



THESE

Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat

Option : Chimie Organique

THEME

PURIFICATION ET IDENTIFICATION DE POLYPHENOLS STILBENIQUES PRESENTS DANS LA VIGNE

Par:

MME. ZGA NADIA

Directeurs de thèse: **K. LAMARA** Professeur U. D'Oum El Bouaghi
J. M. MERLLION Professeur U. BORDEAUX II (France)

Devant le jury :

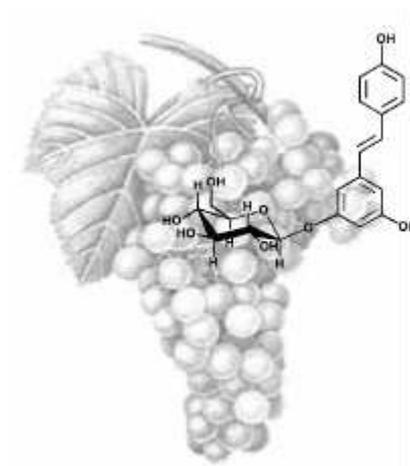
Président : **F. FERKOUS** Professeur U. de Annaba

Examineurs : - **B. LEGSEIR** Professeur U. de Annaba

- **A. YAHYA** Maitre de conférence C. U. de Mila

- **M. BENKHALED** Professeur U. de Batna

TABLES DES MATIERES



TABLES DES MATIERES

REMERCIEMENT

LISTE DES ABREVIATIONS

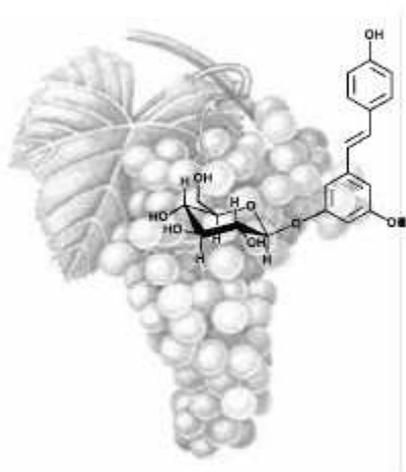
LISTE DES FIGURES

I.INTRODUCTION	16
I - GENERALITES SUR LES POLYPHENOLS.....	19
II. 1 - Origine biogénétique des polyphénols dans <i>Vitis vinifera</i>	19
II. 2 - Connaissance de composition de la vigne.....	20
A .Les polyphénols de la vigne	20
A.1.Composition phénolique	20
A.1.1.Les non-flavonoïdes.....	20
A.1.1. 1-les acides phénols.....	20
A.1.1.2-Les stilbènes.....	24
A.1.2 les flavonoïdes	26
A.1.2.1. Les flavonols	27
A.1.2.2. Les anthocyanes.....	28
B . Polyphénols de la vigne et santé humaine.....	29
B.1 - Quelques données épidémiologiques.....	29
B.2 - Effets cardiovasculaires des polyphénols.....	31
B.3 - Propriétés antioxydantes des polyphénols.....	32
B.3.1 - Mode d'action des antioxydants biologiques.....	32
B .4- Mode d'action des polyphénols	35
B.4.1 - Biodisponibilité des polyphénols chez l'Homme	39
III -TECHNIQUES DE SEPARATION	41
III-1- Chromatographie sur couche mince (CCM).....	41
III. 2 - Chromatographie liquide de Haute Performance, KONTRON.....	41
III .3- LA CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE	
CENTRIFUGE.....	41
III- 3-1 PRICIPE.....	42
III-3-2 AVANTAGES.....	43
III-3-3 INCONVENIENTS.....	44
III-3-4- Le sens de pompage de la phase mobile.....	44
III. 3.5– Système biphasique de solvant.....	46
a) Sélection du système de solvant.....	46
IV- SEPARATION DES COMPOSES STLIBENIQUES.....	48
IV - I – La stratégie de purification.....	48
IV-2. MATERIELS ET METHODES.....	48
IV .2.1- MATERIL VEGETAL ET EXTRACTION.....	48
IV-2.2- -Fractionnement et isolement des stilbènes.....	50
IV-2.2. 1 Sélection du système de solvant biphasique.....	50
IV-. 2. 2. 2- Remplissage de la colonne par la phase stationnaire.....	51
IV- 2. 2. 3- obtention de fractions enrichies en stilbènes.....	51
IV-2.2.4- Caractérisation des stilbènes.....	52
IV-2.2.5 -Purification des stilbènes	54
A- Purification des stilbènes existant dans la CPC sys K.....	54
a) Purification des stilbènes existant dans les fractions 22-29	54

b) Purification des stilbènes existant dans les fractions 89-104 mode ascendant et 114-117 mode descendant.....	55
c) Purification des stilbènes existant dans les fractions 16-19	56
d) Purification des stilbènes existant dans les fractions 12-15.....	57
B- Purification des stilbènes existant dans la CPC sys M	59
a) purification des stilbènes existant dans les fractions 25-53	59
b) Purification des stilbènes existant dans les fractions 61-93.....	60
V .Détermination structurale des substances isolées.....	63
V. 1- GENERALITES	63
V 1.1- la RMN 2D.....	63
A- Corrélations homonucléaires.....	64
a)- COSY.....	64
b)- ROESY.....	64
B – Corrélations hétéronucléaires.....	65
a) – HMQC.....	65
b) –HMBC.....	66
V.2 -TRAVAUX PERSONNELS.....	68
V. 2-A. Analyse structurale des composés isolés.....	68
V . 2- A . 1. Détermination structurale du composé A : <i>Picétannol</i>	68
V 2- A . 2. Détermination structurale du composé B : <i>L'ampilopsine</i>	68
V 2- A . 3. Détermination structurale des composés C et D: <i>Stilbènes glucoside</i>	70
a) <i>Etude de la structure du composé C</i>	70
b) <i>Etude de la structure du composé D</i>	77
V 2- A . 3. Détermination structurale du composé K :	
<i>Resvératrol trans-déhydrodimère</i>	84
V . 2- A . 4. Détermination structurale du composé L : <i>L'ε-Viniférine</i>	86
V . 2- A . 5. Détermination structurale du composé M : <i>la Vitisin C</i>	88
V . 2- A . 6. Détermination structurale du composé N :.....	95
VI. CONCLUSION.....	102
VII. PARTIE EXPERIMENTALE.....	104
VII.1 - GENERALITES.....	105
VII.1 . A –Méthodes chromatographiques.....	105
a) – chromatographie sur couche mince (CCM).....	105
b) – chromatographie liquide haute performance semi préparative (HPLC).....	105
c) – Chromatographie de partage centrifuge (CPC).....	105
VII . 2- Spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	106
VII . 3- Matériel végétal et extraction.....	106
VII . 4 – Fractionnement par chromatographie de partage centrifuge (CPC).....	106
VII.4.1 - Purification des fractions par chromatographie liquide haute performance (HPLC).....	108
VII . 4.1 .a - Purification des fractions 22-29.....	108

VII . 4.1 .b - Purification des fractions 89-104 et 105-106.....	109
VII . 4.1 .c - Purification des fractions 16-19.....	110
VII . 4.1 .d - Purification des fractions 12-15.....	111
VII . 4.1 .d - Purification des fractions 12-1.....	112
1) Purification des fractions 25-53.....	112
2) Purification des fractions 61-93.....	113
- Bibliographie	114

REMERCIEMENTS



REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé à l'université de Bordeaux 2 dans un laboratoire concernant l'isolement, la purification et l'analyse structurale de stilbènes.

*J'aimerais tout d'abord remercier le Professeur **K.LAMARA** directeur de thèse de m'avoir accueilli dans son groupe et de m'avoir donné l'opportunité de me former en phytochimie*

*J'aimerais également exprimer ma gratitude à Monsieur le Professeur **Jean Michel MERILLON** de m'avoir accueilli dans son laboratoire .Je le remercie également de m'avoir donné la possibilité de publier mes résultats et de les présenter un congrès international.*

*J'aimerais de la même façon remercier le Dr **Pierre Waffo – Téguo** de m'avoir donné l'opportunité de me former en phytochimie avec des appareils modernes.*

Je tiens également à remercier :

*Monsieur le Professeur **F. FERKOUS** de l'université de Annaba d'avoir assuré la présidence du jury de thèse.*

Les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail :

*. Monsieur le Professeur **B.LAGSIR** de l'université de Annaba en tant que examinateur.*

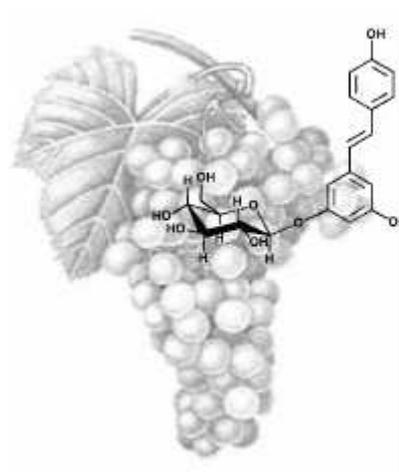
*Monsieur le docteur **A.YAHYA** du centre universitaire de Mila en tant que examinateur.*

*Monsieur le Professeur **M..BENKHALED** de l'université de Batna en tant que examinateur.*

*J'aimerais également remercier mon mari **Mounir** pour son soutien, ses conseils et son aide*

*Toute ma gratitude va enfin à **mère** pour son soutien tout au long des mes études et durant cette thèse, à mes sœurs et frères et sans oublier mes petits anges **Nadhir** et **Amir**.*

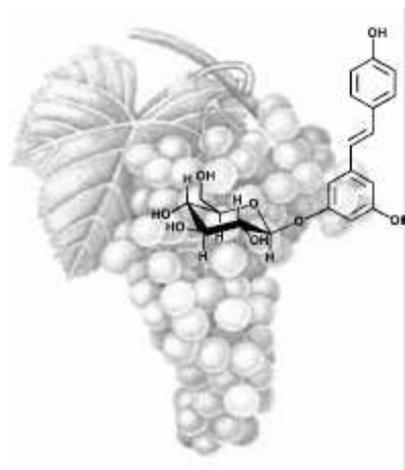
LISTE DES ABREVIATIONS



LISTE DES ABREVIATIONS

^1H	Proton
^{13}C	Carbone 13
AcOEt	Acétate d'éthyle
BIRD	B ilinear R otational D ecoupling
CCM	Chromatographie sur C ouche M ince
CHCl_3	Cloroforme
CLHP	Chromatographie L iquide H aute P erformance
COSY	C orrelation S pectroscop Y
δ ppm	Déplacement chimique exprimé en partie par million
d	Doublet
DEPT	D istortionless E nhancement by P olarisation T ransfer
dd	Doublet d édoublé
fig	Figure
H_2SO_4	Acide sulfurique
H_2O	Eau
HMBC	H eteronuclear M ultiple B onding C onnectivity
HSQC	H eteronuclear S ingle Q uantum C oherence)
hep	Hepthane
L	Litre
m	Multiplet
mg	Milligramme
mL	Millilitre
MeOH	Méthanol
MTBE	Méthyl tertio-butyl éther
min	Minutes
ppm	Partie par million
q	Quadruplet
R_f	Rapport frontal
RMN	Résonance M agnétique N ucléaire
s	Singulet
sys	Système
t	Triplet
UV	Ultrat-Violet

LISTE DES FIGURES



LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Structure chimiques de quelques dérivés de l'ester hydroxycinnamiques présents dans les raisins*
- Figure 2 : Structure chimique de la 2- phényl-benzopyrone**
- Figure 3 : Structure chimiques de quelques flavonols présents dans le raisin.**
- Figure 4: Structure chimiques de quelques anthocynidines**
- Figure5 : Schéma descriptif de l'appareil de Chromatographie de partage centrifuge(CPC à disques « sandwiches ») utilisé au laboratoire*
- Figure 6 : Principaux avantages de la CPC*
- Figure 7 : Illustration des modes ascendants et descendant en CPC*
- Figure 8 : Extraction des serments de vitis vinifera chardonnay*
- Figure 9: Chromatogramme CPC de l'extrait MTBE sys K*
- Figure 10 : Fractionnement de l'MTBE à l'aide de la CPC sys K*
- Figure 11 : CCM du suivie du fractionnement de ccp sys K à 254et 366 nm, éluant : CHCl₃, MeOH, AcOEt , pulvirisation :anisaldéhyde, acide sulfurique*
- Figure 12: photo du Lyophilisateur utilisé pour sécher les extrait aqueux**
- Figure13 : chromatogramme HPLC semi préparative des fractions 22—29 de la CPC sys K*
- Figure 14: chromatogramme HPLC semi préparative des fractions (89 à 104)et (114 à117)de la CPC sys K*
- Figure 15 : chromatogramme HPLC semi préparative des fractions 16-19 de la CPC sys K*
- Figure 16: Fractionnement des fractions 12-15 à l'aide de la CPC sys M*
- Figure17 : chromatogramme HPLC semi préparative des fractions (25 à 53) sys M*
- Figure 18 : CCM du suivie du fractionnement 61-93 (CPC sys M) à 254et 366 nm, éluant : CHCH₃ ,MeOH, ACOEt , pulvirisation :anisaldéhyde, acide sulfurique*
- Figure19 : Chromatogramme HPLC semi préparative des fractions (61à 93) sys M*
- Figure 20 : Comparaison du composé B avec L'ampélopsine et le Balanocapol*
- Figure 21 : Spectre RMN- H du composé (C)*
- Figure 22 : Spectre RMN-¹³C du composé (C)*
- Figure 23 : Spectre DEPT 135 du composé (C)*
- Figure 24 : Spectre COSY du composé (C)*
- Figure 25 : Spectre HMQC du composé (C)*
- Figure 26 : Corrélacion à longue distance(HMBC) du composé C*
- Figure 27 : Spectre HMBC du composé (C)*
- Figure 28 : Spectre ¹H-RMN du composé (D)*

Figure 29 : Spectre ¹³C-RMN du composé (D)

Figure 30 : Spectre JMOD du composé (D)

Figure 31 : Spectre COSY du composé (D)

Figure 32 : Spectre HMQC du composé (D)

Figure 33 : Corrélation à longue distance(HMBC) du composé D

Figure 34 : Spectre HMBC du composé (D)

Figure 35 : Comparaison des données spectroscopiques RMN- H et RMN-¹³C du composé

K avec A. C. Breuil⁶⁴

Figure 36 : Comparaison des données spectroscopiques RMN- H et RMN-¹³C du composé L avec A. C. Breuil⁶⁴

Figure 37 : Spectre RMN-H de la vitisin C

Figure 38 : Spectre RMN-¹³C de la Vitisin C

Figure 39 : Spectre COSY de la Vitisin C

Figure 40 : Corrélation à longue distance(HMBC)du composé C

Figure 41 : Spectre HMBC de la Vitisin C

Figure 42 : Spectre HMQC de la Vitisin C

Figure 43 : Comparaison des données spectroscopiques H-RMN et ¹³C-RMN de la Vitisin C avec A. C. Breuil

Figure 44 : spectre RMN- H du Trimère resvératrol

Figure 45 : Spectre JMOD du Trimère resvératrol

Figure 46 : Spectre COSY du Trimère resvératrol

Figure 47 : Spectre HMBC du Trimère resvératrol

Figure 48 : Spectre HMQC du Trimère resvératrol

Figure 49 : Comparaison des données spectroscopiques H-RMN et ¹³C-RMN du Trimère (N) C avec A. C. Breuil

Figure 50 : Fractionnement de l'extrait MTBE CPC (sys K)

Figure 51 : purification des fractions 22-29

Figure 52 : purification des fractions 89-104et 114-117

Figure 53 : purification des fractions 16-19

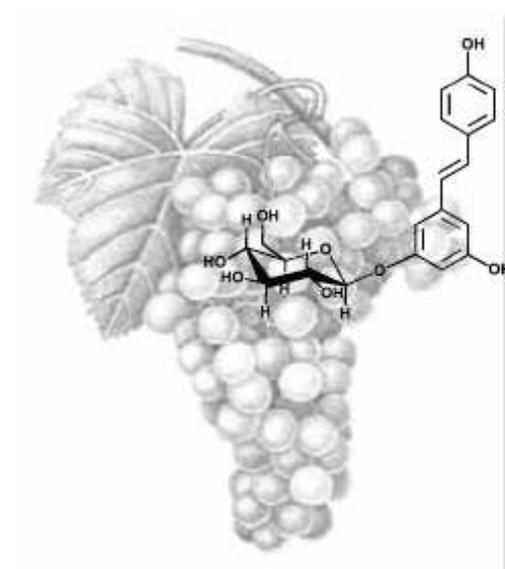
Figure 54: Fractionnement des fractions 12-15 CPC (sys M)

Figure 55 : Purification des fractions 25-53

Figure 56: Purification des fractions 61-93

PREMIERE PARTIE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE



ملخص

لقد أدى تطوير طرق الاستخلاص وتنقية مركبات البوليفينول في نبات الكروم وذلك باستخدام تقنيات الكروماتوغرافيا و التي تتمثل في كروماتوغرافيا السوائل ذات الأداء العالي وكروماتوغرافيا التوزيع حيث سمح ذلك بعزل العديد من المنتجات منها مركبات جديدة

أن التشخيص البنوي باستخدام تقنية التحليل الطيفي ، بما في ذلك الرنين النووي المغناطيسي إلى الكشف على عدة مركبات وذلك بمردود جيد

لقد تم عزل كل من picéatannol ، resveratrol و vinifierine

Résumé

La mise au point de méthodes d'extraction et de purification des stilbènes polyphénoliques dans la vigne en utilisant les deux techniques chromatographiques : la chromatographie liquide haute performance et la chromatographie centrifuge de partage a permis l'isolement de plusieurs produits dont un est nouveau .

Leur caractérisation structurale, par spectroscopie notamment la résonance magnétique nucléaire, 1D et 2D conduit à l'identification des stilbènes déjà connu dans la vigne mais avec des poids importants et deux nouveaux produit, le trimère et la vitisine C.

La vinifierine, le picéatannol et le resveratrol ont également été isolés à partir de la vigne.

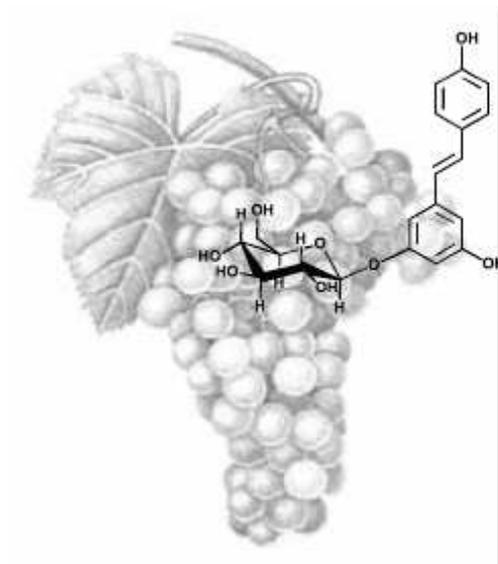
Abstract

The development of methods of extraction and purification of polyphenol stilbenes in the vineyard using the two chromatographic techniques: the high performance liquid chromatography and centrifugal partition chromatography allowed isolation of several products which two is new.

Their structural characterization by spectroscopy, including nuclear magnetic resonance, 1-D and 2-D led to the identification of stilbenes already known in the vineyard but with heavy weights and a newproduct.

The vinifierine the picéatannol and resveratrol have also been isolated from the vine.

INTRODUCTION



I. INTRODUCTION

Les plantes sont depuis toujours une source essentielle de médicaments. Aujourd'hui encore une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne uniquement avec des remèdes traditionnels à base de plantes. De l'aspirine au Taxol, l'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites. Cette source semble inépuisable puisque seule une petite partie des 400'000 espèces végétales connues ont été investiguées sur les plans phytochimique et pharmacologique, et que chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents¹ la présence d'un type ou d'un autre de polyphénols.

Ces substances biologiquement actives sont reconnues comme possédant diverses propriétés pharmacologiques :

- antioxydant ^{2,3}
- anti radicalaire^{4,5,6} compte tenu de leur facultés à piéger les radicaux libres et de leur propriété antioxydante importante, les polyphénols sont facilement altérés et donc d'un usage délicat en thérapeutique et en cosmétique.

- stabilisatrice du collagène ⁷.
- vasculoprotectrice et veinotonique ⁸.
- hypocholestérolémiant ⁹.
- antiathérosclérose ¹⁰ et cardiotonique ¹¹.
- antivirale ¹².
- antimicrobienne ¹³.

Compte tenu de leur large intervalle d'activité biologique, de nombreux chercheurs s'intéressent aux polyphénols de la vigne.

C'est conscient de l'intérêt de cette famille de composés, que le Laboratoire de Pharmacognosie a démarré en 1990 un travail d'isolement et de caractérisation des molécules polyphénoliques les plus abondantes de la vigne ¹⁴

Le travail qui m'a été confié à mon arrivée dans le Laboratoire en 2008 concernait l'isolement, la purification et l'analyse structurale de stilbènes. Il a été réalisé sous la direction du Professeur Jean Michel MERILLON et le Docteur Pierre Waffo – Téguo.

On retrouve les stilbènes dans de nombreuses familles : Cyperaceae, Dipterocarpaceae, Gnetaceae, Leguminosae, et Vitaceae ¹⁵, la vigne qui est une source alimentaire importante, est la plante qui contient le plus le rerveratrol et la viniférine .On y retrouve des dimères trimères , tétramères, hexamères , heptamères, et octamères

Notre travail comporte trois parties :

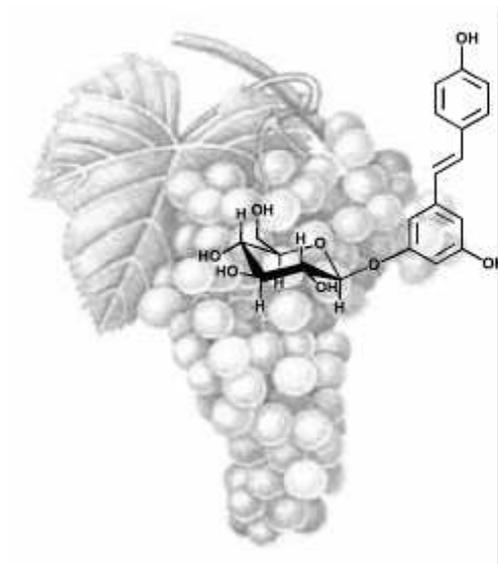
La *première partie* est consacrée à l'étude bibliographique sur les connaissances acquises à ce jour sur la vigne et plus particulièrement sur leur contenu phénolique ainsi que des techniques mises en œuvre pour leur identification

L'essentiel de notre travail personnel fait l'objet de la *deuxième partie* .elle rapporte l'isolement, la purification des produits stilbéniques.

La *troisième partie* est consacrée à l'étude spectrale et la caractérisation des stilbènes purifiés dont deux sont nouveaux.

La partie expérimentale de ce travail est rapportée dans la *quatrième partie*.

GENERALITES

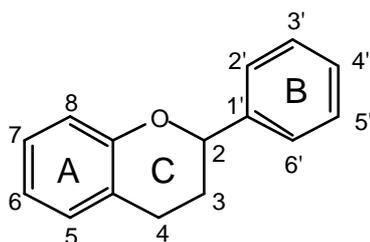


II - GENERALITES SUR LES POLYPHENOLS

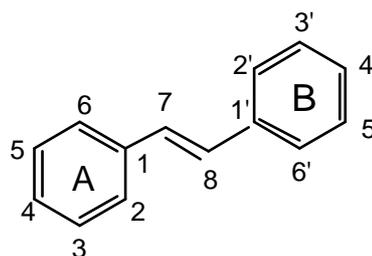
II. 1 - Origine biogénétique des polyphénols dans *Vitis vinifera*

Les polyphénols sont des métabolites secondaires largement distribués dans le règne végétal, où ils existent sous forme libre ou glycosylée. Leur caractère ubiquiste fait qu'on les retrouve déjà chez les végétaux inférieurs (Bryophytes). Chez les Fougères et les Gymnospermes, ils sont présents mais peu variés structuralement, par contre ils sont très largement représentés chez les Angiospermes où leur diversité structurale est maximale ¹⁶

Il est maintenant bien établi que les voies acétate et shikimate convergent pour donner naissance à des dérivés en C₆-C₃-C₆ (flavonoïdes) ¹⁷ et des dérivés en C₆-C₂-C₆ (stilbènes) ¹⁸.



Structure des flavonoïdes (C₆-C₃-C₆)



Structure des stilbènes(C₆-C₂-C₆)

D'après le mécanisme des réactions catalysées par la chalcone synthase et la stilbène (resvératrol) synthase ¹⁹ il apparaît que, dans le cas des flavonoïdes, le cycle A dérive de la voie des acétates (malonates) alors que le cycle B et les trois carbones de l'hétérocycle C proviennent du *p*-coumaryl-CoA (voie des shikimates). En ce qui concerne les stilbènes, les carbones 2, 3, 4, 5 et 6 du cycle A dérivent de la voie des acétates, alors que le cycle B ainsi que les carbones 1, 7 et 8 ont pour origine la voie shikimate.

La voie de biosynthèse des flavonoïdes fait intervenir de nombreuses étapes, dont certaines sont encore mal connues. Par exemple, l'anthocyanidine synthase conduisant à la formation des anthocyanes n'a pas été isolée et son mécanisme réactionnel demeure indéterminé.

La formation de l'épicatéchine, qui possède une configuration 2,3-*cis*, demeure une grande inconnue. Pourtant la stéréochimie *cis* est dominante dans les tannins condensés des baies de raisin ²⁰ Selon ²¹ l'hypothèse la plus vraisemblable serait l'intervention d'une épimérase au niveau du 2,3-trans-dihydroquercétol.

