

Résumé de thèse

\*\*\*\*\*

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

\*\*\*\*\*

Présenté par **Michael Jourdes**

Réalisée en collaboration entre :

- Laboratoire de Chimie des Substances Végétales, Centre de Recherche en Chimie Moléculaire, Université Bordeaux 1, 351 cours de la Libération, F-33405 Talence Cedex
- Laboratoire de Chimie Appliquée, Faculté d'œnologie, Université Bordeaux 2, 351, cours de la Libération, F-33405 Talence Cedex

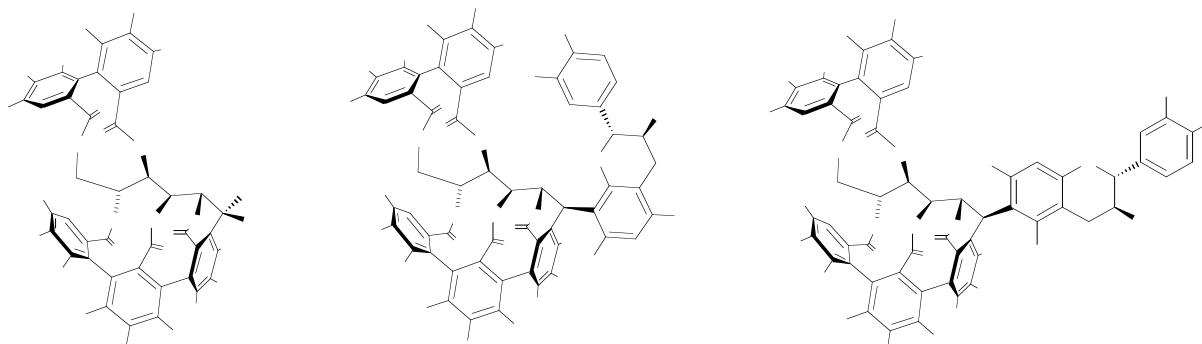
## I-Introduction

Les composés phénoliques sont des substances qui jouent un rôle important en œnologie. Ils sont responsables de la couleur et de l'astringence des vins.<sup>1</sup> Les polyphénols présents dans le vin sont majoritairement des flavonoïdes qui proviennent du raisin. Ces flavonoïdes (tannin condensé et anthocyane) sont localisés dans les parties solides du raisin comme les pépins et la pellicule, et sont extraits durant la fermentation alcoolique et la macération post-fermentaire.<sup>2</sup> Dès lors, les tannins condensés et les anthocyanes qui sont les principaux flavonoïdes du raisin participent à de nombreuses réactions chimiques<sup>3,4</sup> conduisant à la formation de nouveau composé responsable de l'évolution de la couleur et de l'astringence du vin au cours de son vieillissement. L'étude de ces réactions et leur influence sur les qualités organoleptiques des vins rouge ont fait l'objet de nombreuse étude.<sup>5,6</sup>

Simple contenant à l'origine, le fût de chêne s'est affirmé au fil des siècles comme le partenaire indispensable à la maturation des boissons alcoolisées et particulièrement des vins. Ce contact de longue durée avec le fût permet au vin, solution aqueuse alcoolique acide, d'extraire de nombreuses substances, notamment les ellagitannins.<sup>7</sup> La (+)-vescalagine (**1**) et la castalagine (**2**) sont les deux ellagitannins majoritaires du bois de chêne parmi les huit actuellement identifiés (Figure 1).<sup>8-9</sup> Le rôle protecteur de ces ellagitannins vis-à-vis de la dégradation oxydative des flavonoïdes du vin, a été mis en évidence.<sup>11</sup> Cependant aucune étude a montré la possibilité de former des complexes covalents entre les ellagitannins du chêne et les flavonoïdes du vin. Pourtant, ce type de complexes flavano-ellagiques existe dans l'écorce de nombreuses plantes dont certaines espèces de chênes. Les acutissimines A (**3**) et B (**4**) appartiennent à cette famille de flavano-ellagitannins qui se caractérisent par une liaison carbone-carbone entre une unité ellagique et la (+)-catéchine (**7**) (Figure 1).

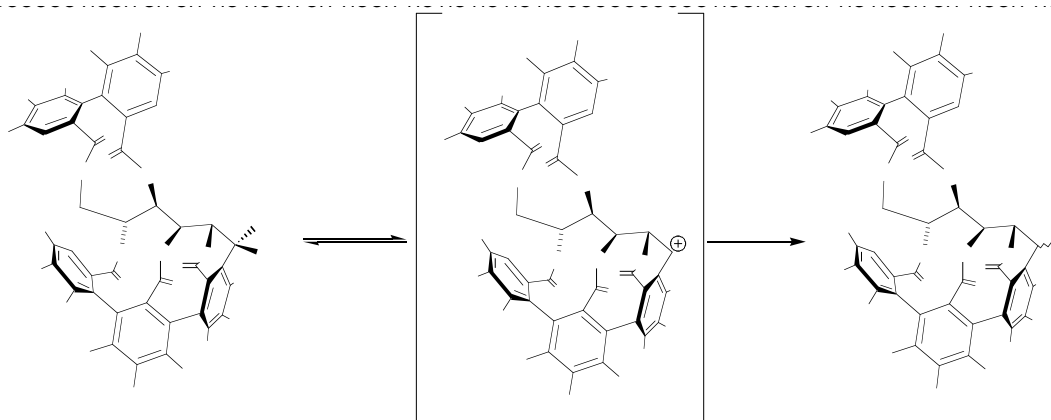
Les flavano-ellagitannins sont constitués d'une unité ellagique, généralement une unité ellagitannin C-glycosidique connectée à une unité flavan-3-ols par une liaison carbone-carbone entre le carbone C<sub>1</sub> de la chaîne glucose ouverte et les carbones 6 ou 8 du cycle A de unité flavan-3-ol.<sup>12,13</sup> Par exemple, les écorces des chênes asiatiques, *Quercus acutissima* et *Quercus miyagii* renferment de la vescalagine (**1**) et de la catéchine (**7**). Les acutissimines A (**3**) et B (**4**) qui sont les tannins complexes présents dans l'écorce de ces chênes ont pour structure une unité ellagitannin C-glycosidiques identique à la vescalagine (**1**) connectée à une

unité flavan-3-ol, la catéchine (7).<sup>14,15</sup> Les acutissimines A (3) et B (4) ont également été isolées dans l'écorce de chêne *Quercus petraea* dont le bois de cœur est utilisé en tonnellerie pour la fabrication des fûts de chêne.<sup>16</sup>



**Figure 1 :** Structure de la vescalagine (1), castalagine (2) et des acutissimines A (3) et B (4)

Les flavano-ellagitannins sont présents uniquement dans les feuilles et dans l'écorce qui sont de surcroît les seules parties de l'arbre où les ellagitannins C-glycosidiques et les flavan-3-ols sont présents à l'état libre.<sup>13</sup> En revanche les flavano-ellagitannins n'ont jamais été isolés dans le bois de cœur qui ne contient pas de flavan-3-ols.



