraits, nous pouvons noter une très nette baisse de la masse tout au long de la maturité (environ 60% pour les M et 70% pour les CS). Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, il est courant de constater que la quantité de procyanidines, extraite à partir des baies de raisins, diminue continuellement après la véraison. Nous noterons également que les rendements sont plus importants pour la variété M que ceux obtenus pour les CS (+ 20% en moyenne sur les quatre prélèvements). Cette constatation est valable également lorsque l'on regarde les masses d'extraits obtenus par baie ou bien les rapports extraits/baies.

Parcelles	Dates	Baies[a]	Pépins[a]	Pépins lyophilisés[a]	Extrait[b]	Extrait/baie[c]	Rapport[d] extrait/baie
110-CS	30/07/07	88,15	4,89	2,42	340	1,648	0,19%
	03/09/07	136,17	5,13	3,09	200	1,237	0,09%
	01/10/07	131,67	4,79	2,95	125,9	0,744	0,06%
	08/10/07	125,55	4,29	2,74	101,7	0,557	0,04%
113-CS	30/07/07	90,37	5,49	2,63	360	1,895	0,21%
	03/09/07	136,27	5,28	3,12	202	1,259	0,09%
	01/10/07	123,70	4,66	2,84	123,1	0,699	0,06%
	08/10/07	126,78	4,80	3,04	119,4	0,727	0,06%
105-M	30/07/07	120,18	7,02	3,44	426	2,927	0,24%
	28/08/07	179,66	7,09	4,34	238	2,068	0,12%
	18/09/07	165,10	6,78	4,37	173,7	1,516	0,09%
	26/09/07	155,81	6,62	4,13	169,7	1,400	0,09%
115-M	30/07/07	124,54	7,47	3,83	395	3,027	0,24%
	28/08/07	182,67	7,63	4,94	182	1,798	0,10%
	18/09/07	175,05	7,83	4,97	143,8	1,429	0,08%
	26/09/07	170,25	7,02	4,70	175,4	1,650	0,10%
122-M	30/07/07	133,35	8,02	4,11	398	3,272	0,25%
	28/08/07	220,84	7,65	4,71	240	2,260	0,10%
	18/09/07	198,46	8,27	5,07	197,4	2,003	0,10%
	26/09/07	176,38	7,68	5,19	154,1	1,601	0,09%

Parcelles	Dates	Baies[a]	Pépins[a]	Pépins lyophilisés[a]	Extrait[b]	Extrait/baie[c]	Rapport[d] extrait/baie
110-CS	04/08/06	81,27	6,21	3,57	310	2,214	0,27%
	04/09/06	119,01	6,29	4,07	210	1,710	0,14%
	25/09/06	123,73	5,97	4,07	202	1,645	0,13%
	02/10/06	nd	nd	nd	103	nd	nd
113-CS	04/08/06	81,43	6,57	4,63	300	2,780	0,34%
	04/09/06	118,00	6,34	4,07	270	2,199	0,19%
	25/09/06	117,74	6,21	4,23	230	1,948	0,17%
	02/10/06	nd	nd	nd	132	nd	nd
105-M	31/07/06	96,09	7,48	4,03	300	2,421	0,25%
	04/09/06	165,99	7,31	5,14	230	2,366	0,14%
	20/09/06	nd	nd	nd	114	nd	nd
115-M	04/09/06	168,00	7,52	5,28	240	2,533	0,15%
	18/09/06	158,31	7,56	5,36	220	2,358	0,15%
	20/09/06	nd	nd	nd	135	nd	nd
122-M	31/07/06	95,77	7,62	4,12	440	3,625	0,38%
	04/09/06	164,01	7,44	5,18	267	2,765	0,17%
	18/09/06	150,02	7,13	5,16	153	1,579	0,11%
	20/09/06	nd	nd	nd	129	nd	nd

[a] *Masse en g pour 100 baies ;* [b] *Masse en mg pour un extrait obtenu à partir de 5 g de pépins lyophilisés ;* [c] *Masse d'extrait en mg par baie ;* [d] *Rapport entre la masse de l'extrait et celle des baies ; nd : non déterminé*

Tableau III.4

Concernant le millésime 2006, les mêmes observations globales ont pu être constatées (Tableau III.4). Une différence de 33% est constatée entre la masse des baies de M et celle des CS. Au niveau des pépins, la différence entre les deux variétés est nettement moins marquée qu'en 2007 (entre 9 et 27% contre des valeurs supérieures à 50% en 2007)

Finalement, concernant les extraits, la baisse des rendements tout au long de la maturité est la même pour les deux variétés (-62%), et les rendements ne présentent pas de différences notables entre les deux variétés.

III.3.1.2. ***Extraction à partir des pellicules***

Concernant la masse des pellicules, les différences entre les M et les CS sont moins marquées que celles des baies ou des pépins (moins de 20% de différence). Nous noterons une croissance avec une allure de courbe en cloche avec une augmentation après la véraison suivie d'une baisse modérée.

Comme pour les pépins, nous constatons une baisse de la masse des extraits obtenus au cours de la maturité à l'exception des baies de CS 2007, où une augmentation est constatée au cours de la maturité. Néanmoins, lorsque l'on s'intéresse aux masses d'extraits obtenus par baie ou bien aux rapports massiques extraits/baies, cette diminution n'est pas notable. Généralement, nous pouvons noter une hausse entre la véraison et la mi-maturité, suivie d'une baisse, et la masse d'extrait par baie finit par remonter pour le dernier prélèvement (Tableau III.5).

Parcelles	Dates	Baies[a]	Pellicules[a]	Pellicules lyophilisées[a]	Extrait[b]	Extrait/baie[c]	Rapport[d] extrait/baie
110-CS	04/08/06	81,27	11,20	2,38	120,6	0,575	0,07%
	04/09/06	119,01	11,18	4,96	90,7	0,899	0,08%
	25/09/06	123,73	12,16	4,75	90,6	0,861	0,07%
	02/10/06	nd	nd	nd	67,4	nd	nd
113-CS	04/08/06	81,43	11,69	2,75	113,9	0,626	0,08%
	04/09/06	118,00	14,28	4,91	87,5	0,859	0,07%
	25/09/06	117,74	12,12	4,45	71,5	0,636	0,05%
	02/10/06	nd	nd	nd	63	nd	nd
105-M	31/07/06	96,09	12,36	2,16	121,4	0,524	0,05%
	04/09/06	165,99	14,01	5,98	87,4	1,044	0,06%
	20/09/06	nd	nd	nd	64,3	nd	nd
115-M	04/09/06	168,00	13,54	5,28	85,6	0,904	0,05%
	18/09/06	158,31	12,92	5,05	83,3	0,842	0,05%
	20/09/06	nd	nd	nd	78,6	nd	nd
122-M	31/07/06	95,77	11,66	2,84	143,5	0,816	0,09%
	04/09/06	164,01	15,55	5,83	88,6	1,032	0,06%
	18/09/06	150,02	15,22	5,86	66,1	0,775	0,05%
	20/09/06	nd	nd	nd	77,8	nd	nd

Parcelles	Dates	Baies[a]	Pépins[a]	Pépins lyophilisés[a]	Extrait[b]	Extrait/baie[c]	Rapport[d] extrait/baie
110-CS	30/07/07	88,15	9,01	3,10	93,5	0,580	0,07%
	03/09/07	136,17	19,51	5,74	105,1	1,206	0,09%
	01/10/07	131,67	20,48	5,17	94,2	0,973	0,07%
	08/10/07	125,55	20,01	5,12	125,9	1,288	0,10%
113-CS	30/07/07	90,37	10,22	2,94	68,5	0,403	0,04%
	03/09/07	136,27	19,56	5,60	117,2	1,314	0,10%
	01/10/07	123,70	21,16	5,21	92,1	0,960	0,08%
	08/10/07	126,78	20,21	4,82	117,1	1,128	0,09%
105-M	30/07/07	120,18	10,30	3,16	105,9	0,669	0,06%
	28/08/07	179,66	18,77	5,64	98,2	1,109	0,06%
	18/09/07	165,10	20,41	6,93	85,3	1,183	0,07%
	26/09/07	155,81	20,10	6,45	85,3	1,100	0,07%
115-M	30/07/07	124,54	10,44	3,45	82,9	0,572	0,05%
	28/08/07	182,67	24,88	7,26	75,2	1,092	0,06%
	18/09/07	175,05	20,68	4,86	59,9	0,582	0,03%
	26/09/07	170,25	20,87	5,41	85	0,920	0,05%
122-M	30/07/07	133,35	10,79	3,97	116,2	0,922	0,07%
	28/08/07	220,84	22,19	6,53	112,9	1,474	0,07%
	18/09/07	198,46	24,88	6,82	97,7	1,333	0,07%
	26/09/07	176,38	23,08	6,12	93,7	1,146	0,06%

[a] *Masse en g pour 100 baies ;* [b] *Masse en mg pour un extrait obtenu à partir de 5 g de pellicules lyophilisées ;* [c] *Masse d'extrait en mg par baie ;* [d] *Rapport entre la masse de l'extrait et celle des baies ; nd : non déterminé*

Tableau III.5

III.3.2. **Mise au point de la méthode de dosage en CLHP**

Le but de la méthode CLHP est de pouvoir quantifier des procyanidines, dans les extraits de raisins et dans le vin par injection directe, par étalonnage externe. Les différents standards dont nous disposons sont des composés commerciaux comme la catéchine **1** et l'épicatéchine **2** et les composés synthétisés selon la méthode développée dans le deuxième chapitre (le monomère ECG **3**, les dimères B1 **37**, B2 **53**, B3 **30,** B4 **42** et B4G **99**, le trimère CatCatEpi **88** et le tétramère CatCatCatCat **91** ainsi que le B2G **159** dont la synthèse n'était pas encore développée au début de cette étude.

La méthode CLHP de Waterhouse *et al.*[245] permet de doser des composés phénoliques dans le vin par injection directe. Nous avons donc décidé d'utiliser cette méthode. Les premiers essais ont été réalisés sur des solutions modèles constituées par les différents standards. Malheureusement dans notre cas, cette méthode ne permettait pas d'obtenir une bonne séparation de certains composés. Nous avons donc adapté leur gradient tout en conservant les différents solvants.

Bien que cette adaptation du gradient nous ait permis d'améliorer la séparation de certains composés, le dimère B2 **53** et le tétramère CatCatCatCat **91** sont co-élués avec le même temps de rétention.

L'utilisation du dosage des polyphénols par fluorimétrie s'est développée ces dernières années. Ce type de détection permet des améliorations en termes de sensibilité et sélectivité. Nous avons pensé que ce type de détecteur pourrait nous permettre d'apporter une réponse à notre problème. Le tétramère **91**, qui, à notre connaissance n'a pas encore été caractérisé par d'autre équipes, répond également en fluorimétrie. Les deux composés sont tout de même élués avec les mêmes temps de rétention. Néanmoins, la réponse des deux composés (B2 **53** et tétramère **91**) étant différente sur les deux détecteurs nous avons pensé pouvoir utiliser une équation pour avoir accès à la concentration de chacun à partir de leur réponse combinée.

III.3.2.1. ***Utilisation d'une double détection***

Pour l'instauration de l'équation nous avons dû, dans un premier de temps, vérifier que les réponses des deux composés co-élués étaient cumulatives, aussi bien en détection UV qu'en détection fluorimétrique. C'est-à-dire que l'aire du pic correspondant au B2 et au

tétramère, était bien égale à la somme des aires que l'on aurait obtenues si l'on avait injecté les deux produits séparément. Cette hypothèse vérifiée nous avons ensuite pu développer un système d'équation.

- Vérification de l'hypothèse:
  - $A_{UV} = A_{UV-1}+A_{UV-2}$
  - $A_F = A_{F-1}+A_{F-2}$

Avec A_{UV} : Aire totale détectée en UV
A_F: Aire totale détectée par fluorimétrie
A_{UV-1} : Aire théorique détectée en UV pour B2
A_{UV-2}: Aire théorique détectée en UV pour le tétramère
A_{F-1}: Aire théorique détectée par fluorimétrie pour B2
A_{F-2}: Aire théorique détectée par fluorimétrie pour le tétramère

- $A_{UV-1} = a*C1+b$
- $A_{UV-2} = c*C2+d$
- $A_{F-1} = e*C1+f$
- $A_{F-2} = g*C2+h$

Avec **C1**: concentration en B2
C2: concentration en tétramère
a,b,c,d,e,f,g,h: coefficients de régression linéaire des courbes d'étalonnages

- Système obtenu

$$\begin{cases} A_{UV} = (a*C1+b) + (c*C2+d) \\ A_F = (e*C1+f) + (g*C2+h) \end{cases}$$

A partir de ce système à deux équations et deux inconnues, nous pouvons déduire à partir des aires obtenues en UV et en fluorimétrie, les concentrations C1 et C2 selon les équations suivantes :

$$\begin{cases} C1 = \{ g * (A_{UV} - b - d) - c*(A_F - f - h) \}*1/(a*g - c*e) \\ C2 = \{ a * (A_F - f - h) - e*(A_{UV} - b - d) \}*1/(a*g - c*e) \end{cases}$$

Ces deux équations nous permettent d'avoir accès à la concentration en B2 **53** et en tétramère **91** d'après l'aire de leur pic commun obtenu par le détecteur UV et fluorimétrique.

III.3.2.2. ***Etalonnage et limites de détection et quantification***

Une courbe d'étalonnage a été établie pour chacun des composés dosés en UV et fluorimétrie à l'exception des composés galloylés qui ne sont détectables qu'en UV. Le coefficient de variation obtenu pour chaque valeur après trois répétitions est dans tous les cas inférieur à 5%. Les coefficients de détermination (R^2) sont tous supérieurs à 0,9995.

En fluorimétrie, la construction de la droite d'étalonnage pour la catéchine n'a été possible que jusqu'à 150 $mg.l^{-1}$, en raison d'une saturation du détecteur au-delà de cette valeur.

Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) ont été déterminées par la méthode graphique décrite dans la résolution Oeno 7/2000 de l'OIV.[186] Nous pouvons voir que le détecteur fluorimétrique possède une meilleure sensibilité. Pour cette raison, et pour sa meilleure spécificité envers les procyanidines, ce détecteur sera préférentiellement utilisé. Néanmoins dans le cas des gallates qui ne réagissent pas en fluorimétrie et pour la catéchine, lorsque la concentration est supérieure à 150 $mg.l^{-1}$, la détection UV sera utilisée. Ces différents résultats sont représentés sur les Tableaux III.6 et III.7ci-dessous.

			Détection UV				
	Composé	t_R (min)	LD (mg/l)	LQ (mg/l)	Equation de la régression linéaire	R^2	Facteur réponse (mg/unité d'aire)
Monomères	Cat	41,6	0.69	2.29	131926*x + 249283	0.9996	7.43E-06
	Epi	51.2	0.78	2.76	136720*x - 84158	1.0000	7.99E-06
	ECG	68.4	0.22	0.7	276452*x + 333789	0.9996	3.41E-06
Dimères	B1	38	1.79	5.96	53507*x - 76700	0.9998	2.08E-05
	B2	48.4	0.9	3	120996*x - 57351	0.9999	8.45E-06
	B3	39.4	1.92	6.4	70318*x - 35650	1.0000	1.50E-05
	B4	45.6	2.61	8.72	64805*x - 22132	0.9996	1.63E-05
	B4G	55.2	1.54	5.15	124181*x-140519	0.9999	9.05E-06
	B2G	60.7	0.83	2.76	140806*x - 75392	0.9999	7.50E-06
Trimère	CCE	49.2	3.17	10.57	28020*x + 38766	0.9995	3.36E-05
Tétramère	CatCatCatCat	48.4	1.6	5.34	31335*x - 28578	0.9999	3.38E-05

Tableau III.6

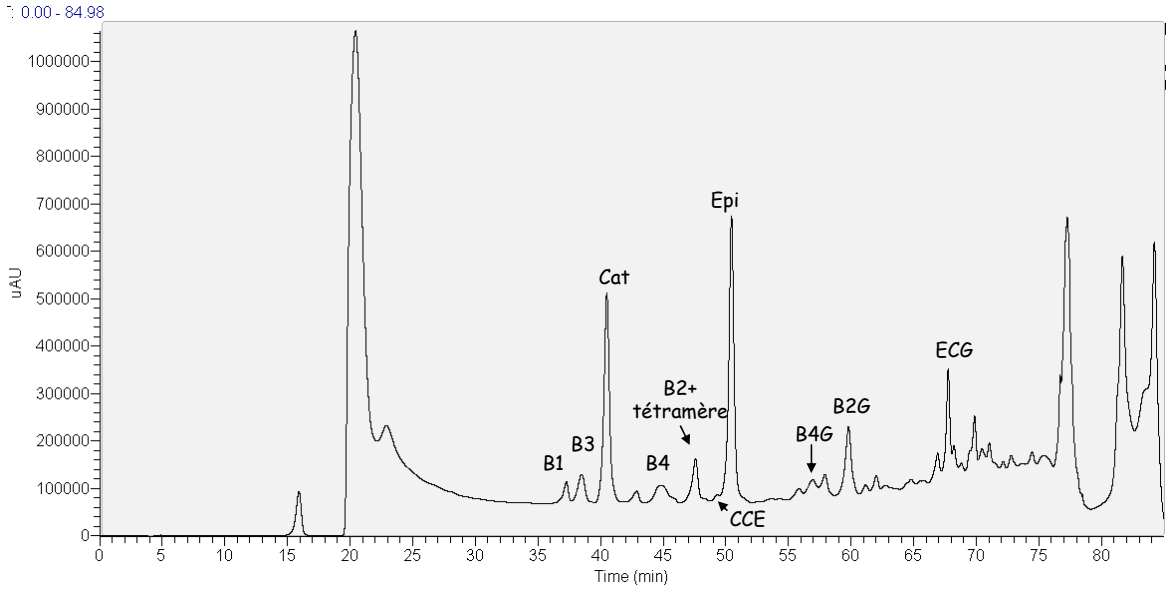
		Détection fluorimétrique					
	Composé	t_R (min)	LD (mg/l)	LQ (mg/l)	Equation de la régression linéaire	R^2	Facteur réponse (mg/unité d'aire)
Monomères	Cat	41.7	0.06	0.19	1791201*x - 941251	0.9998	6.08E-07
	Epi	51.4	0.08	0.28	1369320*x - 1780210	0.9999	8.41E-07
	ECG	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Dimères	B1	38.1	0.37	1.24	256966*x - 135618	0.9999	4.18E-06
	B2	48.5	0.13	0.46	827980*x - 801558	0.9998	1.27E-06
	B3	39.6	0.37	1.22	383723*x - 286435	1.0000	2.76E-06
	B4	45.8	0.5	1.67	355732*x - 194758	0.9999	2.89E-06
	B4G	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	B2G	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Trimère	CCE	49.3	1.12	3.74	95814*x - 87703	0.9999	1.14E-05
Tétramère	CatCatCatCat	48.5	1.26	4.21	71121*x + 1879	0.9999	1.42E-05

Tableau III.7

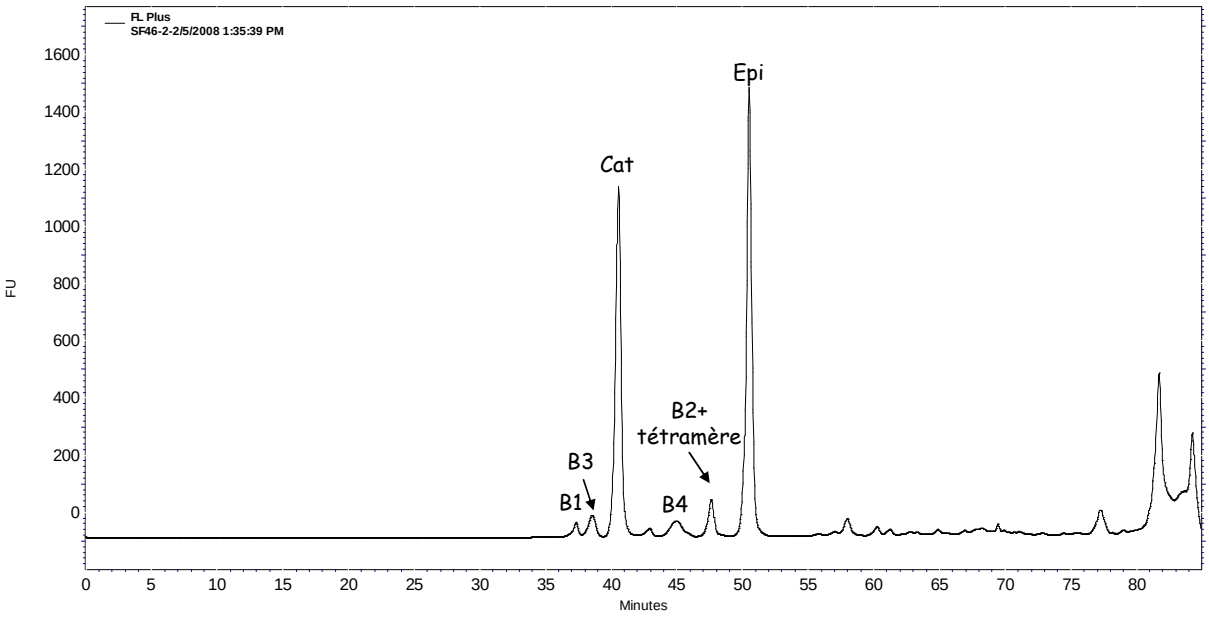
III.3.2.3. ***Chromatogrammes obtenus par détection UV et fluorimétrique***

Concernant les extraits de pépins, les deux méthodes UV et fluorimétrique permettent de doser correctement les différents composés. L'utilisation du fluorimètre s'avère particulièrement utile pour le dosage du B2 et du tétramère, comme expliqué précédemment. Néanmoins en raison de la meilleure sensibilité de la détection fluorimétrique, celle-ci a été utilisée pour le dosage des différentes procyanidines à l'exception des composés gallates qui ne répondent pas ou très peu à cette technique. La figure III.6 ci-dessous représente les deux chromatogrammes obtenus pour un extrait de pépins de raisins avec une détection UV et une détection par fluorimétrie.

Pour le dosage des vins, nous pouvons voir sur la figure III.7 que la détection fluorimétrique apporte une nette amélioration dans la résolution des pics. Le détecteur UV n'a été utilisé que pour le dosage de l'épicatéchine gallate. En effet, la sensibilité et la sélectivité du détecteur UV nous semble insuffisante pour effectuer le dosage des dimères galloylés ainsi que du dimère B2 et du tétramère (interférence avec les anthocyanes…). Pour la même raison, nous n'avons pas effectué le dosage des composés galloylés, du dimère B2 et du tétramère dans les extraits de pellicules.