II. 2 - Connaissance de composition de la vigne

A .Les polyphénols de la vigne

A.1.Composition phénolique

La vigne, fruit de la terre, contient à sa maturité principalement de l'eau et des sucres (glucose, fructose, pectine et polysaccharides). Elle possède aussi d'autres composés ^{22,23} comme, des terpènes (citrol, geraniol...), des aldéhydes (éthanal, propanal, vanilline...), des anthocyanes (responsables de la couleur) et des tanins.

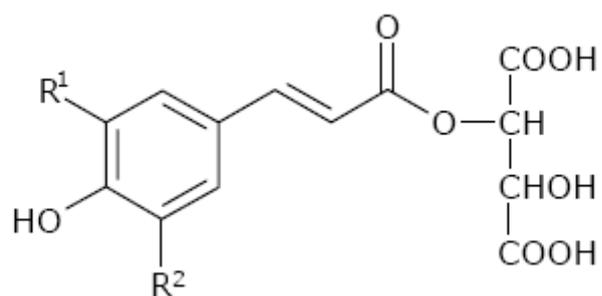
Les composés phénoliques sont des constituants importants de la vigne. Ils sont caractérisés par la présence d'un noyau benzénique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles, pouvant être acylés ou glucosylés. Leur nomenclature est basée sur la distinction entre les composés non-flavonoïdes et les flavonoïdes.

. A.1.1.Les non-flavonoïdes

Les composés non-flavonoïdes regroupent les acides phénoliques ainsi que les stilbénes. Ils ne possèdent pas de squelette « flavone »

A.1.1. 1-les acides phénol

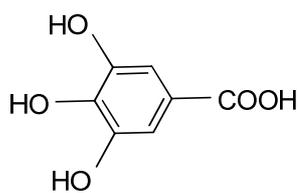
On distingue tout d'abord les dérivés de l'acide benzoïque, composés d'un squelette à sept carbones. Ils sont principalement représentés dans le raisin par l'acide gallique, qui est généralement lié par une liaison ester à l'épicatéchine. D'autres composés phénoliques sont également présents, comme les dérivés d'esters hydroxycinnamiques possédant une structure du type C6-C3 (Fig1)



<i>Esters hydroxynnamiques</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>
<i>Acide t-caféiques</i>	<i>OH</i>	<i>H</i>
<i>Acide p-coumarique</i>	<i>H</i>	<i>H</i>
<i>Acide t-fertarique</i>	<i>OCH₃</i>	<i>H</i>
<i>Acide t-sinapique</i>	<i>OCH₃</i>	<i>OCH₃</i>

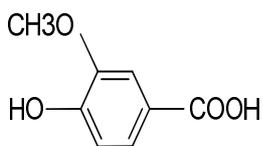
Figure 1 : Structure chimiques de quelques dérivés de l'ester hydroxycinnamiques présents dans les raisins

Parmi les acides phénoliques, 7 acides benzoïques (1-7) ont été identifiés dans le vin :



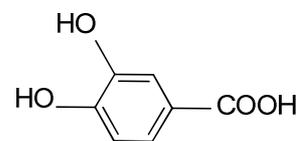
acide gallique

1



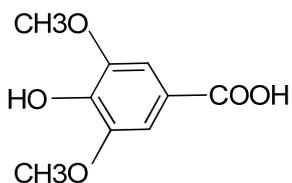
acide vanillique

2



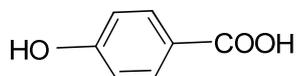
acide protocatéchique

3



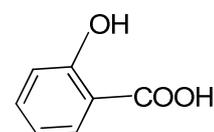
acide syringique

4



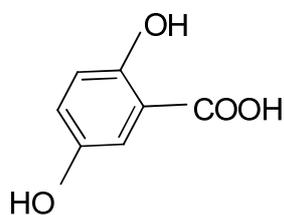
acide p-hydroxybenzoïque

5



acide salicylique

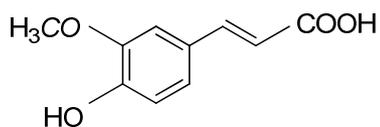
6



acide gentistique

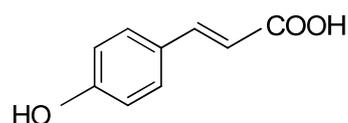
7

D'autres acides phénols sont présents dans le vin et le raisin, qui appartiennent à la série des acides cinnamiques (8-10) :



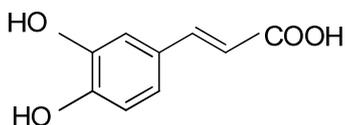
acide férulique

8



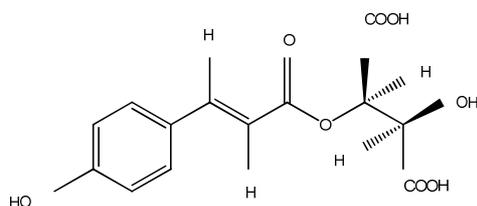
acide p-coumarique

9

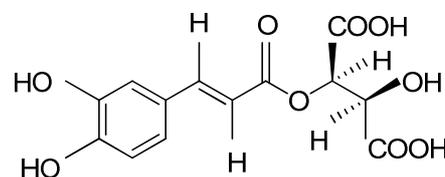


acide caféique
10

Les acides hydroxybenzoïques, tout comme les acides hydroxycinnamiques, font partie des composés phénoliques les plus représentés chez les végétaux. Ils sont présents dans le vin sous forme libre ou sous forme de combinaison de type ester avec des hétérosides, ou avec l'acide tartrique formant les acides coumaroyl tartrique **11** et cafféoyl tartrique **12**

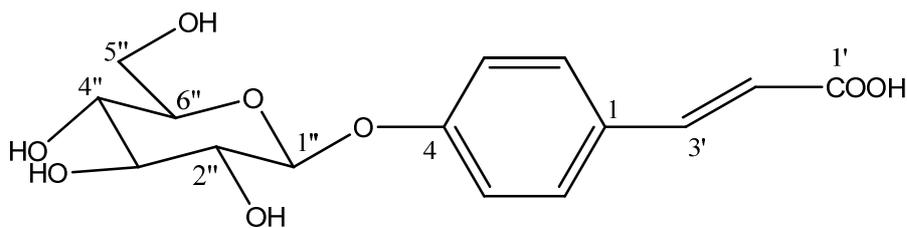


acide coumarroyl tartrique
11



acide cafféoyl tartrique
12

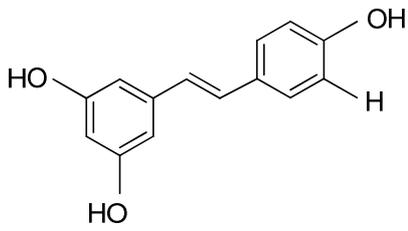
Ils existent également sous forme d'hétérosides par réaction de leur fonction phénol avec des sucres : l'acide (E) 4-O-β-D-glucosyl *p*-coumarique **13** ²⁴



Acide (E) 4-O-β-D-glucosyl *p*-coumarique **13**

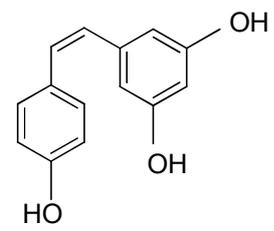
A.1.1.2-Les stilbénes

Les stilbéines sont des polyphénols dont le squelette de base est constitué de deux cycles benzéniques reliés par un pont éthylène ; A partir de structure relativement simple, il existe une variété de composés, dont la nature varie en fonction du nombre et de la position des groupements hydroxyyles, de la substitution par des sucres ou des résidus méthoxy, ainsi que de la configuration stérique (trans-ou-cis) de la molécule



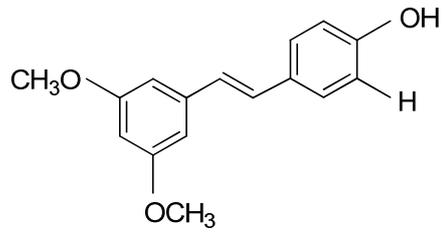
Tans-resvératrol

14



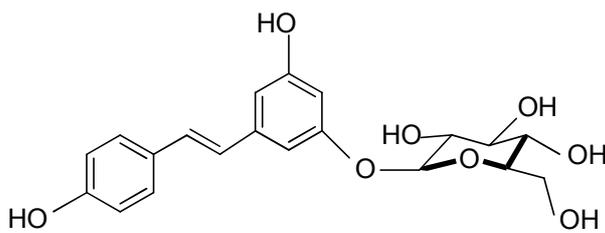
cis-resvératrol

15



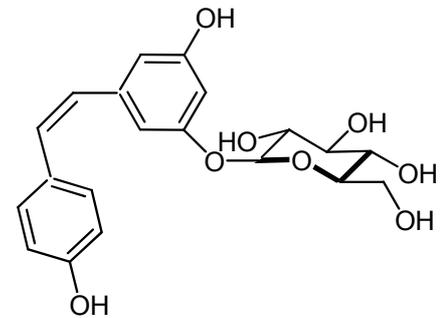
Ptérostilbene

16



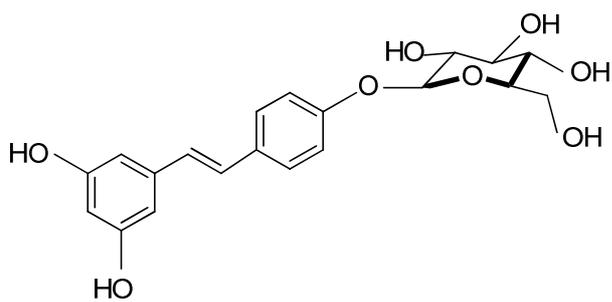
Trans-picéide

17



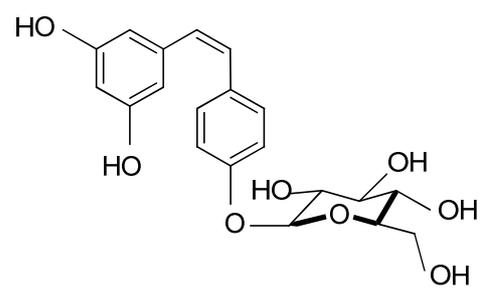
Cis-picéide

18



Trans-resvératrolsido

19



Cis-resvératrolsido

20

A.1.2 Les flavonoïdes

Les composés flavonoïdes sont formés d'un squelette de base à 15 carbones (C6-C3-C6), correspondant à la structure de la 2-phényl-benzopyrone (Fig 2). Au sens large du terme, ce groupe comprend principalement trois familles de composés : les flavonols, les anthocyanes et les flavan-3-ols, qui se différencient par les degrés d'oxydation du noyau pyranique central ²⁷.

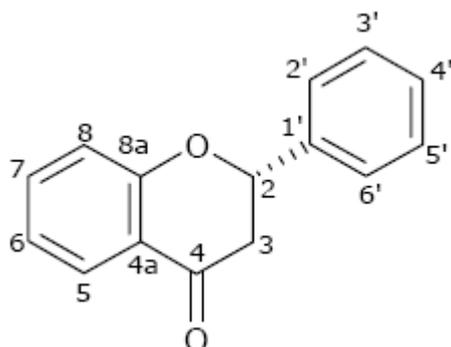
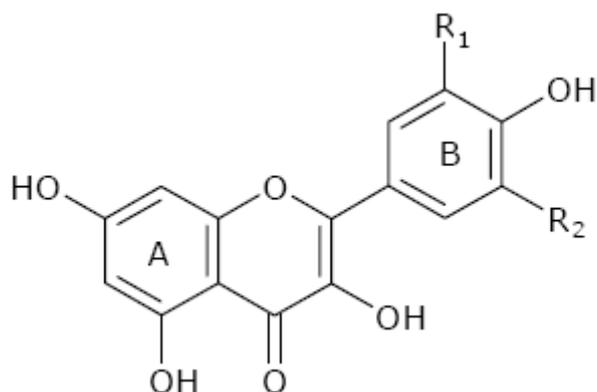


Figure 2 : Structure chimique de la 2- phényl-benzopyrone

A.1.2.1. Les flavonols

Quatre flavonols sont majoritairement présents dans le raisin : Le kaempférol, la quercétine, la myricétine et l'sorhamnéthine (fig 3). Les dérivés de la quercétine sont toujours prédominants. Ceux de la myricétine semblent être spécifiques aux variétés de raisin rouges.²⁸ On leur attribue des propriétés bénéfiques dans le traitement des maladies du cœur et des cancers^{29,30,31} ou encore des activités antitumorales et chimiopréventives.³²

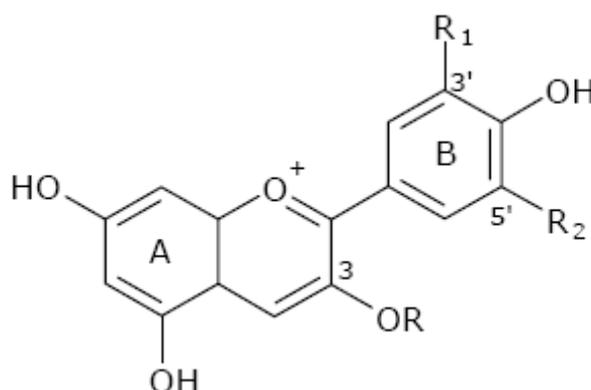


Flavonols	R1	R2
Kaempferol	H	H
Quercétine	OH	H
Myricétine	OH	OH
Isorhamnétine	OCH ₃	H

Figure 3 : Structure chimiques de quelques flavonols présents dans le raisin.

A.1.2.2. Les anthocyanes

Les anthocyanes jouent un rôle prépondérant dans la coloration des raisins rouges. Leur structure de base est caractérisée par un noyau « flavone » généralement glucosylé en position C-3³³. Les anthocyanes se différencient par leur degré d'hydroxylation et de méthylation, par la nature, le nombre et la position des oses liés à la molécule. Laglycone ou anthocyanidines constitue le groupement chromophore du pigment. On distingue cinq anthocyanidines dans le genre *Vitis* : La cyanidine, la péonidine, la delphinidine, la pétunidine et la malvidine (Fig 4)



Anthocyanidines R*=H	R1	R2
Malvidine	OCH3	OCH3
Péonidine	OCH3	H
Delphinidine	OH	OH
Pétunidine	OCH3	OH
Cyanidine	OH	H

R*: Forme monoglucoside, R = glucose

Figure 4: Structure chimique de quelques anthocyanidines

B. Polyphénols de la vigne et santé humaine

B.1 - Quelques données épidémiologiques

À De nombreuses données épidémiologiques obtenues à partir de grands nombres d'individus, au cours des 20 dernières années en Europe et aux USA, suggèrent qu'une consommation modérée de vin est favorable pour la santé, en particulier en exerçant un effet protecteur contre les maladies cardio-vasculaires^{34,35,36,37,38}. Le plus souvent, la relation entre la consommation de vin et la mortalité cardio-vasculaire donne une courbe en forme de U ou de J, qui traduit un minimum de risques pour les consommations modérées de vin (2 à 4 verres par jour) avec une diminution de mortalité de 25 à 40% par rapport aux abstinents. Pour des consommations

immodérées, l'effet cardio-protecteur disparaît, le risque de mortalité par maladie cardio-vasculaire augmente alors avec la consommation et devient nettement supérieur à celui observé chez des abstinents. D'autre part, les autres boissons alcoolisées ne montrent pas ces effets bénéfiques sur la santé.

La France (plus particulièrement certaines régions comme celle de Toulouse) occupe une place "privilégiée" par un taux relativement faible de mortalité cardio-vasculaire, malgré une consommation conséquente de graisses saturées identique à celle des autres pays les plus industrialisés, ce qui fut appelé le "Paradoxe Français" par le Docteur Serge Renaud. En effet, la fréquence de cette maladie, très importante globalement dans les pays industriels, est très variable en fonction des pays et même des régions. Par exemple elle est 5 fois plus grande en Ecosse et en Finlande qu'en France. L'auteur attribue ce paradoxe en grande partie à une caractéristique du style de vie français, qui est la consommation régulière de vin au cours des repas. Les facteurs environnementaux jouent sans doute un rôle primordial. En effet les migrants d'une région auront la même fréquence de maladie que la population d'accueil. Au Danemark, pendant les 15 dernières années, la mortalité due aux maladies coronariennes a chuté d'environ 30%. Parallèlement, on note qu'avec l'ouverture de ce pays au marché européen, les habitudes de consommation d'alcool ont évolué de manière spectaculaire, avec une nette préférence pour le vin. De 17% en 1975, la part de consommation de vin par rapport à la consommation totale d'alcool (stable pendant cette période), est passée à 30% en 1992. Les résultats très récents de

l'équipe Gronbaek, confirment que le taux de décès par maladies cardio- et cérébro- vasculaires (ou toutes causes confondues), est nettement plus faible chez les consommateurs de vin que chez les consommateurs d'autres boissons alcoolisées et chez les abstinents. En effet pour des consommations de 3 à 5 verres de vin par jour le risque de décès par maladies cardio- et cérébro-vasculaires diminue de 56% par rapport aux abstinents, tandis que le risque de décès par d'autres causes diminue de 50%.

À Quelques études épidémiologiques, réalisées aux Etats-Unis, montrent qu'une consommation modérée de vin diminue (ou n'augmente pas), contrairement aux autres boissons alcoolisées, le risque de cancer oropharyngé^{39,40} ou du sein⁴¹ Aussi, en Italie,⁴² observent un minimum de risque de cancer suite à une consommation modérée de vin.

À Des effets du vin sur le vieillissement cérébral ont été mis en évidence récemment par le Professeur Orgogozo en Gironde et en Dordogne⁴³. En effet, une consommation modérée (3 à 4 verres) de vin est associée à une réduction nette des risques de maladies dégénératives telles que la démence sénile et la maladie d'Alzheimer.

À La première interrogation qui nous vient à l'esprit, concerne les molécules responsables de ces effets bénéfiques du vin sur la santé et qui distinguent le vin des autres boissons alcoolisées.

³³ suggèrent, dans une revue critique des nombreuses études épidémiologiques, que l'éthanol pourrait en fait être en partie responsable de la diminution du risque cardiovasculaire, principalement par une augmentation du "HDL cholestérol" sanguin. Mais cette augmentation semble principalement liée à la fraction des lipoprotéines non antiathérogènes Lp AI : AII ⁴⁴ L'éthanol ne peut pas rendre compte de tout l'impact (important) du vin sur les maladies cardiovasculaires.

De très nombreuses études épidémiologiques montrent qu'une consommation régulière de fruits et légumes diminue le risque de cancer et de maladies cardiovasculaires ^{45,46} Or, des études menées par l'équipe d'Hertog dans sept pays, mettent en évidence un risque réduit d'infarctus du myocarde chez les personnes ayant une consommation élevée en flavonols et flavones ; l'analyse des aliments montre que ces flavonoïdes ne sont pas seulement apportés par les fruits et légumes, mais aussi par le thé et le vin rouge ^{47,48,49} estiment qu'aux USA, 35 % de mort par cancer sont attribuables à des variations de la composition de l'alimentation, par des facteurs non nutritifs appelés "chemopreventers", comme, principalement, les polyphénols dont le mécanisme prédominant de l'effet protecteur contre les différentes maladies chroniques (cancers, maladies cardiovasculaires) serait dû à leur activité anti-oxydante et à leur capacité de piégeage des radicaux libres ⁵⁰

B.2 - Effets cardiovasculaires des polyphénols

Les accidents cardiovasculaires sont engendrés par deux phénomènes essentiels :

- l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL) qui est considérée comme un élément clé dans le processus d'athérosclérose, engendrant la formation de plaque d'athérome au niveau de la paroi vasculaire ^{51,52}. Ce processus se déroule sur de nombreuses années. Mais dans la majorité des accidents cardiovasculaires, la sténose des artères, due à la formation de la plaque d'athérome, est trop faible pour avoir des répercussions sur le plan hémodynamique. En effet, il intervient en général une rupture de la plaque d'athérome due à l'action vasomotrice des LDL oxydées qui inhibent la voie NO-GMPc ⁵³

- l'agrégation des plaquettes sanguines qui conduit à la formation d'un thrombus et à l'obstruction relativement rapide du vaisseau ⁵⁴ Les plaquettes sont activées par la mise à nu de l'espace sous-endothélial, ce qui les met en présence des fibres de collagène ; elles adhèrent à la paroi du vaisseau, là où l'endothélium est endommagé par la plaque d'athérome ⁵⁵

B.3 - Propriétés antioxydantes des polyphénols

B.3.1 - Mode d'action des antioxydants biologiques ⁵⁶

"Un antioxydant peut être défini comme étant un principe oxydable qui, introduit dans le cycle de l'auto-oxydation, en détourne le cours et en neutralise les effets tant qu'il existe⁵⁷

Au vue de cette définition, nous pouvons considérer les antioxydants biologiques comme étant les composés qui protègent le système biologique contre les dommages ou les réactions liés à une oxydation excessive. A partir de cela, nous pouvons définir plusieurs variétés d'antioxydants biologiques en fonction de leur localisation intra- ou extra-cellulaire d'une part, et en fonction de leur mécanisme d'action, d'autre part.

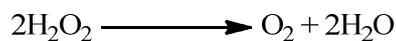
Face aux espèces oxygénées réactives, nous disposons de systèmes de défense, d'antioxydants biologiques, qui peuvent être enzymatiques ou non :

Â processus enzymatiques

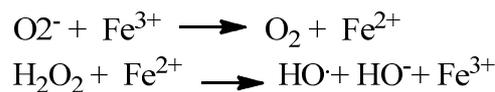
- **Superoxyde dismutase** (SOD) : c'est une enzyme qui catalyse la réaction suivante:



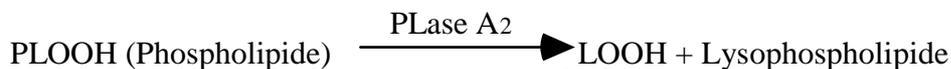
- **Catalase** : un des produits de la réaction précédente, H_2O_2 , va être détoxifié par cette enzyme.



En l'absence des deux enzymes précédentes, et en présence de métaux de transition (cuivre, fer...) la réaction suivante (réaction de Fenton) génère le radical hydroxyle ($HO\cdot$)



- **Sélénium glutathion peroxydase** (Se-GSH-Px) : cette enzyme réduit les hydroperoxydes d'acides gras (LOOH) de la membrane libérés par l'action de phospholipase A2 (PLase A2)



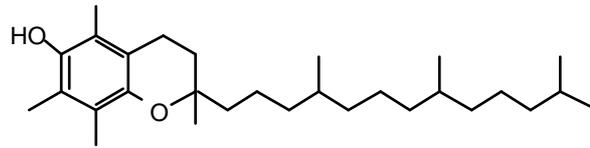
- **Phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase** (PLOOH-GSH-Px) : contrairement à la précédente, cette enzyme agit directement sur les hydroperoxydes de phospholipide



Â processus non enzymatiques

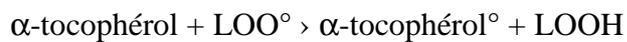
Σ antioxydants liposolubles

- Vitamine E (α-tocophérol)



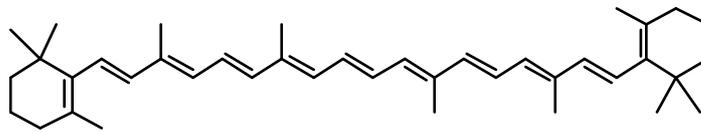
α-tocophérol

Après son absorption intestinale, la vitamine E est transportée dans les chylomicrons jusqu'au foie. Elle est ensuite sécrétée par le foie et incorporée dans les VLDL. Les LDL et HDL sont les lipoprotéines qui en transportent le plus. C'est un inhibiteur de la propagation de la réaction radicalaire.



Le radical α-tocophéryl est stabilisé par sa forme de résonance, mais il peut réagir avec un autre radical (LOO°).

- Caroténoïdes

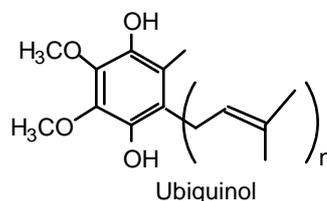


β-carotène

Ils agissent selon le même mécanisme que la vitamine E

Les doubles liaisons conjuguées font d'eux d'excellentes cibles d'attaque pour les radicaux.

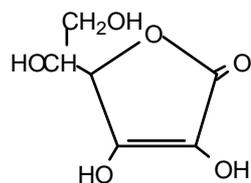
- Quinones (Ubiquinone, UQ) sous sa forme réduite



Elle pourrait réagir en régénérant la vitamine E ou en agissant directement sur les radicaux libres comme la vitamine E.

Σ Antioxydants hydrosolubles

- Vitamines C (acide ascorbique)



Vitamine C

C'est l'antioxydant biologique hydrosoluble le plus représentatif. Son rôle est d'épurer les radicaux libres du milieu aqueux.

L'acide ascorbique agit en synergie avec la vitamine E dans la prévention de la lipoperoxydation, en régénérant cette dernière ⁵⁸. Cette synergie permet de mieux expliquer l'action de nombreux antioxydants hydrosolubles sur la protection de la peroxydation lipidique ⁵⁹

- protéines fixant les métaux (Albumine, ceruloplasmine, transferrine, haptoglobine...)

Ces protéines sériques permettent de diminuer la concentration en ions métalliques (fer, cuivre) qui catalysent les réactions générant les radicaux libres, dans le compartiment extracellulaire.

B.4- Mode d'action des polyphénols

L' α -tocophérol est le principal antioxydant présent au niveau des LDL, qui détermine en partie la résistance à l'oxydation des LDL. En effet, suite à l'addition de vitamine E à du plasma, la teneur de celle-ci croît dans les LDL et entraîne parallèlement une augmentation de la résistance à l'oxydation de ces lipoprotéines ⁶⁰. D'autre part, des personnes recevant une alimentation enrichie en vitamine E, présentent une augmentation de la teneur de celle-ci dans le plasma et les LDL, ainsi qu'une diminution de l'oxydabilité des LDL ⁶¹.