**Figure 2 :** Hypothèse d'évolution des ellagitannins C-glycosidiques dans le vin

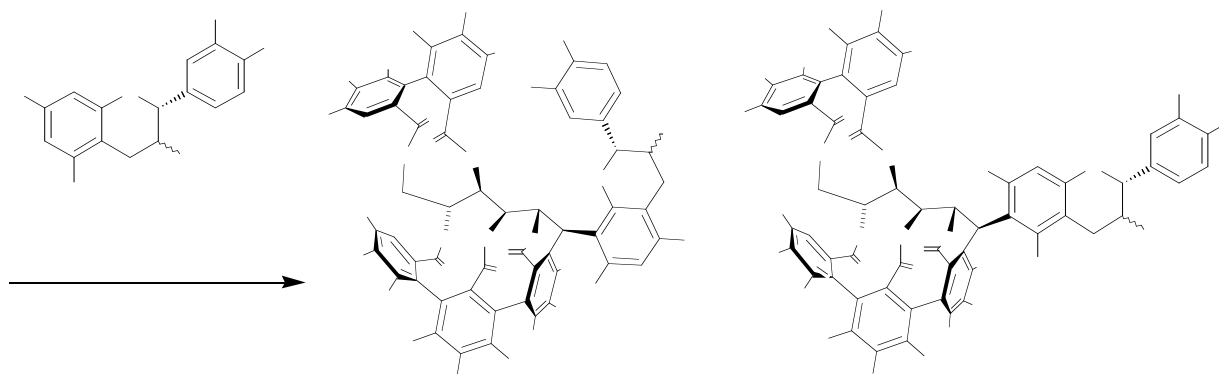
Or les vins élevés en fûts de chêne comportent les ellagitannins C-glycosidiques et évidemment des flavan-3-ols apportés par le raisin. Cette présence simultanée des ellagitannins C-glycosidiques et des flavan-3-ols dans le vin, solution hydroalcoolique acide (pH compris entre 3,2 et 4), nous a conduit à postuler l'hypothèse suivante (Figure 2). La vescalagine (1) et la castalagine (2) pourraient subir une

déshydroxylation de leur alcool benzylique pour conduire à la formation du carbocation benzylique **5**. Cet intermédiaire **5** pourrait alors subir l'attaque nucléophile (NuH) des flavan-3-ols présents dans le vin, ainsi que celle d'autres nucléophiles présents comme l'éthanol, les anthocyanes ou les procyanidines pour conduire à la formation de structures de type **6**.

## II-Hémisynthèse des flavano-ellagitannins

### II-1-Hémisynthèse des acutissimines

Dans le but de valider notre hypothèse de formation d'adduits entre les ellagitannins C-glycosidiques du bois de chêne et les différents nucléophiles du vin, l'hémisynthèse des flavano-ellagitannins présentés précédemment a été envisagée. L'hémisynthèse de ces acutissimines a, dans un premier temps, été réalisée en milieu organique pour pouvoir appréhender et comprendre leur mécanisme de formation en s'affranchissant de toute autre réaction pouvant se produire dans un milieu complexe tel que le vin. L'hémisynthèse de ces acutissimines en milieu organique a également permis l'obtention de produit pur en quantité suffisante pour la caractérisation structurale par RMN et pour son utilisation comme référence chromatographique lors de leur dosage. La formation des acutissimines a ensuite été démontrée en milieu modèle du vin.

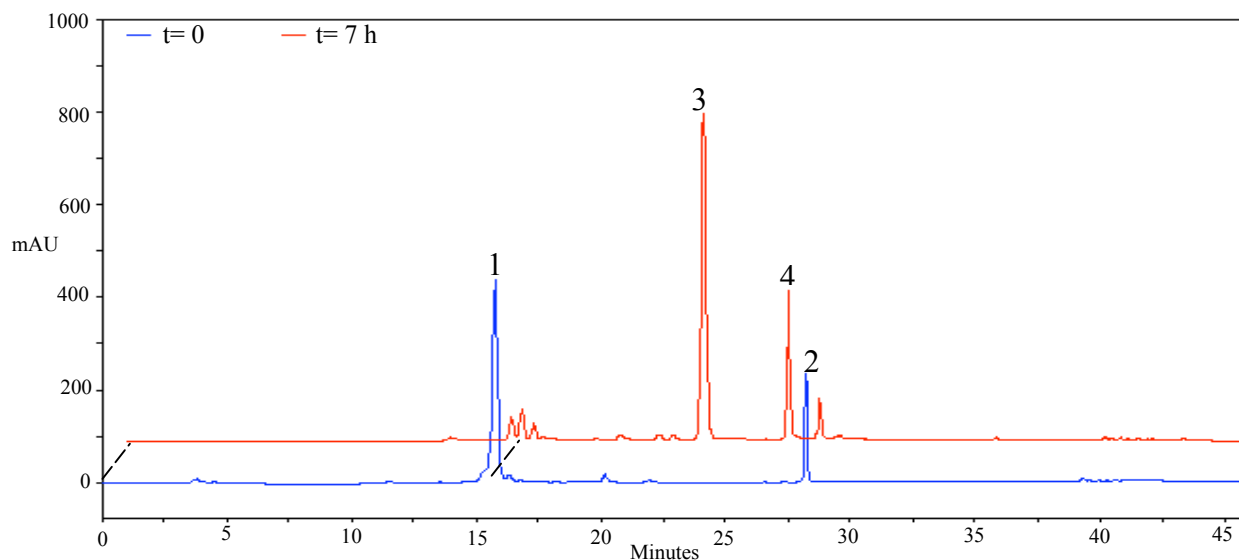


Flavanol	Série A	Série B	Rapport A:B
<b>7</b>	<b>3</b> (65 %)	<b>4</b> (20 %)	80:20
<b>8</b>	<b>9</b> (51 %)	<b>10</b> (26 %)	66:33

**Figure 3** : Réaction de formation des acutissimines **3**, **4**, **9** et **10**

La vescalagine (**1**) et l'unité flavan-3-ol (**7** ou **8**) sont solubilisées dans une solution de THF contenant 0,15 % en volume d'acide trifluoroacétique. Le milieu réactionnel est alors

porté à une température de 60°C, et l'évolution de la réaction est suivie par CLHP analytique. Après 7 heures de réaction, la disparition de la vescalagine (**1**) est totale alors que dans un même temps les acutissimines apparaissent (Figure 4). La séparation et la purification des acutissimines effectuée par CLHP semi-préparative.