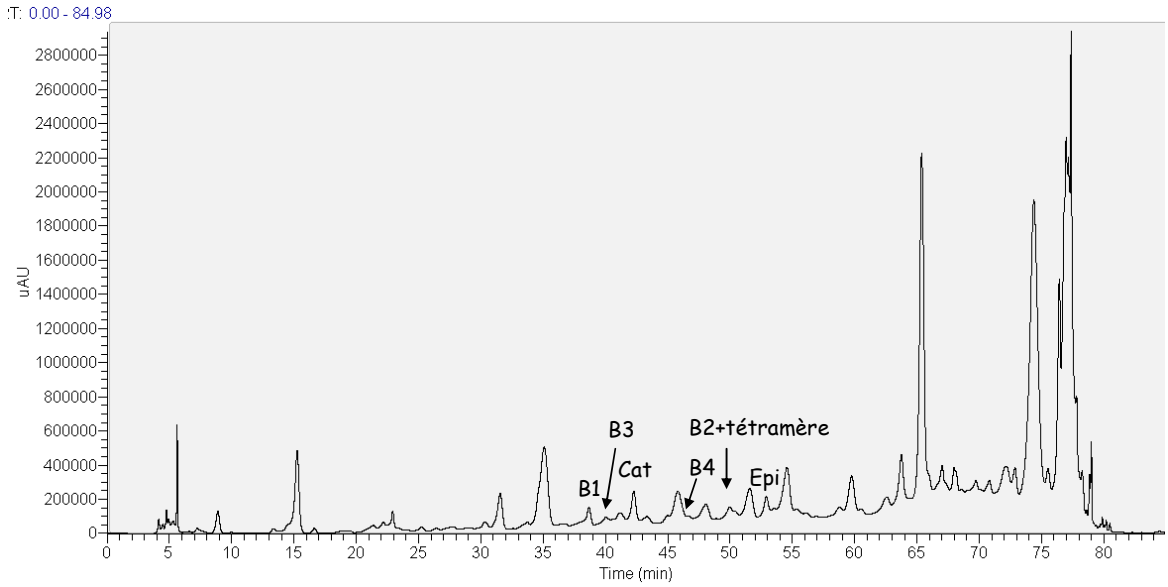


Chromatogramme d'un extrait de pépins (P122, Merlot, Mi-maturité), détection UV à 280 nm

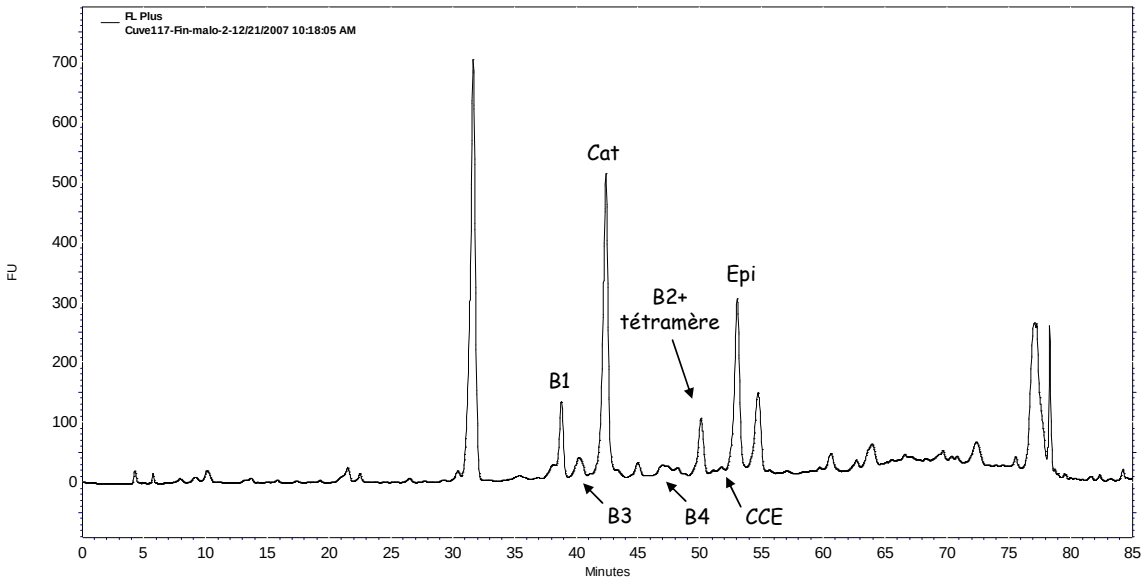


Chromatogramme d'un extrait de pépins (P122, Merlot, Mi-maturité), détection par fluorimétrie, excitation 280 nm, émission à 320 nm

Figure III.6



Chromatogramme d'un vin (Cuve 117, CS, fin de fermentation malolactique), détection UV à 280 nm



Chromatogramme d'un vin (Cuve 117, CS, fin de fermentation malolactique), détection par fluorimétrie, excitation 280 nm, émission à 320 nm

Figure III.7

III.3.3. **Suivi de la maturité des raisins**

Les différents extraits de pépins obtenus après les diverses extractions ont pu être analysés par CLHP afin de quantifier les différents composés. Les concentrations ont pu être déterminées d'après les courbes d'étalonnages effectuées pour les deux détections UV et fluorimétrique. Elles sont représentées dans les différents tableaux ci-dessous (expression en milligramme par kilogramme de baie). Les coefficients de variations (CV) ont été calculés pour chaque triplicata et sont dans tous les cas inférieurs à 5% ; ils ne seront donc pas mentionnés au cas par cas.

III.3.3.1. ***Extraits de pépins de raisins***

a) Résultats

- Extraits de pépins 2006

Période récolte	*Cépage-parcelle*		*Monomères*			*Dimères*						*CCE*	*Tétra*[b]
			Cat	*Epi*	*ECG*[a]	*B1*	*B2*[b]	*B3*	*B4*	*B2G*[a]	*B4G*[a]		
Véraison	*CS*	*P110*	960.24 [a]	298.49	151.53	39.36	15.57	56.97	51.95	125.75	46.58	4.39 [c]	29.76
		P113	1 200.29 [a]	386.72	139.50	59.03	24.54	84.45	82.10	170.12	63.29	6.63 [c]	48.89
	M	*P105*	696.78 [a]	317.72	212.73	27.25	16.85	63.47	78.17	124.10	42.11	7.69 [c]	36.15
		P115	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		P122	984.87 [a]	511.15	286.94	51.38	29.97	98.70	113.48	199.00	63.08	11.86 [c]	43.44
Mi-maturité	*CS*	*P110*	214.71	127.91	13.18	31.42	32.83	38.65	49.68	32.88	31.82	nd	40.16
		P113	247.93	147.99	17.01	36.32	37.94	42.09	55.33	34.29	36.01	nd	45.28
	M	*P105*	150.14	147.81	29.86	19.64	21.67	35.85	56.37	49.85	32.92	6.98 [c]	27.84
		P115	160.40	153.27	24.72	24.06	27.89	47.13	49.02	58.32	41.33	6.75 [c]	25.72
		P122	237.17	229.26	31.13	26.96	31.99	55.55	67.24	88.83	46.66	6.57 [c]	22.24
Maturité	*CS*	*P110*	161.04	97.36	1.53	28.58	36.88	35.29	44.88	21.23	27.51	nd	26.89
		P113	226.54	135.73	2.69	33.01	44.31	45.54	84.67	11.78	36.28	3.18 [c]	44.56
	M	*P105*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		P115	85.17	90.74	10.93	40.91	35.11	55.05	61.31	41.37	28.85	5.65 [c]	41.03
		P122	116.43	115.56	14.99	24.15	24.32	38.12	46.51	46.72	27.24	3.68 [c]	17.34
Vendange	*CS*	*P110*	56.83	26.61	nd	10.16	12.12	11.27	15.24	4.59	7.86	0.68 [c]	9.76
		P113	77.23	38.42	nd	15.30	18.06	16.22	22.65	8.32	14.37	0.85 [c]	15.14
	M	*P105*	59.32	64.96	2.04	12.92	14.31	19.31	29.50	24.57	17.22	1.93	5.83
		P115	54.73	54.15	1.82	15.77	15.01	22.59	30.26	24.91	18.12	2.49 [c]	13.61
		P122	83.16	82.56	3.00	16.25	17.38	24.80	35.89	32.47	21.28	1.87 [c]	10.71

Valeurs exprimées en mg/kg de baie ; Tous les coefficients de variation sont inférieurs à 5% ; Détection par fluorimétrie sauf a : Détection UV et b : Détection UV+ fluorimétrie; c : Valeurs < limite de quantification LQ ; nd : non détecté ; - : non analysé

Tableau III.8

- Extraits de pépins 2007

Période récolte	*Cépage-parcelle*		*Monomères*			*Dimères*						*CCE*	*Tétra*
			Cat	*Epi*	*ECG*[a]	*B1*	*B2*[b]	*B3*	*B4*	*B2G*[a]	*B4G*[a]		
Véraison	*CS*	*P110*	405.24 [a]	270.51	108.21	32.69	13.87	43.28	44.26	108.44	36.12	3.60 [c]	14.97
		P113	486.26 [a]	307.38	142.99	35.99	15.15	50.38	55.84	128.62	43.69	3.70 [c]	23.02
	M	*P105*	502.78 [a]	371.77	156.55	35.19	21.44	81.06	75.93	111.04	47.41	8.54 [c]	21.08
		P115	533.09 [a]	346.59	140.32	29.67	20.78	73.57	62.75	111.65	40.88	2.89 [c]	24.13
		P122	491.23 [a]	444.57	147.58	27.68	19.56	58.88	70.68	94.03	44.90	7.18 [c]	30.87
Mi-maturité	*CS*	*P110*	111.87	99.96	11.45	17.41	20.55	21.29	35.56	20.72	23.80	nd	25.31
		P113	114.73	105.82	9.66	18.35	21.84	20.57	25.87	22.06	19.49	nd	18.72
	M	*P105*	106.72	153.50	12.60	21.66	19.13	37.20	36.28	44.49	24.55	1.77 [c]	26.30
		P115	88.22	140.11	10.87	17.57	16.80	27.81	31.58	38.31	21.93	1.35 [c]	26.48
		P122	88.32	141.46	11.16	20.78	19.17	30.50	31.77	37.19	22.45	1.34 [c]	16.65
Maturité	*CS*	*P110*	50.67	52.29	1.61	12.32	13.83	12.69	17.79	12.70	11.55	nd	6.41
		P113	73.50	71.43	2.30	12.00	20.01	15.95	28.93	12.72	13.23	0.82 [c]	6.46
	M	*P105*	82.33	126.78	8.60	16.18	22.82	32.90	47.79	30.96	23.06	2.44 [c]	10.93
		P115	66.76	111.65	6.57	16.04	21.06	30.37	29.60	28.73	16.75	2.79 [c]	8.64
		P122	89.26	152.02	9.02	19.80	27.82	35.55	34.78	35.23	20.55	2.93 [c]	5.16
Vendange	*CS*	*P110*	46.53	46.09	1.24	9.48	15.75	11.94	14.23	9.91	9.98	0.70 [c]	4.40
		P113	56.04	58.29	1.53	10.50	18.08	13.66	26.46	10.68	9.89	0.83 [c]	4.11
	M	*P105*	70.49	112.60	6.52	22.15	25.32	37.91	30.72	29.97	21.66	3.54	10.79
		P115	65.81	121.07	5.43	20.78	27.71	34.26	34.13	30.50	22.09	3.13 [c]	3.58
		P122	67.79	121.76	6.57	18.05	26.13	29.03	31.24	31.17	20.06	2.17 [c]	8.49

Valeurs exprimées en mg/kg de baie ; Tous les coefficients de variation sont inférieurs à 5% ; Détection par fluorimétrie sauf a : Détection UV et b : Détection UV+ fluorimétrie; c : Valeurs < limite de quantification LQ ; nd : non détecté.

Tableau III.9

Des graphiques représentant les évolutions de chacun des composés pour chaque parcelle et chaque année, en fonction de la maturation du raisin, sont présentés en annexe 1 et 2. Concernant le trimère CCE, les concentrations mesurées sont inférieures à la limite de quantification, son évolution n'est donc pas représentée.

b) Discussion

Nous pouvons constater que l'évolution globale est la même quels que soient le cépage et l'année étudiés et se caractérise par une diminution de la quantité totale des procyanidines. Bien que cette diminution touche aussi bien les monomères que les oligomères et les composés galloylés, les proportions respectives de chacun évoluent au cours de la maturation du raisin. Les monomères (catéchine et épicatéchine) restent

majoritaires mais leur proportion respective diminue au cours du temps (près de 65% à mi-véraison contre à peine plus de 50% à la date de vendange). La proportion des composés gallates diminue également au cours du temps (entre 20 et 15%). Les oligomères voient quant à eux leur proportion passer d'environ 15% à près de 35%. Ces proportions sont des valeurs moyennes représentant les deux années et les deux cépages étudiés. De plus, il convient de préciser que les composés que nous dosons représentent environ entre 60 % pour la mi-véraison et 40% pour la « vendange » de la masse des extraits obtenus à partir des pépins. La figure III.8 ci-dessous représente cette diminution globale en procyanidines ainsi que les évolutions respectives de chaque groupe de composés.

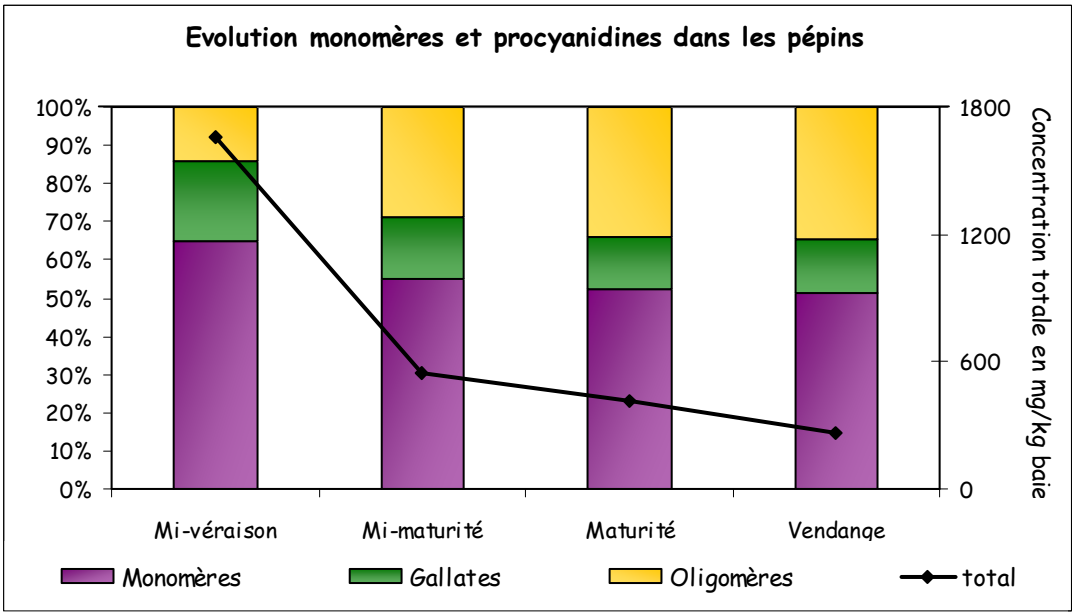


Figure III.8

Ces remarques sont en accord avec les résultats de Kennedy *et al.*,[56] entre autres, qui ont démontré que la cinétique de diminution des monomères et plus importante que celle des oligomères.

Malgré une allure générale constante, nous pouvons noter que ces diminutions sont fonction des années et des cépages. En effet, la diminution est plus importante en 2006 qu'en 2007 et les concentrations des pépins de la variété Cabernet-Sauvignon présentent une diminution supérieure comparée à la variété Merlot (Tableau III.9).

Millésime	Cépage	Monomères	CV	Oligomères	CV	Gallates	CV	Total	CV
2006	*Cabernet-Sauvignon*	-93%	0.50%	-71%	1.06%	-95%	1.67%	-91%	1.01%
	Merlot	-88%	0.94%	-66%	6.23%	-89%	0.98%	-85%	1.46%
2007	*Cabernet-Sauvignon*	-86%	0.57%	-61%	3.45%	-95%	0.48%	-84%	0.42%
	Merlot	-79%	0.64%	-45%	5.41%	-85%	1.19%	-74%	0.92%

Evolutions constatées entre la mi-véraison et la vendange ; Moyenne entre les différentes parcelles de chaque cépage (CS : P110 et 113, M : P105 et 122 en 2006, P105, 115 et 122 en 2007) ; CV = coefficients de variation calculés.

Tableau III.10

Ces quelques remarques générales données, nous allons maintenant nous intéresser plus précisément à l'évolution et la répartition des composés des trois différents groupes *i.e.* monomères, oligomères et gallates. Afin de faciliter la discussion nous considérerons les différentes données par cépages et non par parcelles.

- Monomères

Comme nous pouvons le voir sur la figure III.9, au moment de la mi-véraison, les quantités en catéchine sont supérieures à celles d'épicatéchine. Néanmoins, l'écart diminue jusqu'à la vendange et est même inversé pour la variété Merlot.

Alors que pour le millésime 2006, les pépins de la variété Cabernet-Sauvignon présentent une concentration en catéchine supérieure par rapport à celle de Merlot, l'inverse est globalement constaté en 2007. Dans le cas de l'épicatéchine, c'est la variété Merlot qui admet la plus haute concentration les deux années.

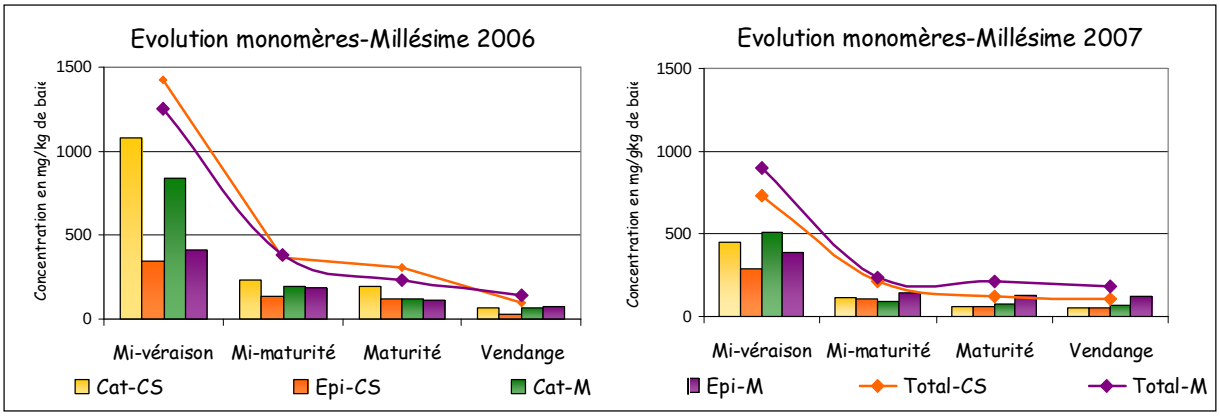


Figure III.9

Au niveau de la mi-véraison, les concentrations globales en monomères sont nettement supérieures en 2006 qu'en 2007, alors que pour les vendanges, les concentrations sont légèrement supérieures en 2007.

On peut également noter qu'au moment de la vendange, les concentrations sont supérieures pour les pépins de Merlot que pour ceux de Cabernet–Sauvignon. Cette constatation est généralement valable pour les autres groupes, mais aussi pour le vin, comme nous le verrons par la suite.

Globalement, nous avons pu montrer que la proportion et l'évolution des deux monomères est dépendante du millésime et du cépage. On peut noter que la quantité en catéchine est, dans tous les cas, supérieure à celle de l'épicatéchine au moment de la véraison. Néanmoins la catéchine semble être " convertie " (polymérisation, réaction avec d'autres composés…) plus vite que l'épicatéchine et donc cette différence n'est pas forcément conservée au moment de la vendange.

- Oligomères

L'oligomère présent en moins grande quantité est, dans tout les cas, le trimère CatCatEpi. De plus, les concentrations mesurées par CLHP dans les extraits de pépins sont pour la plupart en dessous de la limite de quantification. Nous ne détaillerons donc pas son évolution et sa répartition dans les pépins.

Généralement, dans les diverses publications sur le sujet, les auteurs admettent que le dimère B2 est l'oligomère, ou du moins le dimère, présent en plus grande quantité dans les pépins.[54,55,57,58,59] Comme nous l'avons montré plus tôt, le dimère et le tétramère éluent avec le même temps de rétention. Pour contourner ce problème, nous avons initialement testé d'autres méthodes de CLHP, mises au point au laboratoire ou par d'autres équipes, mais dans tous les cas les deux composés possèdent le même temps de rétention. Nous pouvons penser qu'il en est de même pour un certain nombre de méthodes CLHP et que la concentration en dimère B2 a pu être surestimée.

Le dimère B2 admet un comportement différent des autres composés. Alors que la concentration en oligomères décroît avec la maturation du raisin, comme pour les

monomères, la concentration du dimère B2 augmente entre la mi-véraison et la vendange en 2007 (Figure III.10).

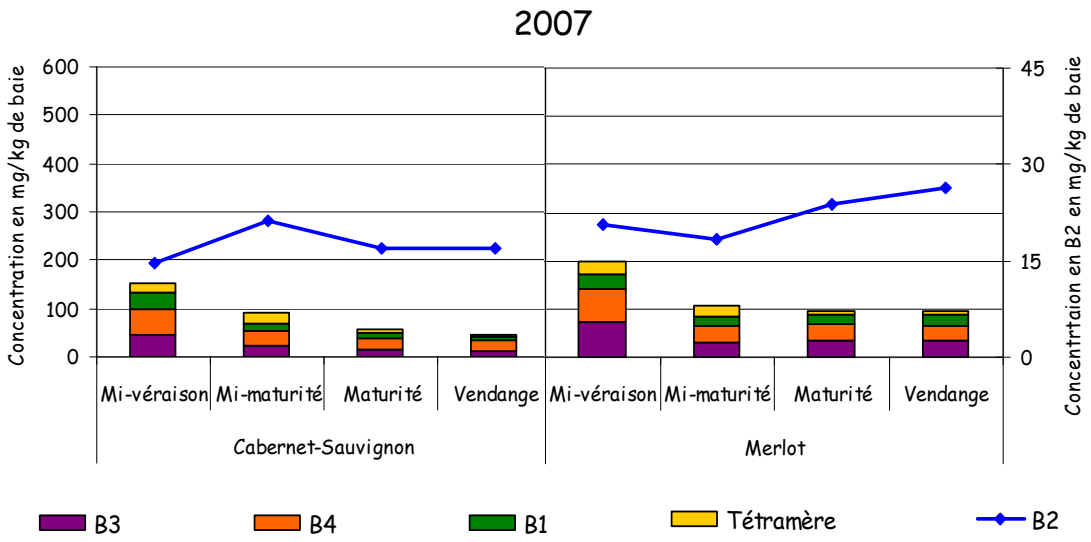


Figure III.10

En effet, comme nous pouvons le voir sur la figure III.10 ci-dessus, la concentration de chacun des oligomères présente une diminution entre la mi-véraison et la vendange, contrairement au dimère B2.

L'oligomère majoritaire est en général le dimère B4 suivit de près par le B3. A la vendange, l'oligomère minoritaire est le tétramère pour les deux variétés. Nous pouvons noter également que les concentrations sont supérieures pour la variété Merlot quelle que soit la date de récolte.

Pour le millésime 2006, le dimère B2 ne présente pas d'augmentation au cours de la maturation du raisin, mais il présente tout de même une diminution plus faible que les autres composés (Figure III.11). Le dimère B4 est également le dimère majoritaire et la variété Merlot présente des concentrations supérieures.

Finalement, nous pouvons voir que, comme pour les monomères, bien que les concentrations mesurées à la mi-véraison soient généralement supérieures en 2006 qu'en 2007, au moment de la vendange, le millésime 2007 présente des concentrations supérieures.