Nous voyons l'importance des antioxydants apportés par notre alimentation qui peuvent compléter l'action des systèmes endogènes, non efficaces à cent pour cent ⁶². Une consommation modérée de vin rouge (2 à 3 verres par jour) apporte potentiellement à l'organisme, 300 à 1200 mg de polyphénols, quantité nettement supérieure à celle recommandée pour les vitamines antioxydantes.

Dès 1993, l'équipe américaine du Professeur Frankel montre que la fraction non alcoolique du vin, contenant le *totum* des polyphénols, possède une activité antioxydante sur les LDL humaines nettement supérieure à celle de la vitamine E ⁶³.

Les composés polyphénoliques peuvent exercer leur activité antioxydante principalement par deux mécanismes ⁶⁴ :

- le piégeage des radicaux libres
- la chélation des métaux

A Piégeage des radicaux libres

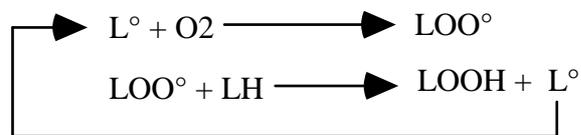
Les composés polyphénoliques peuvent piéger directement les radicaux libres grâce aux fonctions phénol qui leur confèrent de puissantes propriétés réductrices. En recevant un hydrogène ou un électron, le radical libre se trouve neutralisé. La fonction phénol non libre peut aussi jouer ce rôle en formant une liaison dative avec un doublet électronique de l'oxygène. Le piégeage par l'antioxydant (AOH) peut se faire aux différents stades de la réaction radicalaire que peuvent subir les acides gras polyinsaturés (LH), présents en grande quantité dans les membranes, et les LDL ⁶⁵.

Stade 1 : initiation :



Plusieurs types de radicaux libres réactifs (R°) produits dans les systèmes biologiques, comme le radical hydroxyle (HO°), l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\circ-}$) et les radicaux peroxy (LOO°), peuvent initier la réaction radicalaire, en extrayant un des deux atomes d'hydrogène allylique sur le carbone entre deux doubles liaisons de LH.

Stade 2 : propagation :



L° peut réagir rapidement avec l'oxygène pour former un radical peroxy (LOO°) qui peut extraire à nouveau un atome d'hydrogène d'un autre acide gras insaturé pour donner un radical libre (L°) et un hydroperoxyde (LOOH). C'est une réaction auto-entretenue.

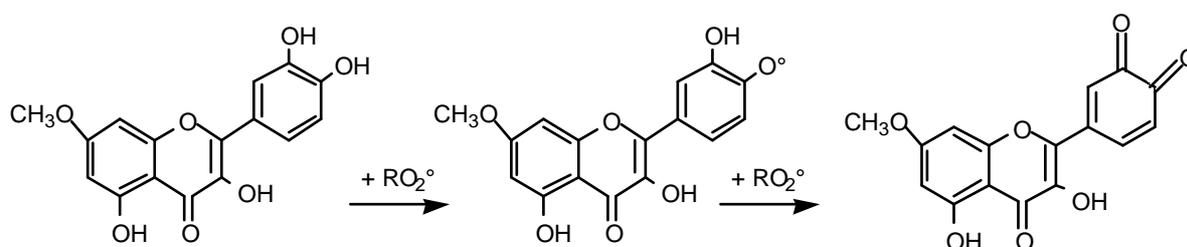
Stade 3 : terminaison



Les radicaux peroxyde et alkyle peuvent réagir entre eux pour former des composés inertes, incapables d'extraire l'hydrogène.

Différents travaux, réalisés principalement sur des flavonols (quercétine, rutine...) et des flavanols (catéchine et dimères), montrent que les flavonoïdes peuvent intervenir aux trois stades de la lipoperoxydation, étant donné leur grande efficacité à piéger le radical hydroxyle, l'anion superoxyde et les radicaux peroxyde ^{66,67,68 69 70 ,71,72}

Jovanovic et al ⁷³ proposent que les radicaux peroxyde attaquent les flavonoïdes, au niveau du cycle B (le plus riche en électrons), par la réaction suivante :



D'autre part, ces derniers auteurs trouvent que le potentiel redox des radicaux phénoxydes de différents flavonoïdes est compris entre 0,5 et 0,7 V, ce qui permet la réduction des radicaux peroxydes (1,05 V) et superoxydes (0,94 V).

À Chélation des métaux de transition

Vu l'importance des métaux de transition dans le système vivant, il est logique de penser que les composés qui forment les complexes stables avec ceux-ci, modifient leur activité. Les ions fer et cuivre peuvent initier la lipoperoxydation en réagissant avec le radical superoxyde et l'eau oxygénée pour donner le radical hydroxyle très réactif (réaction de Fenton).

En 1989, **Afanas'ev et al.** ⁷⁴ ont étudié les propriétés chélatrices de la quercétine et de la rutine sur le fer. Il ressort que les deux flavonoïdes ont une bonne capacité de chélation. **Morel et al** ⁷⁵ ont également mis en évidence l'effet cytoprotecteur de trois polyphénols (catéchine, diosmétine et quercétine) sur des cultures d'hépatocytes selon un mécanisme de chélation du fer. Les polyphénols, en particulier ceux possédant la structure catéchol ou pyrogallol, peuvent former des complexes très stables avec les métaux de transition, comme le fer et le cuivre ⁷⁶.

3.2.4- Autres propriétés des polyphénols au niveau cardiovasculaire

A Inhibition de l'agrégation plaquettaire : le resvératrol isolé des racines de différents *Polygonum* inhibe l'agrégation plaquettaire, principalement après induction de l'agrégation par l'acide arachidonique ⁷⁷. Ce stilbène paraît exercer son action en inhibant le métabolisme de l'acide arachidonique. Ces auteurs trouvent aussi une faible activité pour le picéïde. Il ne révisent pas si les stilbènes étudiés sont des isomères (E) ou (Z). ⁷⁸ trouvent une action similaire pour le (E)-resvératrol isolé des racines de *Veratrum formosanum*.

Â Inhibition de la capture des LDL oxydées : des expériences réalisées sur les LDL, auparavant oxydées puis isolées, montrent que la catéchine inhibe le captage des LDL oxydées par les macrophages ⁷⁹.

Â Inhibition enzymatique : Maffei Facino et al. ⁸⁰ montrent que les oligomères totaux de catéchine de pépins de raisin inhibent la xanthine oxydase (enzyme catalysant la formation d'anions superoxyde), et des enzymes protéolytiques (collagénase, élastase) et des glycosidases (hyaluronidase, \square -glucuronidase) impliquées dans la dégradation des principaux éléments de structure de la matrice extravasculaire (collagène, élastine et acide hyaluronique).

Â Vasorelaxation : la sténose des artères par la formation de la plaque d'athérome est le plus souvent trop faible pour expliquer, à elle seule, la survenue des accidents cardiovasculaires. En effet, il intervient en général une rupture de la plaque d'athérome déclenchée par une activité vasomotrice importante **Cox et Cohen**, ⁸¹ Il a été montré que les polyphénols totaux du vin ou extraits des pellicules de raisin produisaient un effet vasorelaxant nécessitant la présence de l'endothélium par la voie NO-GMPc, sur l'aorte isolée de rat [**Fitzpatrick et al;** **Andriambelason et al** **Freslon et al** ^{82,83,84} suggèrent que cette action, en particulier pour des oligomères de catéchine extraits de pépins de raisin, s'effectue en dehors de toute activité antioxydante, sans doute *via* l'activation de récepteurs par l'ATP menant à la libération de NO.

B.4.1 - Biodisponibilité des polyphénols chez l'Homme

Les polyphénols, contenus dans les fruits, légumes et boissons (vin) qui constituent notre alimentation, possèdent des activités biologiques notables *in vitro*. La question majeure que l'on se pose, est celle de la résorption de ces molécules au niveau intestinal chez l'Homme.

Des études ont été faites sur l'absorption de la quercétine par **Hollman et al** ⁸⁵. Des sujets, ayant subi une iléostomie avec colostomie totale (ce qui élimine les modifications et les pertes dues à la flore colique), ont pris successivement au petit déjeuner, des oignons riches en glucosides de quercétine, du rutinoside de quercétine (rutine) et de la quercétine aglycone. L'absorption a été respectivement de 52, 17 et 24 %. Dans cette étude, le pourcentage d'absorption de quercétine est

calculé par la différence entre la quantité ingérée et la quantité éliminée dans les selles, la quantité excrétée dans les urines étant négligeable.

De plus, **Paganga et Rice-Evans**⁸⁶ ont mis en évidence dans le plasma de volontaires ayant pris une nourriture non enrichie en flavonoïdes, des glycosides de quercétine par HPLC avec détection à barrette diode. Il ressort de cette étude la présence de polyphénols sous forme de glucosides dans le plasma (0,5 à 1,6 μM), ce qui confirme les précédents travaux de Hollman montrant l'absorption de la quercétine principalement sous forme de glucoside. Ces derniers auteurs suggèrent un passage au niveau des entérocytes *via* le transporteur du glucose.

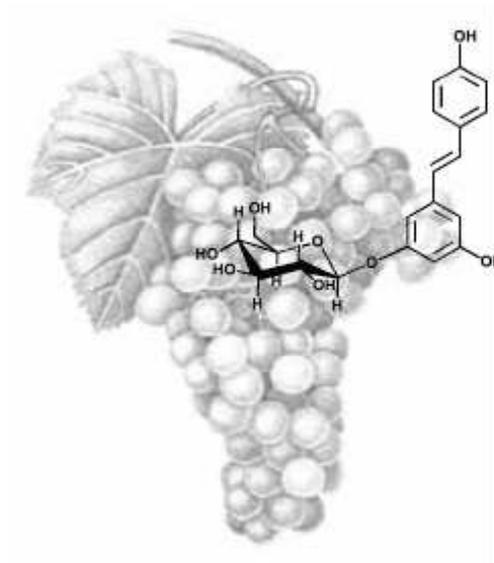
La pharmacocinétique et le métabolisme d'une seule ingestion orale de diosmine (7-rhamnoglucoside de diosmétine (flavone)), connue pour ses propriétés cardioprotectrices, a été étudiée chez des volontaires⁸⁷. La diosmétine aglycone a été détectée par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (LC - MS). le pic plasmatique est atteint au bout d'une heure. Tous ces résultats n'apportent cependant pas une preuve irréfutable sur la résorption des polyphénols chez l'Homme.

Conclusion : Cette revue bibliographique montre les limites des connaissances sur la biodisponibilité (absorption) des polyphénols chez l'Homme. De nos jours aucun travail n'a prouvé de façon indiscutable l'absorption des polyphénols chez l'Homme, notamment les anthocyanes et les stilbènes ; d'où l'intérêt pour nous de produire les polyphénols marqués au C^{13} (isotope non radioactif, détectable en RMN). La RMN nous donnera des informations sur la structure de ces molécules absorbées et nous permettra de suivre les métabolites.

La production des anthocyanes et des stilbènes marqués, en vue des études de la pharmacocinétique *in vivo* chez l'Homme, constitue la finalité de ce travail

DEUSIEME PARTIE

TECHNIQUES DE SEPARATION



III -TECHNIQUES DE SEPARATION

III-1- Chromatographie sur couche mince (CCM)

Elle est utilisée à chaque étape pour le suivi et le contrôle des purifications, les chromatogrammes sur couche mince permettent de vérifier la présence et l'état de pureté des produits suivis.

Les analyses sur couche mince sont réalisées en phase normale sur des plaques d'aluminium Silicagel 60 F254 (Merck). Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié.

Cette phase mobile est constituée d'un mélange binaire, tertiaire ou quaternaire de solvants selon le type de séparation souhaitée.

III. 2 - Chromatographie Liquide de Haute Performance (KONTRON)

* Système d'exploitation : Data system 450 MT

* pompe : HPLC pump 420 haute pression

* mélangeur : M491

* détecteur : UV - visible modèle 430

* colonnes utilisées : ultrasep ES100 RP18 6 µm, 250 x 4 mm (ø) en analytique , 250 x 8 mm (ø) en semi préparative, 250 x 20 mm (ø) en préparative

III .3- LA CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE CENTRIFUGE (CPC)

Dans un premier temps, victimes probablement de la complexité de leur appareillage et des durées de séparations très longues, les CLLCC ont eu du mal à convaincre les utilisateurs. C'est l'émergence d'appareils modernes qui a offert à ces techniques un second souffle et un élan de dynamismes.

Issu du fruit des recherches du japonais Nunogaki en 1982, le Chromatographe de Partage Centrifuge (CPC) est un des appareils modernes de CLLCC à état d'équilibre hydrostatiques.⁸⁸ Avec le HSCCC, le CPC est actuellement l'appareil le plus usité et l'un des plus représentatif des CLLCC modernes.

III- 3-1 -PRINCIPE

La CPC est une technique de chromatographie liquide-liquide sans support solide (Fig 5), basée sur les différences de partage des solutés entre deux phases liquides non miscibles préparées par mélange de 2,3 ou plus de solvants et /ou solutions

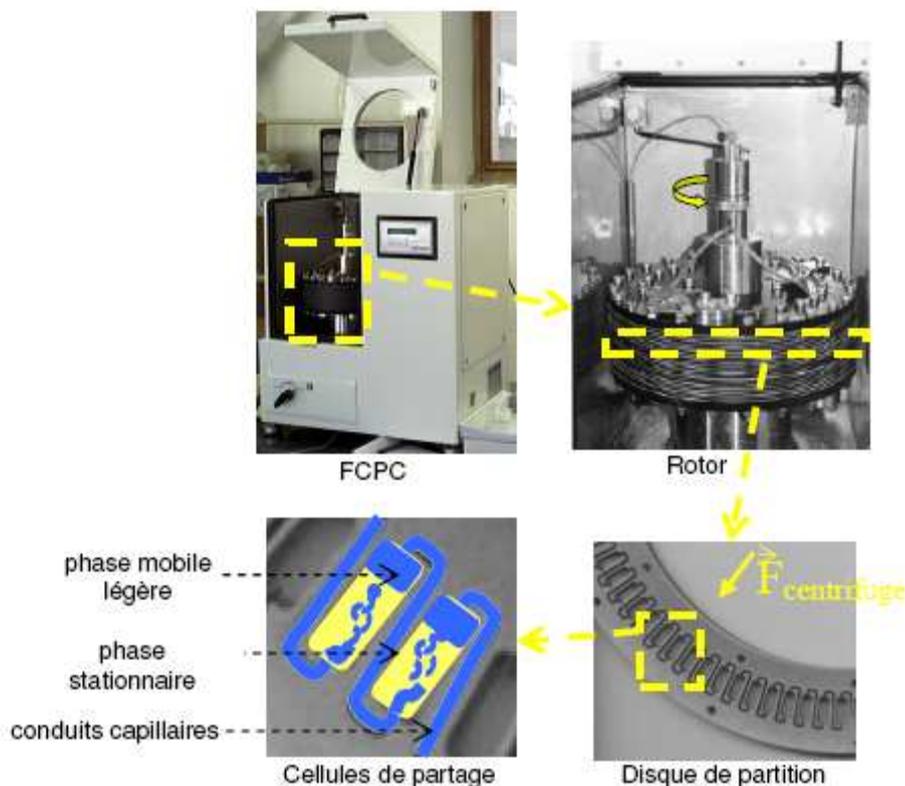


Figure5 : Schéma descriptif de l'appareil de Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC à disques « sandwiches ») utilisé au laboratoire

Une phase liquide est maintenue stationnaire dans la colonne (rotor) par un champ de force centrifuge constant. Ce champ de force est généré par la mise en rotation d'une colonne contenant des cellules de partages ; ces dernières étant reliées entre elles par des conduits de section inférieure à celle des cellules de partage. L'autre phase liquide dite « mobile » elle est pompée au travers de la phase stationnaire.

Les solutés d'un mélange sont alors séparés en fonction de leurs coefficients de partage respectifs

III. 3. 2 AVANTAGES

Les principaux avantages de la CPC reposent sur l'utilisation exclusive de fluides et notamment de solvants (fig 6)

Caractéristiques	Conséquences
* Pas de support solide ⁸⁹	- Pas d'adsorptions irréversibles des solutés - Peu de déchets solides potentiellement contaminés - Manipulation uniquement de liquides - Récupération intégrale de l'échantillon
* Utilisation de mélange de solvants ou de fluides supercritiques ^{90,91,92,93,94}	- Systèmes liquides biphasiques quasi-illimités - Paramètres physicochimiques des 2 phases et sélectivité ajustables - Faible consommation de solvants - Récupération de la phase stationnaire à la fin de l'expérience (par extraction)
* Techniques versatile ^{90,92,95}	- Plusieurs modes de développement (éluo, isocratiques, gradient d'éluo, PH-zone refining, échange d'ions...) - Possibilité d'inverser le rôle des phases à tout instant (mode dual) - Séparation de composés très divers - Finalité surtout préparative - Scale-up aisément prédictible Possibilité d'utilisation comme réacteur et :ou extracteur

Figure 6 : Principaux avantages de la CPC

III.3.3- INCONVENIENTS

L'utilisation exclusive de liquides au sein d'une machine en rotation est souvent très contraignante. En effet, cela nécessite que l'appareillage soit étanche afin d'éviter les fuites de solvants mais également que celui-ci soit robuste et hermétique pour résister à l'augmentation de la perte de charge dans la colonne.

Par ailleurs, l'injection de l'échantillon est une étape cruciale. Celle –ci impose l'emploi de système de solvants solubilisant parfaitement l'échantillon. Dans le cas contraire, les analyses de l'échantillon, apparaissant sous la forme d'un précipité ou sous forme cristallisée, peuvent contaminer la pompe (surtout les clapets) ou la colonne. Il devient ensuite difficile de nettoyer entièrement l'appareillage. De plus, la désaturation du système peut également être observée lors

de l'injection d'un échantillon à fort caractère tensioactif par exemple ⁹⁶ ; ce qui peut nuire à la mise en œuvre des expériences de CPC.

III.3.4- Le sens de pompage de la phase mobile

Une vanne de communication de modes (ascendant ou descendant) permet de choisir le rôle de chaque phase lors des expériences en CPC .L'échange du rôle des phases est possibles, à tout instant de l'expérience, grâce à la permutation de cette vanne. De cette façon, la phase initialement mobile peut devenir la phase stationnaire ou vice et versa, on parle alors de mode dual.

La phase mobile est qualifiée d'ascendante lorsqu'elle est pompée dans la cellule à contre sens du champ de force centrifuge : on parle alors de mode ascendant (Fig7) .de même, la phase mobile est qualifiée de descendante si elle traverse la phase stationnaire dans le sens du champ de force centrifuge : il s'agit là du mode descendant (Fig, 7).

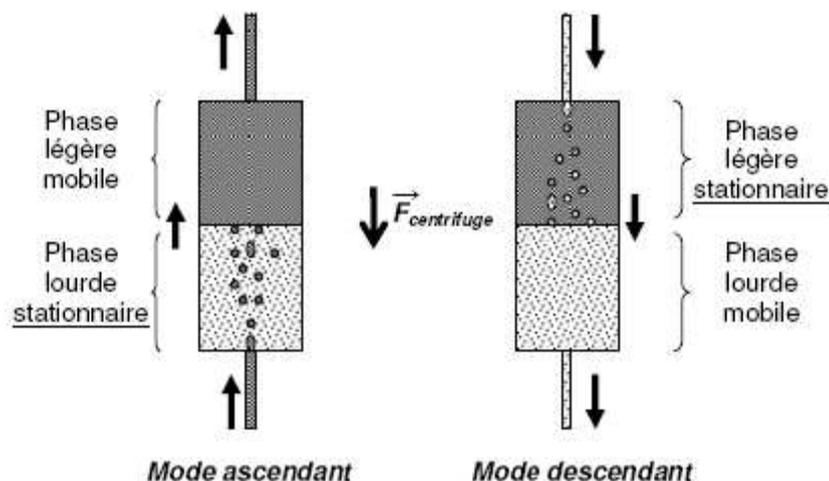


Figure 7 : Illustration des modes ascendants et descendant en CPC

Nous ne travaillons qu'en mode élution.

Dans le mode par élution, la phase mobile est pompée au travers de la phase stationnaire jusqu'à atteindre un équilibre stable entre les volumes de la phase stationnaire (V_{stat}) et de la phase mobile (V_{mob}) .Les phénomènes de partages sont les uniques responsables de la séparation des solutés et ces derniers émergent de l'appareil après un volume de rétention V_r donné par la relation fondamentale en chromatographie sans support solide :

$$V_r = V_{mob} + K_D V_{stas} .$$

K_D étant la constante de distribution du soluté dans ce système de solvant .C'est ce mode qui sera utilisé pour la purification de stilbénes.

La nature liquide de la phase stationnaire permet de choisir laquelle des deux phases, supérieure ou inférieure, sera la phase stationnaire, les deux cas étant possibles. Le mode de pompage de la phase mobile sera différent selon les cas. En CPC, on peut comparer en première approximation la cellule dans le champ de force centrifuge à une ampoule à décanter dans un champ de gravitation terrestre. La partie la plus périphérique de la cellule est comparable à la partie inférieure de l'ampoule à décanter. Par conséquent :- si la phase mobile est la plus légère, il faut l'injecter dans le sens opposé de la force centrifuge, de la périphérique vers le centre : c'est le mode **ascendant** ; si la phase mobile est la plus dense, il faut l'injecter dans le sens de la force centrifuge, du centre vers la périphérique : c'est le mode **descendant**

III. 3.5– Système biphasique de solvant

a) *Sélection du système de solvant*

Le partage d'un composé entre deux phases dépend essentiellement des facteurs propres à sa diffusion (concentration, température, solubilité, polarité...)

En 1891, le physicien et chimiste allemand Walder Hermann Nemst introduit le coefficient de distribution K_D comme une constante physique caractéristique d'une substance donnée en chromatographie de partage. K_D^X est alors défini par le rapport des concentrations d'un soluté X dans la phase supérieure et dans la phase inférieure d'un système biphasique à l'équilibre lorsque ce soluté est dilué dans le système.

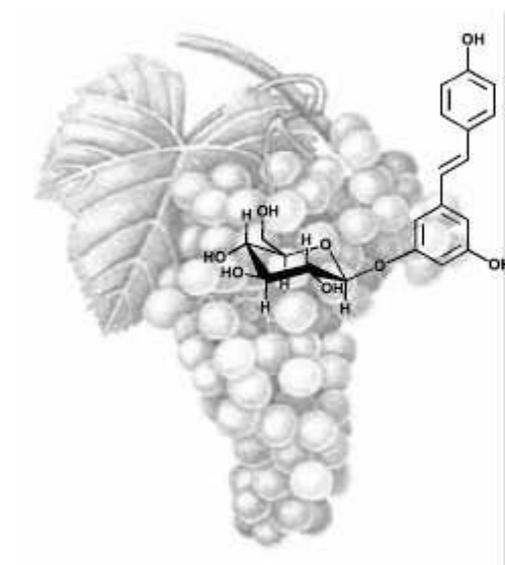
$$K_D^X = \frac{C_{sup}^X}{C_{inf}^X} \text{ ou } K_D^X = \frac{C_{stat}^X}{C_{mob}^X}$$

avec :

- K_D^X : coefficient de distribution de la substance X
- C_{sup}^X : concentration de X dans la phase liquide supérieure
- C_{inf}^X : concentration de X dans la phase liquide inférieure
- C_{mob}^X : concentration de X dans la phase mobile
- C_{stat}^X : concentration de X dans la phase stationnaire

TROISIEME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS



IV- SEPARATION DES COMPOSES STILBENIQUES

IV - I – MATERIELS ET METHODES

IV - I.1- MATERIL VEGETAL ET EXTRACTION

500 g des serments de *vitis vinifera* chardonnay séchées et broyer ont été mises en lixiviation avec du toluène (2l) pendant 24 heures qui permet l'élimination des substances apolaires tout en préservant les polyphénols qui a été rejeter à la fin , sur les marcs une macération a été faite dans un mélange acétone/eau (6/4) (3l) pendant 4 heures qui a été ensuite évaporé. L'extrait hydroacétonique récupéré à été réduit jusqu'à 900ml puis compléter avec le MeOH jusqu'à 1 litre. Une extraction avec 6 litres de MTBE à été faite pendant 24 H sur l'extrait aqueux et qui a été évaporé à sec et le résidu à été récupéré avec du MeOH et compléter avec l'eau distillée, le méthanol à son tour a été éliminer avec évaporation sous vide et l'extrait MTBE a été lyophilisé (6.691g) 1.39 % (fig. : 8)

IV - I.2 La stratégie de purification

La chromatographie sur couche mince (CCM) de l'extrait MTBE nous a montré des taches intéressantes, leurs fluorescences sous la lampe UV (254et 366 nm) nous a orienté vers des structures phénoliques.

Dans ce contexte, notre objectif à été d'isoler les stilbénes existant dans cette plante. La purification de tels composés ces constituants à l'aide de techniques classiques n'ayant pas été fructueuses jusqu'ici en raison de leurs forts caractères polaires et hydrophiles d'une part mais également en raison de leur fragilité chimique .C'est la raison pour laquelle nous avons choisi d'employer la **CPC** comme outil de purification à l'image d'autres techniques de chromatographie liquide-liquide représente un outil alternatif intéressant. Des études précédemment réalisées en mode de développement isocratiques ou par gradient d'élution ont confirmées l'intérêt d'employer une telle technique pour la purification d'anthocyanes^{97,93,98}

La purification à donc été réalisée à l'aide du système biphasique composé de quatre solvants : heptane, acétate d'éthyle, méthanol et l'eau.