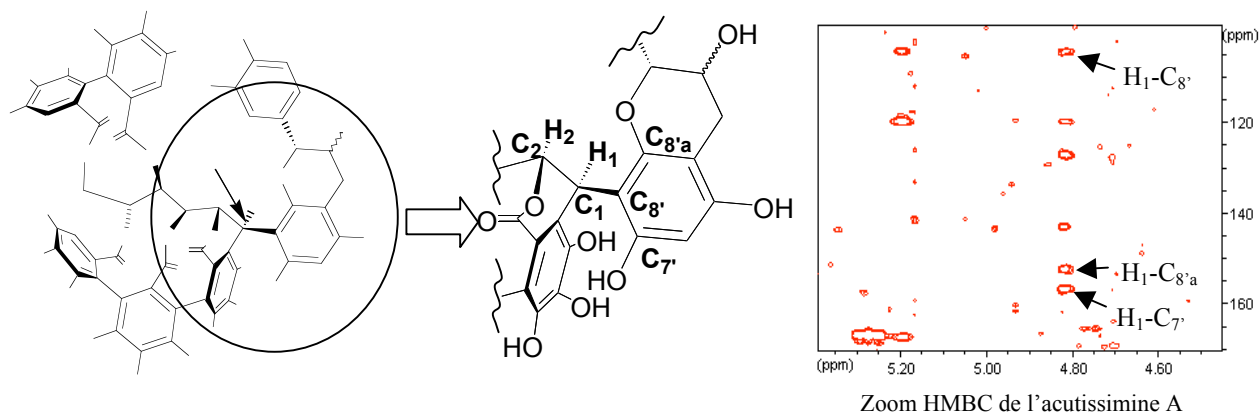
**Figure 4** : Suivi du milieu réactionnel de l'hémisynthèse des acutissimines en milieu organique (1: vescalagine (**1**), 2: catéchine (**7**), 3 : acutissimine A (**3**) et 4 : acutissimine B (**4**))

## II-2-Carractérisation structurales des acutissimines et épiacutissimines A et B

La comparaison des spectres RMN du proton et du carbone du produit d'hémisynthèse avec les données de la littérature montre une très grande similitude.<sup>14</sup> Une analyse plus fine des signaux de la chaîne glucosidique, notamment de la constante de couplage entre les protons H<sub>1</sub> et H<sub>2</sub> permet de déterminer la configuration du carbone C<sub>1</sub>. Cette constante de couplage inférieure à 1 hertz confirme l'orientation-β (vers l'avant) de l'unité flavanol reliée au carbone C<sub>1</sub>.<sup>17-19</sup>

La détermination des sommets de connexion entre la vescalagine (**1**) et l'unité flavanol est réalisée par l'observation des corrélations proton-carbone à longue distance (HMBC) entre le proton H<sub>1</sub> de la vescalagine (**1**) et les carbones C<sub>8'</sub>, C<sub>7'</sub> et C<sub>8'a</sub> de l'unité flavanol. Une telle analyse est régulièrement utilisée pour la détermination structurale des procyanidines.<sup>20</sup> Il découle alors de ces corrélations que l'unité flavanol est bien reliée au carbone C<sub>1</sub> de la vescalagine (**1**) par son sommet 8 dans le cas de l'acutissimine et de l'épiacutissimine A et par

le sommet 6 dans le cas de l'acutissimine et de l'épiacutissimine B (Figure 5). Finalement, la comparaison de toutes ces analyses RMN montre que les produits formés dans notre milieu réactionnel sont bien les acutissimines A et B déjà isolées dans certaines écorces de chênes et les épiacutissimines A et B jusqu'à lors inconnues.

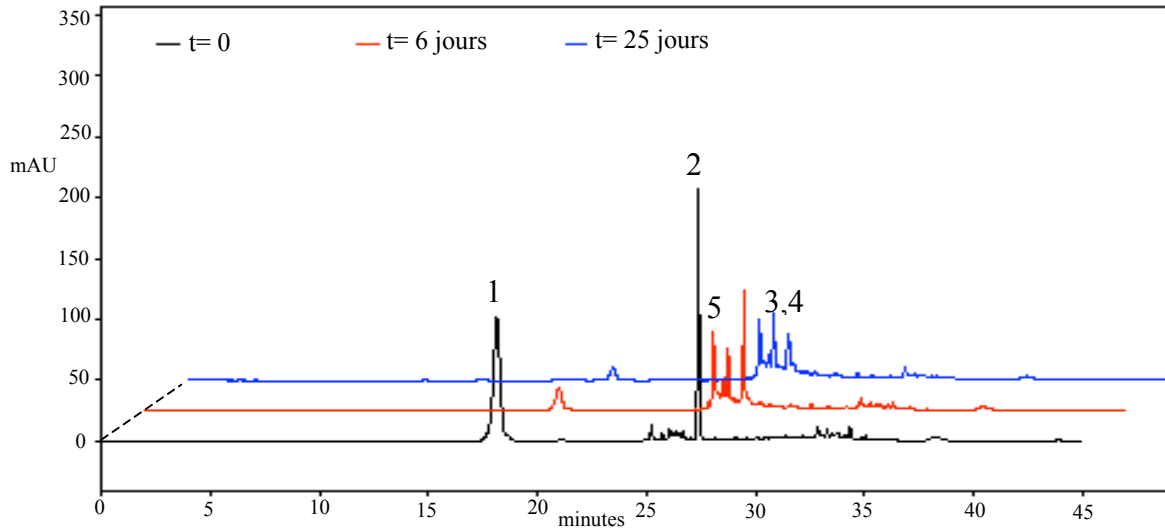


**Figure 5 :** Agrandissement de l'environnement autour du carbone C<sub>1</sub> dans le cas de l'acutissimine A (**3**) ou de l'épiacutissimine A (**9**)