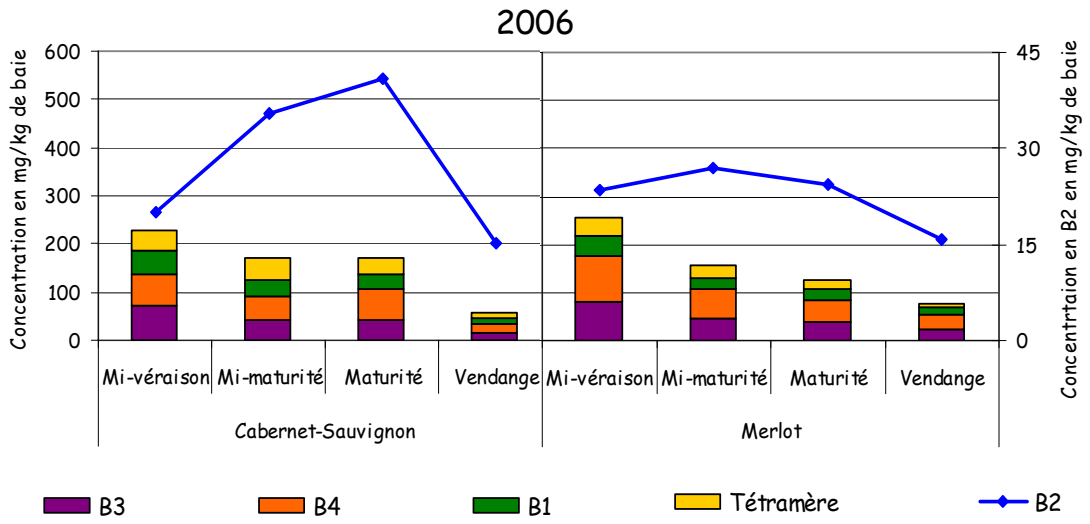


Figure III.11

- Gallates

Concernant les composés gallates, les diverses constatations générales restent vérifiées ; les concentrations du millésimes 2006 sont supérieures au moment de la mi-véraison pour être inférieures à celles du millésime 2007 au moment de la vendange. De même, les concentrations mesurées dans les pépins de la variété Merlot sont supérieures à celles des pépins Cabernet-Sauvignon.

Une différence entre les deux cépages dans la répartition des composés est également notable. Au moment de la mi-véraison, les pépins de la variété CS sont composés d'environ la même concentration en ECG et en B2G, alors que la concentration en dimère B4G est trois fois plus faible. Pour la variété de Merlot, l'épicatechine gallate est majoritaire et représente la moitié (en 2007) ou même un peu plus (en 2006) des composés galloylés. Le dimère B2G est le second composé galloyé (35%) suivi du dimère B4G (11-16%). Les trois composés galloylés présentent une diminution au cours de la maturation du raisin avec une cinétique de diminution plus importante pour le monomère épicatéchine gallate que pour les deux dimères B2G et B4G. L'épicatéchine gallate se retrouve au niveau de la vendange comme le composé galloylé le moins abondant et ceci pour les deux variétés. Au contraire, la concentration du B4G diminue lentement et la différence de concentration entre les deux dimères se réduit. Au niveau de la vendange du Cabernet-Sauvignon, le

dimère B4G se retrouve même avoir une concentration similaire à celle du dimère B2G (Figure III.12).

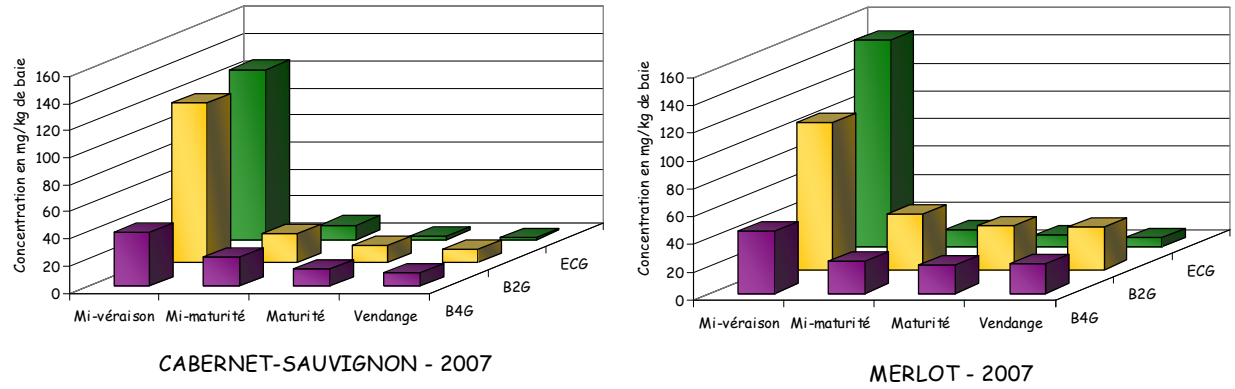


Figure III.12

- Conclusion

Ces quelques résultats nous permettent tout d'abord de montrer l'influence du millésime et du cépage sur la concentration des divers composés que nous avons dosés. En effet, nous avons pu mettre en évidence que, dans notre cas, les pépins de raisins de la variété Merlot étaient plus riches en procyanidines et monomères que ceux de la variété Cabernet-Sauvignon. L'autre observation globale que nous avons pu tirer de ces différents résultats concerne l'influence du millésime. Alors que les concentrations de 2006 à mi-véraison sont généralement supérieures que celles de 2007, à la vendange ce sont les concentrations de 2007 qui sont les plus importantes.

Les concentrations des divers monomères et procyanidines dans des pépins, au moment de la maturité technologique (vendange), ont déjà fait l'objet de plusieurs études par d'autres équipes.[45,55,57,188] Les valeurs que nous trouvons s'avèrent être du même ordre de grandeur que celles observées lors de ces différents travaux. Ces différents résultats sont repris en annexe 6, de manière à pouvoir les comparer aisément.

Par contre, alors que dans notre cas, les concentrations dans les extraits de pépins de Merlot sont sensiblement supérieures à celles des pépins de Cabernet-Sauvignon, Mattivi[45], Fuleki.[55]et Makris,[188] qui ont également étudié ces deux variétés, n'ont pas noté de telles différences.

Nous pouvons souligner également, que c'est la première fois, à notre connaissance, que le tétramère CatCatCatCat a été identifié et quantifié dans des pépins de raisins. De même, bien que le dimère B4G ait déjà été identifié dans des pépins de raisin,[37,39] nous avons déterminé pour la première fois sa concentration, ainsi que son évolution lors de la maturation du raisin. De plus, nous pouvons noter que les concentrations de ces deux procyanidines ne sont pas négligeables car elles sont du même ordre de grandeur que les autre procyanidines.

III.3.3.2. ***Evolution dans les pellicules***

a) Résultats

Le dosage des procyanidines et des oligomères contenus dans les pépins a pu être réalisé à partir de solution contenant 1 $g.l^{-1}$ d'extrait, l'étude des concentrations dans les pellicules a nécessité l'utilisation de solutions plus concentrées (5 $g.l^{-1}$). En effet, alors que les extraits de pépins sont majoritairement composés de procyanidines, les pellicules contiennent en plus des anthocyanes et des prodelphinidines. Dans le cas des pépins, les composés, que nous dosons, représentaient entre 60% et 40 % de l'extrait obtenu alors que pour les pellicules ils ne représentent pas plus de 3% de l'extrait obtenu. La faible sélectivité de la détection UV, comme nous en avons discuté précédemment, ne permet pas son utilisation pour le dosage des extraits de pellicules. Seule la détection fluorimétrique a donc été utilisée pour suivre l'évolution des procyanidines et des monomères dans les extraits de pellicules. De plus, nous pouvons constater une importante variabilité au sein des cépages eux-mêmes et au niveau des deux millésimes (Figure III.13). Ceci nous amène à penser que la méthode d'extraction utilisée n'est peut être pas parfaitement adaptée à l'extraction des tanins des pellicules. Néanmoins certaines informations ont quand même pu être tirées de ces dosages. Les annexes 3 et 4 représentent les évolutions respectives de chaque composé sous forme de graphique.

Période récolte	*Cépage-Parcelle*		**Millésime 2006**						**Millésime 2007**					
			Monomères		*Dimères*			*CCE*	*Monomères*		*Dimères*			*CCE*
			Cat	*Epi*	*B1*	*B3*	*B4*		*Cat*	*Epi*	*B1*	*B3*	*B4*	
Véraison	*CS*	*P110*	0.43	0.24	0.81	0.22	0.15 [b]	0.25 [b]	2.63	0.42	3.33	1.25	0.45	nd
		P113	1.47	0.85	1.14	0.31	0.34 [b]	0.15 [b]	2.48	0.60	3.10	1.23	0.41	nd
	M	*P105*	0.25	0.17	0.41	0.12 [b]	0.12 [b]	0.14 [b]	1.73	0.61	3.72	0.61	0.62	0.65
		P115	-	-	-	-	-	-	1.58	0.17	1.44	0.26	0.06	0.66
		P122	0.29	0.26	0.47	0.19 [b]	0.14 [b]	0.22 [b]	3.46	0.37	3.12	0.50	0.29	2.65
Mi-maturité	*CS*	*P110*	-	-	-	-	-	-	5.41	2.37	5.25	1.60	0.45	nd
		P113	1.00	0.63	2.10	0.38	0.18 [b]	0.27 [b]	5.50	2.43	6.48	1.63	0.49	1.62
	M	*P105*	0.46	0.21	1.94	0.25	0.27	0.53	5.84	3.19	8.23	1.86	1.02	3.44
		P115	0.40	0.20	2.11	0.16	0.25	0.63	2.86	1.80	3.81	0.74	0.14 [b]	2.65
		P122	0.51	0.25	2.38	0.18	0.28	0.64	2.35	1.60	4.09	0.80	0.54	2.97
Maturité	*CS*	*P110*	0.31	0.24	0.95	0.18	0.19 [b]	0.22 [b]	2.48	1.54	3.02	0.71	0.42	0.51 [b]
		P113	0.33	0.21	0.91	0.14	0.15 [b]	0.28 [b]	3.31	1.66	3.57	0.78	0.30	0.90
	M	*P105*	-	-	-	-	-	-	4.47	2.51	6.79	1.25	0.79	3.64
		P115	-	-	-	-	-	-	0.52	0.24	0.55	0.14	0.10 [b]	0.25
		P122	0.55	0.31	2.37	0.33	0.28	0.88	2.63	1.67	4.27	0.73	0.48	3.46
Vendange	*CS*	*P110*	0.33	0.19	0.76	0.17	0.15 [b]	0.20 [b]	2.47	1.22	4.55	1.02	0.45	1.05
		P113	0.30	0.19	0.61	0.15	0.13 [b]	0.22 [b]	1.79	0.85	2.97	0.72	0.35	0.85
	M	*P105*	0.51	0.20	3.15	0.46	0.54	0.78	2.92	1.81	7.40	1.16	0.87	2.81
		P115	0.98	0.18	0.74	0.13	0.14 [b]	0.29 [b]	0.66	0.50	1.97	0.39	0.41	0.80
		P122	0.62	0.29	2.65	0.29	0.28	0.91	0.61	0.40	2.73	0.42	0.43	1.08

Valeurs exprimées en mg/kg de baie ; Tous les coefficients de variation sont inférieurs à 5% ; Détection par fluorimétrie; b : Valeurs < limite de quantification LQ

Figure III.13

b) Discussion

La première constatation que l'on peut faire à partir des dosages effectués est que les échantillons du millésime 2007 présentent des concentrations plus élevées comparées aux concentrations du millésime 2006.

Alors que B1 est le dimère le moins abondant dans les pépins, celui-ci est le dimère, et même le composé, présent en plus grande quantité dans les pellicules. Généralement, il est suivi de la catéchine, de l'épicatéchine, du trimère CCE, et des dimères B3 et B4. Nous pouvons néanmoins noter que dans le cas du Merlot, les concentrations en CatCatEpi sont supérieures à celles de l'épicatéchine.

De plus, nous pouvons voir que si dans le cas des pépins, les monomères restent majoritaires tout au long de la maturation du raisin, ils ne représentent qu'entre 15 et 47% des extraits de pellicules.

Une autre différence notable que l'on peut tirer de ces résultats, concerne l'évolution des différents composés au cours de la maturation. En effet, alors que pour les

pépins nous pouvons constater une baisse continue dans la concentration de chacun des composés, dans le cas des pellicules deux autres évolutions différentes peuvent être constatées. Pour les pellicules de Cabernet-Sauvignon des deux millésimes mais aussi pour celles de Merlot du millésime 2007, nous pouvons constater une hausse des concentrations entre les deux premiers prélèvements (Mi-véraison et mi-maturité) suivie d'une baisse jusqu'à la vendange. Dans certains cas les concentrations finales peuvent même être supérieures aux concentrations initiales. Les extraits obtenus à partir des pellicules de la variété Merlot en 2006 présentent, quant à eux, une évolution différente. En effet, les concentrations ont généralement tendance à augmenter tout au long de la maturation. Ces différentes observations sont représentées sur la figure III.14 ci-dessous.

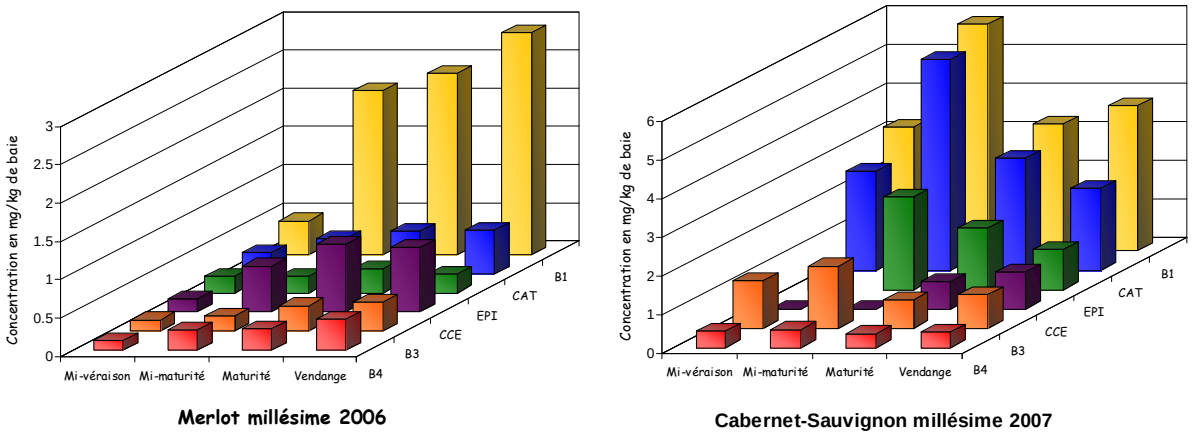


Figure III.14

A notre connaissance, peu de travaux ont été réalisés sur les teneurs en procyanidines des pellicules de raisins Merlot et Cabernet-Sauvignon. De Freitas *et al.* [54] ont effectué le dosage des différents monomères, dimères (4-8 et 4-6) et d'un trimère dans des extraits de pellicules. Les valeurs qu'ils mesurent sont nettement supérieures à celles que nous avons déterminées, notamment pour les monomères. Néanmoins, comme nous l'avons mentionné précédemment, notre méthode d'extraction n'est peut-être pas forcément adaptée à l'analyse des monomères et procyanidines des pellicules. Le dosage des monomères a, lui, été réalisé par d'autres équipes qui trouvent également des valeurs supérieures aux nôtres.[57,189] Seuls Mattivi *et al.*[45] trouvent des valeurs de concentration en catéchine et épicatéchine du même ordre de grandeur que nous.

III.3.4. **Evolution dans le moût et le vin au cours de la vinification.**

La méthode mise au point permet après injection directe du vin de mesurer les concentrations de trois monomères (catéchine, épicatéchine et épicatéchine gallate), et de quatre oligomères dimères (B1, B3, B4 et CCE) dans le vin par CLHP.

Cette méthode a été utilisée pour suivre l'évolution des différentes concentrations au cours de la vinification et de l'élevage du millésime 2007 (Figure III.15). Des graphiques représentant les évolutions respectives des 7 composés sont représentées en annexe 5.

III.3.4.1. ***Résultats***

Période vinification	*Cépage*	*Cuve*	*Monomères*			*Dimères*			*CCE*
			Cat	*Epi*	*ECG*[a]	*B1*	*B3*	*B4*	
Début de fermentation	*Cabernet-Sauvignon*	*117*	20.81	19.13	6.27	19.96	4.40	5.74	2.07 [b]
		119	21.25	21.81	5.25	22.44	9.72	6.60	4.62
	Merlot	*101*	27.41	37.03	21.59	24.77	11.67	15.34	11.71
Fin de fermentation	*Cabernet-Sauvignon*	*117*	33.60	31.29	0.97 [b]	36.80	11.25	8.14	2.24
		119	39.06	36.59	1.32	30.24	15.97	12.83	nd
	Merlot	*101*	47.61	58.71	19.09	45.84	24.59	15.90	5.82
Fin de macération	*Cabernet-Sauvignon*	*117*	34.40	28.68	3.78	38.90	9.78	8.85	4.06
		119	31.83	26.18	4.32	36.80	11.25	8.14	2.24
	Merlot	*101*	48.55	61.61	18.75	68.34	26.73	18.25	9.92
Début de fermentation malolactique	*Cabernet-Sauvignon*	*117*	33.49	27.04	3.39	39.57	8.15	7.51	6.06
		119	34.01	27.27	4.01	43.33	8.43	7.92	8.38
	Merlot	*101*	44.24	53.76	21.28	67.46	17.43	13.89	8.43
Fin de fermentation malolactique	*Cabernet-Sauvignon*	*117*	31.80	25.59	3.16	37.03	14.16	6.89	2.91 [b]
		119	31.25	25.21	3.00	36.73	14.06	6.23	2.52 [b]
	Merlot	*101*	43.63	51.75	18.75	66.94	27.77	13.73	5.31
Mise en barrique Février 2008	*Cabernet-Sauvignon*	*117*	28.62	21.67	1.05 [b]	38.86	7.65	8.46	nd
		119	27.25	21.20	nd	36.05	7.52	10.46	nd
	Merlot	*101*	37.17	41.48	17.89	63.88	16.29	15.95	nd
Barrique Mars 2008	*Cabernet-Sauvignon*	*117*	26.96	20.59	nd	37.69	6.17	10.10	7.29
		119	27.12	20.67	nd	36.61	6.19	11.00	7.39
	Merlot	*101*	34.18	38.60	12.47	55.89	12.00	12.86	6.77
Barrique Août 2008	*Cabernet-Sauvignon*	*117*	22.13	15.53	nd	39.75	10.46	7.75	10.93
		119	22.06	15.82	nd	39.03	10.27	7.84	10.70
	Merlot	*101*	28.29	28.95	9.48	59.88	19.55	11.36	3.67

Valeurs exprimées en mg/l de vin ou de moût ; Tous les coefficients de variation sont inférieurs à 5% ; Détection par fluorimétrie sauf a : détection UV ; b : Valeurs < limite de quantification LQ, nd : non détecté.

Figure III.15

III.3.4.2. ***Discussion***

La première remarque que nous pouvons tirer des résultats ci-dessus est que les deux cuves contenant le cépage Cabernet-Sauvignon présentent, dans tous les cas, des concentrations inférieures à la cuve de Merlot. Nous pouvons également remarquer que, généralement les concentrations augmentent du début à la fin de la macération, où elles atteignent un maximum. Après l'écoulage, qui délimite la fin de la macération, les concentrations ont plutôt tendance à diminuer.

a) Composition des moûts

Les premières analyses ont été réalisées sur le moût au cours de la fermentation alcoolique, 2 jours après les vendanges pour la cuve de Merlot et 3 jours après pour les deux cuves de Cabernet-Sauvignon. Nous pouvons noter que la cuve de Merlot possède des concentrations plus élevées que les deux cuves de Cabernet-Sauvignon (Figure III.16). Les monomères représentent 43% des composés dosés dans la cuve de Merlot alors que dans les cuves de Cabernet-Sauvignon, la proportion est de 47% (cuve 119) ou 51% (cuve 117). Dans la cuve de Merlot, les monomères sont majoritairement composés d'épicatéchine (58%) alors que dans les cuves de CS, les quantités des deux monomères sont équivalentes. Ceci correspond à ce que nous avons pu voir avec les extraits de pépins, où la variété de M présentait une composition plus importante en épicatéchine qu'en catéchine et la variété de CS présentait une composition équivalente en catéchine et épicatechine. De même, le pourcentage d'épicatéchine gallate est deux fois plus important pour la variété M (14%) que pour la variété CS (7%) comme dans le cas des extraits de pépins.

Concernant les dimères, alors que le dimère B4 était majoritaire au sein des pépins, dans les moûts le dimère majoritaire est le dimère B1. Ce même dimère est, en outre, le composé majoritaire des extraits de pellicules. Il est donc normal de voir sa proportion élevée au niveau du moût, d'autant plus que selon Santos-Buelga *et al.*,[66] les procyanidines des pellicules seraient extraites plus rapidement que celles des pépins.

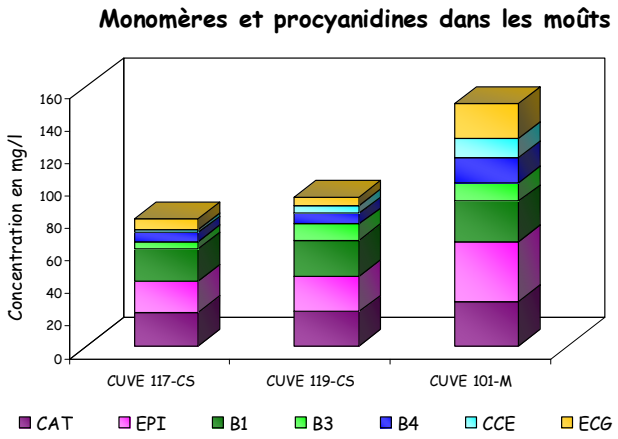


Figure III.16

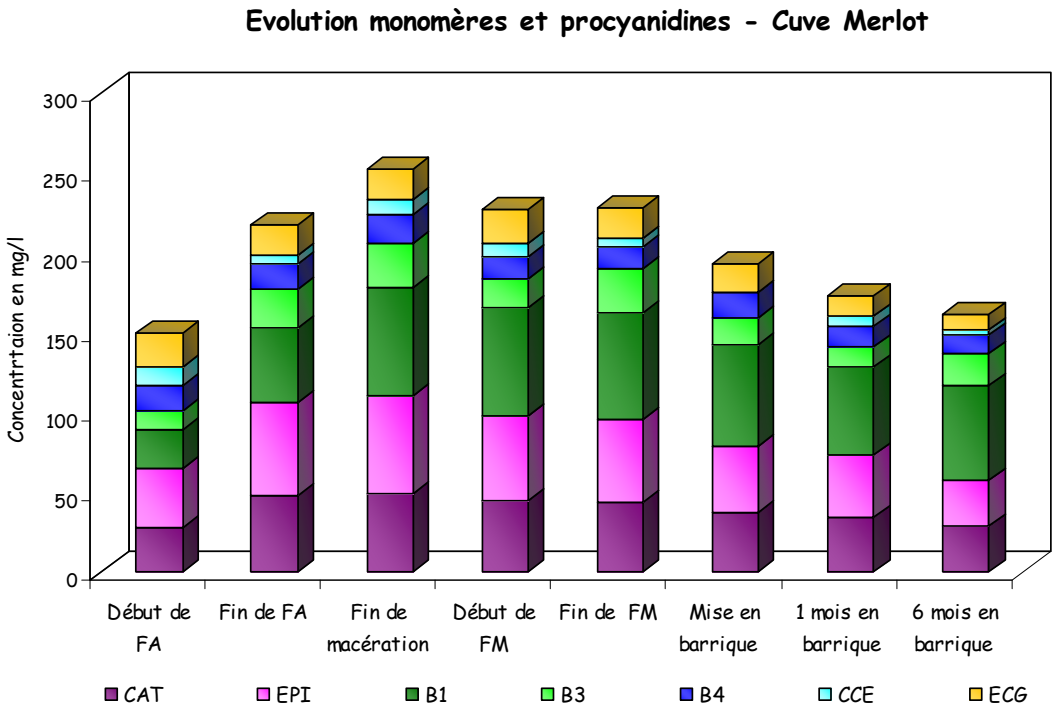
b) Composition au cours de la vinification

- Cuve de Merlot

Comme mentionné précédemment la concentration totale en procyanidines augmente jusqu'à la fin de la macération pour ensuite diminuer durant la suite de la vinification et de l'élevage.