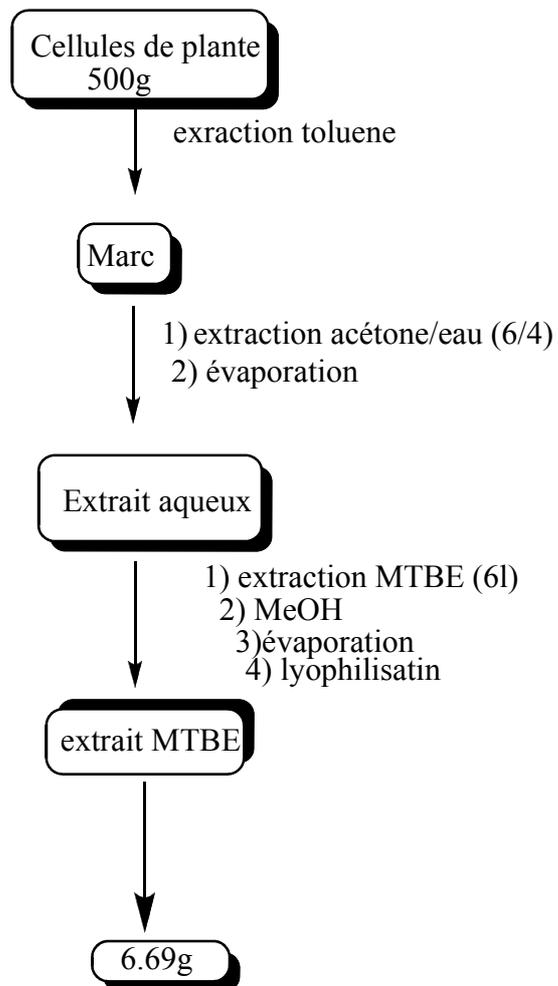


Figure 8 : Extraction des serments de Vitis vinifera chardonnay

IV-I.2 .1- Fractionnement et isolement des stilbènes

IV-2.2.1.a- Sélection du système de solvant biphasique

Tous les systèmes biphasiques utilisés seront issus de la gamme Arizona.⁹⁷ Pour séparer un produit donné, on doit se trouver avec un coefficient de partage proche de 1 pour une élution isocratique. Pour le tester, on mélange un même volume de phase aqueuse et de phase organique de départ.

Une quantité de l'extrait MTBE a ensuite été dissoute dans le mélange des deux phases. Après agitation et décantation, on prélève un même volume des 2 phases obtenues et on les compare par spectrométrie ou chromatographie. On procédera dans des petits piluliers avec seulement 4 ml de solvant au total.

L'étude de l'évaluation du coefficient de partage du soluté dans les deux phases a alors été réalisé en effectuant les analyses par HPLC nous a permis de conclure que les systèmes K et M ont été les meilleurs systèmes de solvant qui convient pour une meilleure séparation des stilbènes dans l'extrait MTBE.

Nous travaillons donc avec un système quaternaire biphasique (Heptane/AcOEt/MeOH/eau) et en mode élution.

Dans le mode par élution, la phase mobile est pompée au travers de la phase stationnaire jusqu'à atteindre un équilibre stable entre les volumes de la phase stationnaire (V_{stat}) et de la phase mobile (V_{mob}). Les phénomènes de partages sont les uniques responsables de la séparation des solutés et ces derniers émergent de l'appareil après un volume de rétention V_r donné par la relation fondamentale en chromatographie sans support solide :

$$V_r = V_{mob} + K_D V_{stat} .$$

K_D étant la constante de distribution du soluté dans ce système de solvant .C'est ce mode qui sera utilisé pour la purification de stilbènes.

IV-. 2. 2. 2.b- Remplissage de la colonne par la phase stationnaire

Après sélection des systèmes de solvant, la colonne CPC a été remplie de phase stationnaire (phase lourde riche en eau) en mode ascendant à 100 tr/min puis la préparation de l'échantillon a nécessité la dissolution de 2g de l'échantillon dans 8ml d'un mélange (1/1, v/v) de la phase stationnaire et la phase mobile. L'échantillon a été introduit à l'aide d'une seringue dans une boucle de 20 ml reliée à l'entrée de la colonne de CPC.

La vitesse de rotation a été augmentée à 1000 tr/min et sous une pression de 25 bar .Puis la phase mobile (phase organique) a été pompée dans la colonne en **mode ascendant** à un débit de 3ml/min et l'injection de l'échantillon a été faite en même temps .l'éluant en sortie de la

colonne a été récupéré par des fractions de 9 ml .la détection a été faite à 280 nm .la séparation a été faite en mode ascendant et descendant .

IV- 2. 3- obtention de fractions enrichies en stilbènes

Le fractionnement de la CPC avec le sys K (heptane/AcOEt/MeOH/H₂O :1/2/1/2) a donné 132 fractions recueillies par mesure de l'absorption UV à 280 nm (fig 9).

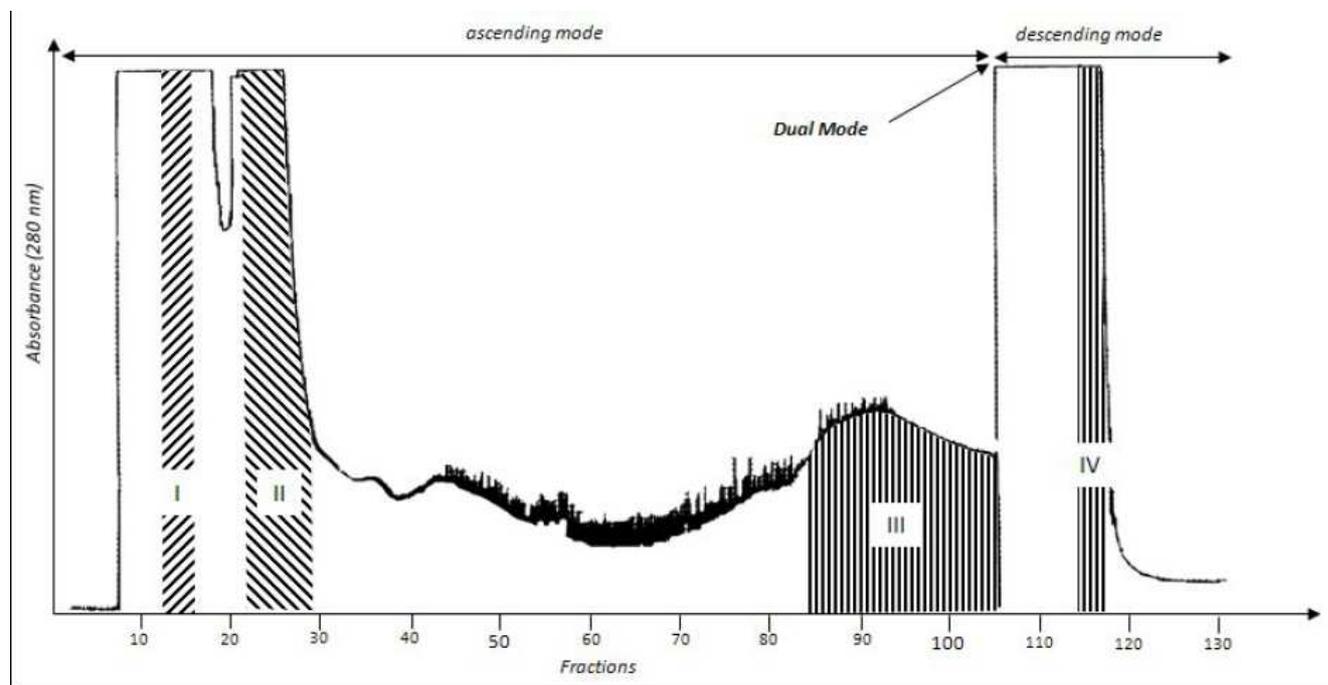


Figure 9: Chromatogramme CPC de l'extrait MTBE sys K

IV-2. 4- Caractérisation des stilbènes

L'analyse des différentes fractions par chromatographie sur couche mince (silice 60 F 254) avec un éluant composé de : CHCl₃, MeOH, acide acétique (85/15/3), une révélation à la lumière UV (254 et 366 nm) et pulvérisation avec le révélateur : anisaldéhyde, acide sulfurique (90/5), permettent de regrouper les fractions dans différents blocs (fig 10).

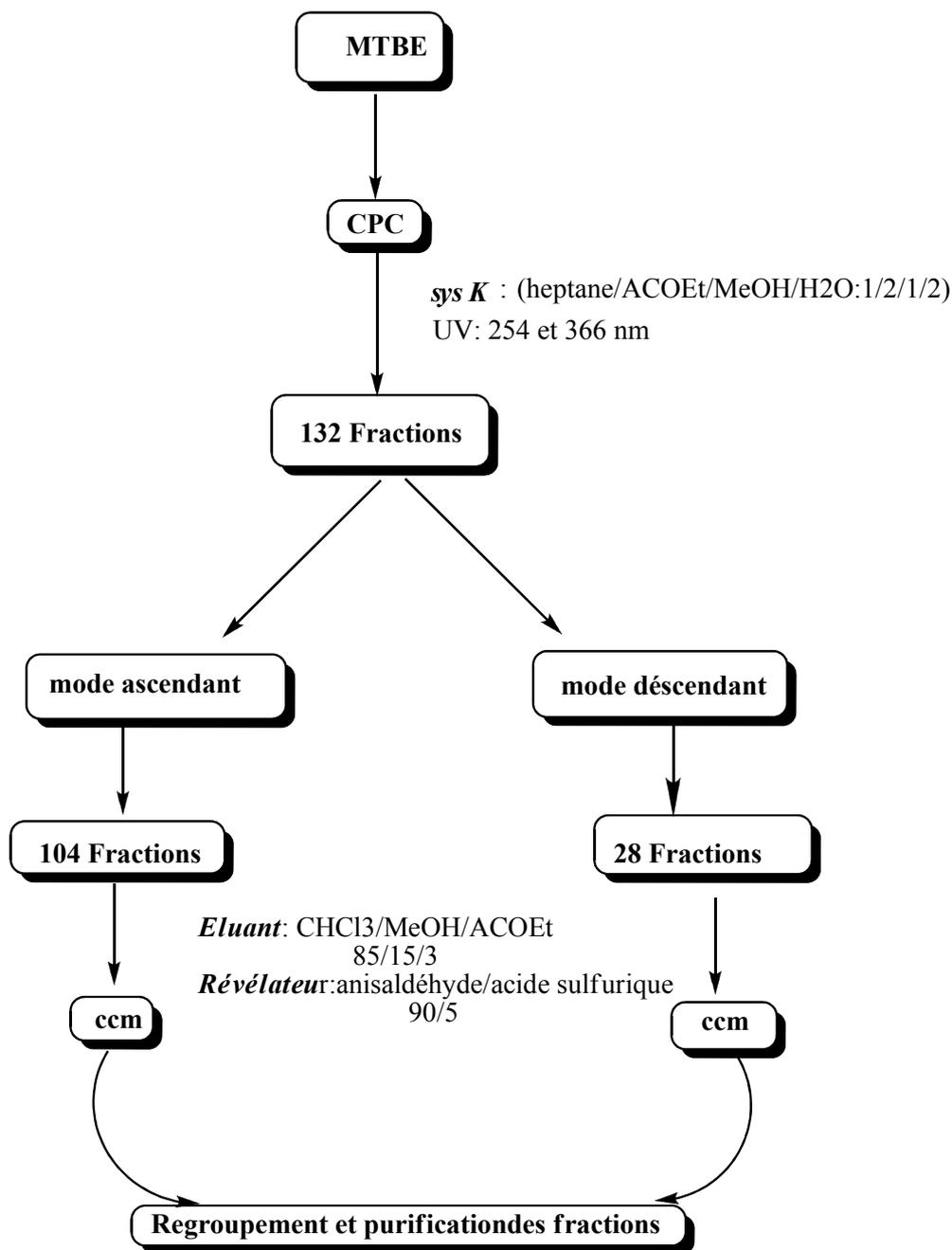


Figure 10 : Fractionnement de l'MTBE à l'aide de la CPC sys K

Sont ainsi retenus les blocs dont le profil chromatographique signale la présence de stilbènes (fig 11).

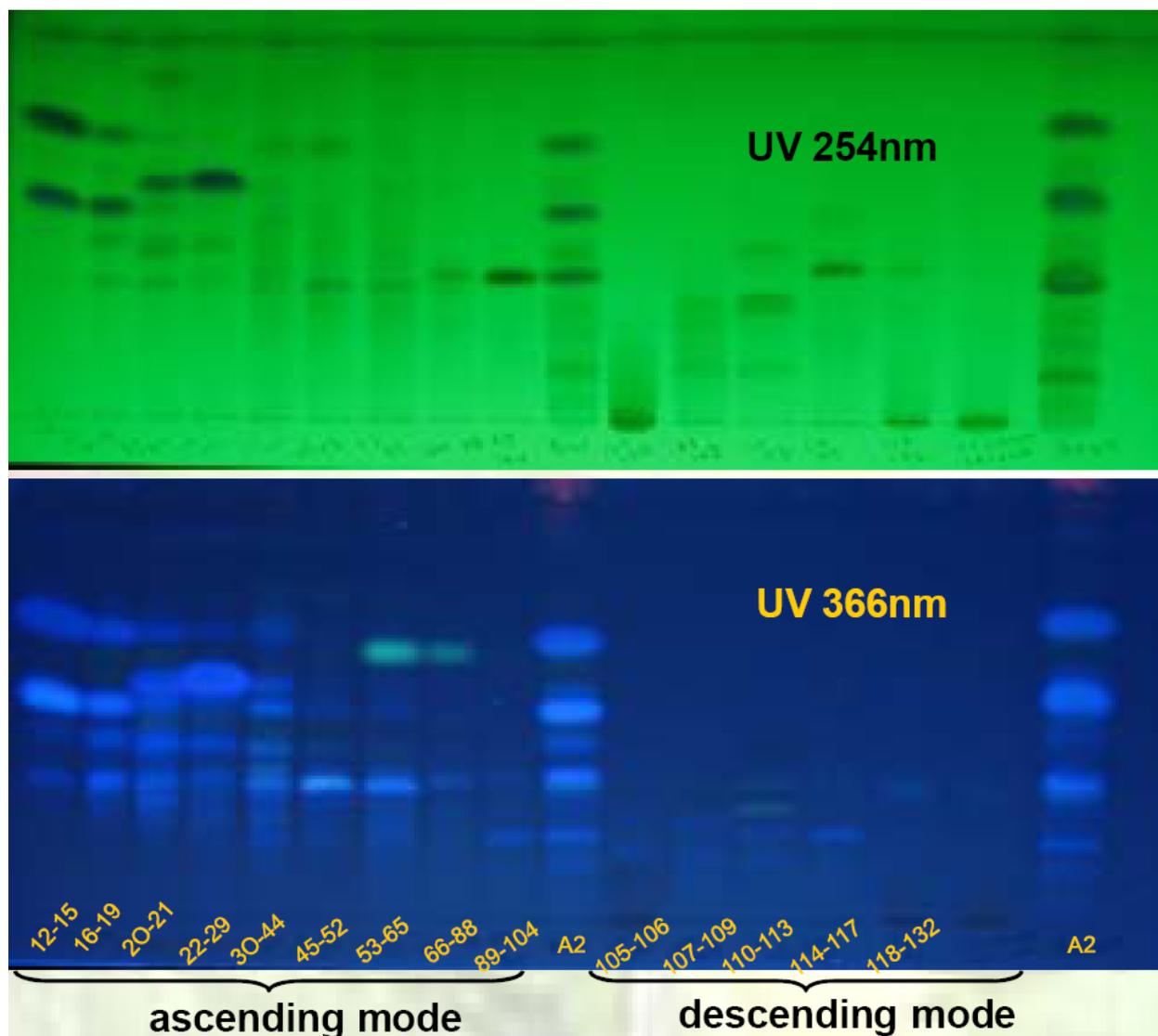


Figure 11 : CCM du suivie du fractionnement de CPC sys K à 254et 366 nm, éluant :CHCl₃ ,MeOH,AcOEt , pulvirisation :anisaldéhyde, acide sulfurique

IV -2.5 -Purification des stilbènes

A- Purification des stilbènes existant dans la CPC sys K

a) Purification des stilbènes existant dans les fractions 22-29

L'étude précédente nous a montré que les fractions 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 et 29 contiennent seulement un seul produit majoritaire (fig 11). Ces fractions ont été regroupées, évaporées, lyophilisées (fig 12) et analysées par HPLC.



Figure 12: Photo du Lyophilisateur utilisé pour sécher les extraits aqueux

L'analyse des huit fractions déjà regroupées par HPLC a été effectuée en utilisant une colonne remplie d'une phase inverse (C18) comme phase stationnaire et la phase mobile a été composé de deux solvants : A et B (H_2O à 0.0025 % de TFA et ACN).

L'échantillon a été dissous dans le $MeOH / H_2O$ (1/1) et filtré sur un filtre à $0.45\mu m$ pour éviter un colmatage. Des échantillons de $100\ \mu l$ ont été injectés avec un débit de $1 ml/min$ avec le gradient suivant : 15% B (0-5min), 15 à 100 % B (5-35min) , 100% B (35-45min) et la détection des produits a été faite à 286 et 306 nm (fig13).

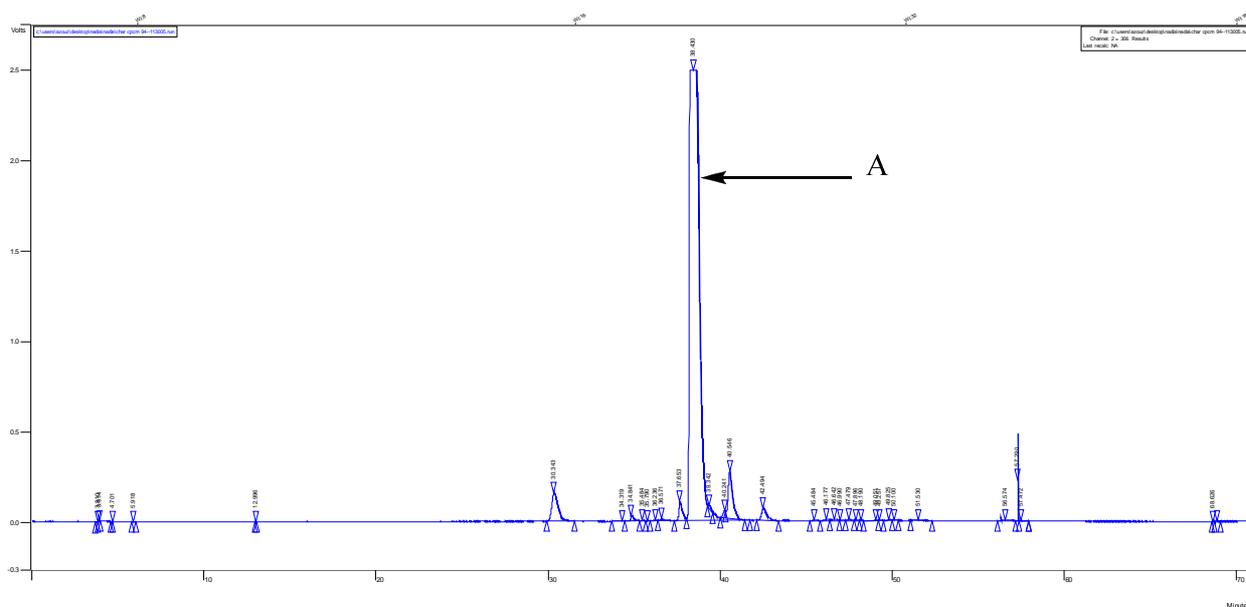


Figure13 : Chromatogramme HPLC semi préparative des fractions 22—29 de la CPC sys K

Après purifications du produit **A**, ce dernier a été récupéré sous forme de poudre blanche $R_f=0.55$ avec une masse 74 mg à 90 % de pureté (fig 13).

Il a montré sur le chromatogramme une tache visible à l'UV, donnant une fluorescence violette à 254 et 366 nm ; Une comparaison a été faite avec des échantillons de référence nous a orienté vers l' piceatannol.

b) Purification des stilbènes existant dans les fractions 89-104 modes ascendants et 114-117 mode descendant

Le deuxième produit **B** a été purifié à partir des fractions 89 à 104 du mode ascendant et 114 à 117 du mode descendant, ce dernier a été récupéré sous forme de poudre blanche $R_f=0.53$ avec une masse totale 130 mg à 90% de pureté (fig 14).

Son chromatogramme selon le gradient suivant : 15%B (0-5min), 15à100 % B (5-35min) ,100%B (35-45min), a montré une tache visible à 254 et 366 nm ; une comparaison a été faite sur des échantillons de référence nous a orienté aussi vers l'ampilopsine ce qui a été confirmé par l'étude spectrale voir tableau (fig 20), chapitre IV .

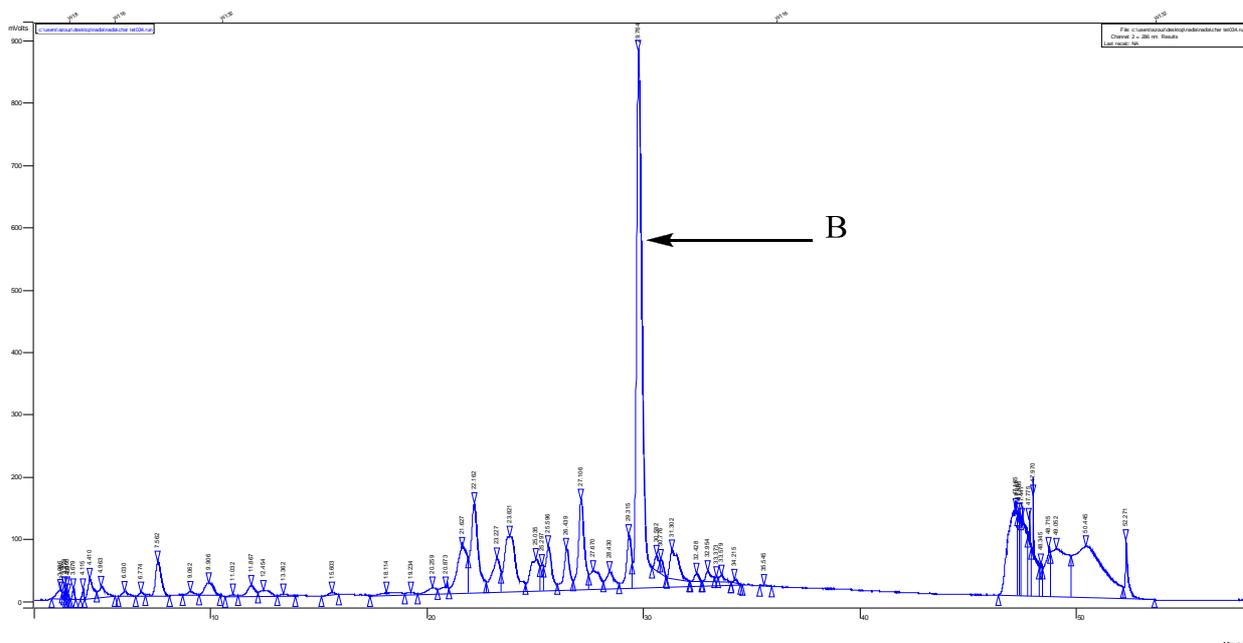
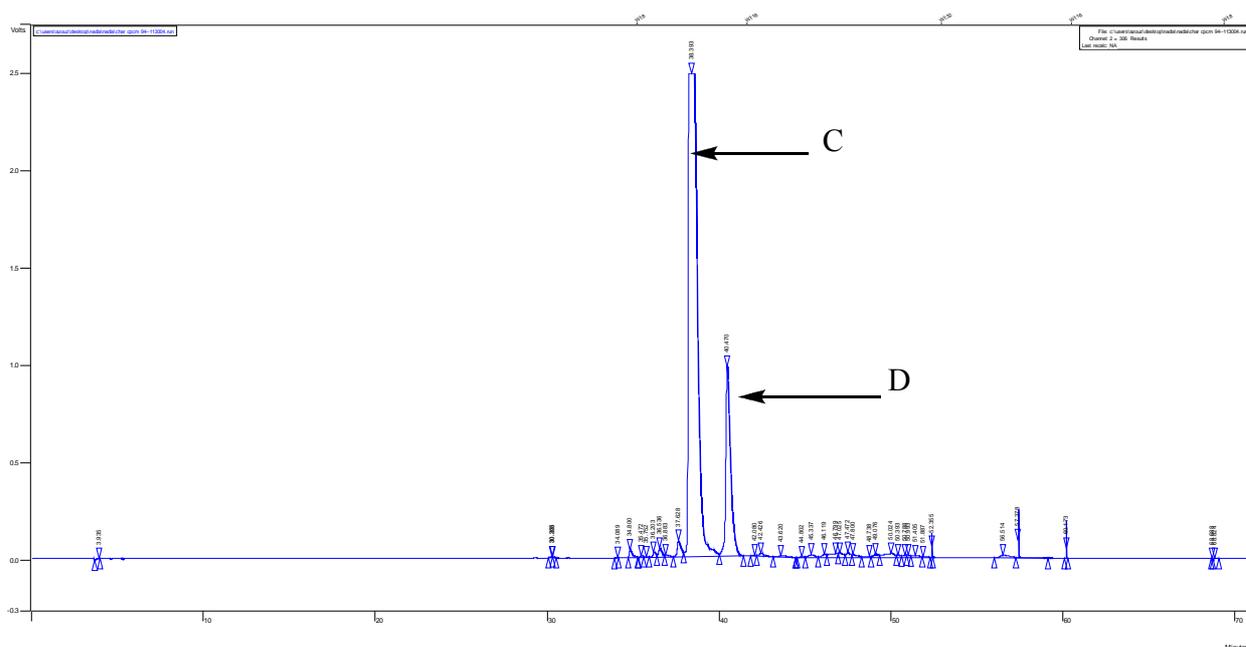


Figure 14: Chromatogramme HPLC semi préparative des fractions (89 à 104)et (114 à117)de la CPC sys K

c) Purification des stilbènes existant dans les fractions 16-19

Similairement pour la fraction 16 du mode ascendant, les produits **C** et **D** ont été récupérés selon le gradient suivant : 15%B (0-5min),15-50%B (5-35min),50-100%B (35-45).