### III-Hémisynthèse des flavano-ellagitannins en milieu modèle du vin

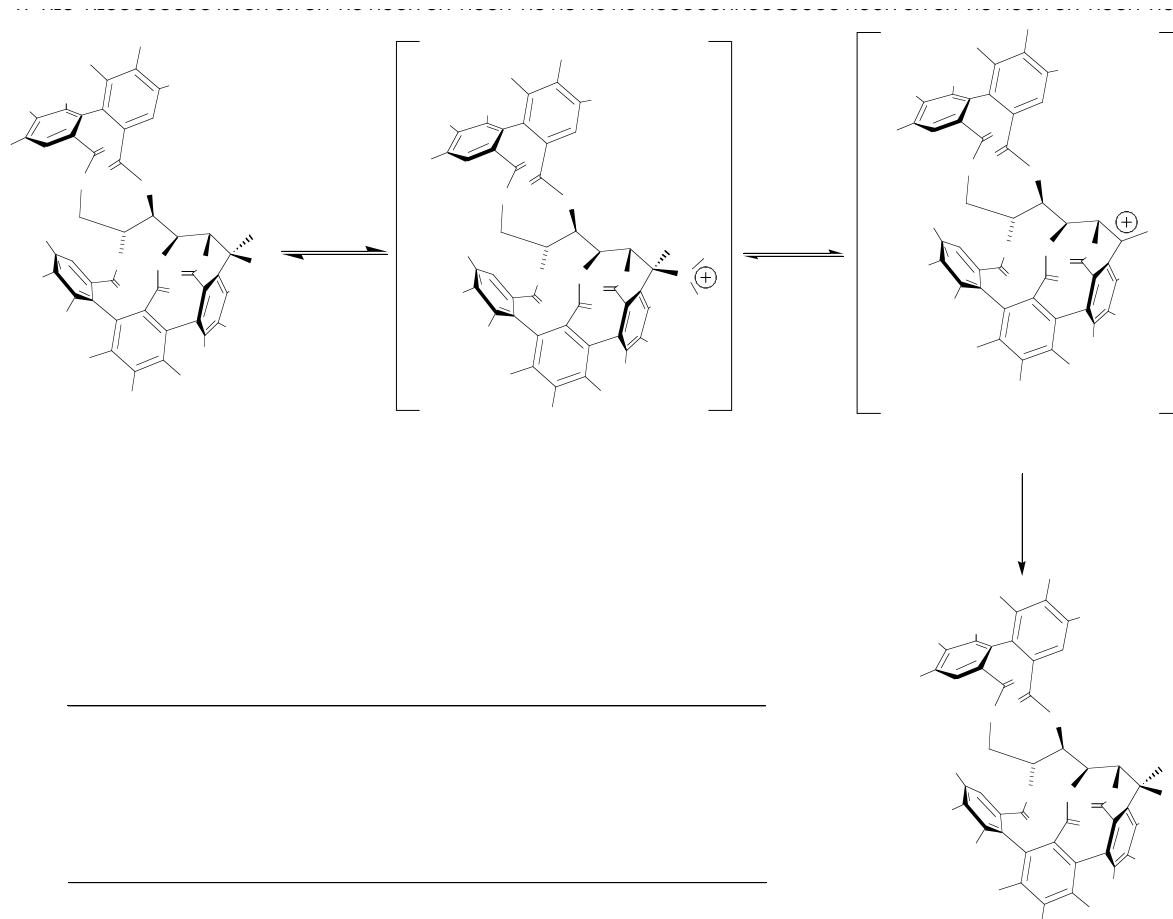
La formation des acutissimines A (**3**) et B (**3**) en milieu organique ayant été démontrée, l'étude de leur formation en milieu modèle du vin a été réalisée. Le milieu utilisé est une solution aqueuse à 12 % en éthanol et acidifiée avec 5 g/L d'acide tartrique. Le pH de la solution est ensuite ajusté à 3,2. La vescalagine (**1**) et la catéchine (**7**) sont solubilisées dans ce milieu modèle. Le milieu réactionnel est maintenu à température ambiante et l'évolution de la réaction est suivie par CLHP.

Après six jours de réaction (Figure 5), trois produits apparaissent dont deux avec des temps de rétention identiques à ceux des acutissimines A (**3**) et B (**4**). Le troisième est dû à l'éthylvescalagine (**11**) qui provient de l'addition d'éthanol sur le carbocation **5**. L'analyse du milieu par CLHP-ESI-MS a confirmé l'identification de ces trois produits. La formation des acutissimines A (**3**) et B (**4**) ainsi que de l'éthylvescalagine (**11**) se produit donc également en milieu modèle du vin. L'hémisynthèse des épiacutissimines A (**9**) et B (**10**) a également été réalisée en milieu modèle du vin. De plus l'hémisynthèse de l'éthylvescalagine (**11**) en milieu organique été réalisée pour permettre ainsi sa caractérisation par RMN suivant une stratégie identique à celle des acutissimines.



**Figure 6 :** Suivi du milieu réactionnel de l'hémisynthèse des acutissimines A et B milieu modèle de vin (1: vescalagine (1), 2: catéchine (7), 3 : acutissimine A (3) et 4 : acutissimine B (4) et 5 : l'éthylvescalagine (11))

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

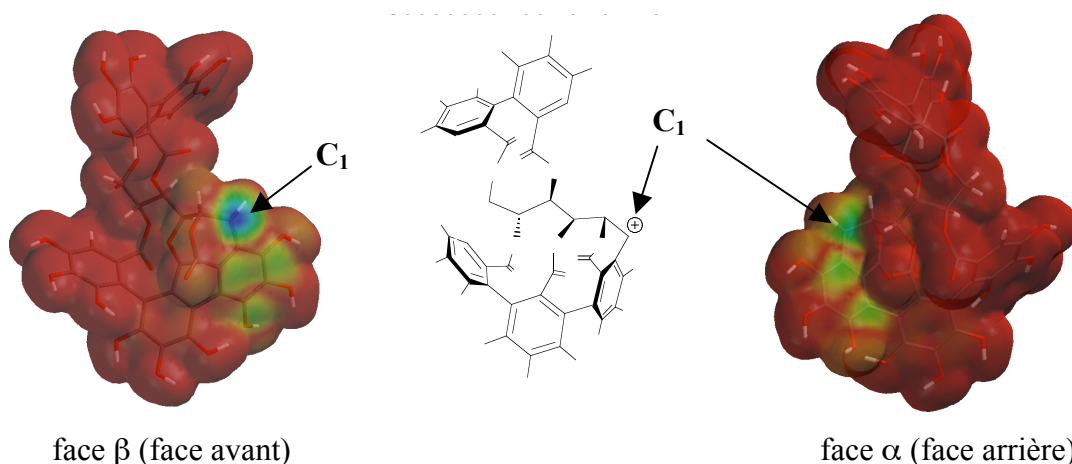


**Figure 7 :** Mécanisme général de formation des structures de type **6**

La formation des flavano-ellagitannins **3**, **4**, **9**, et **10**, ainsi que celle de l'éthylvescalagine (**11**), découlent d'un même mécanisme général en milieu acide. Il s'agit d'une simple substitution nucléophile unimoléculaire (type  $S_N1$ ) avec rétention de configuration qui comprend deux étapes (Figure 7). Premièrement il y a protonation en milieu acide de l'alcool benzylique porté par le carbone  $C_1$  conduisant à la formation du carbocation benzylique **5**. Ce carbocation benzylique **5** peut alors subir l'attaque d'un nucléophile pour conduire à la formation de nos produits avec une structure commune de type **6** qui varie suivant le nucléophile utilisé. L'attaque nucléophile sur le carbocation **5** se fait par la face  $\beta$  (face avant); tous les flavano-ellagitannins présentent une orientation- $\beta$  (vers l'avant) du carbone  $C_1$  identique à celle de la vescalagine.