Les trois composés majoritaires, la catéchine, l'épicatéchine et le dimère B1, qui représentent à eux trois entre 60 et 75% des composés dosés, se comportent de manière similaire. Leur concentration augmente jusqu'à la fin de la maturation puis baisse jusqu'à atteindre le niveau initial pour la catéchine, une concentration inférieure pour l'épicatéchine (-22%) et supérieure pour le dimère B1 (+142%). Les dimères B3 et B4 qui représentent entre 15 et 20% des composés dosés, montrent des évolutions plus fluctuantes.

Le monomère épicatéchine gallate et le trimère CatCatEpi voient, quant à eux leur concentration diminuer tout au long de la vinification et de l'élevage (-56% et -69% respectivement). Ces différentes évolutions sont représentées sur la figure III.17 ci-dessous.



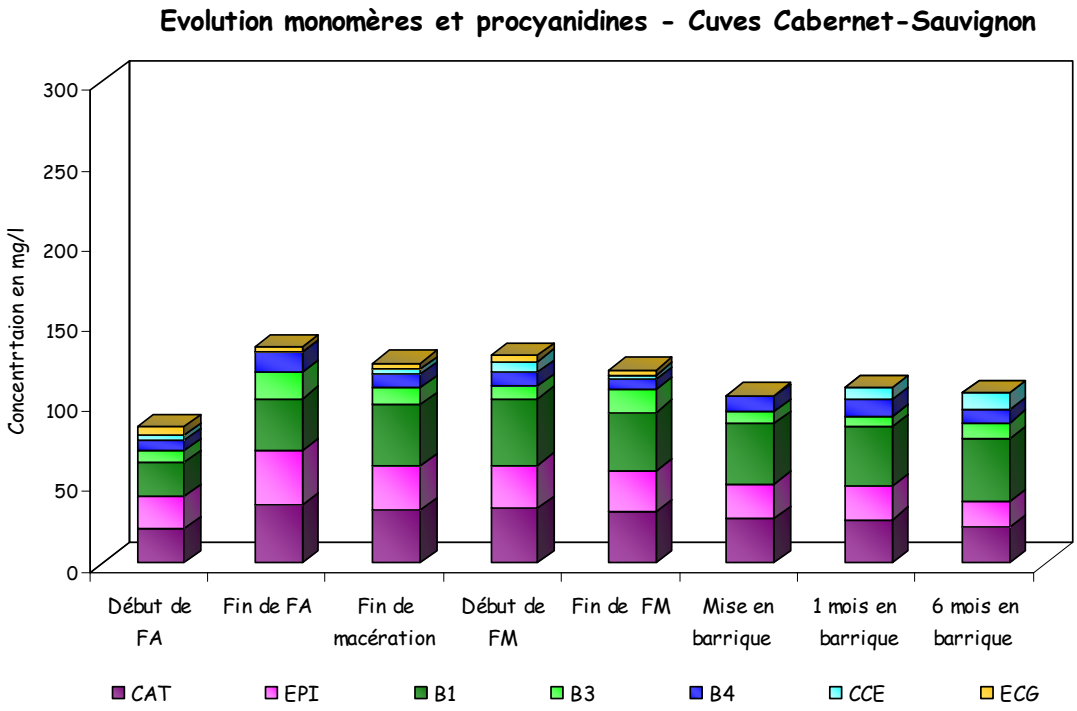
FA : Fermentation alcoolique ; FM : Fermentation malolactique

Figure III.17

➢ Cuve de Cabernet-Sauvignon

Contrairement à la cuve de Merlot, la concentration maximale n'est pas atteinte au moment de la fin de la macération mais à la fin de la fermentation alcoolique. L'évolution des trois composés majoritaires est la même avec une concentration finale en catéchine identique à celle de départ, une concentration inférieure en épicatéchine (-23%) et une concentration supérieure en B1 (+ 86%). Les deux dimères B4 et B3 montrent également des évolutions fluctuantes.

Alors que l'épicatéchine gallate montre la même baisse au cours de la vinification, pour même être absente dans les échantillons prélevés en barrique, le trimère CatCatEpi présente une évolution complètement différente dans les cuves de Cabernet-Sauvignon. En effet celui-ci, présente une évolution fluctuante pour atteindre un maximum après 6 mois en barrique (figure III.18)



FA : Fermentation alcoolique ; FM : Fermentation malolactique

Figure III.18

c) Conclusion

Le suivi de l'évolution des concentrations en monomères et en procyanidines nous a permis de montrer l'évolution de deux monomères, de quatre oligomères et d'un monomère galloylé dans des moûts et des vins de deux cépages différents au cours du même millésime. Nous pouvons noter, que comme dans le cas des pépins de raisins, le vin issu du cépage Merlot présente des concentrations supérieures en monomères et procyanidines que celui issu du cépage Cabernet-Sauvignon. Les diverses concentrations et les proportions relatives de chaque composé nous permettent de montrer que les pellicules et les pépins contribuent, tous deux, à la composition en monomères et procyanidines des vins.

Concernant la différence des concentrations du cépage Merlot et Cabernet-Sauvignon, comme pour le cas des pépins, cette observation n'est pas forcément retrouvée dans la bibliographie.[54,182] Néanmoins, lors d'analyses effectuées sur le millésime 2008, la même constatation a pu être effectuée (résultats non présentés dans ce manuscrit).

III.3.5. **Analyse colloïdale des tanins : analyse des gallates**

Les tanins sont connus pour s'auto-associer pour former des micelles ou agrégats de plus ou moins grandes tailles. Le modèle le plus couramment utilisé pour décrire l'auto-association des tanins est un modèle isodesmique. Dans ce modèle, l'auto-association s'effectue pour former des empilements avec 2 puis 3, 4, 5… molécules de façon non coopérative et indéfinie où la constante d'équilibre (Ka) est la même pour chaque étape (Figure III.19).[190,191] Cette auto-association peut conduire à un comportement colloïdal spécifique proche de celui de la micellisation. En dessous d'une certaine concentration appelée CMC (Concentration Micellaire Critique) les espèces moléculaires existent préférentiellement sous forme libre alors qu'au-delà elles existent sous une forme d'agrégats (Figure III.19).

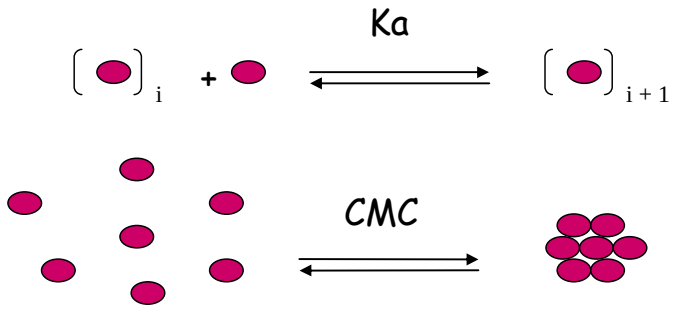


Figure III.19

III.3.5.2. ***Mesure de la constante d'affinité Ka de l'Auto-association des tanins***

L'auto-association des tanins a été suivie, soit en mesurant les variations de certains de leurs déplacements chimiques en fonction de leur concentration, soit en suivant l'évolution de leur coefficient de diffusion translationnelle D à différentes concentrations en tanins.

Dans ces deux cas, on peut obtenir la valeur de la constante d'équilibre Ka grâce à l'équation suivante tirée du modèle isodesmique :

$$\Delta A = |A_{obs} - A_{libre}| = (A_{micelle} - A_{libre}) * Ka * [C_0] * \{2 / [1+(Ka*[C_0]+1)^{1/2}]^2 \qquad \text{[Equation 2]}$$

Où A_{obs} peut représenter, selon ce que l'on observe, le déplacement chimique δH ou le coefficient de diffusion D ; A_{libre} représente le déplacement chimique ou le coefficient de diffusion des molécules non associées ; $A_{micelle}$, représente le δH ou le coefficient de diffusion des molécules engagées dans une micelle et C_0 la concentration totale en tanin.

a) Suivi du déplacement chimique

La variation de déplacement chimique est une bonne sonde pour suivre de subtiles variations d'environnement d'une molécule, en particulier quand celle-ci s'auto-associe. Ce phénomène a déjà été utilisé dans divers modèles de tanins.[89,191]

Dans le cas des procyanidines galloylées, les spectres protons enregistrés à différentes concentrations montrent des variations de déplacements chimiques notables, en particulier, et comme pour les dimères non galloylés B1-B4, pour les protons de l'hétérocycle (H2, H3 et H4 de B4G, figure III.20). Le lissage de ces variations avec l'équation [2], reflétant les variations que l'on peut observer dans le cadre d'un modèle isodesmique, permet de mesurer la constante d'association Ka. La figure III.20 montre dans la partie droite les variations de déplacement chimique (δH) du proton H4F en fonction de la concentration en B2G. L'utilisation de l'équation 2 montre que la mesure de la constante d'association Ka peut être obtenue avec une bonne précision, ce qui valide le modèle utilisé.

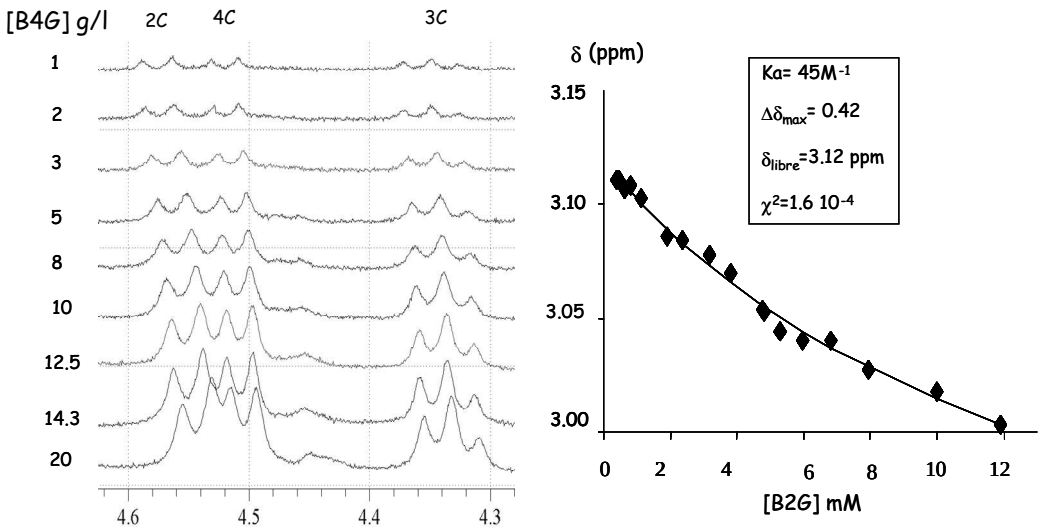


Figure III.20

b) Mesure du coefficient de diffusion

Le coefficient de diffusion D est inversement proportionnel à la taille de l'objet moléculaire que l'on observe, selon la relation de Stokes-Einstein :

$D = K_b * T/(6\pi\eta rH)$ [Equation 3]

Avec η= 1,095 pour D_2O à 25°C et rH le rayon hydrodynamique de l'objet moléculaire observ.é

La figure III.21 illustre le phénomène d'auto-association : en effet, D diminue lorsque la concentration en tanin augmente (dans le cas de la figure III.21, l'exemple est donné pour la B4G). Cette variation de D peut être lissée avec la même équation que celle utilisée pour suivre les variations de déplacements chimiques (équation 2). On obtient là encore une mesure de la constante d'association Ka avec une bonne précision.

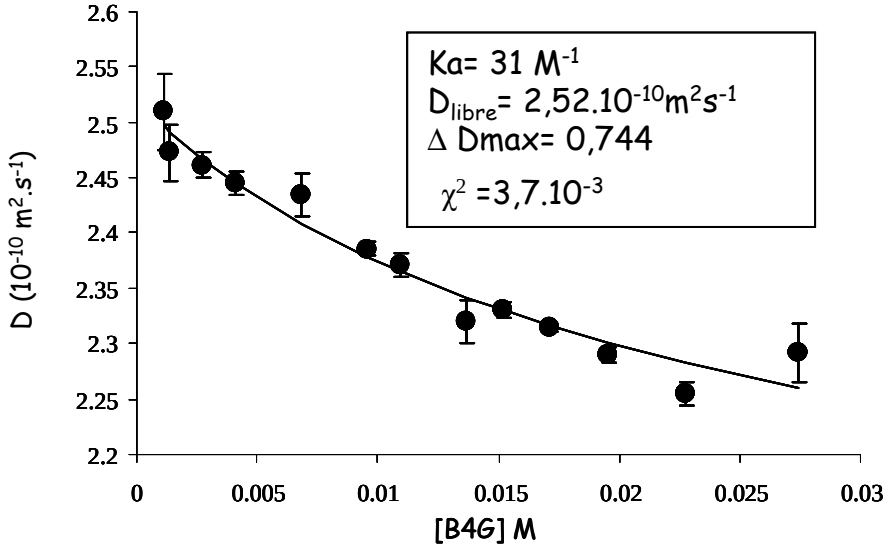


Figure III.21

Les valeurs de Ka ont finalement été mesurées pour chaque composé en fonction des différents protons H2, H3 et H4 et en utilisant pour chacun les variations de déplacements chimiques et les variations de diffusion. Les différents Ka, correspondant à une moyenne des différentes expériences, sont représentés sur le tableau III.11. Les valeurs correspondant aux composés non galloylés sont reprises des travaux de Pianet *et al.*[89]

Structure commune	Epicatéchine		B2		B4	
Composé	EGC	Epi	B2G	B2	B4G	B4
Ka (M^{-1})	42±6	39±8	40±8	7±1	34±4	7±2

Tableau III.11

Les valeurs, exprimées dans M^{-1}, ne présentent pas de grandes différences d'un dimère galloylé à un autre et sont proches de 40 M^{-1}, dans la même gamme que la catéchine ou l'épicatéchine. Par contre, la constante d'association des dimères galloylés est 5 à 6 fois plus élevée que celle des dimères non galloylés, montrant que les dimères galloylés sont plus enclins à former des micelles que leurs homologues non galloylés. Concernant l'épicatéchine gallate, la différence avec l'épicatéchine n'est pas notable.

III.3.5.3. ***Taille des micelles***

La taille des micelles a été évaluée à partir du coefficient de diffusion des micelles $D_{micelle}$ et de la relation de Stokes-Einstein [Equation 3]

La figure III.21 montre clairement que les coefficients de diffusion diminuent lorsque la concentration augmente, suggérant que les molécules s'organisent en micelles. Pour les concentrations les plus faibles, la valeur de D atteint une valeur correspondant à la molécule sous sa forme libre (D_{libre}) tandis que pour les plus fortes concentrations, la valeur de D correspond à la molécule engagée dans une micelle. Cette valeur évolue jusqu'à un plateau pour atteindre une valeur D minimale correspondant à $D_{micelle}$. Cette valeur est obtenue à partir de la relation entre D et les concentrations en tanins en utilisant l'équation 2, et est utilisée pour évaluer les tailles moyennes des micelles grâce à l'équation 3.

Comme nous pouvons le voir sur le Tableau III.12, $D_{micelles}$ atteint des valeurs de l'ordre de l' $Å^2.s^{-1}$ ce qui correspond à des rayons de micelles allant jusqu'à 20 Å comme c'est le cas pour les tanins non galloylés.

Squelette commun	Epicatéchine		B2		B4	
Composé	EGC	Epi	B2G	B2	B4G	B4
D_{libre} $(10^{-10}\ m^2\ s^{-1})$	2,71	3,4	2,69	2,6	2,53	2,8
rH_{libre} (Å)	7,36	5,9	7,41	7,7	7,91	7,7
$D_{micelle}$ $(10^{-10}\ m^2\ s^{-1})$	1	nm	1,2	0,9	1,4	0,9
$rH_{micelle}$ (Å)	19,9	nm	16,6	22,1	14,2	24,9

nm : non mesuré

Tableau III.12

III.3.5.4. ***Mesure de la concentration micellaire critique (CMC)***

La mesure des coefficients de diffusion à différentes concentrations en tanin nous permet également de mesurer la concentration au-delà de laquelle les tanins s'auto-organisent en pseudo-micelles, la CMC. La figure III.22 représente l'évolution de la valeur de D en fonction de l'inverse de la concentration en B4G. Deux droites de pentes différentes sont obtenues. L'intersection des deux droites correspond à la valeur de la CMC. Le même type de profil est obtenu lorsque l'on utilise l'évolution des déplacements chimiques en fonction de l'inverse de la concentration.

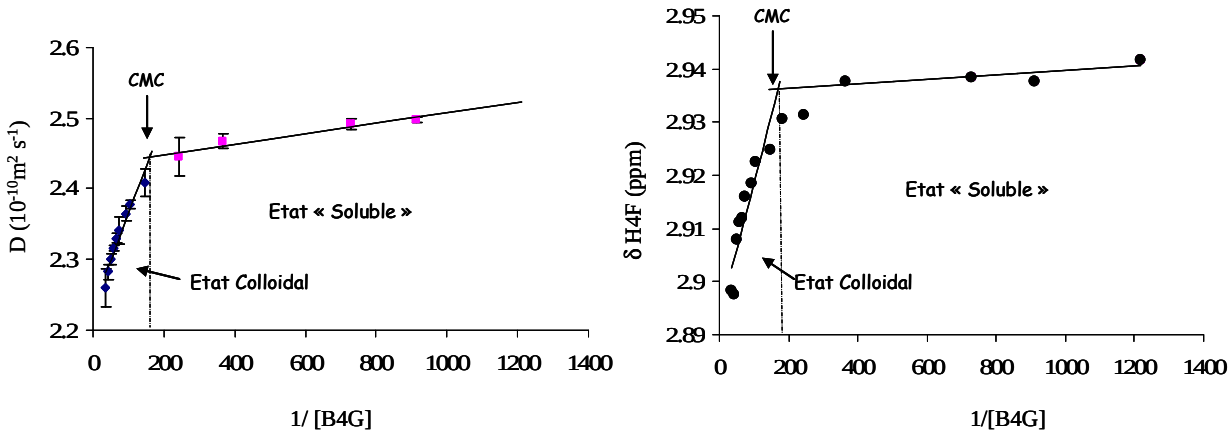


Figure III.22

Les valeurs de CMC ont été estimées de ces deux manières pour les différents composés et les valeurs moyennes apparaissent dans le tableau III.13 ci-dessous. Nous

pouvons constater que les valeurs sont significativement inférieures à celles mesurées pour les composés non galloylés.

Structure commune	Epicatéchine		B2		B4	
Composé	EGC	Epi	B2G	B2	B4G	B4
CMC (mM)	2.8 ± 0,3	<5	4.2 ± 1,4	18±3	5.6 ± 0,7	17 ± 4

Tableau III.13

III.3.5.5. ***Discussion***

Les précisions obtenues pour l'obtention des valeurs de constantes d'association montrent que l'auto-association des tanins galloylés ou non s'effectue selon un processus non coopératif et indéfini.

Les tanins galloylés restent à l'état libre jusqu'à une concentration de l'ordre de 3-5 mM et s'auto-associent préférentiellement à une concentration supérieure avec une constante d'équilibre proche de 40 M^{-1}. Les valeurs de CMC inférieures et les valeurs de Ka plus importantes, comparées à leurs homologues non galloylés, montrent que les composés galloylés sont plus enclins à former des micelles dans le vin. Cependant, le rayon des micelles formées ne dépasse pas le nm quelle que soit la procyanidine considéré. Ce résultat nous laisse penser que ces procyanidines seules ne peuvent pas être impliquées dans la turbidité des vins.[89,81]

III.4 **Conclusion**

Les différents standards synthétisés, selon la méthode décrite dans le chapitre II, nous ont permis de réaliser plusieurs études analytiques concernant le comportement de ces composés dans le raisin et le vin.

Une première étude a concerné l'étude de l'évolution des concentrations en monomères et procyanidines dans les baies de raisins au cours de la maturation de ces derniers. Nous avons pu montrer, au cours de cette étude, l'influence du millésime et du cépage. Alors que les dosages à partir des extraits de pépins ont permis de suivre assez fidèlement l'évolution de chaque composé au cours de la maturation, les analyses à partir des pellicules n'ont pas été aussi probantes. La méthode d'extraction mériterait d'être optimisée afin d'obtenir des extraits plus représentatifs. De plus, la complexité des extraits de pellicules ne nous a pas permis d'utiliser la détection UV pour doser tous les composés. En effet, les composés galloylés, le dimère B2 et le tétramère CatCatCatCat n'ont pas pu être dosés dans les pellicules. Une étape de fractionnement des extraits, afin d'éliminer les anthocyanes, permettrait sans aucun doute de pouvoir doser ces composés dans les pellicules.

La deuxième des études a concerné la quantification de ces différents composés dans des moûts et dans des vins au cours de la vinification et de l'élevage. Nous avons pu mettre en évidence, comme dans le cas des pépins, l'influence du cépage sur les concentrations rencontrées dans les moûts et les vins. Néanmoins comme pour les pellicules, la complexité du vin, ne nous a pas permis d'utiliser la détection UV pour tous les standards. Seule l'épicatechine gallate a pu être dosée avec la détection UV. Néanmoins, le fractionnement du vin permettrait d'utiliser la détection UV seule et en parallèle avec la détection flurimétrique, afin de rendre possible le dosage des composés galloylés ainsi que du dimère B2 et du tétramère dans le vin.

En effet, ni le tétramère CatCatCatCat ni le dimère B4G n'ont fait, à ce jour, l'objet d'études spécifiques dans les vins. Nous avons présenté ici, les premiers résultats concernant leur comportement dans des extraits de pépins. Mais il serait

intéressant, étant donner leurs concentrations non négligeables dans les pépins, de réaliser leur analyse quantitative au sein de pellicules de raisins et dans du vin.

Nous pouvons également souligner, que l'utilisation de standards de synthèse nous a permis d'établir des courbes d'étalonnage spécifiques pour chaque composé et donc de réaliser les dosages de façon rigoureuse. En effet, nous pouvons rencontrer dans la bibliographie, des résultats de quantification exprimés en équivalent de catéchine pour le dosage des différents monomères et en équivalent de B2 pour tous les dimères par exemple. [55,57] Or comme nous l'avons montré, les facteurs de réponse de chaque composé, même s'ils appartiennent au même groupe peuvent montrer de grandes différences.