Le premier sous forme de poudre blanche $R_f=0.52$ et le deuxième sous forme de poudre jaune $R_f=0.61$ avec les poids respectivement 20.03 mg et 13.57 mg avec une pureté de 70% et 65 % (fig 15)



L'identification et l'élucidation des structures de ces deux composés purifiés confirment qu'ils sont deux **glucosides du *trans*-resveratrol** de formule brute $C_{20}H_{22}O_8$, dont les formules développées sont représentées dans la quatrième partie.

d) Purification des stilbènes existant dans les fractions 12-15

Pour la purification de la fraction 12-15 de la première CPC avec le système K l'étude chromatographique sur couche mince a montré que ces fractions contiennent les mêmes produits (3 produits), ce qui a été confirmé par HPLC mais leurs coefficients de partage ont été au voisinage de 0.1, ce qui a traduit que leur séparation a été impossible avec ce système de solvant (sys K). Un second test des différents systèmes de solvant de la gamme Arizona a été nécessaire pour trouver le système de solvant idéal pour la séparation de ces produits ; Ce dernier nous a permis de les séparer avec le sys M .

Le fractionnement de la CPC avec le sys M a donné 132 fractions recueillies par mesure de l'absorption UV à 280 et 306 nm. .

L'analyse des différentes fractions par chromatographie sur couche mince (silice 60 F 254) avec un éluant composé de : $CHCl_3$, MeOH, acide acétique (85/15/3) et une révélation à la lumière UV (254 et 366 nm) et pulvérisation avec le révélateur : anisaldéhyde, acide sulfurique (90/5), permettent de regrouper les fractions dans différents blocs (fig16).

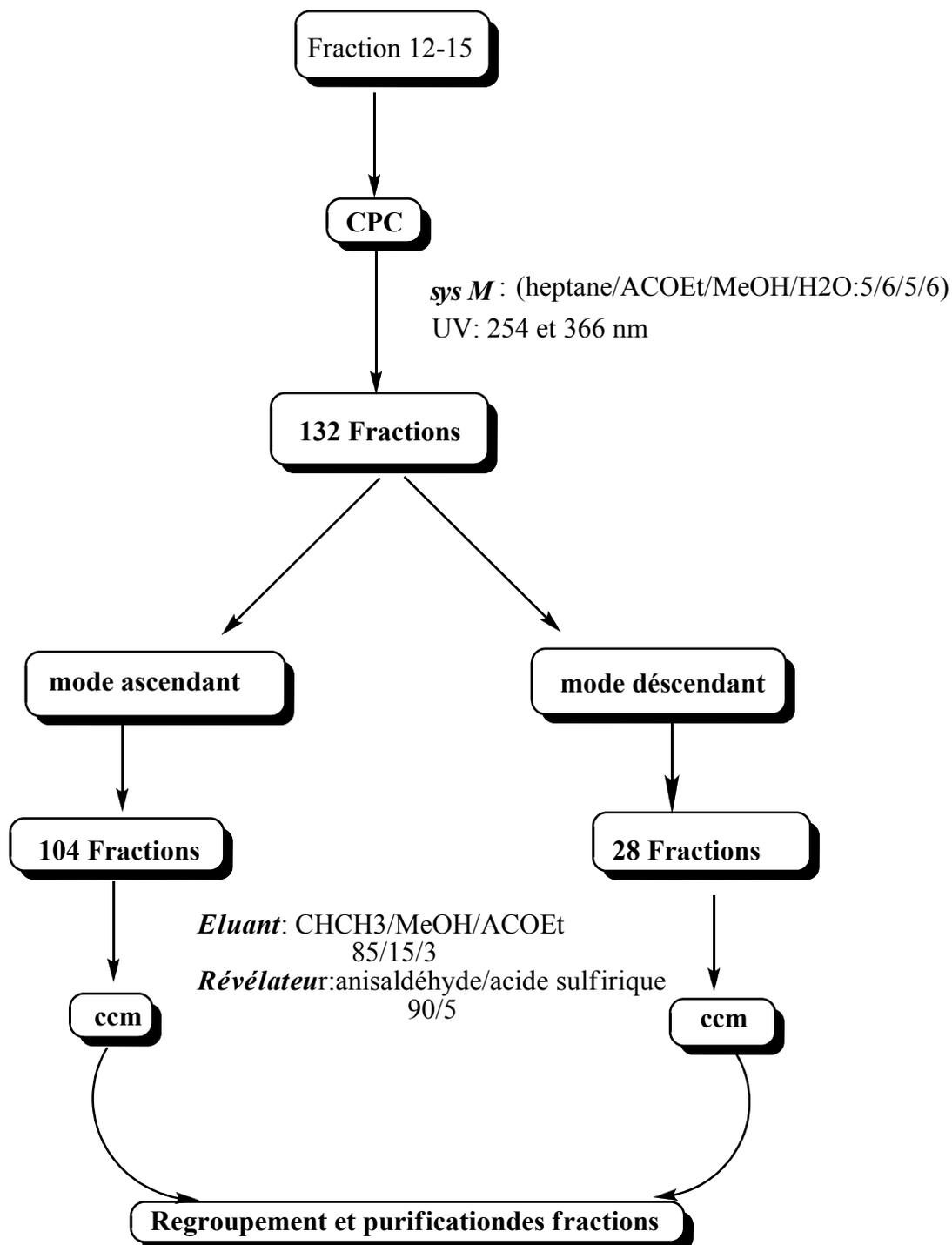


Figure 16: Fractionnement des fractions 12-15 à l'aide de la CPC sys M

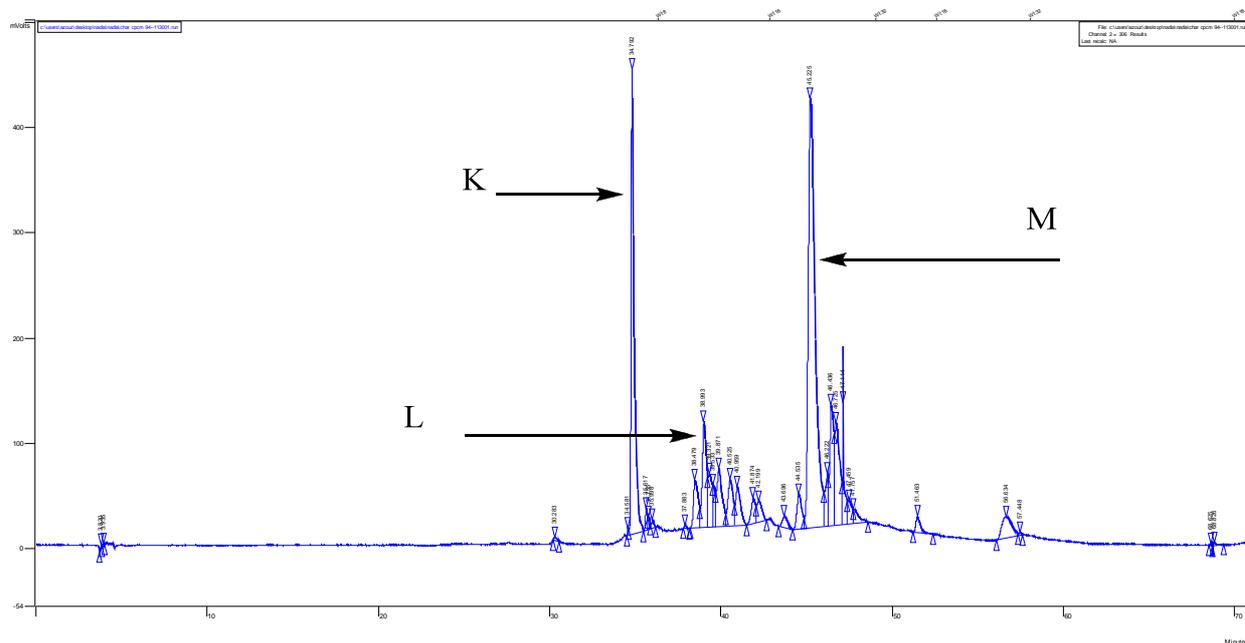
B- Purification des stilbènes existant dans la CPC sys M

a) purification des stilbènes existant dans les fractions 25-53

La purification des fractions 25-53 de cette 2^{ème} CPC avec le gradient de solvant HPLC suivant : 5% B (0-5min), 5 à 10% B (5-8min), 10 à 20% B (8-29min), 20 à 35 % B (29-42 min), 35 à 50 %B (42-43 min), 50 à 100% B (43-64 min), nous a permis de récupérer trois produits

sous forme de poudre blanche pour les produits **K** et **L** et jaune clair pour le produit **M** avec les poids respectivement :

7.9 mg, 5.5 mg et 20 mg avec une pureté de 95% pour M et 80% pour les deux autre (fig 17).



5

Figure17 : Chromatogramme HPLC semi préparative des fractions (25 à 53) sys M

Concernant les composés **K** et **L** leurs chromatogrammes ont donné des taches visibles donnant une fluorescence violette à la longueur d'onde 254 et 366 nm ; En faisant une comparaison avec des échantillons de référence et en s'appuyant sur les données spectrales, nous avons conclu sans ambiguïté que ces deux composés correspondent respectivement au **resveratrol** et la **ϵ -viniferine** voir tableau (fig35) et tableau (fig 36) partie IV.

Le composé **M** se présente également sous forme de poudre jaune $R_f = 0.64$, son chromatogramme a donné une fluorescence jaune à 254 et 366 nm et sa révélation a donné une tache marron foncé, L'identification de ce produit par les méthodes spectroscopiques, nous a permis d'affirmer qu'il correspond à la **vitisine c**⁴⁴.

Par contre, une étude bibliographique nous a confirmée que ce dernier est un nouveau produit non encore décrits dans notre plante.

b) Purification des stilbénes existant dans les fractions 61-93

Pour la purification des fractions 61-93 de la première CPC avec le système L l'étude chromatographique sur couche mince a montré des taches visibles à 255nm et une fluorescence violette à 366 nm et que ces fractions contiennent un produit **N** majoritaire (fig 18), ce qui a été confirmé par HPLC (fig 19)

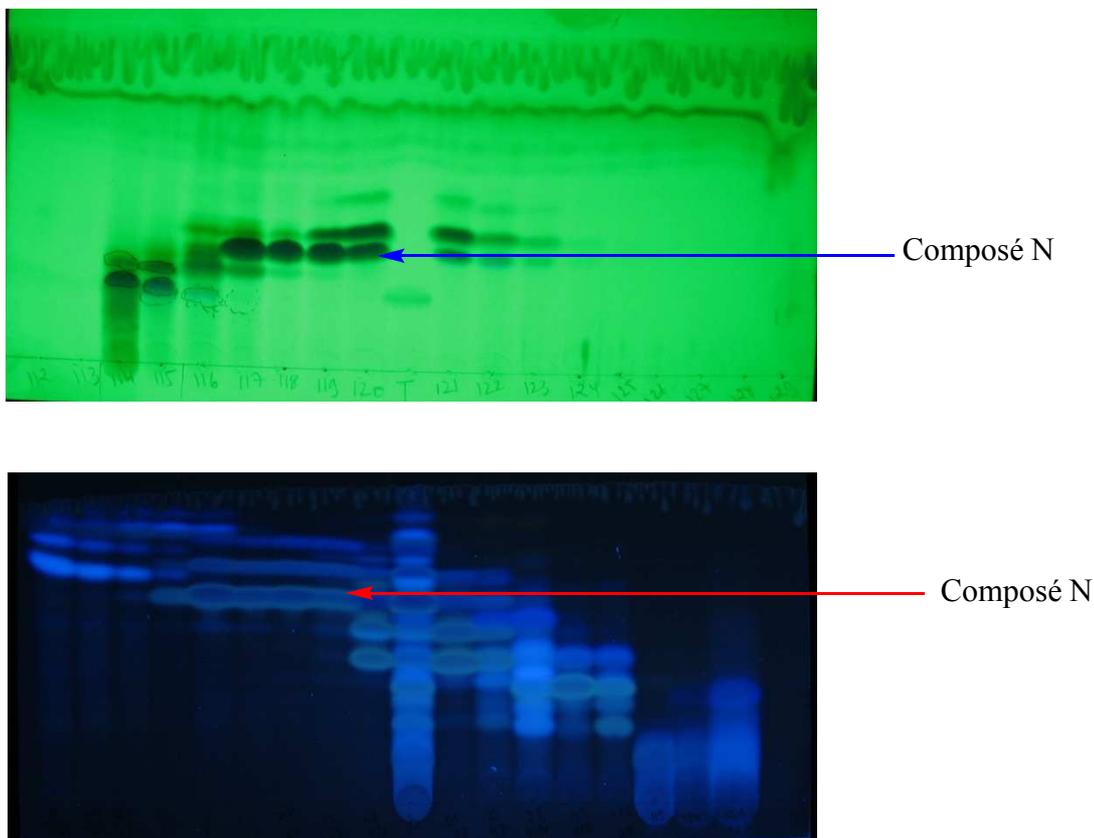


Figure 18 : CCM du suivie du fractionnement 61-93(CPC sys M) à 254et 366 nm, éluant : $CHCl_3$, MeOH, AcOEt, pulvirisation: anisaldéhyde, acide sulfurique

La purification de ce produit avec le gradient de solvant HPLC suivant : 15 % B (0-5min), 15 à 100 % B (5-35min) ,100 % B (35-45min), nous a permis de récupérer un produit **N** sous forme de poudre jaune $R_f = 0.62$ avec 15.6 mg, et une pureté de 95% .

L'identification de ce produit par les méthodes spectroscopiques, en corrélation avec l'étude bibliographique, nous a permis à notre connaissance d'affirmer qu'il correspond aussi à un nouveau produit naturel extrait à partir de cette plante.

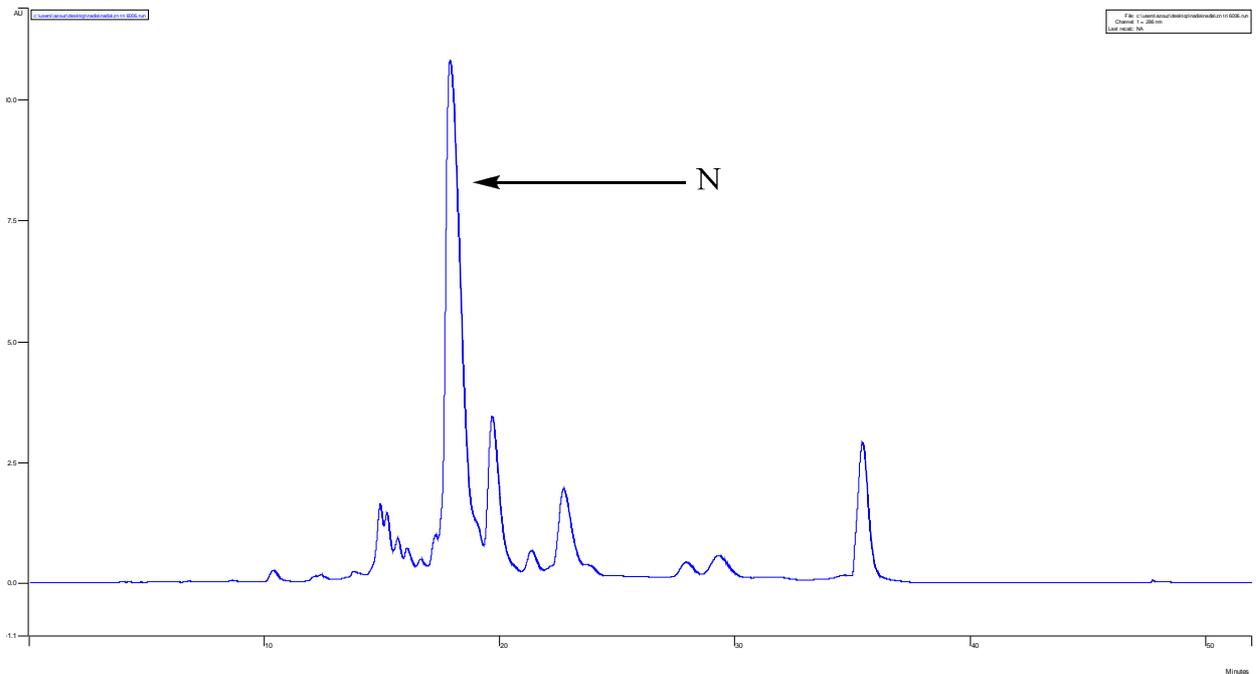
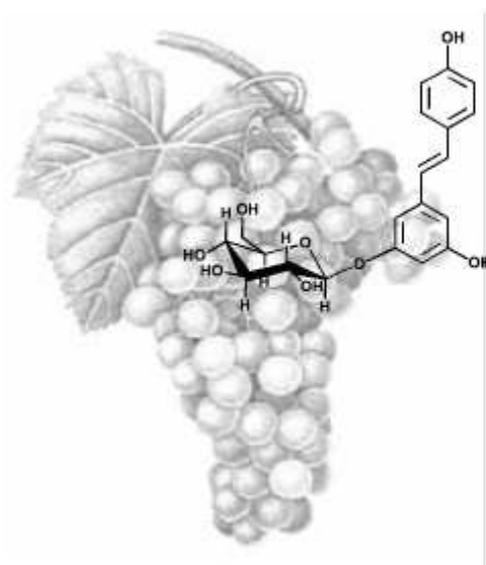


Figure19 : Chromatogramme HPLC semi préparative des fractions (61 à 93) sys M

QUATRIEME PARTIE

DETERMINATION STRUCTURALE

DES SUBSTANCES ISOLEES



V. Détermination structurale des substances isolées

V. 1- GENERALITES

V. 1.1- la RMN 2D

Ces rappels exposent brièvement le principe de base des différentes séquences impulsionsnelles et bidimensionnelles utilisées, ainsi que les informations structurales auxquelles elles permettent d'accéder sur le composé étudié.

L'explication théorique des expériences bidimensionnelles n'apparaît pas dans ce mémoire ; de nombreux ouvrages ^{99,100,101} permettent d'accéder à ces informations.

Les spectres du proton (^1H) et du (C^{13}), enregistrés au cours de notre étude, ont été attribués pour la plupart à partir de spectres RMN à deux dimensions (2D) ¹⁰² homonucléaires (^1H - ^1H) et hétéronucléaires (^1H - ^{13}C).

Toutes ces expériences reposent sur une succession de trois périodes : Préparation, évolution et détection.

Après la période de préparation qui se termine toujours par une pulse de 90° , le système de spins évolue pendant un temps t_1 . Puis le signal, après une dernière pulse de 90° , est détecté pendant un temps t_2 . Une double transformée de Fourier transforme la fonction temporelle $S(t_1, t_2)$, composée d'une série d'interférogrammes, en une fonction fréquentielle $S(\nu_1, \nu_2)$ dans laquelle apparaissent des taches de corrélations pour les spins couplés.

A- Corrélation homonucléaires

a)- COSY

L'expérience **COSY** (**CORrelated SpectroscopY**)¹⁰³ homonucléaire ^1H - ^1H est une technique RMN 2D couramment utilisée. La séquence de pulse de la COSY 45 est composée de deux impulsions p_1 et p_2 de 90° et 45° respectivement, selon le schéma ci-dessous

Cette expérience permet d'observer le couplage scalaire entre deux protons d'un même système de spins et donc de retrouver l'enchaînement des protons voisins sur le squelette de la molécule. La diagonale du spectre 2D représente le proton 1D (autocorrélations) et les taches de corrélation croisée apparaissent symétriquement par rapport à la diagonale.

b)- ROESY

L'expérience ROESY (**R**otational **O**verhauser **E**nhancement **S**pectroscopY) ¹⁰⁴ repose sur le phénomène de relaxation dipolaire de spins nucléaires et met en évidence le couplage dans l'espace, entre protons distants de moins de 4.5Å dans les meilleures conditions. La séquence d'impulsions est la suivante :

La pulse "spin-look" est choisie de manière à ce que le maximum d'échange et d'effet r.O.e ait lieu. Elle varie entre 100 et 700 ms (350 ms pour un poids des taches de corrélation est inversement proportionnelle à r^6 , r étant la distance entre les deux noyaux interactifs).

Cette technique permet ainsi de tirer des informations sur la structure tridimensionnelle.

B – Corrélations hétéronucléaires

Les expériences bidimensionnelles hétéronucléaires ^1H - ^{13}C utilisées ont été enregistrées en mode "inverse", c'est-à-dire détectées par le canal ^1H . Après une première impulsion d'excitation des noyaux des protons, une séquence de transfert de cohérence aux C^{13} permet à la magnétisation du système d'évoluer sous l'action des déplacements chimiques des protons et de leur couplage avec les noyaux ^{13}C est détecté à la fréquence des protons. Le rapport signal/bruit est considérablement augmenté par rapport aux expériences bidimensionnelles enregistrées en mode "direct", qui utilisent une détection à la fréquence du noyau du ^{13}C .

a)- HMQC

La spectroscopie hétéronucléaire ^1H - ^{13}C directe ou HMQC (**H**eteronuclear **M**ultiple **Q**uantum **C**orrelation) ¹⁰⁵ met en évidence le couplage d'un carbone avec le ou les proton(s) directement liés à ce carbone.

La séquence d'impulsions est la suivante :

Elle comprend une séquence **BIRD** (**B**ilinear **R**otational **D**ecoupling) qui élimine les signaux des protons liés à des atomes de carbone ^{12}C dont l'intensité est 200 fois plus importante que ceux liés à des atomes ^{13}C . Le découplage hétéronucléaire ^1H - ^{13}C est obtenu par une séquence "CPD" (Composite Pulse Decoupling).

b) -HMBC

L'expérience hétéronucléaire **HMBC** (**H**eteronuclear **m**ultiple **B**ond **C**onnectivity) $^{106}\text{H}-^{13}\text{C}$ à longue distance (2J-3J). Elle permet de reconstruire le squelette de la molécule à travers les quaternaires, mais aussi à travers les hétéroatomes, déterminant ainsi le point d'accrochage des résidus glycosylés dans le cas de composés hétérosidiques.

La séquence d'impulsion est la suivante :

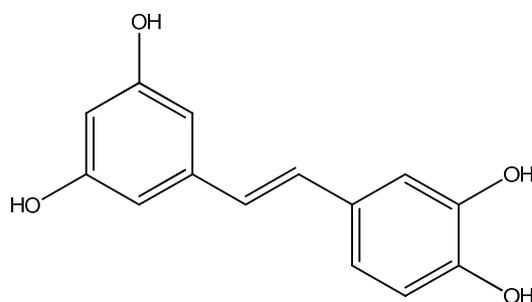
Les corrélations directes (^1J) entre les protons et les carbones sont éliminées par l'insertion d'un filtre "passe-bas" d_2 , d'une valeur de 3.8 ms en moyenne ($J=130\text{Hz}$). Quand la constante de couplage s'éloigne de cette valeur moyenne, il apparaît quelquefois sur le spectre deux taches dites "résiduelles", symétriques par rapport au signal du proton

V.2 -TRAVAUX PERSONNELS

V. 2-A. Analyse structurale des composés isolés

V 2- A. 1. Détermination structurale du composé **A** : *Picéatannol*

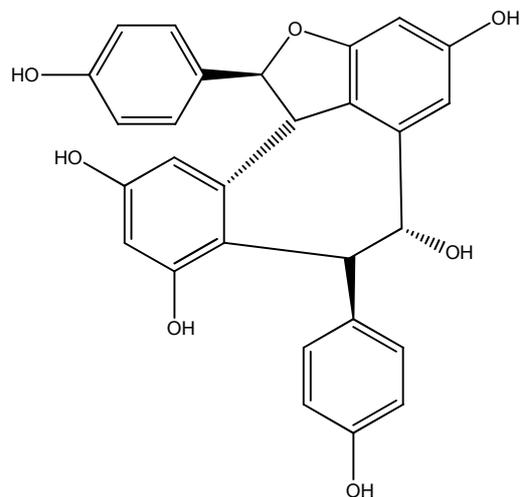
Les constantes spectrales (UV, RMN du proton) du composé **A**, comparées à celles de substances de référence au laboratoire, indiquent qu'il s'agit de la **Picéatannol**.



Composé (A)

V 2- A. 2. Détermination structurale du composé **B** : *L'ampelopsine*

Deux dérivés de stilbènes bien connus des plantes du genre Vitaceae attirent notre attention, l'ampélopsine A et le balanocarpol. La comparaison des données RMN du composé (**B**) à celles de ces substances permet d'identifier le composé (**B**) comme l'ampélopsine A¹⁰⁷.