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





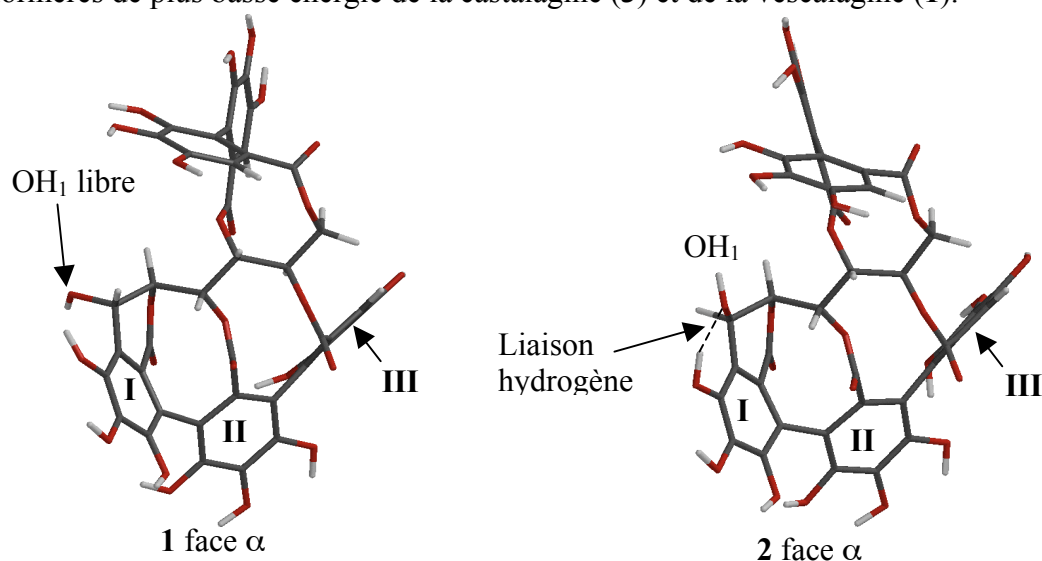
**Figure 8** : Représentation graphique de la LUMO projetée sur la carte de densité électronique du carbocation **5**

Les flavano-ellagitannins que nous avons obtenus par hémisynthèse présentent une configuration de leur carbone  $C_1$  identique à celle de la vescalagine (**1**). Le groupe hydroxyle du carbone  $C_1$  de **1** est effectivement substitué par une unité flavan-3-ol avec rétention de configuration. Or, une attaque nucléophile sur un carbocation conduit généralement à la racémisation du centre sur lequel s'opère la substitution (formation de deux produits). Une orientation  $\beta$  de la liaison entre l'unité flavan-3-ol et l'unité ellagitannin  $C$ -glycosidique est également présente chez tous les tannins complexes naturels isolés et caractérisés à ce jour. La grandinine et les roburines ellagitannins également présent dans le bois de chêne présentent une orientation  $\beta$  entre leur unité ellagique et leur pentose connecté sur le carbone  $C_1$ .<sup>8</sup> Pour mieux comprendre et rationaliser les causes de ce contrôle stéréochimique des attaques nucléophiles sur ce type de carbocation ellagique, nous avons modélisé la LUMO du carbocations intermédiaires **5** dérivant de la vescalagine (**1**).

Il apparaît clairement sur la représentation graphique de la modélisation orbitalaire de la LUMO du carbocation **5** que la face  $\beta$  est plus électrophile (couleur bleu plus intense) que la face  $\alpha$ , de plus la face  $\alpha$  présente un encombrement stérique plus important (Figure 8). Cette différence stéréoelectronique du caractère électrophile des faces  $\alpha$  et  $\beta$  explique l'orientation sélective de toutes les attaques nucléophiles sur le carbocation **5** observée lors des hémisynthèses des flavano-ellagitannins<sup>19</sup> est à l'origine de l'exclusivité de l'orientation- $\beta$  observée pour tous les tannins complexes isolés à ce jour.

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

La déshydroxylation de l'alcool benzylique de la castalagine (**3**) devrait aussi conduire à la formation du carbocation benzylique **5**, intermédiaire clé de la formation des flavano-ellagitannins. Il serait alors possible de réaliser l'hémisynthèse des flavano-ellagitannins à partir de la castalagine (**3**). Après de nombreux essais, il est apparu que la déshydroxylation de l'alcool benzylique de la castalagine (**3**) n'est pas possible. Pour comprendre cette absence de réactivité de la castalagine (**3**), nous avons réalisés une étude sur la comparaison des conformères de plus basse énergie de la castalagine (**3**) et de la vescalagine (**1**).<sup>21</sup>



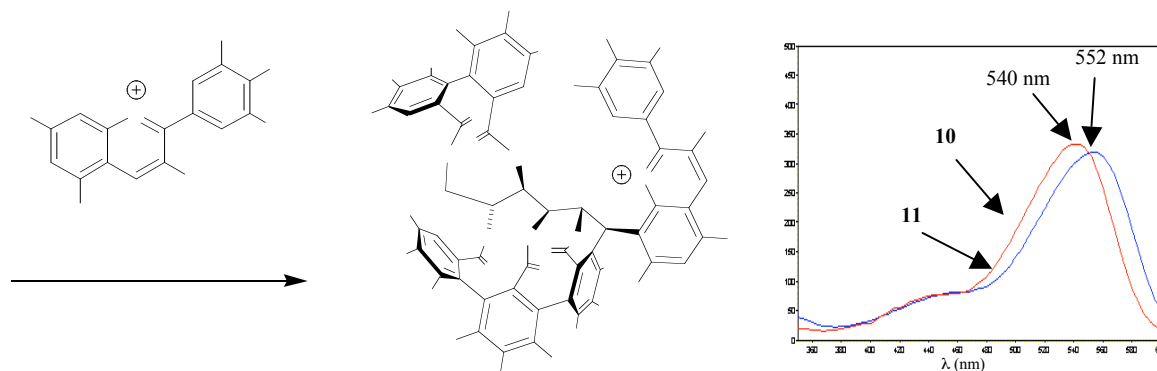
**Figure 9** : Conformère de plus basse énergie de la vescalagine (**1**) et de la castalagine (**2**)

La comparaison entre ce conformère montre que l'alcool benzylique en position C<sub>1</sub> de la castalagine (**2**) est emprisonné par sa participation à une liaison hydrogène intramoléculaire alors que, dans le cas de la vescalagine (**1**), cet alcool benzylique est libre (Figure 9). Cette liaison hydrogène entre l'oxygène de l'alcool benzylique et le proton du premier hydroxyle phénolique du cycle I diminue le caractère basique de l'oxygène benzylique et "empêche" la protonation et la déshydratation de l'alcool benzylique de la castalagine (**2**) supprimant ainsi toute possibilité de formation des acutissimines.

## VII-Hémisynthèse des anthocyano-ellagitannin

La formation des acutissimines **3**, **4**, **9** et **10** résulte d'un mécanisme général en milieu acide se traduisant par l'attaque stéréosélective d'un nucléophile en position C<sub>1</sub> sur le carbocation **5**. Dans le cas des acutissimines **3**, **4**, **9** et **10**, les espèces nucléophiles sont les sommets 8 et 6 de la catéchine (**7**) ou de l'épicatéchine (**8**). Cependant, le vin contient de

nombreux autres nucléophiles pouvant potentiellement attaquer le carbocation **5** et conduire ainsi à la formation d'autres composés non encore mis en évidence.