La troisième étude réalisée à partir des standards synthétisés concerne le comportement supramoléculaire des composés galloylés. Nous avons pu montrer que l'auto-association des composés gallates se déroulait selon le même système non-coopératif et indéfini que les composés non galloylés. Néanmoins, les gallates auraient tendance à s'auto-associer plus facilement que leurs analogues non galloylés.

IV. Isolation et caractérisation d'un nouveau composé des vins rouges

Au cours de nos dosages par injection directe d'échantillons de vins rouges, dans les conditions de double détection, nous avons remarqué la présence d'un produit semblant être présent en assez grande quantité. Ce produit présente la particularité d'éluer dans les mêmes conditions que les procyanidines, et d'être détectable en UV (détection à 280 nm) et en fluorimétrie (Excitation : 280 nm, Emission : 320 nm) dans les conditions habituellement utilisées pour les procyanidines. Il présente également un comportement différent des procyanidines. En effet si l'on peut voir une légère augmentation de la concentration globale des différentes procyanidines au cours de la vinification, la concentration de ce composé diminue. Enfin, ce qui a particulièrement retenu notre attention est le fait que ce produit, contrairement aux procyanidines, est beaucoup plus abondant dans le Cabernet-Sauvignon que le Merlot. Il nous est alors apparu intéressant de chercher à l'identifier.

IV.1 Mise en évidence du composé et caractérisation

IV.1.1. Mise en évidence par CLHP

Lors de l'analyse des vins en cours de vinification, nous avons remarqué sur les chromatogrammes obtenus par détection fluorimétrique, un pic présentant une aire relativement importante et dont le temps de rétention était légèrement supérieur à celui de l'épicatéchine (Figure IV.1).

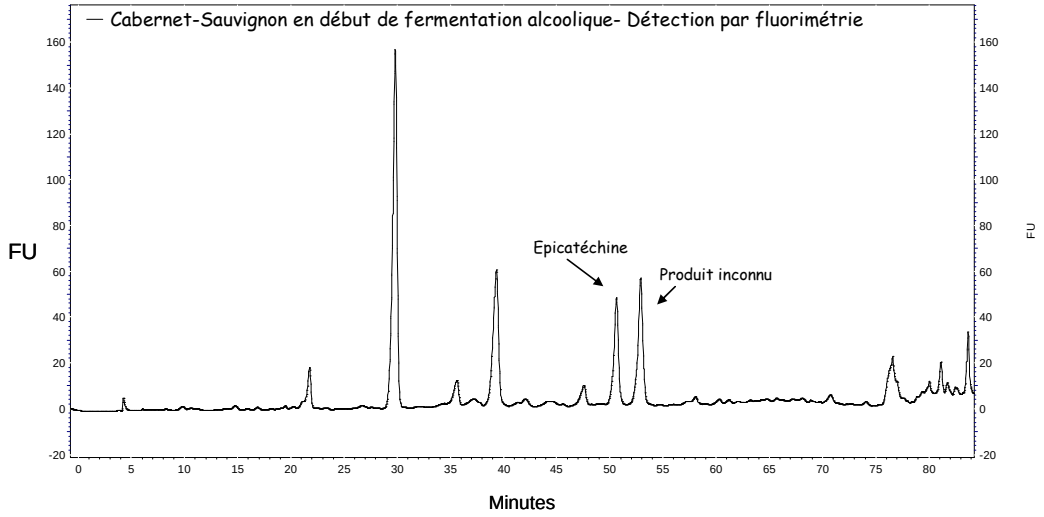


Figure IV.1

L'analyse obtenue par la détection UV permet également de mettre en évidence ce produit et d'accéder ainsi à son spectre UV en utilisant la barrette de diodes entre 200 et 600 nm (Figure IV.2)

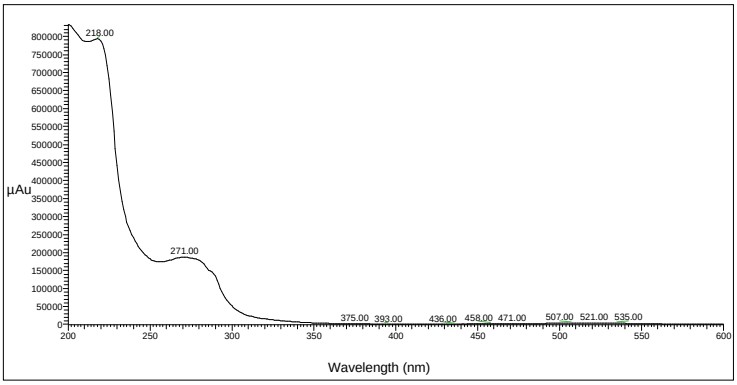


Figure IV.2

Ces deux informations ne nous permettent évidemment pas d'émettre une hypothèse sur la structure du composé. Nous avons donc décidé de coupler l'analyse par chromatographie liquide à une analyse par spectrométrie de masse afin d'élucider sa structure.

IV.1.2. **Caractérisation par spectrométrie de masse**

Les analyses de masse ont été réalisées en couplage avec la CLHP sur le même appareil Finnigan LCQ équipé d'une trappe ionique et d'une source électrospray (ESI).

La phase de séparation est conduite dans les mêmes conditions que la CLHP exceptée pour la nature des solvants. Les deux solvants utilisés pour la séparation sont les suivants :

- Solvant A= H_2O, 0,1% acide formique
- Solvant B= Acétonitrile ; 0,1 % acide formique

Le gradient utilisé est le suivant : De 0 à 5 min : 97,6% de A ; de 5 à 15 min : de 97,6 à 92,6% de A ; de 15 à 18 min : 92,6% de A ; de 18 à 30 min : de 92,6 à 89,6% de A ; de 30 à 55 min : De 89,6 à 84% de A ; de 55 à 60 min : de 84 à 80 % de A ; de 60 à 70 min : De 80 à 86 % de A ; de 70 à 75 min : De 86 à 36% de A ; de 75 à 80 min : de 36 à 20% de A ; de 80 à 82 min : de 20 à 97,6% de A ; de 82 à 85 min : 97,6% de A.

Les conditions d'analyse de la source ESI sont les suivantes : mode négatif, température capillaire : 400°C, voltage du spray : 5 kV, voltage du capillaire : –3 V, Sheath gaz à 70 unités arbitraire et gaz auxiliaire à 40 unités arbitraire. Pour l'étude de fragmentation en LC-MS^2, une énergie d'activation de 25% est appliquée.

Le système de solvant ternaire utilisé pour l'analyse des vins et des extraits n'est pas adapté à l'utilisation du spectromètre de masse ESI que nous possédons (présence de sels, acide non volatil). Nous avons donc modifié dans un premier temps le système de solvant utilisé pour la phase de séparation. La phase aqueuse utilisée est composée d'eau et d'acide formique à 0,1% (beaucoup plus volatil que l'acide orthophosphorique). La phase organique est composée d'acétonitrile et d'acide formique à 0,1%. Le gradient utilisé est le même que pour le dosage (en considérant les volumes totaux phase aqueuse/ phase organique du système ternaire). Ce système de solvant, même s'il ne présente pas les mêmes propriétés que notre système ternaire, notamment en terme de sélectivité et sensibilité, nous a permis d'obtenir le pic moléculaire et les fragmentations successives dans la trappe de l'appareil (MS^3). Le spectre obtenu en mode négatif est représenté ci-dessous avec le TIC correspondant à la masse du produit (Figue IV.3).

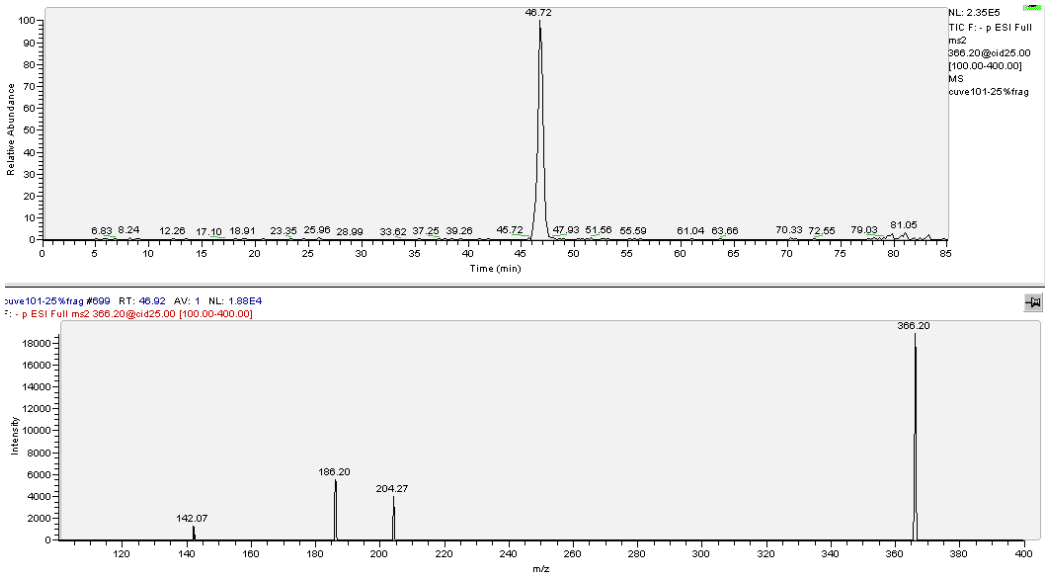


Figure IV.3

De cette première analyse, plusieurs informations ont pu être déduites :

- Le pic moléculaire $[M-H]^-$ égal à 366,20 nous indique une masse molaire d'environ 367,20 $g.mol^{-1}$. La règle de l'azote nous permet de conclure que notre molécule possède un nombre impair d'azotes.

- Le premier fragment à 204,27 (perte d'une masse de 162) nous permet de penser que la molécule recherchée possède sûrement un sucre de type $C_6H_{12}O_6$.

- Les deux fragments suivants à 186,20 et 142,07 pourraient correspondre à une perte d'H_2O (-18) puis de CO_2 (-44).

Ces trois informations couplées à une recherche bibliographique n'ont pas permis de remonter à une structure connue. La purification du produit devrait permettre de réaliser d'autres analyses telles que la RMN ou la spectrométrie de masse haute résolution afin de déterminer la structure du composé.

IV.1.3. **Purification du composé**

Afin de réaliser des études de détermination structurale plus poussées nous avons décidé de purifier le composé à partir du vin. Dans ce but, nous avons utilisé la même méthode chromatographique avec une colonne semi-préparative (même phase stationnaire: Nucléosil 5 µm mais diamètre de 10 mm, débit 2 ml/min). Une boucle d'injection de volume plus important (100 µl au lieu de 20 µl) a permis de limiter le nombre d'injection. Pour la

même raison, le vin (Cabernet-Sauvignon en fin de fermentation alcoolique) a été partiellement évaporé avant d'être injecté. Une cinquantaine d'injections nous ont permis d'isoler, après évaporation et lyophilisation, une dizaine de milligrammes d'une poudre violette. Le chromatogramme UV obtenu avec la colonne analytique est représenté sur la figure IV.4. Malgré une pureté non optimale, une analyse complète par RMN et HRMS a tout de même été réalisée.

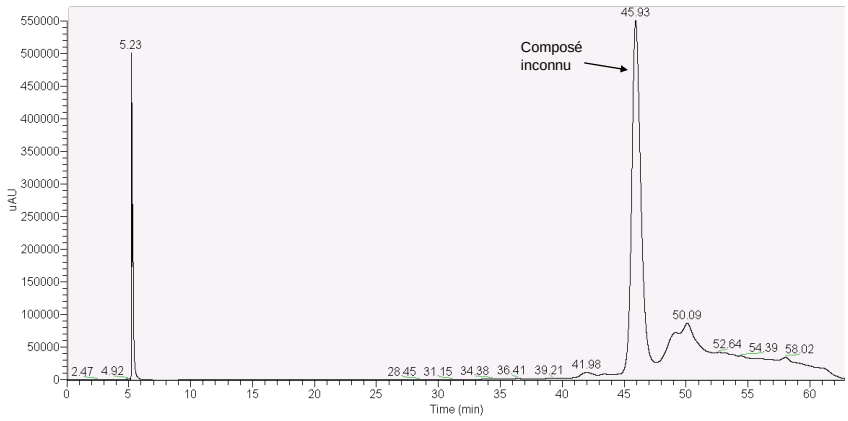


Figure IV.4

IV.1.4. **Caractérisation par spectrométrie de masse haute résolution**

L'analyse de masse à haute résolution permet de connaître la masse molaire d'un composé avec une résolution plus importante, et donc d'en limiter le nombre de formules brutes possibles.

Les analyses de haute résolution ont été réalisées sur un Spectromètre Qstar – Applied Biosystems équipé d'un analyseur quadripôle-temps de vol (QTOF) et d'une source electrospray (ESI). La détection a été réalisée après injection directe avec un étalon interne.

Le pic moléculaire $[M-H]^-$ est détecté avec une masse de 366.1185 $g.mol^{-1}$, ce qui nous indique que le composé a une masse exacte de 367,1263 $g.mol^{-1}$. Plusieurs formules brutes pour le pic moléculaire nous ont alors été proposées par le logiciel de calcul. Nous avons alors décidé d'utiliser la haute résolution sur les fragments. Une seule formule brute correspond au plus petit fragment m/z= 142,0637 $g.mol^{-1}$: $C_{10}H_8N$. A partir de cette

formule brute et des hypothèses sur la fragmentation, nous avons pu remonter à la formule brute correspondant au pic $[M-H]^-$ de notre composé (Figure IV.5).

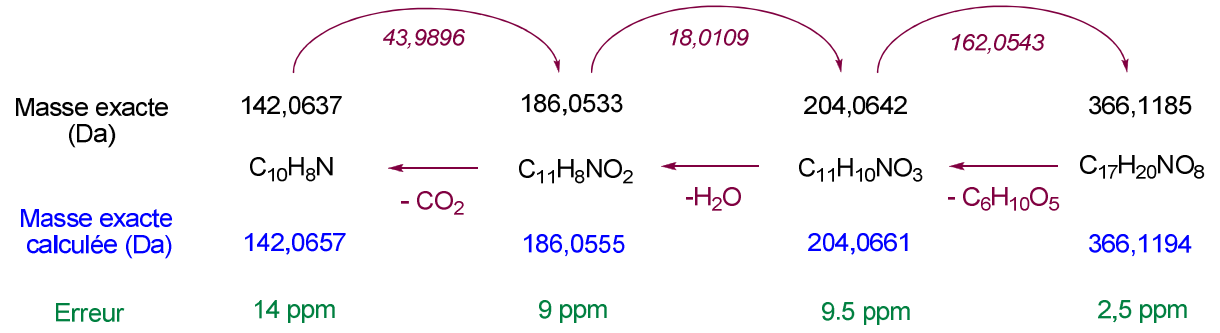


Figure IV.5

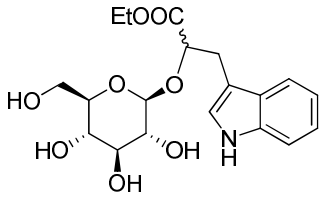
Cette formule brute, (proposée par le logiciel directement lors de l'analyse du pic parent) admet une erreur de seulement 2,5 ppm par rapport à la masse haute résolution obtenue. Les autres erreurs intermédiaires sont inférieures à 15 ppm. Nous nous sommes dès lors concentrés sur cette hypothèse pour retrouver notre composé.

Des informations peuvent être tirées à partir du calcul du degré d'insaturation de la formule moléculaire correspondante au dernier pic.

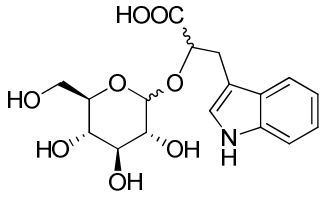
- Formule moléculaire= $C_{10}H_8N$ = $[M-H]^-$
- M= $C_{10}H_9N$, ce qui correspond à un degré d'insaturation (DI) égal à 7
- La présence d'un ou plusieurs cycles semble très probable

Plusieurs publications relatent la présence de tryptophane ainsi que de ses dérivés dans le vin.[192,193] Le tryptophane est constitué d'un hétérocycle de type indole (C_8H_7N ; DI = 6), ce qui pourrait correspondre à une partie de notre molécule. L'autre partie serait constituée d'un éthylène (C_2H_4 ; DI = 1).

A partir de cette supposition et considérant les travaux de Williams *et al.*[194] relatant la présence de glucoside d'indole-3-lactate d'éthyle **160** dans du Riesling blanc, nous pouvons émettre l'hypothèse, que notre composé pourrait correspondre à cette même molécule sous forme acide carboxylique **161** (Figure IV.6).



β-D-Glucoside d'indole-3-lactate d'éthyle
160
Formule Chimique: $C_{19}H_{25}NO_8$
Masse Exacte : 395.15802



Glucoside d'acide indole-3-lactique
161
Formule Chimique : $C_{17}H_{21}NO_8$
Masse Exacte : 367.12672

Figure IV.6

IV.1.5. **Caractérisation par RMN**

Le spectre proton ^1H a pu confirmer la présence d'une partie glycosidique sur notre composé. En effet, nous pouvons voir sur ce spectre, le doublet caractéristique d'un proton anomérique avec un déplacement chimique de 4,27 ppm. Les autres protons du cycle glycosidique ainsi que les protons de la partie indolique apparaissent clairement sur le spectre (Figure IV.7). Ces données sont appuyées par le spectre carbone ^{13}C et l'analyse COSY.

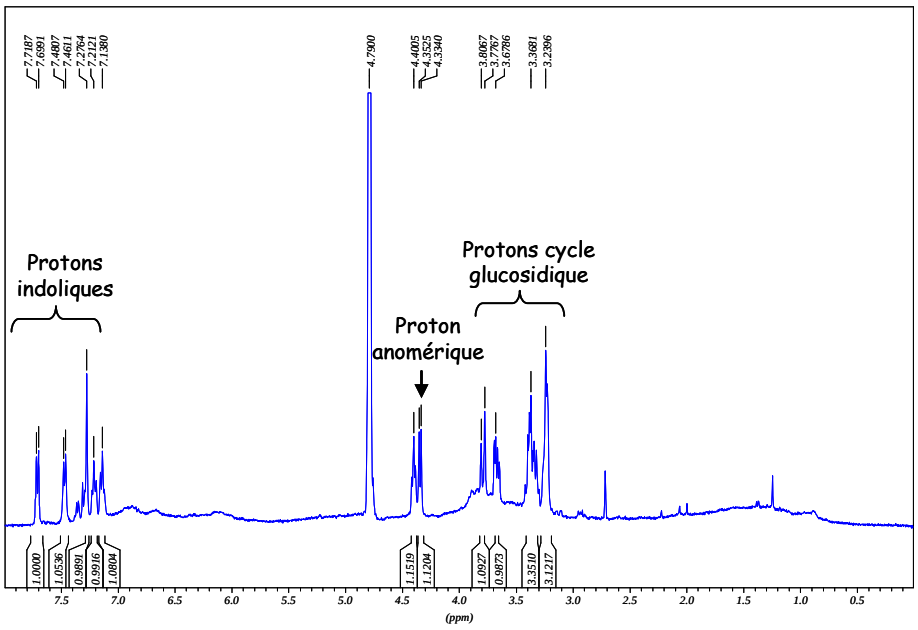
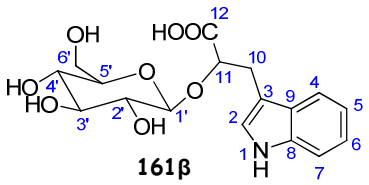


Figure IV.7

Les autres protons et carbones ont également pu être détectés et attribués. La caractérisation de la molécule entière apparaît sur la figure IV.8 ci-dessous. Le déplacement chimique du proton anomérique 1' et sa constante de couplage avec le proton 2' ($J_{1'-2'}$= 7,4 Hz) nous indique que nous avons un β-glycoside **161β**.

A ce stade de l'étude, les différentes analyses effectuées sont en accord avec notre détermination structurale. La dernière étape consiste à synthétiser cette molécule afin de confirmer notre hypothèse et déterminer la configuration absolue de la molécule. En effet le carbone C11 est chiral et sa configuration absolue doit être confirmée.



161β

Partie aglycone			Partie glycone		
	^1H (400 MHz, H_2O, ppm)	^{13}C (400 MHz, H_2O, ppm)		^1H (100,6 MHz, H_2O, ppm)	^{13}C (400 MHz, H_2O, ppm)
1	8,36, sl	-	1'	4,35; d; $J_{1'-2'}$=7,4 Hz	102,5
2	7,28, s	124,7	2'	3,30-3,42 m	73,2
3	-	112,1	3'	3,30-3,42 m	75,7
4	7,71; d; J_{4-5}=7,6 Hz	118,8	4'	3,30-3,42 m	69,6
5	7,14; dd; J_{4-5}=7,6 Hz; J_{5-6}=7,2 Hz	119,3	5'	3,25-3,21; m	75,9
6	7,21; dd; J_{6-7}=7,6 Hz; J_{5-6}=7,2 Hz	121,9	6'	6'a et 6'b, 3,79 et 3,67; ABX;	60,65
7	7,47; d; J_{6-7}=7,6 Hz	112,0		$J_{6'a-6'b}$=12Hz; $J_{6'a-2'}$=5Hz;	
8	-	136,2		$J_{6'b-2'}$<1 Hz	
9	-	130,8			
10	3,25-3-21; m	28,4			
11	4,40; t; J_{6-7}=6,3 Hz	80,8			
12	-	na			

na: non attribué

Figure IV.8

IV.1.6. Synthèse du composé : approche rétrosynthétique

La synthèse chimique du composé **161β** devrait nous permettre de confirmer notre hypothèse sans aucune ambiguïté et d'établir sa configuration absolue. De plus, l'obtention de ce produit sous forme pure et en quantité suffisante devrait permettre la réalisation d'une courbe d'étalonnage et la quantification du composé dans les vins.

A ce stade de l'étude, cette synthèse n'a pas pu être achevée, néanmoins une première étude rétrosynthétique a été envisagée.

L'acide indole lactique sous forme racémique **162** est disponible dans le commerce, nous pourrions donc partir de ce produit et le coupler à une unité glucose **163**. La fonction acide de l'indole serait préalablement protégée par estérification puis **164** serait couplé, selon la méthode de Koenigs-Knorr, avec l'α-bromotétra-*O*-acétyl-D-glucose **163**. La déprotection des acétates suivie de la saponification de la fonction ester devraient nous permettre d'accéder à la molécule attendue **161β**.