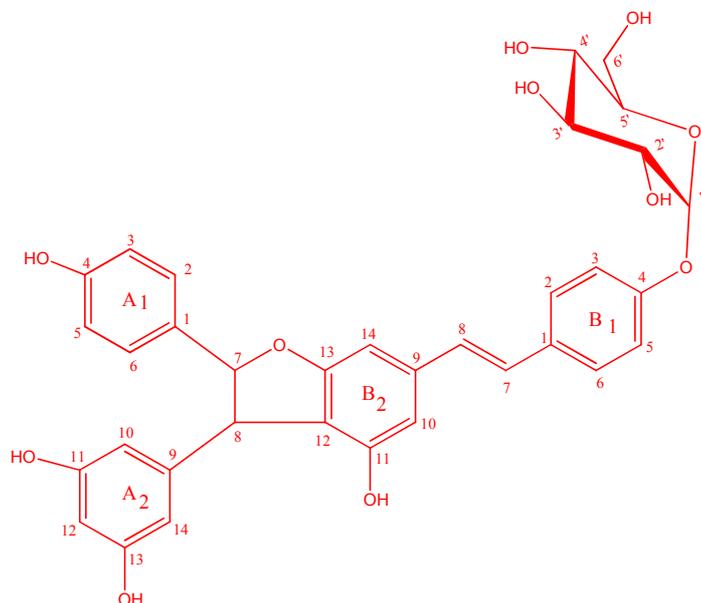
Composé (B)

	<i>Composé B</i>			<i>Ampélopsine A</i>			<i>Balanocarpol</i>		
	$\delta^1\text{H}^a$	J^b	$\delta^{13}\text{C}^a$	$\delta^1\text{H}^a$	J^b	$\delta^{13}\text{C}^a$	$\delta^1\text{H}^a$	J^b	$\delta^{13}\text{C}^a$
1a	-	-	130.6	-	-	132.3	-	-	133.7
2a,6a	7.12d	8.6	129.4	7.10d	8.4	129.6	7.50d	8.3	130.0
3a,5a	6.78d	8.6	115.3	6.77d	8.4	115.6	6.90d	8.3	116.4
4a	-	-	158.1	-	-	156.9	-	-	158.6
7a	5.76d	11.4	87.9	5.75d	11.4	88.1	5.69d	9.3	93.5
8a	4.15d	11.4	48.9	4.15d	11.4	49.2	5.16brd	9.3	52.3
9a	-	-	142.7	-	-	142.7	-	-	142.3
10a	-	-	118.5	-	-	118.5	-	-	120.4
11a	-	-	156.9	-	-	155.7	-	-	157.4
12a	6.43d	2	100.6	6.42d	2.2	101.1	6.09brs		102.0
13a	-	-	156.9	-	-	158.5	-	-	156.9
14a	6.23brd	2	104.5	6.22brs		105.1	5.96d	2.3	106.8
1b	-	-	132.2	-	-	130.6	-	-	133.5
2b, 6b	6.90d	8.8	128.3	6.88d	8.8	128.3	6.75d	8.3	131.5
3b, 5b	6.64d	8.7	114.6	6.63d	8.4	115.0	6.42d	8.3	115.0
4b	-	-	155.5	-	-	158.1	-	-	155.8
7b	5.45d	4.7	43.2	5.44d	4.8	43.5	4.90brs		50.3
8b	5.41t	4.7	70.3	5.40d	4.8	70.7	5.40brs		73.2
9b	-	-	140.1	-	-	140.1	-	-	140.8
10b	-	-	118.3	-	-	118.0	-	-	113.8
11b	-	-	159.7	-	-	159.8	-	-	159.7
12b	6.15d	2.2	96.3	6.14d	2.2	97.0	6.20brs		95.1
13b	-	-	159.7	-	-	159.8	-	-	159.2
14b	6.61d	2.1	110.1	6.60d	2.2	110.1	6.26d	2	104.4
OH							7.74s, 7.85s, 8.04s, 8.56s		7.97s,

Figure 20 : Comparaison du composé B avec L'ampélopsine et le Balanocarpol

V 2- A. 3. Détermination structurale des composés C et D: *Stilbènes glucoside*

a) Etude de la structure du composé C



Composé (C)

Le composé **C** se présente sous forme d'une poudre blanche soluble dans le méthanol. L'étude des constantes spectrales du composé (**C**) montre qu'il s'agit d'un Glucoside trans resvératrol par corrélation avec le produit de référence¹⁰⁸. Dans le spectre RMN-1H du composé (**C**) on observe deux protons aromatiques couplant entre eux avec la même constante de couplage formant deux doublets à 6.75 et 7.12 ppm ($J = 8.6$ Hz), 6.97 et 7.42 ppm ($J = 8.7$ Hz) pour le cycle (A1) et (B1) successivement, on observe aussi trois autres protons aromatiques qui forment un système AB₂ à 6.17 (2H, d, $J = 2.2$ Hz), 6.25 (1H, t, $d = 2.2$ Hz) pour le cycle aromatique (A2), deux autres protons aromatiques qui forment un système AB, couplé en position méta vers 6.51 (1H, d, $J = 1.1$ Hz) et à 6.61 (1H, d, $J = 1.1$ Hz), pour le cycle (B2), ainsi les deux doublets correspondent aux deux protons oléfiniques vers 6.97 (1H, d, $J = 16.5$ Hz, H-8b), 7.11 (1H, d, $J = 16.5$ Hz, H-7b), deux protons couplés entre eux du groupe méthine à 4.38 (1H, d, $J = 4.7$ Hz, H-8a), 5.44 (1H, d, $J = 4.7$ Hz, H-7a), un signal à 4.97 ppm peut correspondre au proton anomérique du glycoside. Cinq autres signaux sont présents sur le spectre de RMN-1H de composé (**C**) (fig21) et correspondent sans doute aux protons de la partie osidique.

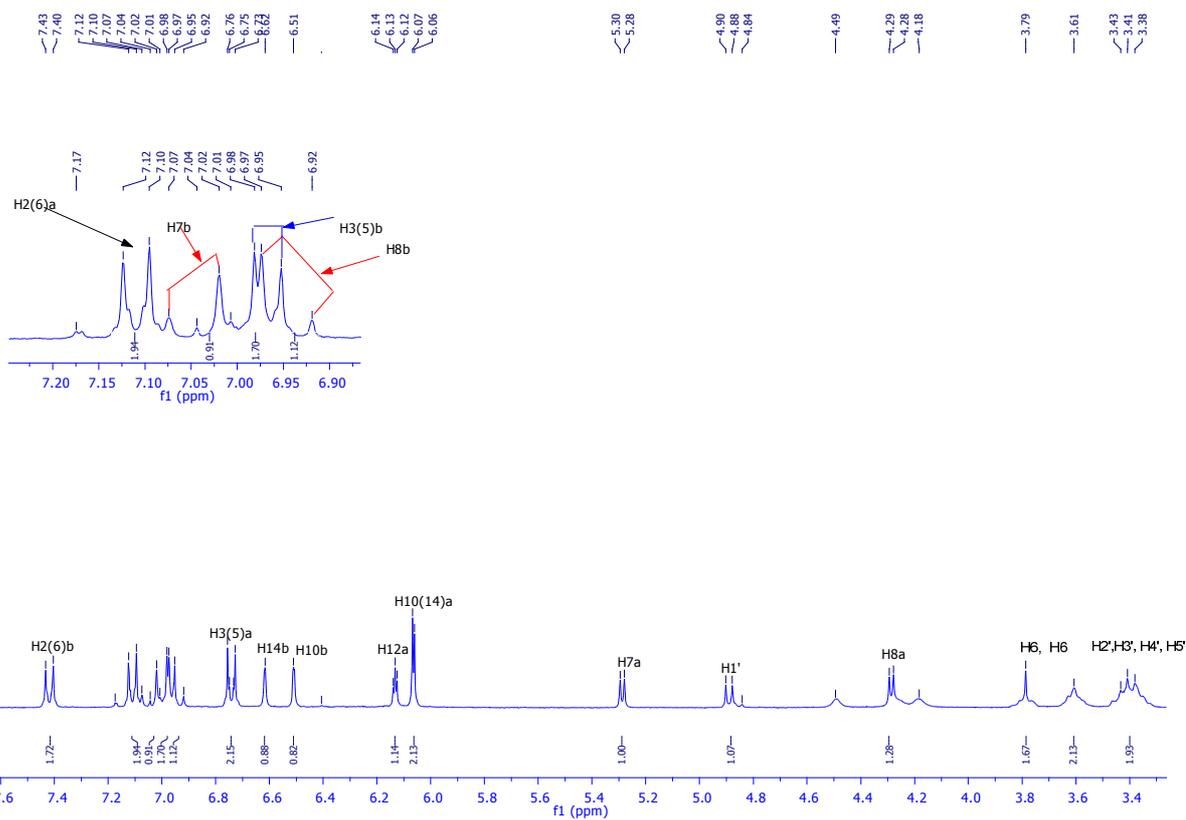


Figure 21 : Spectre ^1H -RMN du composé (C)

Les spectres RMN- ^{13}C et le DEPT 135 du composé (C) présentent 29 signaux distincts. Parmi ceux-ci, nous distinguons onze carbones quaternaires et dix-sept CH aromatiques (fig22) et un CH_2 .

Spectre ZN10 RMN ^{13}C

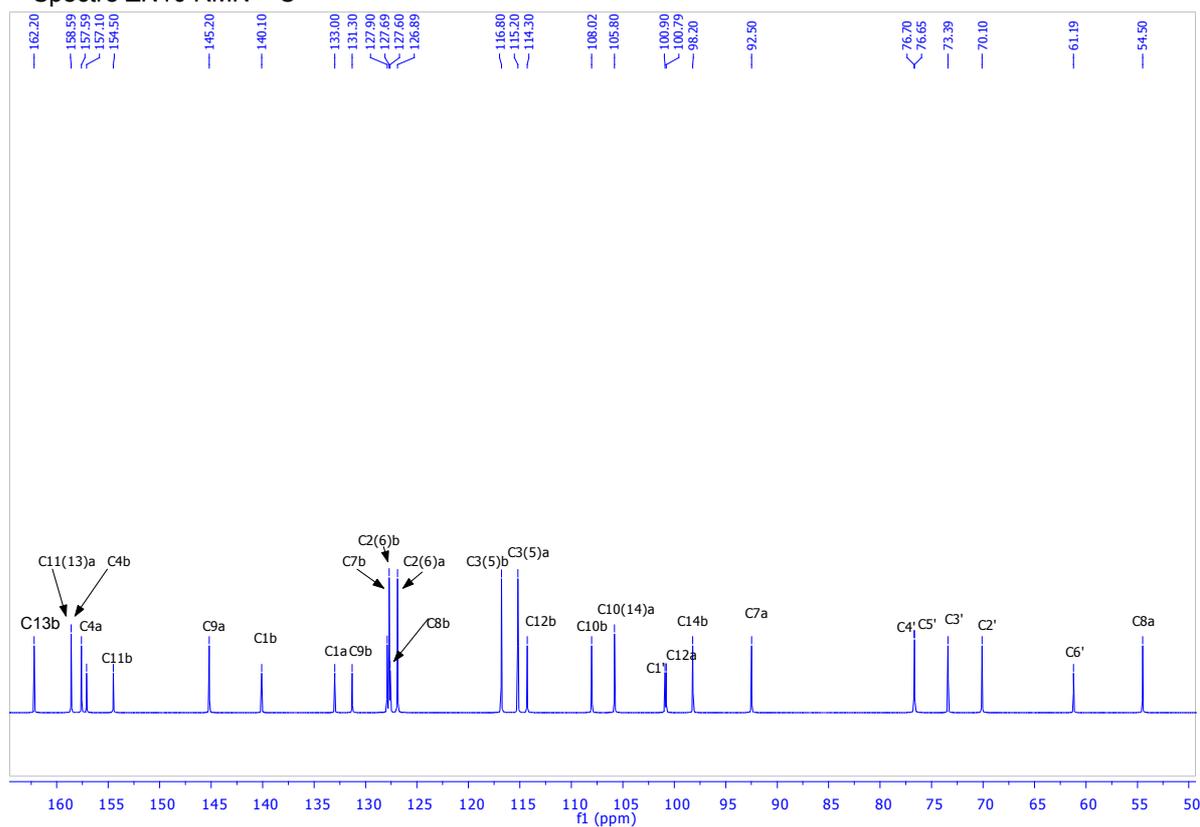


Figure 22 : Spectre ^{13}C -RMN du composé (C)

Spectre ZN10 DEPT 135

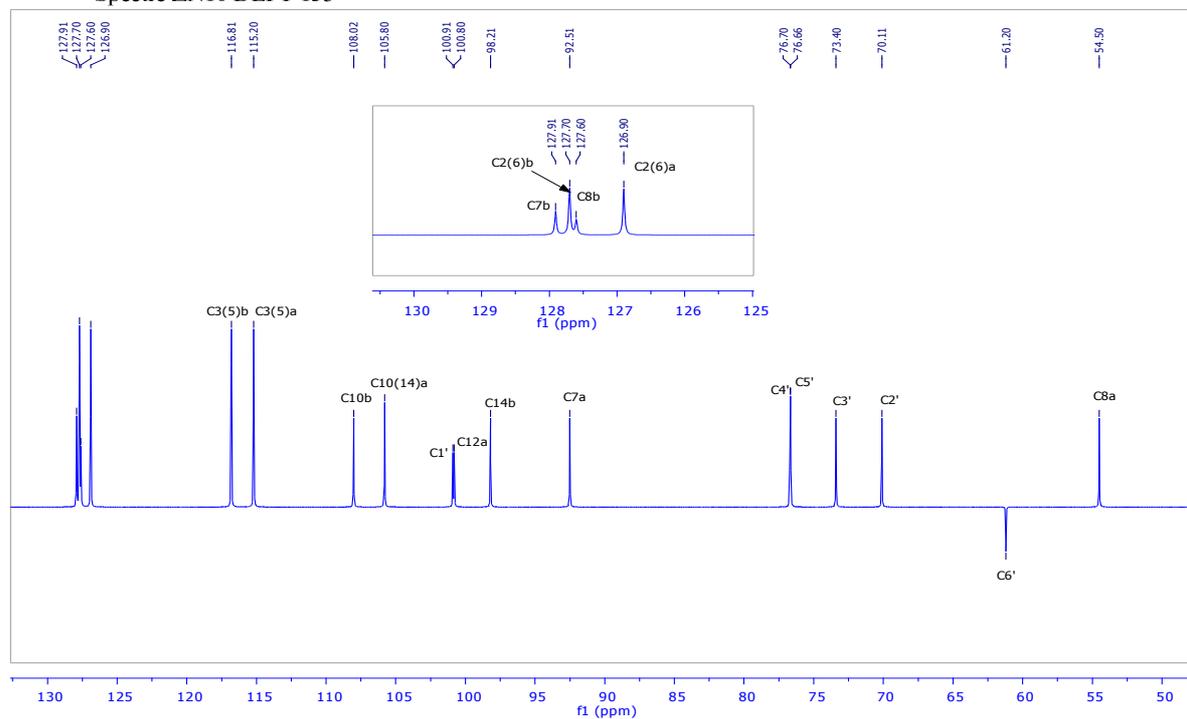


Figure 23 : Spectre DEPT 135 du composé (C)

D'après les deux spectres précédant le composé (C) présente cinq signaux de CH et un CH₂ dans la région des sucres indiquant la présence d'un pyranose. Nous pouvons l'identifier comme étant un glycopyranose grâce aux déplacements chimiques δ C 70.1, 73.4, 76.7 et 76.7 ppm pour, respectivement, les carbones C-2', C-3', C-4' et C-5'¹¹⁰. Le déplacement caractéristique du carbone C-1' (δ C 100.9 ppm) ainsi que le déplacement chimique du proton H-1 (δ H 4.9 ppm) et sa constante de couplage ($J = 7.3$ Hz) observés sur le spectre de RMN-1 H indiquent un anomérie β pour ce sucre.

Toutes les valeurs de protons et de carbones ont été attribuées d'après l'analyse des spectres de RMN 2D de corrélation homonucléaire COSY et hétéronucléaires HSQC et HMBC ainsi qu'en comparant ces données avec celles de la littérature¹¹¹.

L'expérience COSY H-H montre des couplages entre :

- le proton H-1' et le proton H-2'.
- le proton H-8a et le proton H-7a.
- le proton oléfinique H-7b et un autre proton oléfinique H-8b.
- le proton H-2(6b) et le proton H-3(5b).
- le proton anomère H-1' et le proton H-2'.

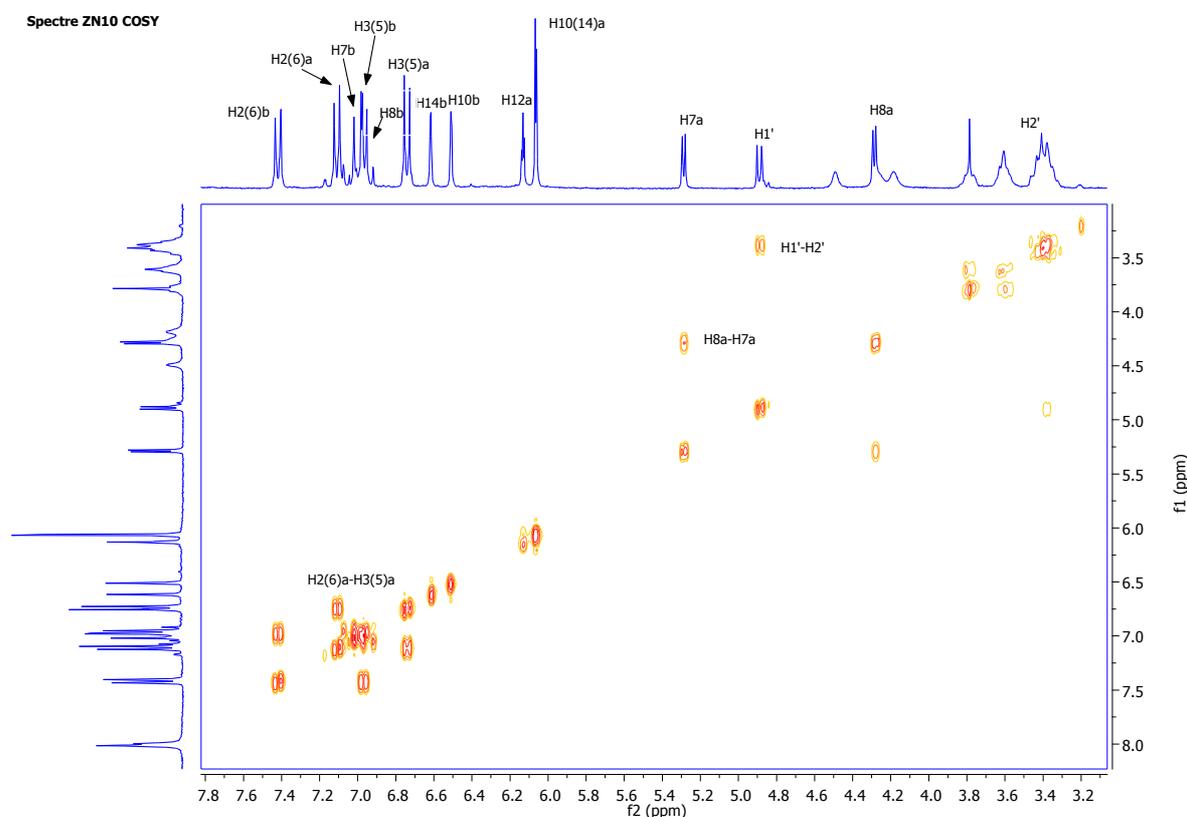


Figure 24 : Spectre COSY du composé (C)

L'expérience de corrélation directe carbone- proton ou HMQC (fig 25) montre les couplages entre :

- le proton H-8a et son carbone C-8a résonnant à 54.5ppm.
- les deux protons H-6 et leurs carbones C-6 résonnant à 61.2ppm.
- le proton H-2' et son carbone C-2' résonnant à 70.1ppm.
- le proton H-3' et son carbone C-3' résonnant à 73.4 ppm.

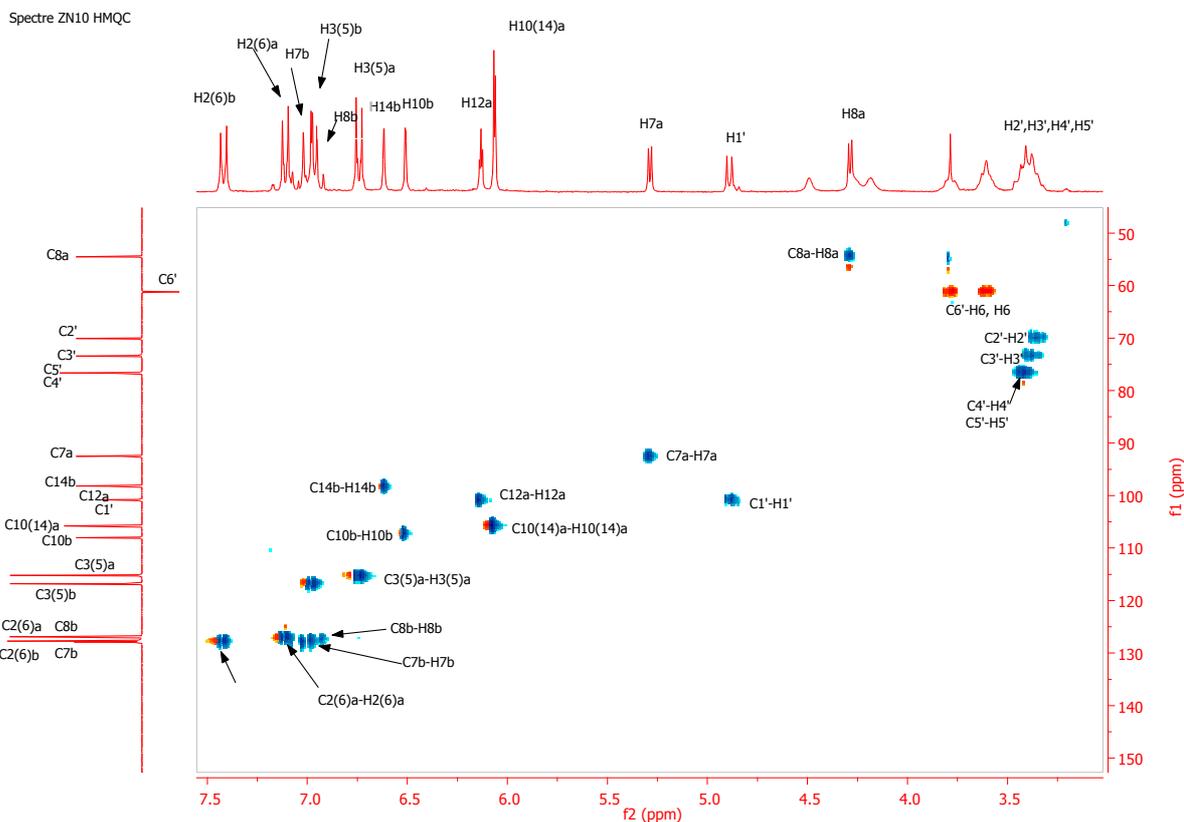


Figure 25 : Spectre HMQC du composé (C)

L'expérience HMBC (fig25) montre les couplages C-H à longue distance entre :

- le proton H-1' et des carbones résonnants à $\delta=70.1, 73.4, 76.7$ et 157.6 ppm correspondant respectivement aux carbones : C-2', C-3', C-5', et C-4b.
- le proton H-8a et les carbones résonnants à $\delta =92.5, 133, 105.8$ et 145.2 ppm correspondant respectivement aux carbones C-7a, C1a, C-10(14a) et C-9a.
- le proton H-7a et les carbones résonnants à $\delta =145.2, 133, 126.9$ et 145.2 ppm correspondant respectivement aux carbones C-8a, C1a, C-2(6)a et C-9a.
- le proton H-7b et les carbones résonnants à $\delta =140.1, 131.5$ ppm correspondant respectivement aux carbones C-1b, C-9b.
- le proton H-8b et les carbones résonnants à $\delta =140.1, 131.5$ ppm correspondant respectivement aux carbones C-1b, C-9b.

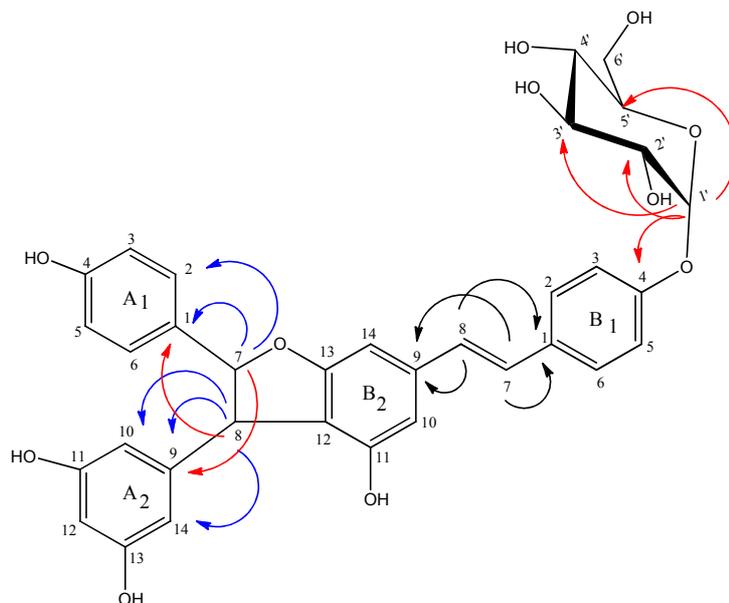


Figure 26 : corrélation à longue distance(HMBC) du composé C

Le site de glycosylation de glycopyranose sur notre dimère a été finalement déterminé grâce à la corrélation entre le proton anomérique du sucre et le carbone en position 4b du dimère (fig27).