**Figure 10** : Réaction de formation des anthocyano-ellagitannins **14** et **15**

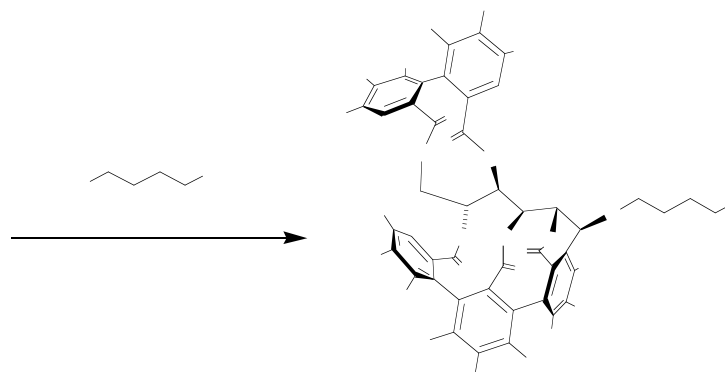
Parmi ces nucléophiles, le remplacement de l'unité flavan-3-ol par une anthocyane pourrait conduire à la formation d'un adduit comportant une unité ellagique C-glycosidique connectée avec une unité anthocyanique également nucléophile par ses sommets 8 et/ou 6. Ce nouveau type de composé jamais observé serait alors coloré, mais probablement avec une teinte légèrement différente de celle de l'anthocyane seule. L'hémisynthèse de deux anthocyano-ellagitannins entre la vescalagine (**1**) et deux anthocyanes (la malvidine aglycone (**12**) et de la malvidine-3-O-glucoside (**13**)) dans des conditions proche de celle des acutissimines a été réalisée en milieu organique permettant leur caractérisation par RMN.

La comparaison des spectres UV-visible de ces nouveaux composés avec l'anthocyane seule montre un effet bathochrome positif de 12 nm (Figure 10) ainsi qu'un effet hyperchrome important. Ces anthocyano-ellagitannins présentent donc une teinte plus violette et plus intense que les anthocyanes dont ils dérivent. De tels déplacements positifs sont couramment observés lors de la formation des adduits flavan-3-ol-malvidine.<sup>4, 5, 22</sup>

### VIII-Hémisynthèse d'un thioéther d'ellagitannin

Le vin comporte également des composés ayant des fonctions thiols pouvant être envisagés comme nucléophiles. De nombreux composés aromatiques notamment dans les vins blanc sont des thiols<sup>23</sup> ainsi que les peptides et protéines provenant des levures de

fermentation et du raisin ayant des résidus cystéine. L'hémisynthèse d'un thioéther d'ellagitannin **17** entre la vescalagine (**1**) et le 1,4-butanedithiol (**16**) (utilisé comme thiol modèle) a été réalisée en milieu organique dans des conditions identiques à celles utilisées pour l'hémisynthèse des acutissimines (Figure 11). Dans le cas des vins blanc élevés en fût de chêne, la formation de thioéther d'ellagitannins entre les composés aromatiques de ces vins et la vescalagine est très probable. La formation de ces composés ayant certainement une influence positive ou négative sur l'intensité et la qualité de ces arômes.

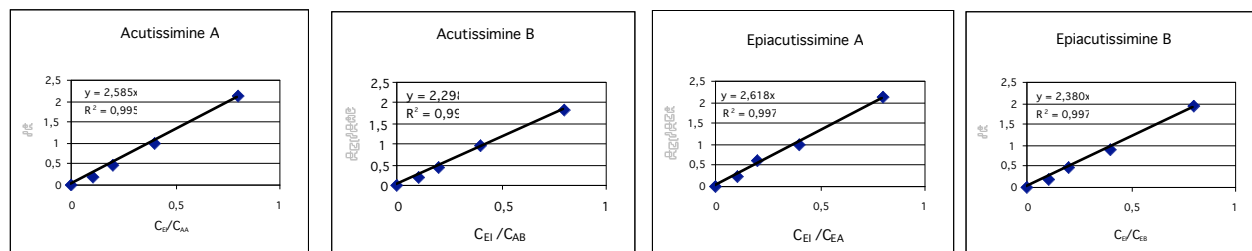


**Figure 11** : Réaction de formation du 4'-butanedithiol-1-thioéthervescalagine (**17**)

### **IX-Identification et dosage des acutissimines et de l'éthylvescalagine dans un vin élevé en fûts de chêne**

L'identification et le dosage des acutissimines **3**, **4**, **9** et **10** et de l'éthylvescalagine (**11**) a été réalisée à partir d'un vin rouge élevé pendant 18 mois en barrique neuve. Le vin rouge est un milieu très complexe qui contient de nombreux produits différents. Deux étapes de purification sur gel dans des conditions couramment utilisées pour les vins rouge<sup>24</sup> sont indispensables avant de pouvoir réaliser l'identification et dosage par CLHP-ESI-MS. Ces deux étapes permettant d'éliminer tous les produits indésirables génèrent un bruit de fond important au cours de l'analyse en masse et en UV masquant nos produits présents en faible quantité. L'identification des acutissimines **3**, **4**, **9** et **10** et de l'éthylvescalagine (**11**) a été réalisée par CLHP-ESI-MS par corrélation avec les spectres de masse et les temps de rétention des produits pur obtenus par hémisynthèse.

Leur dosage a également été réalisé en CLHP-ESI-MS par étalonnage interne avec comme étalon interne, l'acide chlorogénique. Malgré sa structure très différente de celle de nos flavano-ellagitannins, l'acide chlorogénique a été choisi comme étalon interne car son temps de rétention et sa sensibilité à l'ionisation sont proche de ceux de nos composés. Il est également généralement utilisé comme étalon interne pour le dosage par CLHP-ESI-MS des ellagitannins,<sup>25</sup> et est totalement absent dans les vins obtenus à partir de raisin de type *Vitis vinifera*,<sup>26</sup> absence vérifiée avant la réalisation de notre dosage.