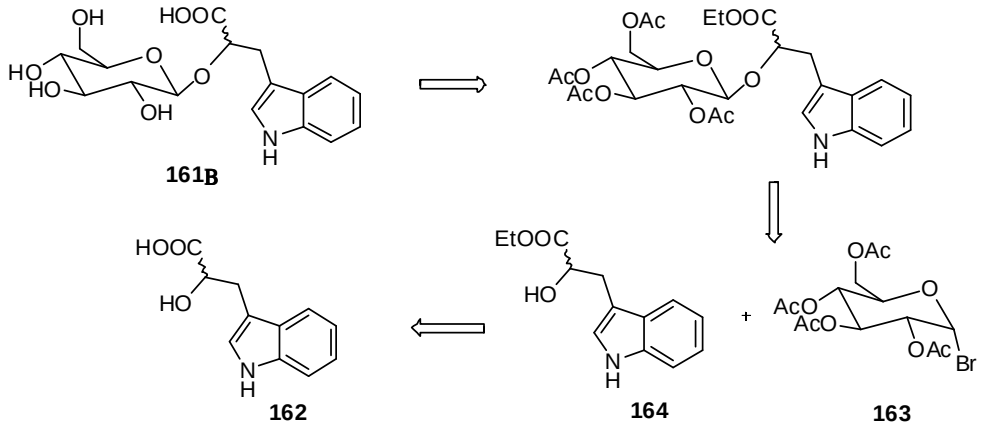


Figure IV.9

IV.2 **Indole et vin**

IV.2.1. **Bibliographie**

La présence de composés possédant une structure indole est largement référencée dans les vins blancs. Ces composés sont généralement issus du métabolisme du tryptophane **165**. Un de ces métabolites, l'acide indole-3-acétique (AIA) **166** a été plus particulièrement étudié car il serait à l'origine de la synthèse de la 2-aminoacétophénone.[195,196] Ce composé **165**, initialement rapporté par Rapp en 1993,[197] se développe dans les vins blancs au cours du vieillissement. Il est responsable d'un type de vieillissement prématuré du vin avec l'apparition de notes atypiques rappelant le naphtalène, la laine humide ou encore l'encaustique, associées à la perte du bouquet variétal typique du raisin. Il est probablement synthétisé *via* la dégradation oxydative de l'indole acétaldéhyde (IAAld) **167** favorisée lors du sulfitage des vins blancs. Cette réaction serait d'ailleurs inhibée par l'ajout d'antioxydants tel que l'acide ascorbique.[198]

L'acide indole-3-acétique (AIA) **166** est une des plus abondantes phytohormones responsables du contrôle de la croissance et du développement des plantes. Nous pouvons voir dans la voie de biosynthèse que plusieurs voies d'accès pour l'AIA **166**, via le tryptophane **165** ou non, peuvent être envisagées.[199,200,201] Concernant la voie passant par l'acide indole-3-pyruvique (AIPy) **168**, nous pouvons voir que ce dernier est en équilibre avec l'acide indole-3-lactique (AIL) **169**, qui pourrait très probablement être un des précurseurs de notre composé.

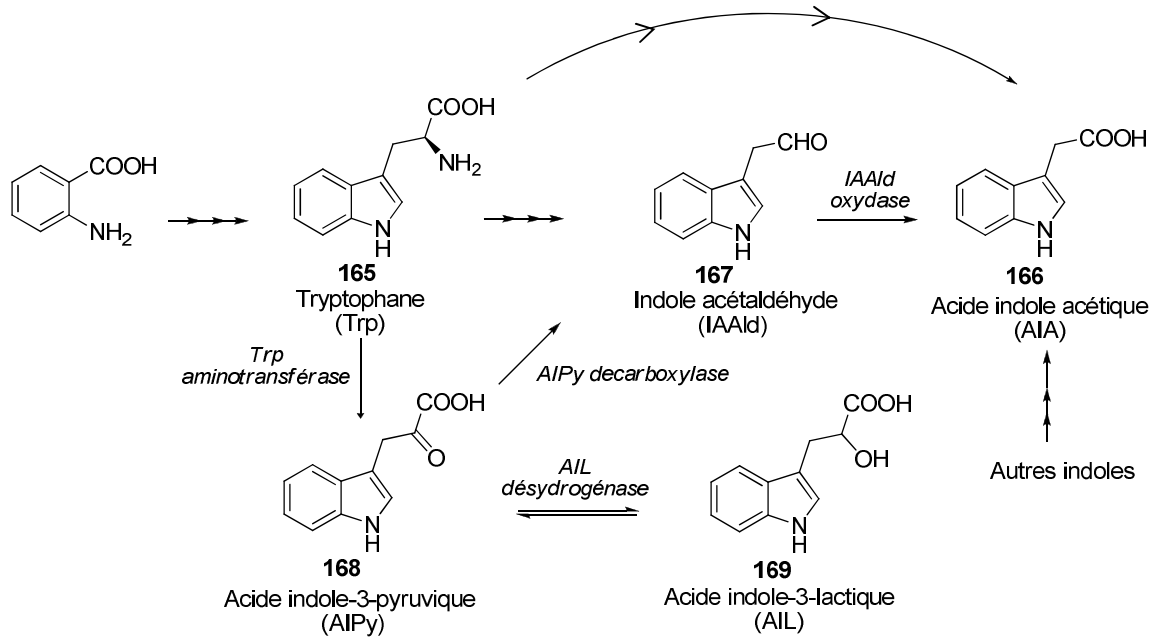


Figure IV.10

Cet équilibre n'a pas été démontré dans le vin mais il serait sans nul doute intéressant de voir si ces deux précurseurs probables sont présents dans les vins rouges contenant notre glucoside **161β**.

IV.2.2. **Aspect quantitatif du composé isolé dans les vins**

Bien que nous n'ayons pas établi de courbe d'étalonnage, l'évolution et la quantité relative du composé **161β** ont pu être déterminées dans plusieurs types de vins. La première étude concerne les vins que nous avons suivis lors de la vinification du millésime 2007, pour la quantification des procyanidines. Cette étude a été menée sur 3 cuves différentes, dont deux de Cabernet-Sauvignon et une de Merlot, à différents moments de la vinification (Figure IV.11). Comme nous pouvons le voir sur le graphique, le composé

indolique **161β** est présent en plus grande quantité dans les 2 cuves de Cabernet-Sauvignon (CS) comparées à celle de Merlot. Bien que les résultats ne soient pas présentés ici, nous avons analysé différentes cuves du millésime 2008 afin de confirmer cette observation, et cette différence due au cépage est également constatée pour le millésime 2008.

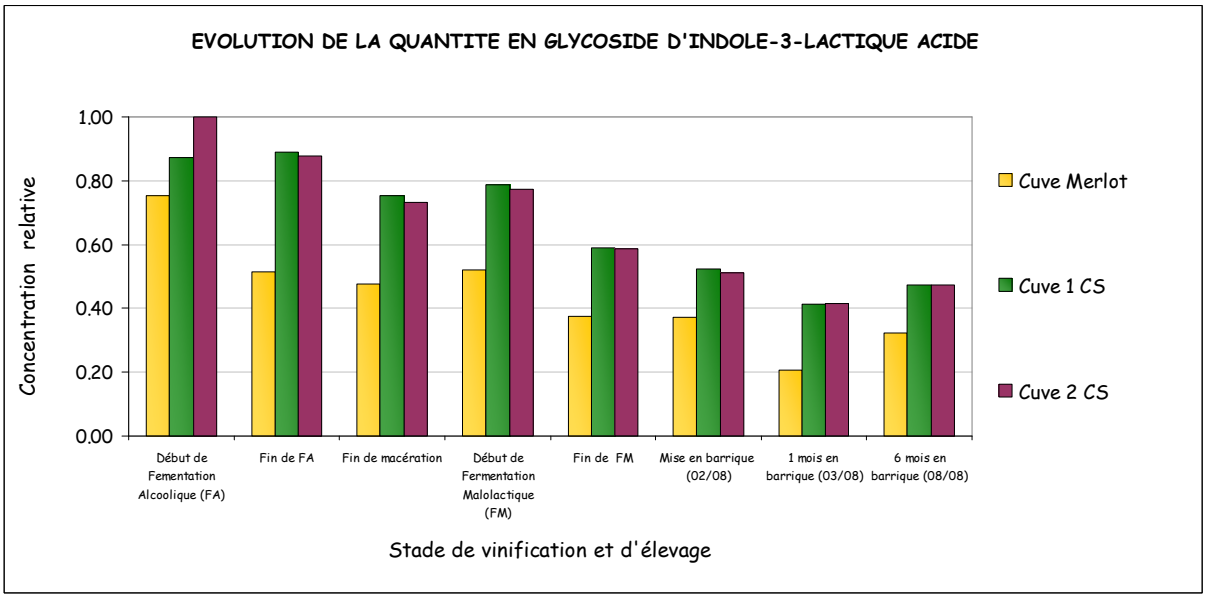


Figure IV.11

Nous pouvons également noter une importante diminution quantitative au cours de la vinification (un peu plus que la moitié). Après la mise en barrique, la diminution semble moins importante et nous constatons même une augmentation entre le 1er et le 6ème mois.

Il nous a également semblé intéressant d'étudier l'aspect quantitatif de ce composé **161β** pour d'autres vins en particulier d'assemblage. Cinq vins différents ont été analysés, dont trois du millésime 2007 et deux du millésime 2006. Pour le millésime 2007, les trois vins étudiés, encore en barrique, correspondent au grand vin Mouton Rothschild, au second vin (Petit Mouton) et au vin de presse. Pour le millésime 2006, nous avons étudié le grand vin Mouton Rothschild et le Mouton Cadet, un vin de marque commercialisé par la société Baron Philippe de Rothschild. Les procyanidines ont également été dosées dans ces vins. Le graphique ci-dessous représente la concentration totale des différentes procyanidines que nous dosons (monomères, dimères, trimères et tétramères) ainsi que la concentration relative en indole (Figure IV.12).

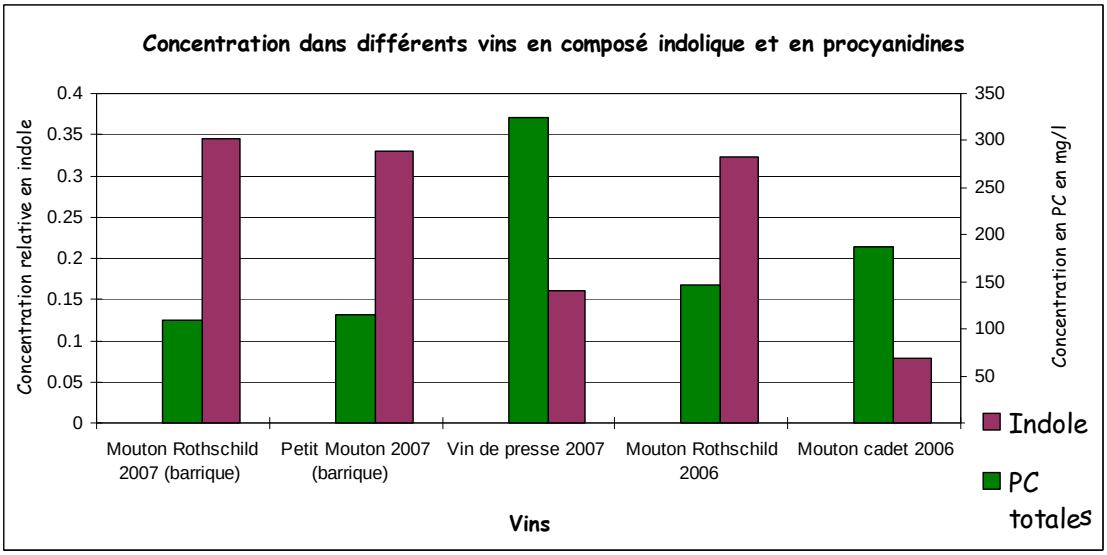


Figure IV.12

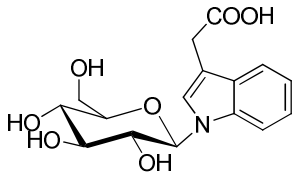
Concernant les deux vins Moutons Rothschild et Petit Mouton 2007, nous ne notons pas de différences notables que ce soit pour la concentration en indole **161β** ou en procyanidines totales. Le vin de presse contient de manière logique plus de procyanidines que les autres vins de 2007. Par contre, sa concentration en indole **161β** est deux fois moins importante. Pour le Mouton Rothschild 2006, le profil de concentration est sensiblement le même que pour celui de 2007. Nous pouvons tout de même noter que la concentration en indole **161β** se trouve au même niveau que dans le cas de nos cuves après 6 mois d'élevage en barrique. Le fait le plus marquant concerne le Mouton Cadet. Bien que sa concentration en procyanidines soit supérieure, la concentration en indole **161β** est nettement inférieure par rapport aux autres vins.

Ces données ne sont que des observations émises d'après quelques analyses, aucune généralisation ne peut en être actuellement déduite. Néanmoins, il semblerait intéressant d'élargir ces dosages à d'autres vins, et d'étudier plus précisément l'influence du cépage, du terroir ou bien encore du millésime sur la concentration en ce composé indolique **161β**.

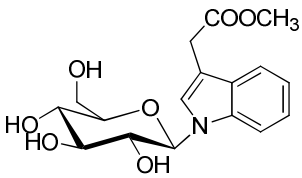
IV.2.3. **Influence sensorielle possible sur le vin**

Comme nous l'avons vu précédemment, des composés possédant un noyau indole seraient des précurseurs d'arômes dans les vins blancs. Le composé isolé **161β** ne pourrait pas en raison de sa structure non volatile avoir des répercussions sur l'arôme des vins, mais il pourrait néanmoins avoir des effets au niveau du goût.

Hofmann et Schwarz[202,203] ont récemment étudié les composés responsables de l'astringence dans les groseilles et parmi les composés incriminés, deux composés **170** et **171** possédant à la fois un noyau indole et un noyau glucose ont été isolés et caractérisés (Figure IV.13).



170



171

Figure IV.13

Ces deux composés induiraient une sensation d'astringence avec des seuils de perception extrêmement bas (0,0003 μmol.l^{-1} pour **170** et 0,001 μmol.l^{-1} pour **171**). Le composé **170** est décrit comme la substance naturelle d'origine végétale ayant le plus bas seuil de perception d'astringence jamais décrit. Pour déterminer la relation entre la structure et l'astringence, ils ont soumis le panel sensoriel à l'analyse de l'AIA **166** (même structure sans la partie sucre) et du tryptophane **165** (fonction amine supplémentaire). Ces deux composés présentent bien un caractère astringent, mais les seuils de perception sont 33 fois plus importants pour **166** et 1650 fois pour **165**. Cette augmentation du caractère astringent pour un composé glycosilé, par rapport à l'aglycone correspondant, a déjà été observée notamment sur des flavans-3-ol-*C*-glycosides.

Etant donné sa structure combinant un indole et un sucre, le composé **161β**, que nous avons isolé, doit certainement posséder un caractère astringent, et sa participation dans l'astringence globale du vin reste à déterminer. Sa synthèse pourra permettre d'envisager des études sensorielles sur ce composé.

V. Conclusion générale

Dans le premier chapitre de ce manuscrit, nous avons pu voir différentes généralités concernant les raisins, le vin et les procyanidines. A partir de leur biosynthèse au niveau de la baie de raisins et jusqu'à ce que le vin les contenant soit dégusté, les procyanidines ne cessent d'évoluer, aussi bien au niveau quantitatif que qualitatif. Leurs différents rôles dans le vin ont également été abordés et montrent qu'une meilleure connaissance et compréhension des évolutions des procyanidines est importante. Des études sur les procyanidines peuvent être réalisées en utilisant des composés extraits à partir de substances naturelles, mais cette technique, qui nécessite différentes étapes de purification, est longue et fastidieuse. Nous avons préféré opter pour la synthèse chimique afin d'obtenir des standards parfaitement caractérisés qui peuvent être utilisés par la suite comme outil afin d'étudier l'évolution et le comportement de ces diverse procyanidines dans le raisin et le vin.

Cette stratégie de synthèse ainsi que la bibliographie relative à la synthèse de procyanidine ont été détaillées dans le deuxième chapitre. La méthodologie de synthèse de procyanidines oligomères, mise au point précédemment au laboratoire,[212,219,220] nous a permis d'obtenir des standards utilisés par la suite pour l'analyse quantitative de ces composés dans les baies de raisins et le vin. Cette méthode itérative qui permet de contrôler la régiochimie et la stéréosélectivité des liaisons interflavanes mais également le degré d'oligomérisation lors de l'étape de couplage, nous permet de travailler en conditions stœchiométriques.

L'utilisation d'un catalyseur à l'or nous a permis d'améliorer sensiblement l'étape clé de la synthèse qu'est le couplage. Cette nouvelle méthodologie de couplage qui permet de travailler en conditions plus douces et moins contraignantes, a permis d'augmenter les rendements pour la synthèse des précurseurs des dimères B3 **30**, B1 **37** et B2 **53**.

L'étape de déprotection a également fait l'objet d'amélioration, notamment en termes de praticité, avec l'utilisation du système H-Cube®.

La bibliothèque de standards a pu être élargie par la mise au point de la synthèse de deux dimères gallates (B4-3''-*O*-gallate natif **99** et B2-3''-*O*-gallate protégé **98**). Cette

méthodologie peut également permettre l'accès à d'autres composés gallates, dimères ou autres.

La synthèse de procyanidines de type 4-6 reste, à ce jour, toujours un défi. Plusieurs pistes restent encore à explorer dans le cadre du couplage catalysé à l'or. L'approche par ouverture régiosélective et stéréocontrôlée de l'époxyde reste également à approfondir.

Le troisième chapitre relate les différentes études entreprises avec les standards synthétisés. Ils ont pu être utilisés en tant que standards pour étudier l'évolution des procyanidines dans le raisin mais aussi dans le vin. L'analyse de baies de raisins, récoltées à différentes dates de la maturation du raisin, nous a permis de suivre l'évolution de la concentration des différents monomères et oligomères.

C'est la première fois, à notre connaissance, que le tétramère CatCatCatCat a été identifié et quantifié dans des pépins de raisins. De plus, bien que le dimère gallate ait déjà été identifié dans des extraits de pépins de raisins, nous présentons ici les premiers résultats quantitatifs.

Au cours de cette thèse, nous avons pris le parti d'analyser le vin de la façon la plus simple et rapide possible, *i.e.* en procédant par injection directe. La complexité du vin ne nous a pas permis de doser, entre autres ces deux composés. Néanmoins, un simple fractionnement préalable du vin pour éliminer les anthocyanes nous permettrait d'appliquer aisément notre méthode et de quantifier également ces deux composés dans le vin.

La méthode nous a tout de même permis d'effectuer le dosage de trois monomères, de trois dimères et d'un trimère au cours de la vinification et de l'élevage de deux cépages différents : Merlot et Cabernet-Sauvignon.

Pour compléter cette étude, il serait intéressant de coupler ces résultats avec des analyses sensorielles. Il est notamment prévu de réaliser la synthèse de quelques procyanidines à l'échelle du multigramme afin de réaliser des études organoleptiques.

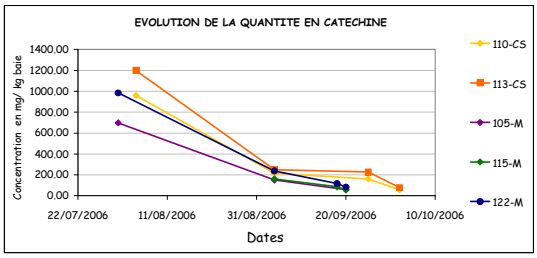
Dans le quatrième chapitre, nous avons présenté nos résultats concernant l'identification, l'isolation et la caractérisation d'un nouveau composé des vins rouges. Toutes les études organoleptiques restent à faire, mais la structure établie nous amène

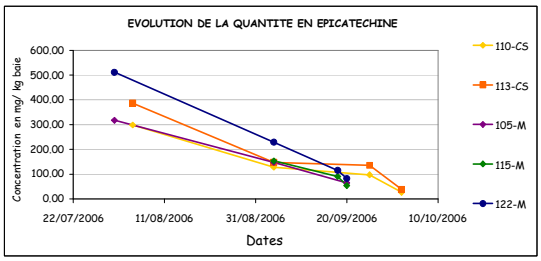
fortement à penser que ce composé indolique pourrait avoir une influence sur l'astringence du vin.

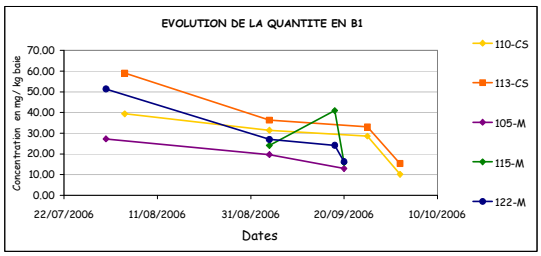
Un projet, en cours, prévoit justement d'effectuer la synthèse chimique de ce composé afin de pouvoir le doser dans différents vins et ainsi étudier d'éventuelles corrélations entre le cépage, le millésime et le terroir. Une étude sensorielle est également envisagée afin de déterminée l'influence organoleptique de ce composé dans les vins rouges.