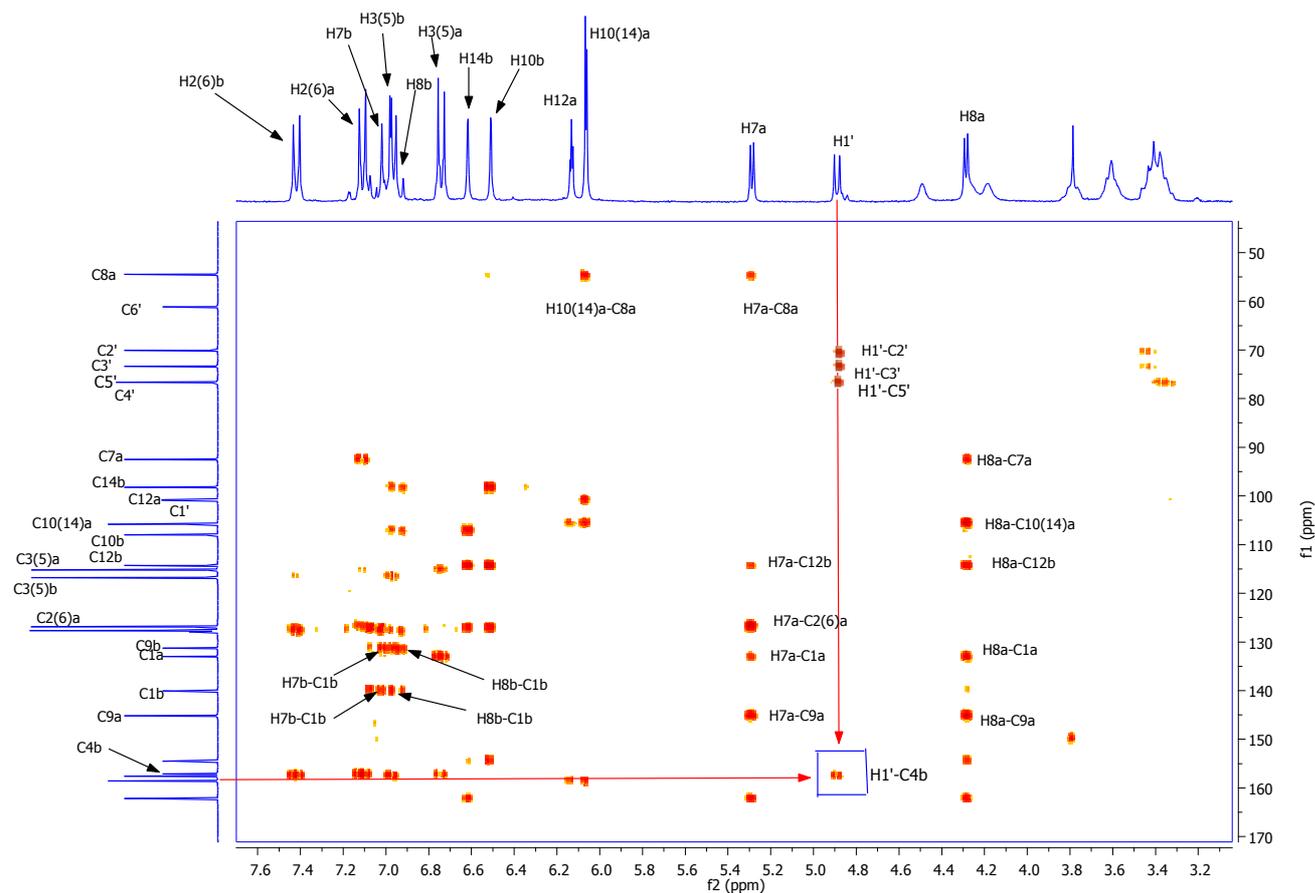
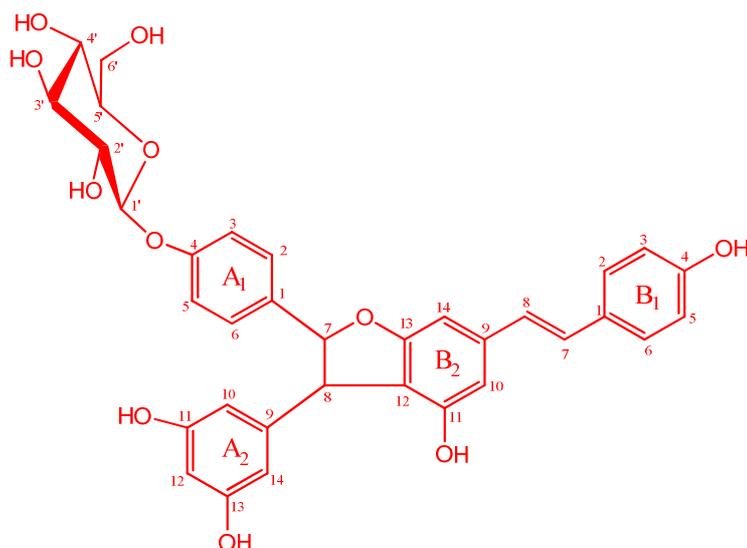


Figure 27 : Spectre HMBC du composé (C)

b) Etude de la structure du composé D



Composé (D)

Le composé **D** se présente d'une poudre blanche soluble dans le Methanol.

Le spectre 1 H-RMN nous suggère que ce composé appartient à la même classe des glucoside *trans* resvératrol.

Dans le spectre RMN-1H du composé **D** on observe deux protons aromatiques couplant entre eux avec la même constante de couplage formant deux doublets à 6.85 et 7.29 ppm ($J = 8.8$ Hz), 6.85 et 7.45 ppm ($J = 8.8$ Hz) pour le cycle (A1) et (B2) successivement, on observe aussi trois autres protons aromatiques qui forment un système AB₂ à 6.17 (2H, d, $J = 2.2$ Hz), 6.25 (1H, t, $d = 2.2$ Hz) pour le cycle aromatique (A2), deux autre protons aromatiques qui forme un système AB, couplé en position méta vers 6.60 (1H, d, $J = 1.1$ Hz) et à 6.72 (1H, d, $J = 1.1$ Hz), pour le cycle (B2) ainsi deux doublet correspondent au deux protons oléfiniques vers 6.97 (1H, d, $J = 16.5$ Hz, H-8b), 7.11 (1H, d, $J = 16.5$ Hz, H-7b), deux protons couplé entre eux du groupe méthyne à 4.38 (1H, d, $J = 4.7$ Hz, H-8a), 5.44 (1H, d, $J = 4.7$ Hz, H-7a), un signale à 4.97 ppm peut correspondre au proton anomérique du glycoside. Cinq autres signaux sont présents sur le spectre de RMN-H du composé **(D)** (fig28) et correspondent sans doute aux protons de la partie osidique.

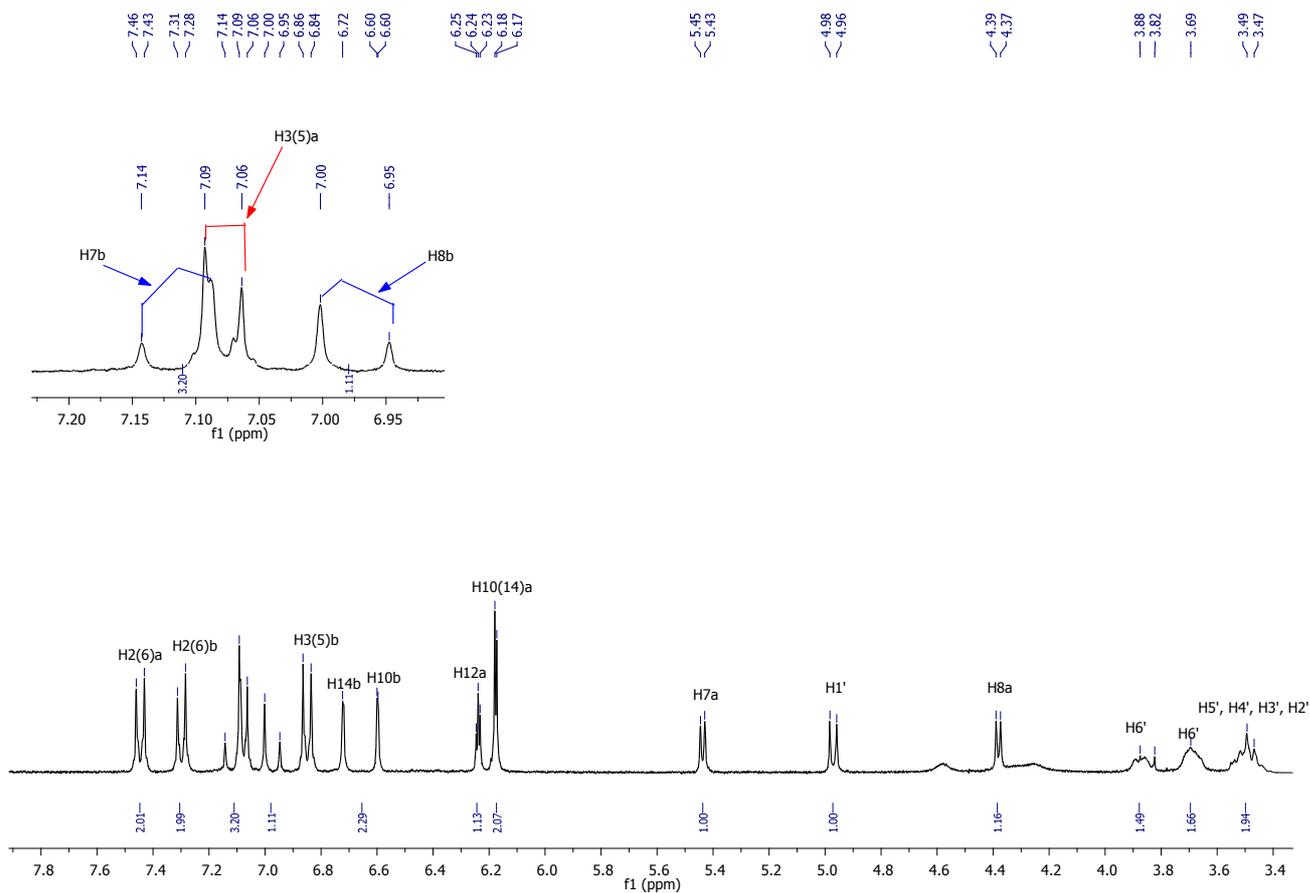


Figure 28 : Spectre $^1\text{H-RMN}$ du composé (D)

Le spectre de RMN-13C et le JMOD du composé (D) présente 29 signaux distincts. Parmi ceux-ci, nous distinguons onze carbones quaternaires et dix-sept CH aromatiques (fig29) et un CH_2 .

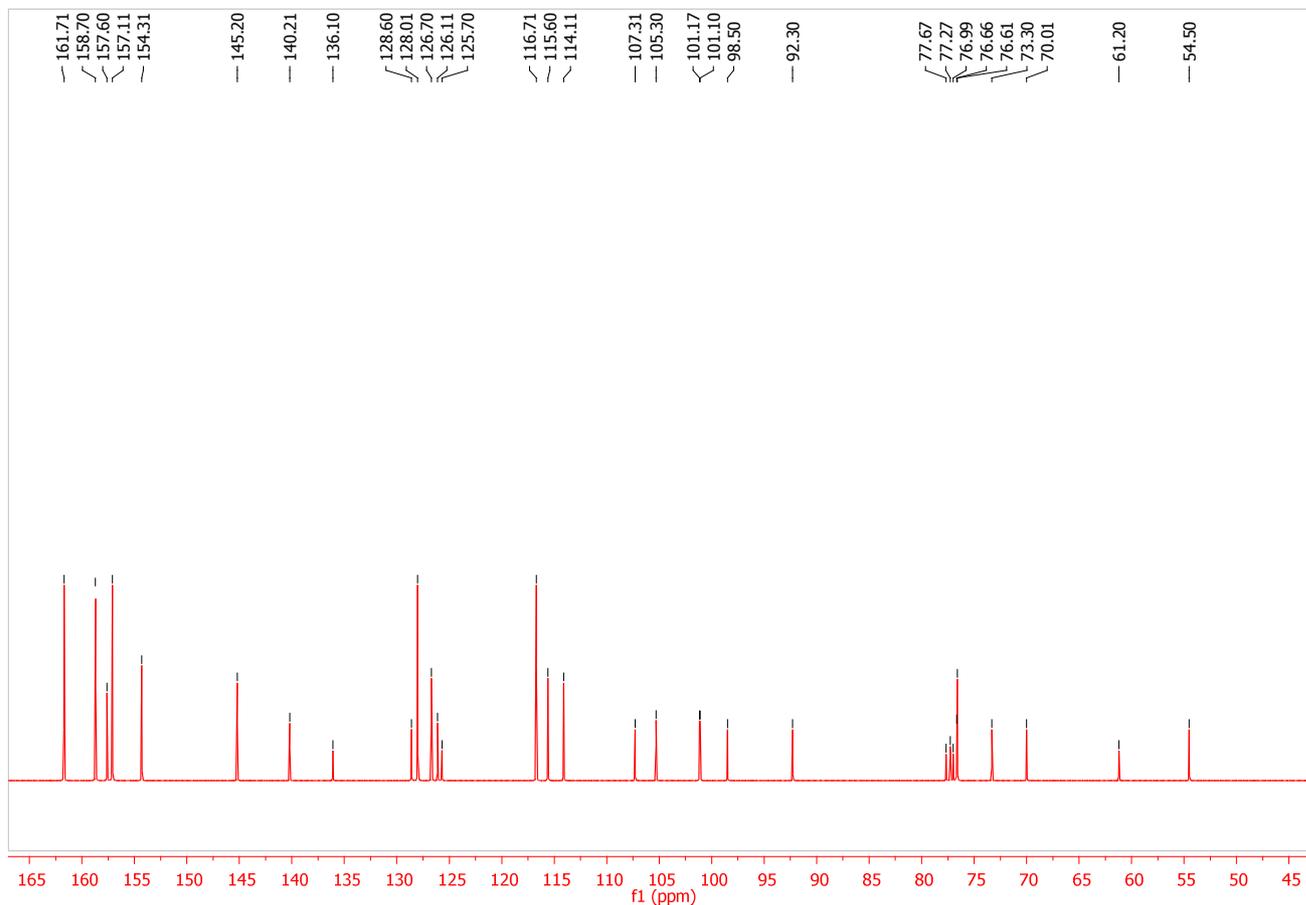


Figure 29 : Spectre ^{13}C -RMN du composé (D)

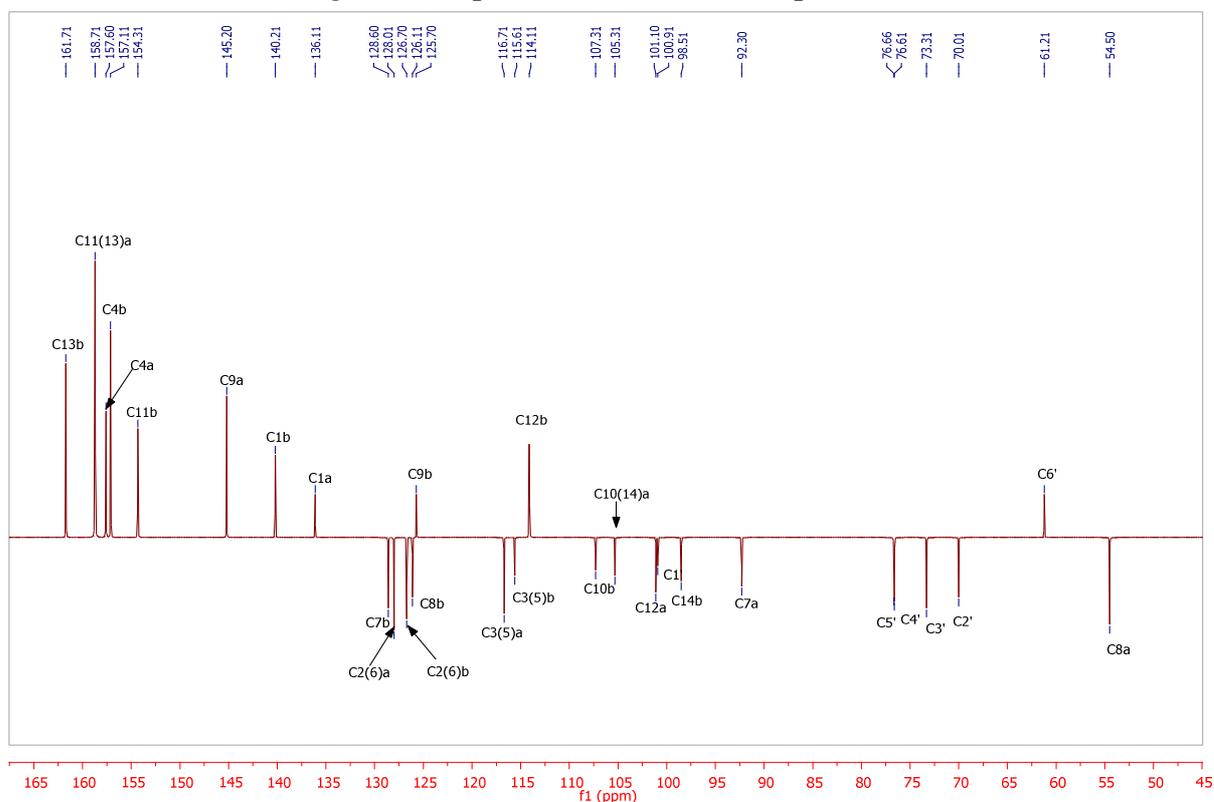


Figure 30 : Spectre JMOD du composé (D)

D'après les deux spectres précédant le composé (D) présente cinq signaux de CH et un CH_2 dans la région des sucres indiquant la présence d'un pyranose. Nous pouvons l'identifier

comme étant un glycopyranose grâce aux déplacements chimiques δ C 70.1, 73.4, 76.7 et 76.7 ppm pour, respectivement, les carbones C-2',C-3', C-4' et C-5'¹¹². Le déplacement caractéristique du carbone C-1' (δ C 100.9 ppm) ainsi que le déplacement chimique du proton H-1'' (δ H 4.97 ppm) et sa constante de couplage ($J = 7.4$ Hz) observés sur le spectre de RMN-1 H indiquent un anomérie β pour ce sucre.

Toutes les valeurs de protons et de carbones ont été attribuées d'après l'analyse des spectres de RMN 2D de corrélation homonucléaire COSY et hétéronucléaires HSQC et HMBC ainsi qu'en comparant ces données avec celles de la littérature¹¹³.

L'expérience COSY H-H (fig 31) montre des couplages entre :

- le proton H-1' et le proton H-2'.
- le proton H-8a et le proton H-7a.
- le proton H-6' et le proton H-6'.
- le proton oléfinique H-7b et un autre proton oléfinique H-8b.
- le proton H-2(6) b et le proton H-3(5) b.
- le proton H-2(6) a et le proton H-3(5) a.
- le proton anomère H-1' et le proton H-2'.

Spectre ZN11 COSY

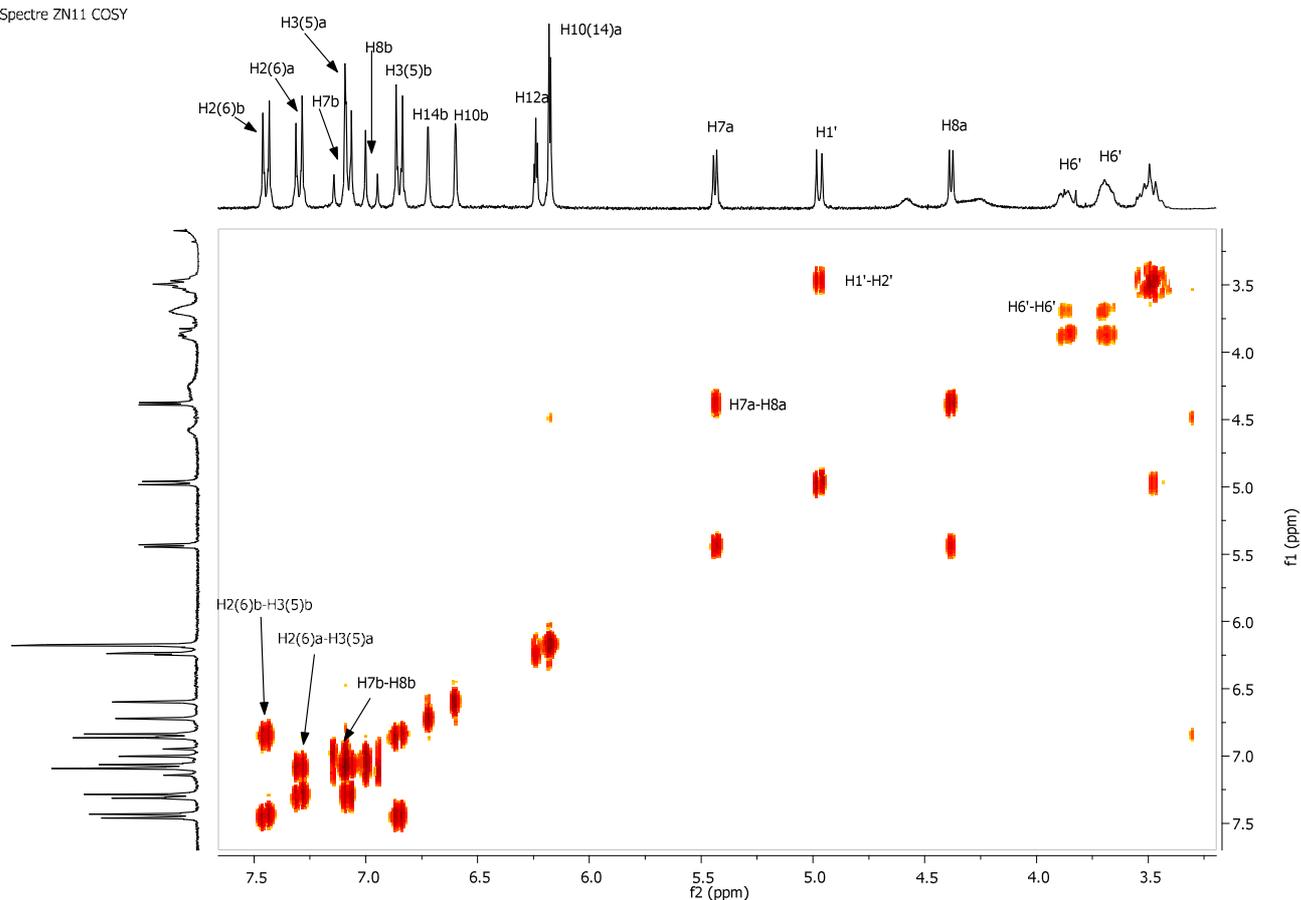


Figure 31 : Spectre COSY du composé (D)

L'expérience de corrélation directe carbone- proton ou HSQC (fig 31) montre les couplages entre :

- le proton H-8a et son carbone C-8a résonnant à 54.5ppm.
- les deux protons H-6 et leurs carbones C-6 résonnant à 61.2ppm.
- le proton H-2' et son carbone C-2' résonnant à 70.0ppm.
- le proton H-3' et son carbone C-3' résonnant à 73.3 ppm.
- proton H-7a et son carbone C-7a résonnant à 92.3ppm.
-

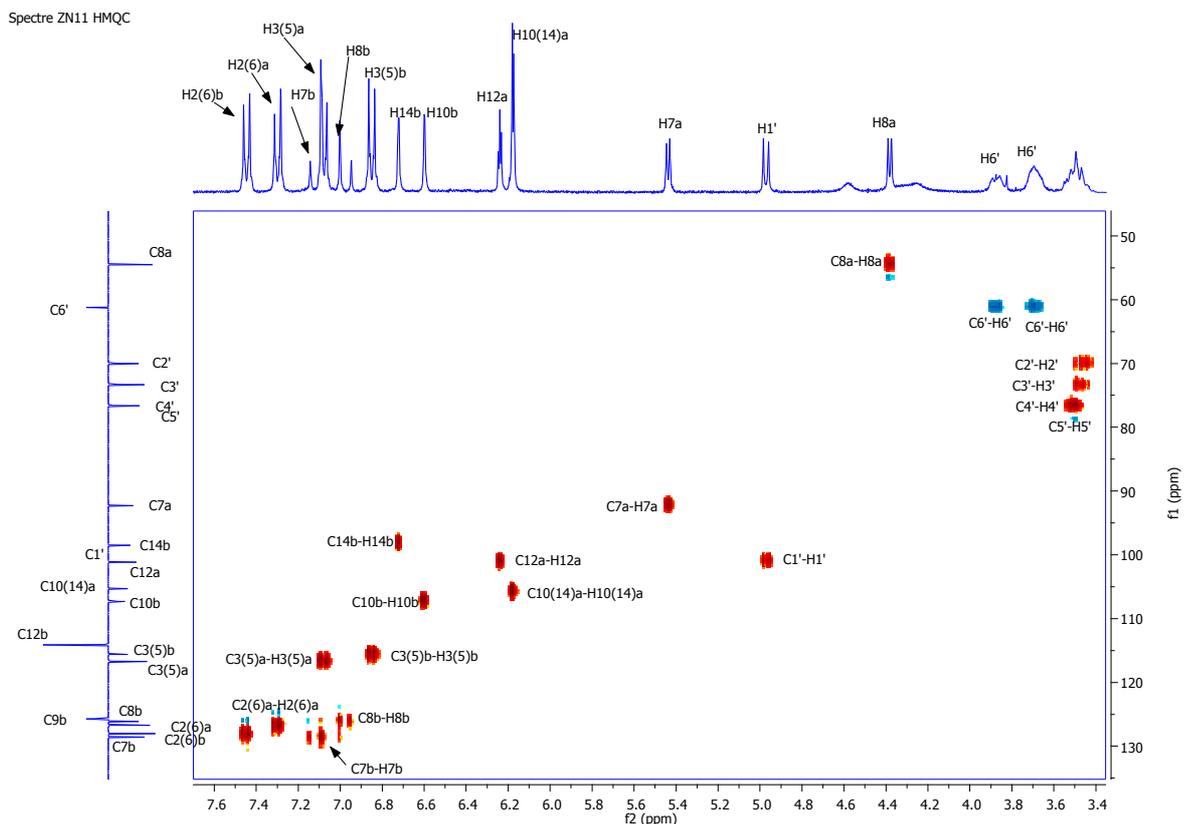


Figure 32 : Spectre HMQC du composé (D)

L'expérience HMBC (fig34) montre les couplages C-H à longue distance entre :

- le proton H-1' et des carbones résonnants à $\delta=70.0, 73.3, 76.6$ et 157.6 ppm correspondant respectivement aux carbones : C-2', C-3', C-5', et C-4a.
- le proton H-8a et les carbones résonnants à $\delta =92.5, 105.8, 136.1$ et 145.2 ppm correspondant respectivement aux carbones C-7a, C-10(14a), C1a et C-9a.
- le proton H-7a et les carbones résonnants à $\delta =54.5, 92.3, 126.7, 136.1$ et 145.2 ppm correspondant respectivement aux carbones C-8a, C-7a, C-2(6)a, C1a et C-9a.
- le proton H-7b et les carbones résonnants à $\delta =140.2, 125.7$ ppm correspondant respectivement aux carbones C-1b, C-9b.
- le proton H-8b et les carbones résonnants à $\delta =140.2, 125.7$ ppm correspondant respectivement aux carbones C-1b, C-9b.