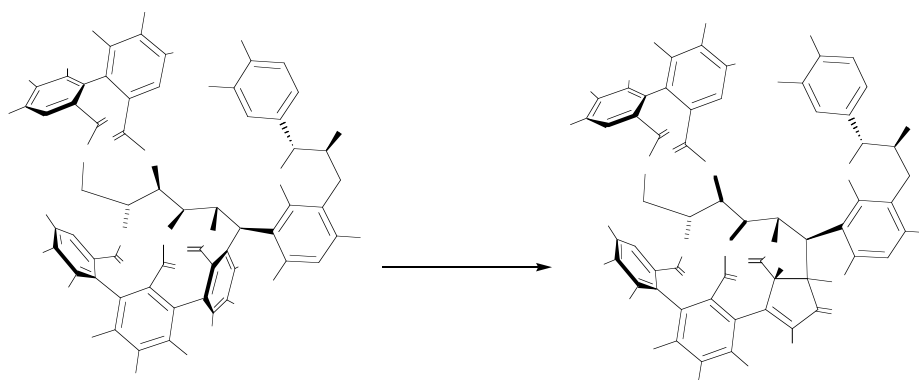
**Figure 12 :** Coefficient de réponse des quatre acutissimines **3**, **4**, **9** et **10** pour des concentrations exprimées en mg/L

Le coefficient de réponse de chacune des acutissimines **3**, **4**, **9** et **10**, de l'éthylvescalagine (**11**) ainsi que de la vescalagine (**1**) et la castalagine (**2**) par rapport à l'étalon interne ont été déterminés séparément (Figure 12). Tous nos composés montrent une excellente linéarité sur la gamme de concentration utilisée ainsi que des coefficients de réponse très proches (Figure 12). La détermination ces coefficients de réponse ayant été réalisée, le dosage de nos composés dans un vin rouge élevé en fût de chêne a alors été effectué pour conduire aux teneurs suivante.

Acutissimine A ( <b>3</b> ) :	0,40 mg/L	Ethylvescalagine ( <b>11</b> ) :	0,85 mg/L
Acutissimine B ( <b>4</b> ) :	0,28 mg/L	Vescalagine ( <b>1</b> ) :	2,20 mg/L
Epiacutissimine A ( <b>9</b> ) :	0,30 mg/L	Castalagine ( <b>2</b> ) :	8,10 mg/L
Epiacutissimine B ( <b>10</b> ) :	0,35 mg/L		

Ces teneurs inférieures au milligramme par litre peuvent paraître faibles. Cependant il a été montré que seul la vescalagine (**1**) réagit pour conduire à la formation des acutissimines **3**, **4**, **9** et **10** et de l'éthylvescalagine (**11**). De plus l'addition sur le carbocation benzylique **5** de dimère, voire d'oligomères procyanidiques doit également être envisagée. La réactivité des sommets 8 et 6 de leurs unités flavan-3-ol est comparable à celle de la catéchine (**7**) ou de l'épicatéchine (**8**). De tels tannins complexes formés d'une procyanidine B3 reliée à une unité

ellagique C-glycosidiques ont déjà été isolés dans l'écorce du chêne asiatique *Quercus miyagii*.<sup>15</sup> De plus un vin élevé en fûts de chêne moins de 18 mois pourrait révéler des concentrations plus élevées en acutissimines **3**, **4**, **9** et **10**. En effet, l'oxydation des acutissimines peut conduire à la formation de produits ayant des structures de type "camelliatannins".<sup>27</sup> Par exemple, l'acutissimine A (**3**) peut s'oxyder en mongolicaine A (**18**) (Figure 13).<sup>28</sup> Une telle oxydation a été réalisée dans un milieu modèle du vin saturé en oxygène à partir de l'acutissimine A (**3**) qui a été obtenu par hémisynthèse.



**Figure 13** : Formation de la mongolicaine A (**18**) à partir de l'acutissimine A (**3**)

## X-Conclusion

Au cours de ce travail, le mécanisme général postulé pour l'évolution des ellagitannins C-glycosidiques dans le vin a été démontré par la formation de divers produits de substitution nucléophile entre la vescalagine (**1**) et différents nucléophiles. L'hémisynthèse des flavano-ellagitannins **3**, **4**, **9** et **10** a été réalisée en milieu organique par condensation entre la vescalagine (**1**) et la catéchine (**7**) ou l'épicatéchine (**7**). Leur formation a également été montrée en milieu hydroalcoolique modèle du vin.

Ce mécanisme général postulé pour l'évolution des ellagitannins C-glycosidiques est une simple substitution nucléophile unimoléculaire sous catalyse acide en deux étapes. Premièrement la protonation suivi de la déshydratation de l'alcool benzylique de la vescalagine (**1**) conduit à la formation de l'intermédiaire carbocationique **5**. Cet intermédiaire subit alors une attaque nucléophile stéréosélective assurant l'orientation- $\beta$  sur le carbone C<sub>1</sub>. La formation de nombreux produits d'addition sur l'intermédiaire carbocationique dérivé de la vescalagine (**1**) a été démontrée au cours de ce travail comme l'addition d'éthanol

conduisant à la formation de l'éthylvescalagine (**11**) composé probablement présent dans les eaux de vie élevé en fût de chêne.

Ce mécanisme général diastéréosélectif et non enzymatique régit également probablement la biosynthèse de tous les flavano-ellagitannins d'origine végétale. Le rapport **3** : **4** obtenu par hémisynthèse est quasi identique à celui observé dans l'écorce de *Quercus acutissima*. De plus l'orientation- $\beta$  de l'unité flavan-3-ol sur le carbone C<sub>1</sub> de l'unité ellagique des flavano-ellagitannins s'explique par des effets stéréoélectroniques sans qu'aucune intervention enzymatique soit nécessaire

L'hémisynthèse des premiers membres d'une nouvelle famille de composés, les anthocyano-ellagitannins **14** et **15** a été effectuée. Ces nouveaux composés résultent de la condensation entre deux anthocyanes et la vescalagine (**1**) selon un mécanisme de formation identique à celui conduisant aux flavano-ellagitannins. Ces anthocyano-ellagitannins sont colorés et présentent une teinte plus violette et plus intense que les anthocyanes dont ils dérivent. La formation d'anthocyano-ellagitannins au cours de l'élevage en fûts de chêne des vins rouges est très probable et contribue certainement à l'évolution de la couleur vers des teintes sombre de ces vins rouges.

La présence indiscutable des acutissimines **3**, **4**, **9** et **10** et de l'éthylvescalagine (**11**) dans un vin rouge élevé en fûts de chêne a été démontrée avec des teneurs légèrement inférieures au milligramme par litre. L'identification et la quantification de ces molécules dans un vin élevé en fûts de chêne prouvent que leur mécanisme de formation vérifié en milieu organique et en milieu modèle du vin est bien effectif dans le vin au cours de son élevage. La formation de ces produits dans le vin représente la première hypothèse vérifiée d'un mécanisme général d'évolution chimique des ellagitannins C-glycosidiques dans les vins.