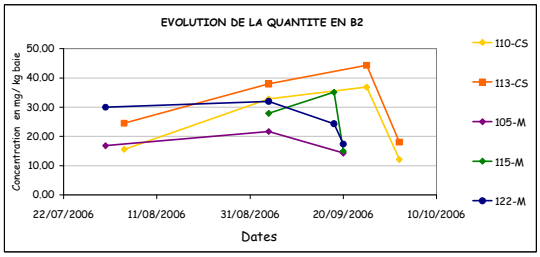
ANNEXES

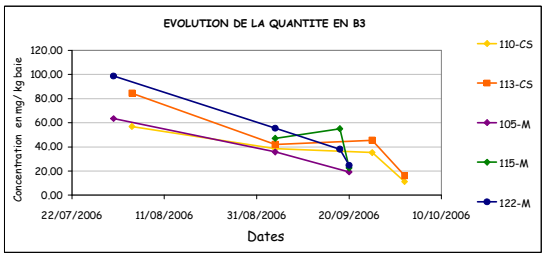
ANNEXE 1: EVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN MONOMERES ET PROCYANIDINES ISSUS DES PEPINS PAR KG DE BAIE RAISIN DURANT LA SAISON 2006

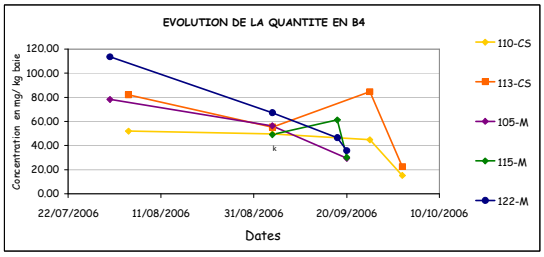


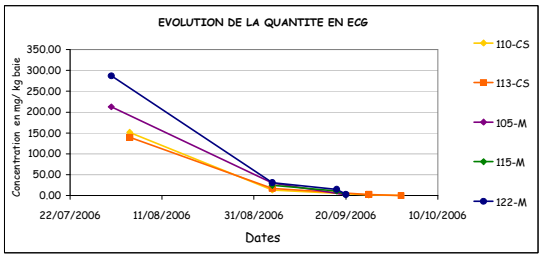


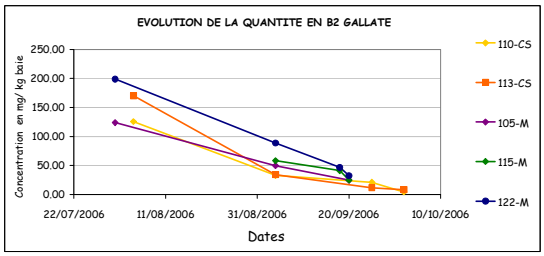


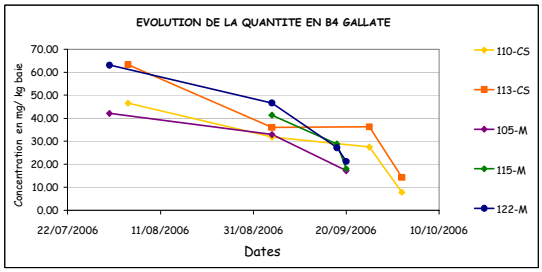


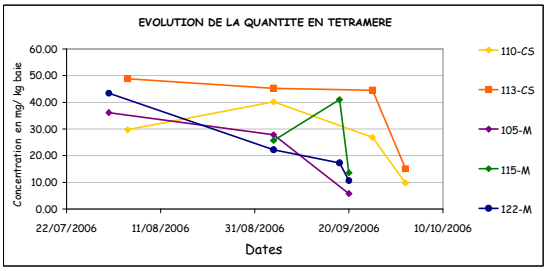




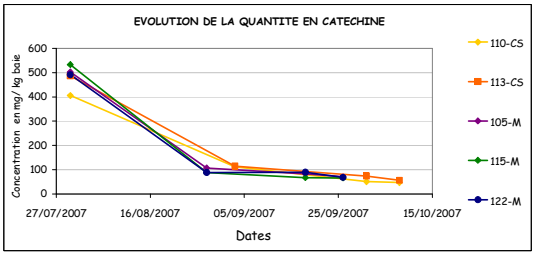


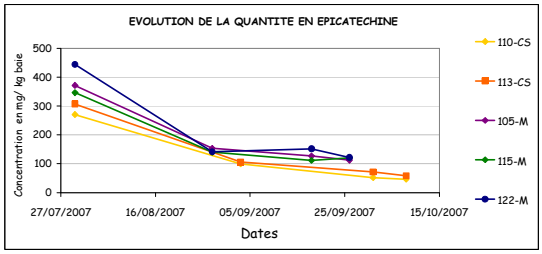


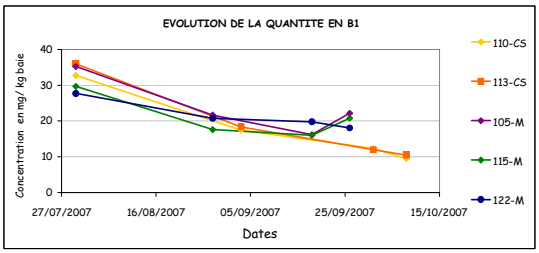


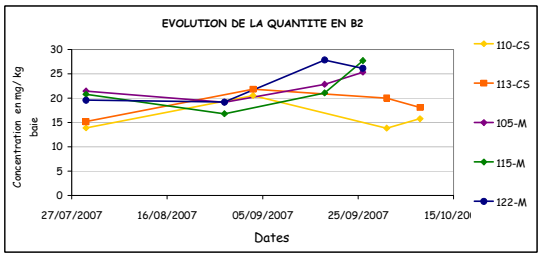


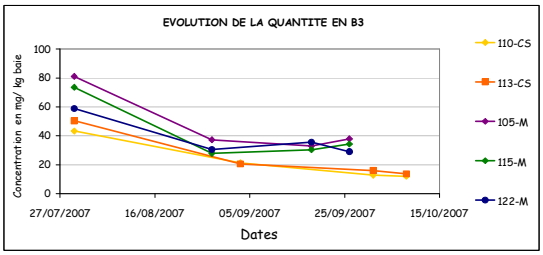
ANNEXE 2: EVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN MONOMERES ET PROCYANIDINES ISSUS DES PEPINS PAR KG DE BAIE RAISIN DURANT LA SAISON 2007

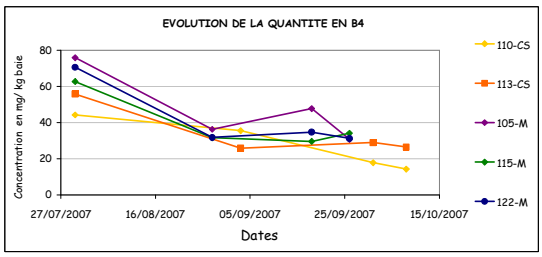


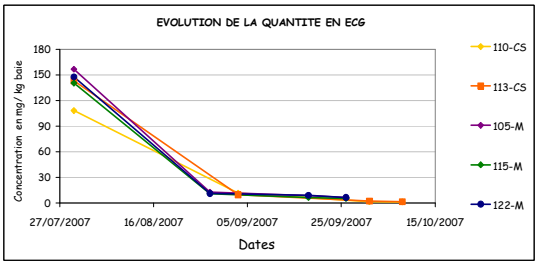


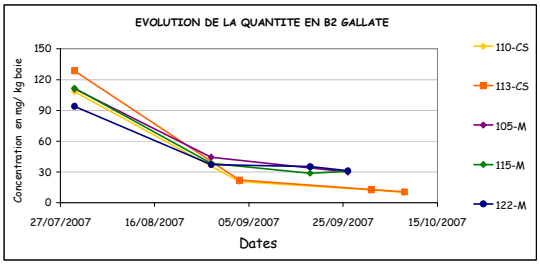


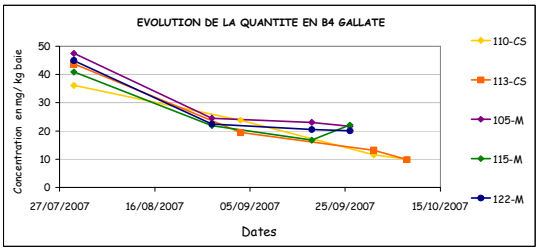


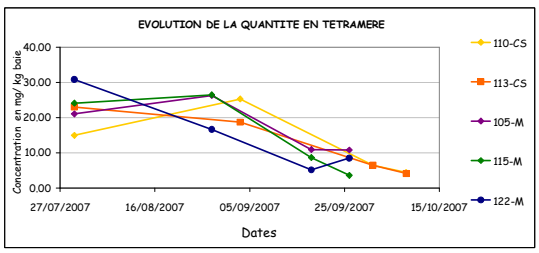




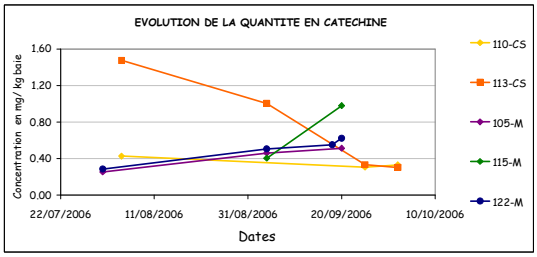


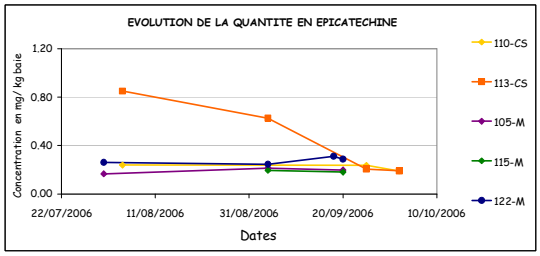


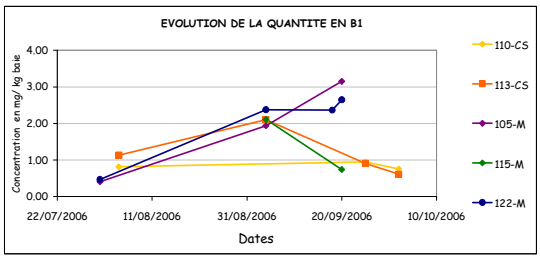


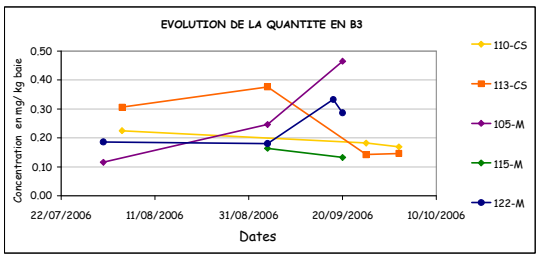


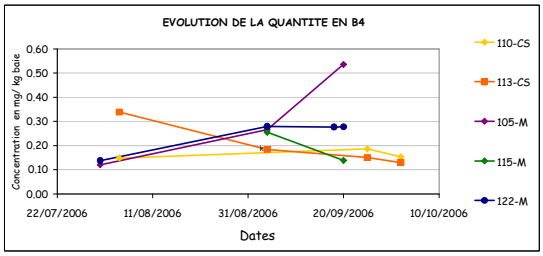
ANNEXE 3: EVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN MONOMERES ET PROCYANIDINES ISSUS DES PELLICULES PAR KG DE BAIE RAISIN DURANT LA SAISON 2006

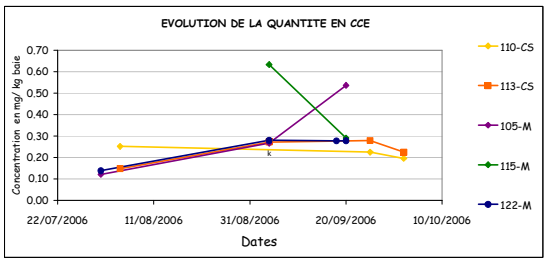




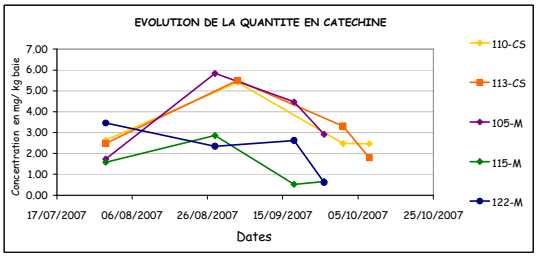


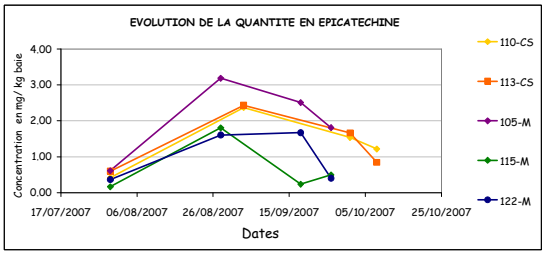


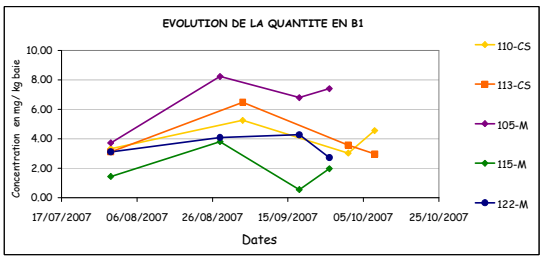


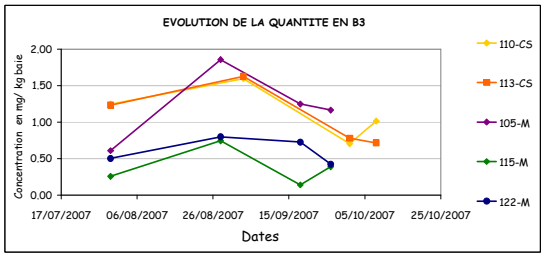


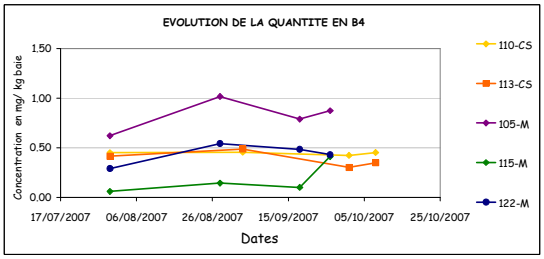
ANNEXE 4: EVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN MONOMERES ET PROCYANIDINES ISSUS DES PELLICULES PAR KG DE BAIE RAISIN DURANT LA SAISON 2007

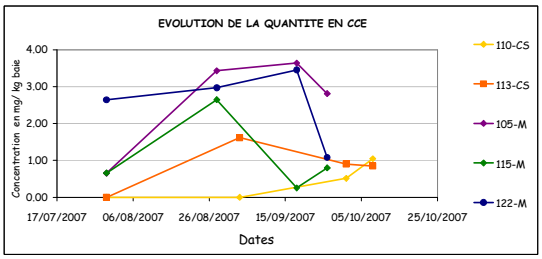




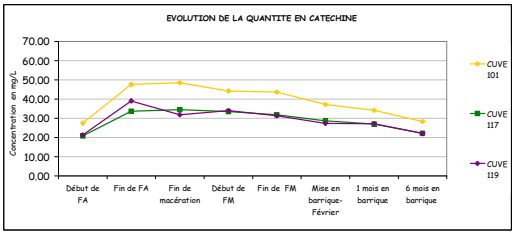


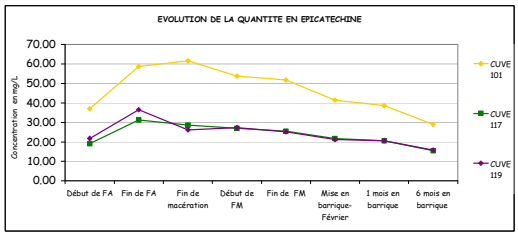


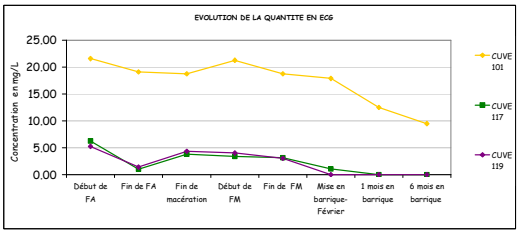


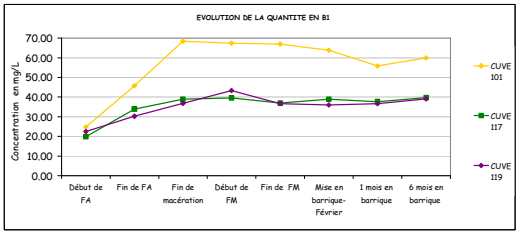


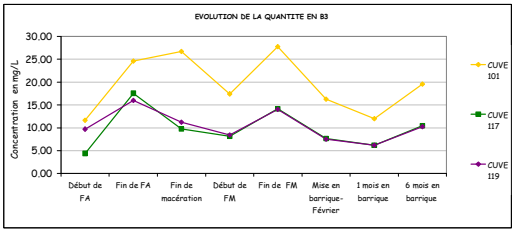
ANNEXE 5 : EVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN MONOMERES ET PROCYANIDINES DANS LES MOUTS ET VINS

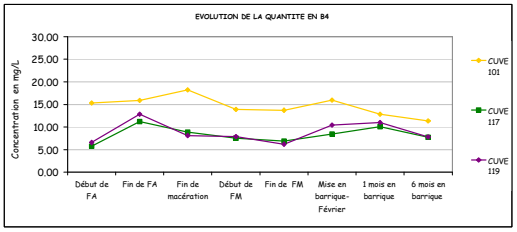


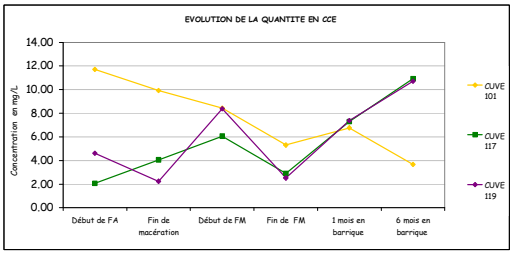












FA= fermentation alcoolique
FM= fermentation malolactique

Annexe 6 : Concentrations en monomères et procyanidines des pépins de raisins des variétés Merlot et Cabernet-Sauvignon Comparaison avec la littérature

Concentrations en monomères et procyanidines dans des pépins de raisins expimées en mg/g de pépins

Auteurs	Cépage	Millésime	Région	Monomères			Dimères				
				Cat	Epi	ECG	B1	B2	B3	B4	B2G
Fuleki[55]	Cabernet-Sauvignon	1994	Ontario	0.58	0.67	nd	0.17	0.5	0.09	0.19	tr
	Merlot	1993	(USA)	0.64	0.79	nd	0.2	0.48	0.08	0.21	0.04
Makris[188]	Cabernet-Sauvignon	2004[a]	Grèce	2.15	0.89	0.28	0.15	0.11	-	-	-
	Merlot			1.83	0.83	0.58	0.14	0.18	-	-	-
Notre étude[b]	Cabernet-Sauvignon	2006	Bordeaux (France)	1.85	0.90	0.00	0.35	0.42	0.38	0.52	0.18
		2007		1.42	1.44	0.04	0.28	0.47	0.36	0.56	0.29
	Merlot	2006		1.54	1.58	0.05	0.35	0.37	0.52	0.75	0.64
		2007		1.60	2.79	0.15	0.48	0.62	0.80	0.76	0.72

Concentrations en monomères et procyanidines dans des pépins de raisins expimées en mg/g de pépins lyophilisés

Auteurs	Cépage	Millésime	Région	Monomères			Dimères				
				Cat	Epi	ECG	B1	B2	B3	B4	B2G
Gomez-Cordoves[57]	Cabernet-Sauvignon	2000	Navarre (Espagne)	3.14	2.71	0.01	0.42	0.8	0.3	0.18	0.11
Notre étude[b]	Cabernet-Sauvignon	2006	Bordeaux (France)	2.91	1.41	0.00	0.55	0.65	0.60	0.82	0.28
		2007		2.23	2.27	0.06	0.44	0.74	0.56	0.87	0.45

Concentrations en monomères dans des pépins expimées en mg/kg de baies de raisins

Auteurs	Cépage	Millésime	Région	Monomères		
				Cat	Epi	ECG
Mattivi[45]	Cabernet-Sauvignon	2008[a]	Trentino (Italie)	25.2	31.9	0.6
				34.7	38	1.7
				80.8	68.5	1.1
				55.5	46.3	0.6
	Merlot			25	46	1.8
				28.5	47.5	2.2
				48.7	63.8	5.2
Notre étude[b]	Cabernet-Sauvignon	2006	Bordeaux (France)	67.03	32.50	0.00
		2007		51.29	52.19	1.39
	Merlot	2006		71.24	73.76	2.52
		2007		68.03	118.48	6.18

a: année de publication; b: moyenne sur les différentes parcelles de chaque variété; - : non déterminé

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] Cabanis J.C., Cabanis M.T., Cheynier V., Teissedre P.L. *Oeno. Fond. Sc. Tech.*, London-New York-Paris, **1998**, 321-331.

[2] Vivas N., *Les composés phénoliques et l'élaboration des vins rouges*, **2007**, Ed. Féret.

[3] Soleas G.J., Diamandis E.P., Goldberg D.M., J. *Clin. Lab. Anal.*, **1997**, 11, 287-313.

[4] Jackson R.S., Chemicals constituents in *Wine science,* **2008**, Ed. III, Academic Press, San Diego, 270-317.

[5] Amerine M.A., Roessler E.B., Composition of wines in *Wines, Their Sensory Evaluation*, **1982**, Amerine M.A. edition Freeman, New York, 67–80.

[6] Harborne J. B., *Comparative Biochemistry of the Flavonoids*, Academic Press, New York, **1967**, 1-30.

[7] Brouillard R., The Flavonoids, *Advances in research since 1986*, éd. J. B. Harborne, Chapman and Hall, London, **1993**, 525-538.

[8] Cheynier V., Dueñas-Paton M., Salas E., Maury C., Souquet J-M., Sarni-Manchado P., Fulcrand H., *Am J Enol Vitic*, **2006**, 57, 298–305.

[9] Somers T. C., *Phytochemistry,* **1971**, 10, 2175–2186.

[10] Pasteur L., *Etudes sur le vin,* Paris, Imprimerie Impériale, **1866.**

[11] Renaud S., De Lorgeril M., *Lancet*, **1992**, 339, 1523-1526.

[12] Haslam E., Polyphenols complexation in *Plant Polyphenols, Vegetable Tannins Revisited.*, Cambridge University Press, Cambridge, **1989,** 154-215.

[13] Hummer W., Schreier P., *Mol. Nutr. Food Res.*, **2008**, 52, 1381-1398.

[14] Haslam, E. in *Practical Polyphenolics: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action*; Cambridge University Press, Cambridge, **1998**.

[15] Bate-Smith E.C, Swain T., **1962**, Flavonoid compounds in: *Comparative biochemistry.* Florkin M. Mason H.S., Eds. III, Academic Press, New-York, 75-809.

[16] Khanbabaee K., Van Ree T., *Nat. Prod. Rep.,* **2001,**18, 641 – 649.

[17] Hemingway R.W., Foo L.Y., Porter L.J., *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1982**, 1, 1209-1216.

[19] Aaron P.M., Kennedy J.A., *Mol. Nutr. Food Res.*, **2008**, 52, 79-104.

[20] Burger J.F.W., Kolodziej H., Hemingway R.W, Steynberg J.P., Young D.A, Ferreira D., *Tetrahedron*, **1990**, 46, 5733-5740.

[21] Kondo K., Kuriharab M., Fukuharab K., Tanakac T., Suzukia T., Miyatab N., Toyodaa M., *Tetrahedron. Lett.*, **2000**, 41, 485-488.

[22] Passos C.P., Cardoso S.M., Domingues M.R.M., Domingues P., Silva C.M., Coimbra M.A., *Food Chem.*, **2007**, 105, 1457–1467.

[23] Gu L., Kelm M.A., Hammerstone J.F., Beecher G., Holden J., Haytowitz D., Prior R.L., *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 7513–7521.

[24] Macheix J.J, Fleuriet A., Jay-Allemand C., *Les composés phénoliques des végétaux*, Ed. PPUR presses polytechniques, **2005**, 67-93.

[25] He F., Pan Q.H., Shi Y., Duan C.Q., *Molecules*, **2008**, 13, 3007-3032.

[26] Su C.T., Singleton V.L., *Phytochemistry*, **1969**, 8, 1553-1558.

[27] Czochanska Z., Foo L.Y., Porter L.J., *Phytochemistry*, **1979**, 18, 1819-1822.

[28] Souquet J.M., Cheynier V., Brossaud F., Moutonnet M., *Phytochemistry*, **1996**, 43, 509-512.

[29] Prieur C., Rigaud J., Cheynier V., Moutonnet M., *Phytochemistry*, **1994**, 36, 781-784.

[30] Labarbe B., Cheynier V., Brossaud F., Souquet J.M. Moutonnet M., *J. Agric. Food Chem.,* **1999**, 47, 2719-2723.

[31] Fowler Z.L., Koffas M.A.G., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2009**, 83, 799–808.

[32] He F., Pan Q.H., Shi Y., Duan C.Q., *Molecules,* **2008**, 13, 2674-2703.

[33] Dixon R.A., Xie D.Y., Sharma S.B., *New Phytologist,* **2005**, 165, 9–28.

[34] Xie D.Y., Dixon R.A., *Phytochemistry*, **2005**, 66, 2127–2144.

[35] Creasey L.L., Swain T., *Nature,* **1965**, *208*, 151-153.

[36] Boukharta M., *Thèse INP de Lorraine, Nancy*, **1988**.

[37] Ricardo Da Silva J.M., Rigaud J., Cheynier V., Cheminat A., Moutonnet M., *Phytochemistry*, **1991**, 30, 1259-1264.

[38] Santos-Buelga C., Francia-Aricha E.M., Escribano-Bailon M.T, *Food Chem.*, **1995**, 53, 197-201.

[39] De Freitas V.A.P., Glories Y., Bourgeois G., Vitry C., *Phytochemistry*, **1998**, 49, 1435-1441.

[40] Romeyer, F.M., Macheix J.J., Sapis J.C., *Phytochemistry,* **1986**, 25, 219-221.

[41] Escribano-Bailon T., Guitierrez-Fernandez Y., Rivas-Gonzalo J., Santos-Buelga C., *J. Agric. Food Chem.*, **1992**, 40, 1794-1799.

[42] Escribano-Bailon M.T., Guerra M.T., Rivas-Gonzalo C., Santos-Buelga C., *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **1995**, 200, 221–224.

[43] Thompson R.S., Jacques D., Haslam E., Tanner R.J.N., *J. Chem. Soc. Perkin Trans.,* **1972**, 1387-1399.

[44] Rigaud J., Perez-Ilzarbe J., Ricardo Da Silva J.M., Cheynier V., *J. Chrom. A*, **1991**, 540, 401-405.

[45] Mattivi F., Vrhovsek U., Masuero D., Trainotti D., *Aust. J. Grape Wine Res.*, **2009**, 15, 27-35.

[46] Koupai-Abyazani M.R., McCallum J., Bohm B.A., *J. Chrom.,* **1992,** 594, 117-123.

[47] Kennedy J.A., Jones G.P., *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49, 1740-1746.

[48] Drinkine J., Lopes P., Kennedy J.A., Teissedre P.L., Saucier C., *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, 55 , 1109–1116.

[49] Chira K., Schmauch G., Saucier C., Fabre S., Teissedre P.L., *J. Agric. Food Chem.*, **2009**, 57, 545-553.

[50] Karonen M., Leikas A., Loponen J., Sinkkonen, Ossipov V., Pihlaja K., *J. Phytochem. Anal.*, **2007**, 18, 378-386.

[51] Schofield P., Mbugua D.M., Pell A.N., *Anim. Feed Sc. Tech.*, **2001**, 91, 21-40.

[52] Matthews S., Mila I., Scalbert A., Pollet B., Lapierre C., Hervé du Penhoat C.L.M., Rolando C., Donnelly D.M.X., *J. Agric. Food Chem.,* **1997**, 45, 1195–1201.

[53] Souquet J.M., Labarbe B., le guernéve C., Cheynier V., Moutonnet M., *J. Agric. Food Chem., **2000,*** 48, 1195–1201.

[54] De Freitas V.A.P., Glories Y., Monique A., *Am. J. Enol. Vitic.*, **2000**, 51, 387-403.

[55] Fuleki T., Ricado Da Silva J.M, *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45, 1156-1160.

[56] Kennedy J.A., Matthews M.A., Waterhouse A.L., *Phytochemistry*, **2000**, 55, 77-85.

[57] Monagas M., Gomez-Cordoves C., Bartolomé B., Laureano O., Ricardo Da Silva J.M, *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 6475-6481.

[58] Gomez-alonso- Garcia-Romero E., Hermosin-Gutierrez I., *J. Food Comp. Anal.,* **2007,** 20, 618-626.

[59] Bourzeix M., Weyland D., Heredia N., *Bull. de l'OIV*, **1986,** 788-794.

[60] Coombe B.G., McCarthy M.G., *Aust. J. Grape Wine Res.*, **2000**, 6, 131-135.

[61] Ristic R., Iland P.G., *Aust. J. Grape Wine Res.*, **2005**, 11, 43-58.

[62] Kennedy J.A., Troup G.J., Pilbrow J.R., Hutton D.R., Hewitt D., Hunter C.A., Ristic R., Iland P.G., Jones G.P., *Aust. J. Grape Wine Res.*, **2000**, 6, 244-254.

[63] Downey M.O., Harvey J.S., Robinson S.P., *Aust. J. Grape Wine Res.*, **2003**, 9, 15-27.

[64] O-Marques J.D., reguinda R., Laureano O., Ricardo-da-Silva J.M., *Ciencia Tec. Vitiv.*, **2005**, 1, 35-52.

[65] Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D., *Traité d'œnologie, Tome 2, Chimie du vin, Stabilisation et traitemenent*, Dunod, Paris, **1998**.

[66] Gonzales-Manzano S., Rivas-Gonzalo J.C., Santos-Buelga C., *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 513, 283-289.

[67] De Pascual-Teresa S., Treutter D., Rivas-Gonzalo J.C., Santos-Buelga C., *J Agric. Food Chem.,* **1998**, 46, 4209-4213.

[68] De Pascual-Teresa S., Rivas-Gonzalo J.C., Santos-Buelga C., *Int. J. Food Sci. Tech.*, **2000**, 35, 33-40.

[69] Fulcrand H., Remy S., Souquet J.M, Cheynier V., Moutonnet M., *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 1023-1028.

[70] Carando S.,Teissedre P.L., Pascual-Martinez L., Cabanis J.C., *J. Agric. Food Chem.,* **1999**, 47, 4161-4166.

[71] Gomez-Alonzo S., Garcia-Roméro E., Hernosin-Guitierrez I., *J. Food Comp., Anal.,* **2007**, 618-626.

[72] Monagas M., Bartolomé B., Gomez-Cordovés C., *Crit. Rev. Food Sci. Nut.,* **2005**, 118, 45-85.

[73] Duenas M., Fulcrand H., Cheynier V., *Analytica Chimica Acta* , **2006**, 563, 15–25.

[74] Remy-Tanneau S., Le Guernevea C., Meudec E., Cheynier V., *J. Agric. Food Chem.,* **2003**, 51, 3592-3597.

[75] Es-Safi N.E., Fulcrand H., Cheynier V., Moutounet M., *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 2096–2102.

[76] Saucier C., Bourgeois G., Vitry C., Roux D., Glories Y., *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45, 1045–1049.

[77] He F., Pan Q.H., Shi Y., Duan C.Q., *Molecules*, **2008**, 13, 3007-3032.

[78] Saucier C., Little D., Glories Y., *Am. J. Enol. Vitic.*, **1997**, 48, 370-373.

[79] Revilla I., Pérez-Magariño S., González-SanJosé M.L., Beltrán S., *J. Chrom. A*, **1999**, 847, 83-90.

[80] Atanasova V., Fulcrand H., Le Guernevé C., Cheynier V., Moutonnet M., *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 6151-6153.

[81] Zanchi D., Vernhet A., Poncet-Legrand C., Cartalade D., Tribet C., Schweins R., Cabane B., *Langmuir*, **2007**, 23, 9949-9959.

[82] Zanchi D., Poulain C., Konarev P., Tribet C., Svergun D.I., *J. Phys. Cond. Mat.*, **2008**, 20, 494224.

[83] Waters E.J., Peng Z., Pocock K.F., Jones G.P., Clarke P., Williams P.J., *J. Agric. Food Chem.*, **1994**, 42, 1761

[84] Sarni-Manchado P., Cheynier V., Moutounet M., *J. Agric. Food Chem.,* **1999,** 47, 42-47.

[85] Carvalho E., Mateus N., Plet B., Pianet I., Dufourc E.J., De Freitas V.A.P., *J Agric. Food Chem.,* **2006,** 54, 8936-8944.

[86] Pascal C. Poncet-Legrand C., Imberty A., Gautier C., Sarni-Manchado P., Cheynier V., Vernhet A., *J. Agric. Food Chem.,* **2007,** 55, 4895-4901.

[87] Arnold R.A., Noble A.C., Singleton, V.L., *J. Agric. Food Chem.,* **1980,** 28, 675-678.

[88] Baxter N.J., Lilley T.H., Haslam E., Williamson M.P., *Biochemistry*, **1997**, 36, 5566-5577.

[89] Pianet I., André Y., Ducasse M.A., Tarascou I., Lartigue J.C., Pinaud N., Fouquet E., Dufourc E.J., Laguerre M., *Langmuir*, **2008**, 24, 11027-11035.

[90] Riou V., Vernhet A., Doco T., Moutonnet M., *Food Hydrocolloids*, **2002**, 17-23.

[91] Saucier C., Bourgeaois G., Vitry C., Roux D., Glories Y., *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45, 1045-1049.

[92] Poncet-Legrand C., Cartalade D., Putaux J.L., Cheynier V., Vernhet A., *Langmuir*, **2003**, 19, 10563-10572.

[93] Zanchi D., Konarev P.V., Tribet C., Baron A., Svergun D.I., Guyot S., *J. Chem. Phys.*, **2009**, 130, 245103.

[94] Tarascou I., Barathieu K., Simon C., Ducasse M.A., André Y., Fouquet E., Dufourc E.J., De Freitas V., Laguerre M., Pianet I., *Magn. Reson. Chem.*, **2006**, 44, 868.

[95] Tarascou I., Ducasse M.A., Dufourc E.J., Moskau D., Fouquet E., Laguerre M., Pianet I., *Magn. Reson. Chem.*, **2007**, 45, 157.

[96] Gawel R., Iland P.G., Francis I.L., *Food Quality and Preference*, **2001**, 12, 83-94.

[97] Gawel R., *Aust. J. Grape Wine Res.,* **1998,** 4, 74-95.

[98] Oh H.I., Hoff J.E., Armstrong G.S., Haff L.A., *J. Agric. Food Chem.*, **1980**, 28, 394–398.

[99] Haslam E., *J. Nat. Prod.,* **1996,** 59, 205-215.

[100] Luck G., Liao H., Murray N.J., Grimmer H.R, Warminski E.E., Williamson M.P., Lilley T.H. Haslam E., *Phytochemistry,* **1994,** 37, 357-371.

[101] Simon C.,Barathieu K., Laguerre M., Schmitter J.M., Fouquet E., Pianet I., Dufourc E.J., *Biochemistry,* **2003**, 42, 1385-1395.

[102] Fontoin, F., Saucier C., Teissedre P.L., Glories Y. *Food Qual. Prefer.*, **2008,** 19, 286-291.

[103] Peleg H., Gacon K., Schlich P., Noble A.C., *J. Sci. Food Agric.,* **1999**, 79, 1123–1128.

[104] Geissman T.A., Yosmhimura N.N., *Tetrahedron Lett.*, **1966**, 24, 2669-2673.

[105] Botha J.J., Viviers P.M., Young D.A., Du Preez I.C., Ferreira D., Roux D.G., Hull W.E., *J.Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1982**, 527-533.

[106] Delcour J.A., Ferreira D., Roux D.G., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1983**, 1711-1717.

[107] Young D.A., Cronjé A., Botes A.L., Ferreira D., Roux D.G., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1,* **1985,** 2521-2527.

[108] Hemingway R.W., Foo L.Y., *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, **1983**, 18, 1035-1036.

[109]Steynberg P.J., Nel R.J.J., Van Rensburg H., Bezuidenhoudt B.C.B., Ferreira D., *Tetrahedron,* **1998**, 54, 8153-8158.

[110] Sears K.D., Casebier R.L., Hergert H.L., *J. Org. Chem.*, **1974**, 39, 3244-3247.

[111] Kiatgrajai P., Wellons J.D., Gollob L., White J.D., *J. Org. Chem.*, **1982,** 47, 2910-2912.

[112] Slabbert N.P., *Tetrahedron*, **1977**, 33, 821-824.

[113] Kennedy J.A., Munro M.H.G., Powell H.K.L., Porter L.J., Foo L.Y., *Aust. J. Chem.*, **1984**, 37, 885-892.

[114] Sweeny J.G., Iacobucci G.A., *J. Org. Chem.*, **1979**, 44, 2298-2299.

[115] Kiehlmann E., Lehto N., Cherniwchan D., *Can. J. Chem.*, **1988**, 66, 2431-2439.

[116] Weinges K., Seiler D., *Liebigs Ann. Chem.*, **1968**, 714, 193-204.

[117] Deme E., *J. Org. Chem.*, **1976**, 41, 23, 3769.

[118] Kawamoto H., Nakatsubo F., Murakami K., *J. Wood Chem. Tech*, **1989**, 9, 35-52.

[119] Achilonu M.C., Bonnet S.L., Van der Westhuizen J.H., *Org. Lett.*, **2008**, 17, 3865-3868.

[120] Weinges K., Perner J., *Chem. Comm.*, **1967**, 7, 351.

[121] Kozikowski A.P., Tückmantel W., Hu Y., *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 1287-1296.

[122] Kawamoto H., Nakatsubo F., Murakami K., *Mokuzai Gakkaishi*, **1991**, 37, 488-493.

[123] Tückmantel W., Kozikowski A.P., Romanczyk L.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 12073-12081.

[124] Arnaudinaud V., Nay B., Nuhrich A., Deffieux G., Mérillon J.M., Monti J.P., Vercauteren J., *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42, 1279-1281.

[125] Arnaudinaud V., Nay B., Verger S., Nuhrich A., Deffieux G., Mérillon J.M., Monti J.P., Vercauteren J., *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42, 5669-5671.

[126] Saito A., Nakajima N., Tanaka A., Ubukata M., *Tetrahedron*, **2002,** 58, 7829-7837.

[127] Saito A., Nakajima N., Tanaka A., Ubukata M., *Heterocycles*, **2003**, 61, 287-298.

[128] Ohmori K., Ushimaru N., Suzuki K., *PNAS, U.S.A*. **2004**, 101, 12002–12007.

[129] Saito A., Nakajima N., Matsuura N., Tanaka A., Ubukata M., *Heterocycles*, **2004**, 62, 479-489.

[130] Tarascou I., Barathieu K., André Y., Pianet I., Dufourc E. J., Fouquet E., *Eur. J. Org. Chem.*, **2006**, 5367–5377.

[131] Mohri Y., Sagehashi M., Yamada T., Hattori Y., Morimura K., Kamo T., Hirota M., Makabe H., *Tetrahedron Lett.*, **2007**, 48, 5891–5894.

[132] Oyama K., Kuwanob M., Itob M., Yoshidac K., Kondo T., *Tetrahedron Lett.*, **2008**, 49, 3216-3180.

[133] Ganguli A.K., Seshadri T.R., Subramanian F.A., Subramanian P., *Proc. Indian Acad. Sc.*, **1957**, 56, 25-28.

[134] Steenkamp J.A., Ferreira D., Roux D.G., *Tetrahedron Lett.*, **1985**, 26, 3045-3048.

[135] Mouton C.H.L., Steenkamp J.A., Young D.A., Bezuidenhoudt B.C.B., Ferreira D., *Tetrahedron*, **1990**, 46, 6885-6894.

[136] Steenkamp J.A., Mouton C.H.L., Ferreira D., *Tetrahedron*, **1991**, 47, 6705-6716.

[137] Tarascou I., *Thèse de l'université de Bordeaux*, **2005**.

[138] Barathieu K., *Thèse de l'université de Bordeaux*, **2002**.

[139] Kiehlmann E., Van der Merwe P.J., Hundt H.K.L., *Org. Prep. Proc. Int.*, **1983**, 15, 341-348.

[140] Kiehlmann E., Tracey A. S., *Can. J. Chem.*, **1986**, 64, 1998-2005.

[141] Kiehlmann E., Tracey A. S., *Magn. Res. Chem.*, **1988**, 26, 204-210.

[142] Felix A.M., Heimer E.P., Lambros T.J., Tzougraki C., Meienhofer J., *J. Org. Chem.*, **1978**, 43, 4194-4196.

[143] Kawamoto H., Nakatsubo F., Murakami K., *Mokuzai Gakkaishi*, **1993**, 39, 7, 820-824.

[144] Yoneda S., Kawamoto H., Nakatsubo F., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1997**, 1025-1030.

[145] Saito A., Doi Y., Tanaka A., Matsuura N., Ubukata M., Nakajima N., *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 4783–4790.

[146] Saito A., Tanaka A., Ubukata M., Nakajima N., *Synlett*, **2004**, 6, 1069-1073.

[147] Sajiki H., Kume A., Hattori K., Hirota K., *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 7247-7250.

[148] Sajiki H., Kume A., Hattori K., Nagase H., Hirota K., *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 7251-7254.

[149] Yoneda S., Kawamoto H., Nakatsubo F., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1997**, 1025-1030.

[150] Kozikowski A.P., Tückmantel W., Böttcher G., Romanczyk Jr. L.J., *J. Org. Chem.*, **2003**, 68, 1641-1658.

[151] Saito A., Emoto M., Tanaka A., Doi Y., Shoji K., Mizushina Y., Ikawa H., Yoshida H., Matsuura N., Nakajima N., *Tetrahedron,* **2004**, 60, 12043-12049.

[152] Saito A., Mizushina Y., Ikawa H., Yoshida H., Doi Y., Tanaka A., Nakajima N., *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, 13, 2759-277.

[153] Sakuda H., Saito A., Mizushina Y., Yoshida H., Tanaka A., Nakajima N., *Heterocycles*, **1996**, 67, 175-188.

[154] Tranchimand S.,Tron T., Gaudin C., Lacazio G., *Synth. Comm.*, **2006**, 36, 587-597.

[155] Belin F., Barthelemy P., Ruiz K., Lacombe J.M., Pucci B., *Helv. Chim. Act.*, **2003**, 86, 2, 247-265.

[156] Ren Y., Himmeldirk K., Chen X., *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 2829-2837.

[157] Halkes S., BartA., Vrasidas I., Rooijer G.R., Van den Berg A.J.J., Liskamp R.M.J., Pieters R.J., *Bioorg. Med. Chem. Let.,* **2002**, 12, 1567–1570.

[158] Ley S.V., Norman J., Griffith, W.P., Marsden S.P., *Synthesis*, **1994**, 7, 639-666.

[159] Kawamoto H., Nakatsubo F., Murakami K., *Synth. Comm.*, **1996**, 26, 3, 531-534.

[160] Cren-Olivé C., Lebrun S., Rolando C. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2002**, 821–830.

[161] Achilonu, M.C., Bonnet S.L.,Van der Westhuizen J.H.. *Org. Lett.*, **2008**, 10, 3865–3868.

[162] Bond G.C., Sermon P.A., Webb G., Buchanan D.A., Wells P.B., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1973**, 444-445.

[163] Hutchings G.J., Brust M., Schmidbaur H., *Chem. Soc. Rev.,* **2008**, 37, 1759-1765.

[164] Hashmi A.S.K., Hutchings G.J., *Angew. Chem. Int. Ed.,* **2006**, 45, 7896-7936.

[165] Hashmi A.S.K., *Chem. Rev.,* **2007**, 107, 3180-3211.

[166] Gorin D.J., Sherry B.D., Toste F.D., *Chem. Rev.,* **2008**, 108, 3351-3378.

[167] Marion N., Nolan S.P, *Chem. Soc. Rev.,* **2008**, 37, 1776-1782.

[168] Li Z., Brouwer C., He C., *Chem. Rev.,* **2008**, 108, 3239-3265.

[169] Arcadi A., *Chem. Rev.,* **2008**, 108, 3266-3325.

[170] Ashmi A.S., Rudolph M., *Chem. Soc. Rev.,* **2008**, 37, 1766-1775.

[171] Mertins K., Iovel I., Kischel J., Zapf A., Beller M., *Adv. Synth. Catal.,* **2006**, *348*, 691-695.

[172] Georgy M., Boucard V., Campagne J.M., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 41, 14180-14181.

[173] Y. Lu, X. Du, X. Jia, Y. Liu, *Adv. Synth. Catal.,* **2009**, 351, 1517-1522.

[174] Georgy M., Boucard V., Debleds O, Dal Zotto C., Campagne J.M., *Tetrahedron*, **2009**, 9, 1758-1766.

[175] Terrasson V., Marque S., Georgy M., Campagne J.-M., D. Prim, *Adv. Synth. Catal.*, **2006,** 348, 2063–2067.

[176] Rigaud J., Escribano-Bailon M.T., Prieur C., Souquet J.M., V. Cheynier, *J. Chrom. A,* **1993**, 654, 255-260.

[177] Saint-Cricq de Gaulejac N., Provost C., Vivas N., *J. Agric. Food Chem.,* **1999,** 47, 425-431.

[178] Fontoin H., Saucier C.,Teissedre P.L., Glories Y., *Food Quality Pref.*, **2008,** 19, 286–291.

[179] Saucier C., Mirabel M., Daviaud F., Longieras A., Glories Y., *J. Agric. Food Chem.,* **2001,** 49, 5732-5735.

[180] Revilla E., Ryan J.M., *J. Chrom. A,* **2000**, 681, 461-469.

[181] Lamuela-Raventos R.M., Waterhouse A.L., *Am. J. Enol. Vitic.,* **1994,** 45, 1-5.

[182] Vinas P., Lopez-Erroz C., Marin-Hernandez J.J., Hernadez-Cordoba M., *J. Chrom. A*, **2000**, 871, 85-93.

[183] Gomez-Alonso S., Garcia-Romero E., Hermozin-Gutierrez I., *J. Food Comp. Anal.*, **2007**, 20, 618-626.

[184] Pezet R., Pont V., Cuenat P., *J. Chrom. A*, **1994,** 663, 191-197.

[185] Carando S., Teissedre P.L., Cabanis J.C., *Chromatographia*, **1999**, 50, 253-254.

[186] OIV, 2000, *Résolution Oeno 7/2000*, 80 Assemblée générale, Paris, 23 juin **2000**.

[187] Stejskal E.O., Tanner J.E., J. *Chem. Phys.*, **1965**, 42, 288.

[188] Guendez R., Kallithraka S., Makris D.P., Kefalas P., *Food Chem.*, **2005**, 89, 1-9.

[189] Yilmaz Y., Toledo R.T.,*J. Agric. Food Chem.,* **2004**, 52, 255-260.

[190] Davies D. B., Djimant L.N., Veselkovb A.N., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.,* **1996**, 92, 383-390.

[191] Baxter N. J., Williamson M.P., Lilleyb T.H., Haslamb E., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.,* **1996**, 92, 231-234.

[192] Ehmann, A.,*Plant Physiology*, **1976**, (Suppl.) 57, 30.

[193] Mattivi F., Vrhovsek U., Versini G., *J. Chrom. A*, **1999**, 855, 227–235.

[194] Marinos V.A., Tate M.A, Williams P.J, *Phytochemistry*, **1992**, 31, 2155 -2759.

[195] Hoenicke K., Simat T.J., Steinhart H., Christoph N., Geßner M., Köhler H.J., *Anal. Chim. Acta*, **2002**, 458, 29–37.

[196] Hoenicke K., Borchert O, Grüning K., Simat T.J. *J. Agric. Food Chem.,* **2002,** 50, 4303-4309.

[197] Rapp A., Versini G., Ullemeyer H., *Vitis*, **1993**, 32, 61-62.

[198] Linsenmeier A., Rauhut D., Kurbel H., Schubert S., Lohnertz O., *Vitis*, **2007**, 46, 91-97.

[199] Prinsen E., VanDongen W., Esmans E.L., Van Onckelen H.A., *J. Mass Spectr.*, **1997**, 32, 12-22.

[200] Aerts R.,·Prinsen E., Muys B., *Nature Precedings* (online), **2008**.

[201] Woodward A. W., Bartel B., *Annals of Botany*, **2005**, 95, 707–735.

[202] Schwarz B., Hofmann B., *J. Agric. Food Chem.,* **2007,** 55, 1394-1404.

[203] Schwarz B., Hofmann B., *J. Agric. Food Chem.,* **2007,** 55, 1405-1410.