L'activité antitopoisomérase II des acutissimines **3**, **4**, **9** et **10** a également été déterminée, une activité antitopoisomérase II ayant déjà été observée pour l'acutissimine A (**3**).<sup>27</sup> La topoisomérase II est une enzyme participant à la prolifération des cellules cancéreuses et est l'une des cibles majeures dans la lutte contre le cancer. Les acutissimines **3**, **4**, **9** et **10** montrent une activité inhibitrice de cette enzyme quatre à dix supérieurs à celle du

VP-16 produit utilisé actuellement cliniquement dans la lutte contre de nombreux cancer, avec des valeurs IC50 de l'ordre du micro-molaire.<sup>19</sup>

## XI-Références bibliographiques

- (1) Ribéreau-Gayon, P., Interprétation Chimique de la Couleur des Vins Rouges. *Vitis* **1973**, *12*, 119-142.
- (2) Souquet, J. M.; Cheynier, V.; Broussaud, F.; Moutounet, M., Polymeric Proanthocyanidins from Grape Skins. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 509-512.
- (3) Ribéreau-Gayon, P.; Pontallier, P.; Glories, Y., Some Interpretation of Colour Changes in Yong Red Wines During their Conservation. *J. Sci. Food Agric.* **1983**, *34*, 505-516.
- (5) Liao, H.; Haslam, E., Polyphenol Interactions. Anthocyanins: Co-pigmentation and Colour Changes in Red Wines. *J. SCI; Food Agric.* **1992**, *59*, 299-305.
- (6) Remy, S.; Fulcrand, H.; Labarde, B.; Cheynier, V.; Moutounet, M., Frist Confirmation in Red Wine of Products Resulting from Direct Anthocyanin-Tannin Reactions. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 745-751.
- (7) Moutounet, M.; Rabier, P.; Puech, J. L.; Verette, E.; Barillère, J. M., Analysis by HPLC of Extractible Substances in Oak Wood. Application to a Chardonnay Wine. *Scienc. Alim.* **1989**, *9*, 35-51.
- (8) Quideau, S.; Feldman, K. S., Ellagitannin Chemistry. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 475-503.
- (9) Mayer, M.; Seitz, H.; Jochims, J. C., Die struktur des castalagins. *Liebigs Ann. Chem.* **1969**, *721*, 186-193.
- (10) Mayer, M.; Seitz, H.; Jochims, J. C.; Schauerte, K.; Schilling, G., Schilling G. Struktur des Vescalagins. *Liebigs Ann. Chem.* **1971**, *751*, 60-68.
- (11) Puech, J. L.; Mertz, C.; Michon, V.; Le Guernevé, C.; Doco, T.; Hervé du Penhoat, C., Evolution of Castalagin and Vescalagin in Ethanol Solution. Identification of New Derivatives. *J. Agri. Food Chem.* **1999**, *47*, 2060-2066.
- (12) Lin, T. C.; Tanaka, T.; Nonaka, G. I.; Nishioka, I.; Young, T. J., Tannins and Related Compounds. CVIII. Isolation and Characterisation of Novel Complex Tannins (Flavano-ellagitannins), Anogeissimin and Anogeissusins A and B from *Anogeissus acuminata* (Roxb ex DC.) Guill. et Perr. var. *lanceolata* Wall. ex Clarke. *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 1144-1147.



- (13) Hatano, T.; Han, L.; Taniguchi, S.; Shingu, T.; Okuda, T.; Yoshida, T., Tannins and Related Polyphenols of Theaceous Plants. VIII. Camelliatannins C and E, New complex Tannins from *Camellia japonica* Leaves. *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 1629-1633.
- (14) Ishimaru, K.; Nonaka, G. I.; Nishioka, I., Tannins and Related Compounds. LV. Isolation and Characterisation of Acutissimins A and B, Novel Tannins from *Quercus* and *Castanea* Species. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 602-610.
- (15) Ishimaru, K.; Ishimatsu, M.; Nonaka, G. I.; Mihashi, K.; Iwase, Y.; Nishioka, I., Tannins and related compounds. LXXII. Isolation and characterisation of Mongolicanin (Procyanidino-ellagitannin), Mongolinin A, Acutissimin C and Vescalagin carboxylic acid, novel tannins from *Quercus mongolica* and var. *grosserrata*. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 3319-3327.
- (16) König, M.; Scholz, E.; Hartmann, R.; Lehmann, W.; Rimper, H., Ellagitannins and Complex Tannins from *Quercus petraea* Bark. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 1411-1415.
- (17) Karplus, M., Vicinal Proton Coupling in Nuclear Magnetic Resonance. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2870-2871.
- (18) Nonaka, G. I.; Sakai, T.; Tanaka, T.; Mihashi, K.; Nishioka, I., Tannins and Related Compounds. XCVII. Structure Revision of C-glycosidic Ellagitannins Castalagin, Vescalagin, Casuarinin and Stachyurin, and Related Hydrolysable Tannins. *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 2151-2156.
- (19) Quideau, S.; Jourdes, M.; Saucier, C.; Glories, Y.; Pardon, P.; Baudry, C. "DNA Topoisomerase II Inhibitor Acutissimin A and other Flavano-Ellagitannins in Red Wine", *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 6012-6014
- (20) Balas, L.; Vercauteren, J., Extensive High-Resolution Reverse 2D NMR Analysis for the Structural Elucidation of Procyanidin Oligomers. *Magn. Reson. Chem.* **1994**, *32*, 386-393.
- (21) Quideau, S.; Varadinova, T.; Karagiozova, D.; Jourdes, M.; Pardon, P.; Baudry, C.; Genova, P.; Diakov, T.; Petrova, R. "Main Structural and Stereochemical Aspects of the Antiherpetic Activity of Nonahydroxyterphenoyl-Containing C-Glycosidic Ellagitannins", *Chemistry and Biodiversity*, **2004**, *1*, 247-258.
- (22) Bakker, J.; Picinelli, A.; Bridle, P., Modl Wine Solution: Colour and Composition Changes During Ageing. *Vitis* **1993**, *32*, 111-118

- (23) Tomonaga, T.; Baltenweck-Guyot, R.; Peyrot des Gachons, C.; Dubourdieu, D., Contribution of Volatile Thiols to the Aromas of White Wines Made from Several *Vitis vinifera* Grape Varieties. *Am. J. Enol. Vitic.* **2000**, *51*, 178-181.
- (24) De Freitas, V.; Glories, Y.; Bourgeois, G.; Vitry, C., Characterisation of Oligomeric and Polymeric Procyanidins from Grape Seeds by Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1435-1441.
- (25) Salminen, J. P.; Ossipov, V.; Haukioja, E.; Pihlaja, K., Seasonal Variation in the Content of Hydolysable Tannins in Leaves of *Betula pubescens*. *Phytochemistry* **2001**, *57*, 15-22.
- (26) Cheynier, V.; Moutounet, M.; Sarni-Manchado, P. *Oemologie. Fondements Scientifiques et Technologiques.*; Lavoisier., **1998**; 125-162.
- (27) Han, L.; Hatano, T.; Yoshida, T.; Okuda, T., Tannins of Theaceous Plants. V. Camelliatannins F, G and H, Three New Tannins from *Camellia japonica* L.. *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, *42*, 1399-1409.
- (28) Kashiwada, Y., Antitumor Agent, 129. Tannins and Related Compounds as Selective Cytotoxic Agents. *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 1033-1043.