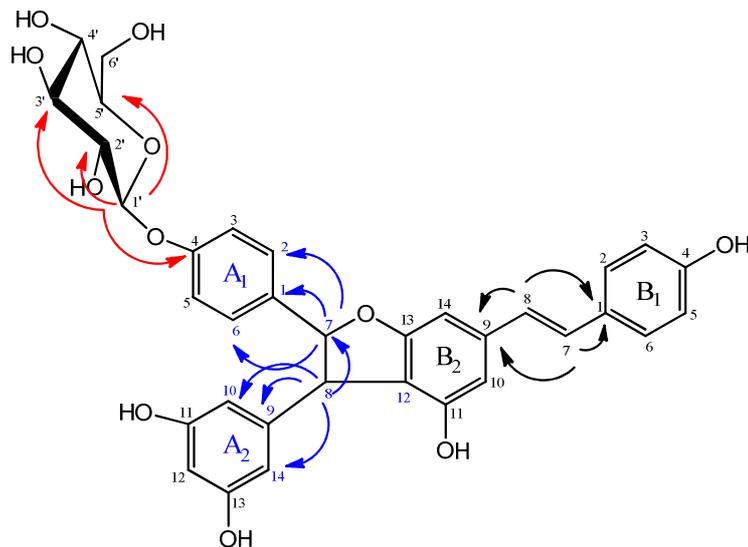


Figure 33 : corrélation à longue distance(HMBC) du composé D

Le site de glycosylation de glycopyranose sur notre dimère a été finalement déterminé grâce à la corrélation entre le proton anomérique du sucre et le carbone en position 4a du dimère (fig34).

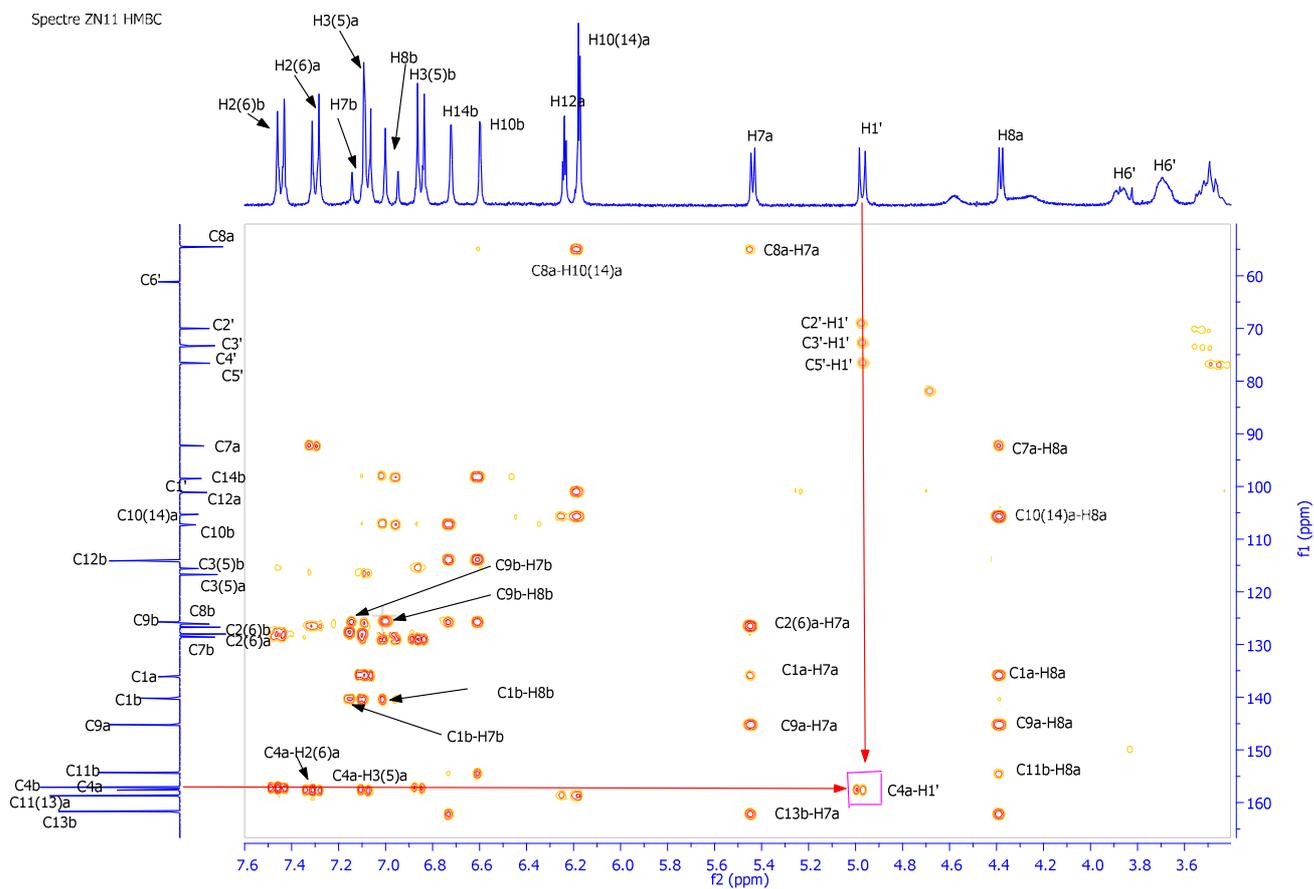
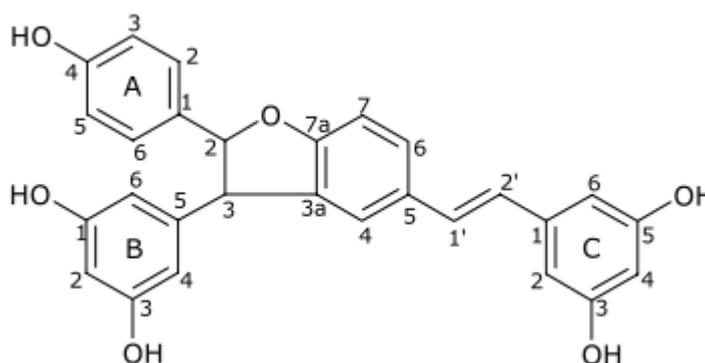


Figure 34 : Spectre HMBC du composé (D)

V 2- A. 3. Détermination structurale du composé K :

Resvératrol trans-déhydrodimère



Composé (K)

Ce composé a été synthétisé pour la première fois par P. Langcake en 1977¹¹². Sa structure fut par la suite confirmée par A.-C. Breuil en 1998¹¹³ voir tableau (fig35).

Le spectre ¹H-RMN montre un système aromatique complexe entre 6,0 et 7,4 ppm, correspondant à 15 protons, dont deux appartiennent à un système oléfinique.

Grâce à leur constante de couplage de 16,2 Hz (H-2' et H-1'), on peut déduire la présence d'une double liaison trans.

Nous pouvons observer un couplage AA'BB', présent sous la forme de doublets de doublets avec des constantes de couplage de 8,5 et 2,0 Hz, à 7,16 et 6,77 ppm (H-2,6A et H-3,5A).

Deux systèmes doublet/triplet avec une constante de couplage de 2,2 Hz, correspondant à 6 hydrogènes, nous font suggérer un double système aromatique ortho/para.

Les signaux à 7,37, 7,17 et 6,84 ppm (H-6, H-4, H-7) nous indiquent la présence d'un cycle aromatique trisubstitué. Le proton à 7,37 ppm est couplé au proton à 6,77 ppm avec une constante de couplage de 8,2 Hz, (couplage ortho sur le noyau benzénique). Il est aussi faiblement couplé (J 3 = 1,6 Hz) avec le proton à 7,17 ppm, indiquant que ces hydrogènes sont en méta l'un de l'autre.

Deux autres hydrogènes, avec des constantes de couplage identiques (8,3 Hz), ont des déplacements chimiques un peu trop faibles pour appartenir à un système aromatique, mais suffisants pour être placé près d'un centre électronégatif, comme par exemple l'oxygène. Ceci est confirmé par le spectre HETCOR qui montre deux signaux couplés à 94,94/5,38 ppm et 58,00/4,39 ppm n'appartenant pas à un système aromatique (C-2 et C-3). Ceci permet de suggérer la présence d'un éther cyclique, reliant les différents systèmes entre eux.

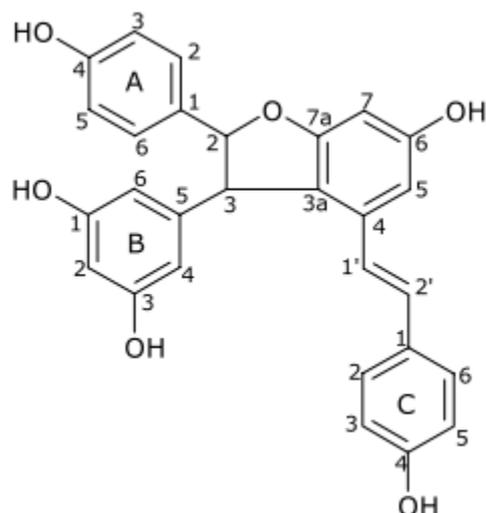
Figure 35 : Comparaison des données spectroscopiques RMN- H et RMN-13C du composé K avec A. C.

Breuil¹¹³

Protons	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm) ⁶⁴
2	5.38 (1H, d, J=8.4 Hz)	5.49 (1H, d, J=8.0 Hz)
3	4.39 (1H, d, J=8.3 Hz)	4.49 (1H, d, J=8.0 Hz)
4	7.17 (1H, s)	7.28 (1H, brs)
6	7.37 (1H, dd, J=8.2 et 1.6 Hz)	7.45 (1H, dd, J=8.3 et 1.5 Hz)
7	6.84 (1H, d, J=8.3 Hz)	6.89 (1H, d, J=8.4 Hz)
1'	6.96 (1H, d, J=16.2 Hz)	7.08 (1H, d, J=16.2 Hz)
2'	6.78 (1H, d, J=16.2 Hz)	6.92 (1H, d, J=16.4 Hz)
2,6A	7.16 (2H, dd, J=8.5 et 2.0 Hz)	7.26 (2H, d, J=8.7 Hz)
3,5A	6.77 (2H, dd, J=8.6 et 2.0 Hz)	6.87 (2H, d, J=8.8 Hz)
4,6B	6.12 (2H, d, J=2.2 Hz)	6.21 (2H, d, J=2.0 Hz)
2B	6.18 (1H, t, J=2.2 Hz)	6.30 (1H, J=2.1 Hz)
2,6C	6.42 (2H, d, J=2.2 Hz)	6.55 (2H, d, J=2.1 Hz)
4C	6.13 (1H, t, J=2.2 Hz)	6.28 (1H, t, J=2.1 Hz)

Carbones	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ⁶⁴
2	94.94	93.57
3	58.00	57.15
3a	132.87 ou 132.43 ou 132.37	131.26 ou 131.67 ou 132.05
4	124.18	123.44
5	132.87 ou 132.43 ou 132.37	131.26 ou 131.67 ou 132.05
6	128.68	128.14
7	110.38	109.86
7a	161.05	160.13
1'	129.39	128.60
2'	127.48	126.70
1A	132.87 ou 132.43 ou 132.37	131.26 ou 131.67 ou 132.05
2,6A	128.68	128.09
3,5A	116.34	115.62
4A	158.77	157.88
1,3B	159.98	159.22
2B	102.5	101.79
4,6B	107.75	106.86
5B	145.39	144.73
1C	141.19	140.28
2,6C	105.82	105.15
3,5C	159.67	159.00
4C	102.74	102.12

V. 2- A. 4. Détermination structurale du composé L : L' ϵ -Viniférine



Composé (L)

Ce composé a pour la première fois été isolé de *Vitis vinifera* en 1977 par P. Langcake¹¹⁴ Il a ensuite à nouveau été isolé de la vigne par W.-W. Li en 1996¹¹⁵ et de *Gnetum parvifolium* en 1992 par M. Lin¹¹⁶ voir tableau (fig36).

Le spectre ¹H-RMN nous suggère que ce composé appartient à la même classe que le resvératrol trans-déhydrodimère. Nous observons un seul système ortho/para à 6.18 et 6.16 ppm (H-2B et H-4,6B), correspondant à 3 hydrogènes. Les signaux à 6.82 et 6.57 ppm, avec un couplage de 16.3 Hz, nous indiquent la présence d'une double liaison trans.

Nous pouvons observer la présence de deux systèmes AA'BB', indiquant une substitution para sur les cycles aromatiques (H-2,6A-3,5A et H-2,6C-3,5C).

Deux hydrogènes, représentés par des doublets à 5.36 et 4.34 ppm avec une même constante de couplage de 6.6 Hz, nous indiquent un système central semblable au resvératrol trans-déhydrodimère (H-2 et H-3).

Les signaux à 6.63 et 6.24 ppm apparaissent sous la forme de doublets avec une constante de couplage de 1.9 Hz, correspondant à un couplage méta (H-5, H-7).

Le spectre ¹³C-RMN montre plusieurs carbones très déblindés pouvant être attribués à des phénols. Nous pouvons en conclure que la structure est très proche du resvératrol trans-déhydrodimère, mais avec des variations au niveau des substituants aromatiques.

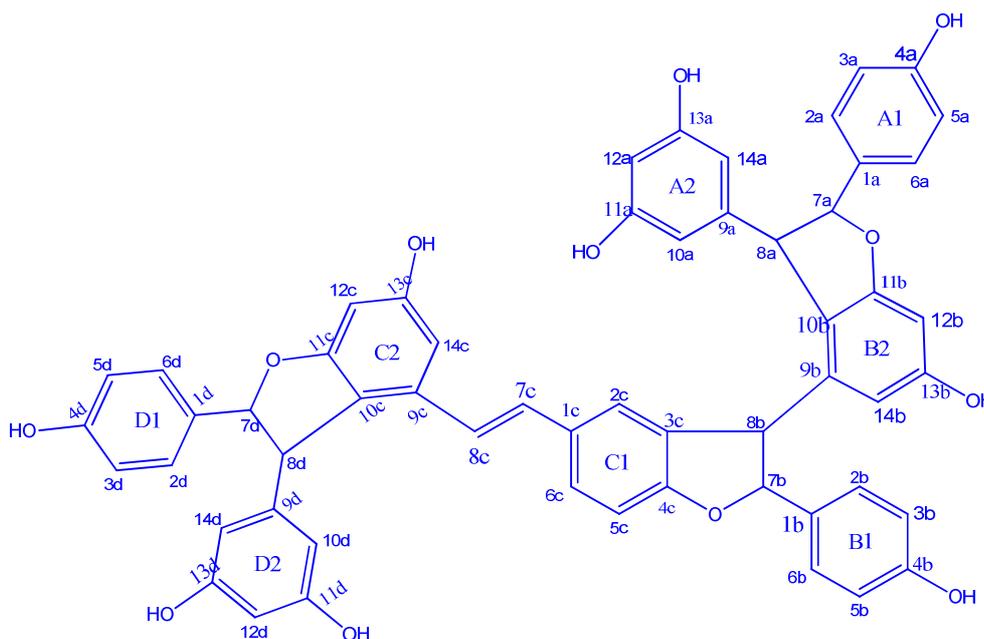
Figure 36 : Comparaison des données spectroscopiques H-RMN et ¹³C-RMN du composé L avec A. C. Breuil¹¹³

Protons	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm) ¹⁶⁵
2	5.36 (1H, d, J=6.6 Hz)	5.42 (1H, d, J=5.5 Hz)
3	4.34 (1H, d, J=6.6 Hz)	4.45 (1H, d, J=5.5 Hz)
5	6.63 (1H, d, J=1.9 Hz)	6.70 (1H, d, J=2.0 Hz)
7	6.24 (1H, d, J=1.9 Hz)	6.32 (1H, d, J=2.0 Hz)
1'	6.82 (1H, d, J=16.3 Hz)	6.89 (1H, d, J=16.0 Hz)
2'	6.57 (1H, d, J=16.4 Hz)	6.67 (1H, d, J=16.0 Hz)
2,6A	7.14 (2H, dd, J=8.5 et 1.8 Hz)	7.19 (2H, dd, J=8.5 et 2.0 Hz)
3,5A	6.76 (2H, dd, J=8.6 et 1.8 Hz)	6.83 (2H, dd, J=8.5 et 2.0 Hz)
4,6B	6.16 (2H, d, J=2.2)	6.24 (2H)
2B	6.18 (1H, t, H-2B)	6.25 (1H)
2,6C	7.03 (2H, dd, J=8.6 et 1.8 Hz)	7.16 (2H, dd, J=8.6 et 2.0 Hz)
3,5C	6.64 (2H, dd, J=8.6 et 1.8 Hz)	6.74 (2H, dd, J=8.6 et 2.0 Hz)

Carbones	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ¹⁶⁵
2	93.94	93.7
3	57.34	57.2
3a	118.66	119.7
4	135.97	136.4
5	103.52	104.2
6	159.49	159.5
7	95.98	96.7
7a	161.73	162.4
1'	129.35	130.1
2'	122.25	123.5
1A	132.36	133.8
2,6A	127.19	127.8
3,5A	115.66	116.1
4A	159.08 ou 158.57	158.2
1,3B	159.65	159.6
2B	101.60	102.0
4,6B	106.45	106.9
5B	146.36	147.3
1C	128.54	129.8
2,6C	127.76	128.6
3,5C	115.97	116.2
4C	159.08 ou 158.57	158.2

Grâce à ces données spectroscopiques, nous pouvons conclure que ces composés sont bien ceux présentés par P. Langcake en 1977 ^{112,114}.

V. 2- A. 5. Détermination structurale du composé **M** : la *Vitisin C*



Composé (**M**)

L'analyse des spectres de la RMN du composé **M** montre qu'ils sont semblables aux données Correspondrait à la vitisine C décrite dans la littérature voir tableau¹¹⁷ (fig 43), le composé **M** serait un analogue de la vitisine C.

Dans le spectre RMN-1H (fig 37) du composé **M** on observe trois séries de deux protons aromatiques couplant entre eux avec la même constante de couplage formant deux doublets à 7.19 et 6.82 ppm ($J=8.6\text{Hz}$) typique d'un couplage en ortho sur le cycle aromatique (D1), vers 7.25, 6.90 ppm ($J=8.5\text{ Hz}$) pour le cycle (A1) et vers 6.58, 6.62 ppm pour le cycle (B1). On observe aussi trois autres protons aromatiques qui forment un système AB_2 à 6.13 (2H, d, $J= 2.1\text{ Hz}$), 6.25 (1H, t, $J= 2.1\text{ Hz}$) et à 6.21 (2H, br, s), 6.19 (1H, d, $J= 2.1\text{ Hz}$) pour le cycle aromatique (D2) et (A2), ainsi deux doublet qui caractérisent les deux protons oléfiniques trans vers 6.63(1H, d, $J=16.4\text{Hz}$, H-8c), 6.76(1H, d, $J=16.4\text{Hz}$, H-7c), on observe aussi deux autres protons aromatiques qui forme un système AB, couplé en position méta vers 6.66 (1H, d= 2.06 Hz) et à 6.32 (1H, d, $J= 2.06\text{ Hz}$), 6.66 (1H, d= 2.06 Hz) 6.19(2H, d, $J=2.1\text{Hz}$), pour le cycle (C2) et (B2), en revanche les trois protons présent sur le cycle (C1) trisubstitué résonnent à 7.17 (1H, dd, $J= 8.3, J=1.5\text{ Hz}$), 6.85 (1H, d, $J= 1.6\text{ Hz}$), 6.76 (1H, d, $J= 8.2\text{ Hz}$) et enfin on trouve les trois groupes méthynes qui sont couplée entre eux à 4.31 (1 H, d, $J= 4.7\text{ Hz}$, H-8b), 5.5 (1 H, d, $J= 4.7\text{ Hz}$, H-7b), 4.45 (1 H, d, $J= 5.4\text{ Hz}$, H-8a), 5.42 (1 H, d, $J= 5.4\text{ Hz}$, H-7a), 4.53 (1 H, d, $J= 4.6\text{ Hz}$, H-8d), 5.42 (1 H, d, $J= 4.5\text{ Hz}$, H7d),

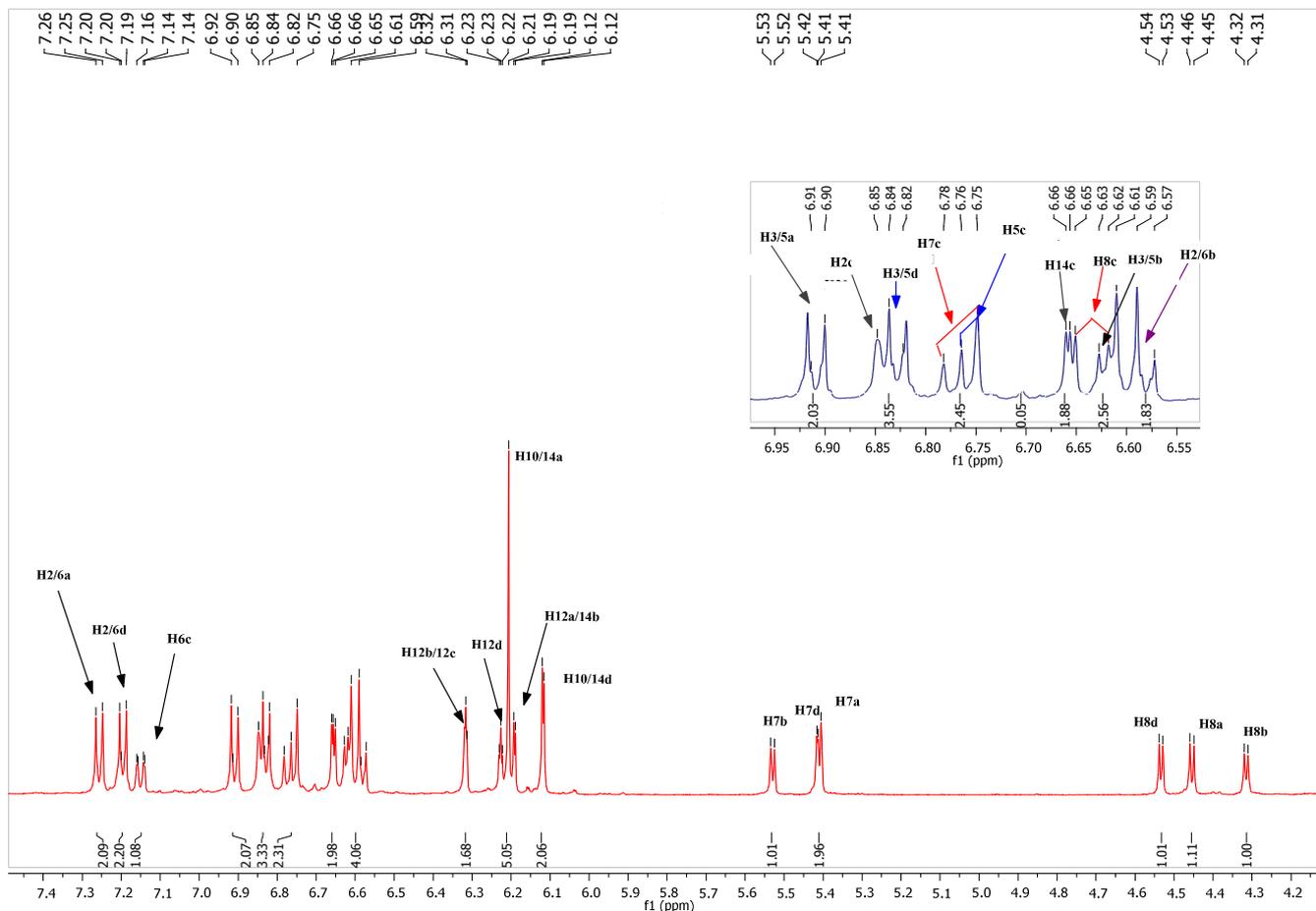


Figure 37 : Spectre $^1\text{H-RMN}$ de la vitisin C

L'étude du spectre JMOD du composé (M) apporte des informations complémentaires en affichant quarante et huit signaux (fig38). Nous observons dix huit carbones quaternaires aromatiques ainsi que vingt et neuf CH aromatiques et deux CH oléfiniques.

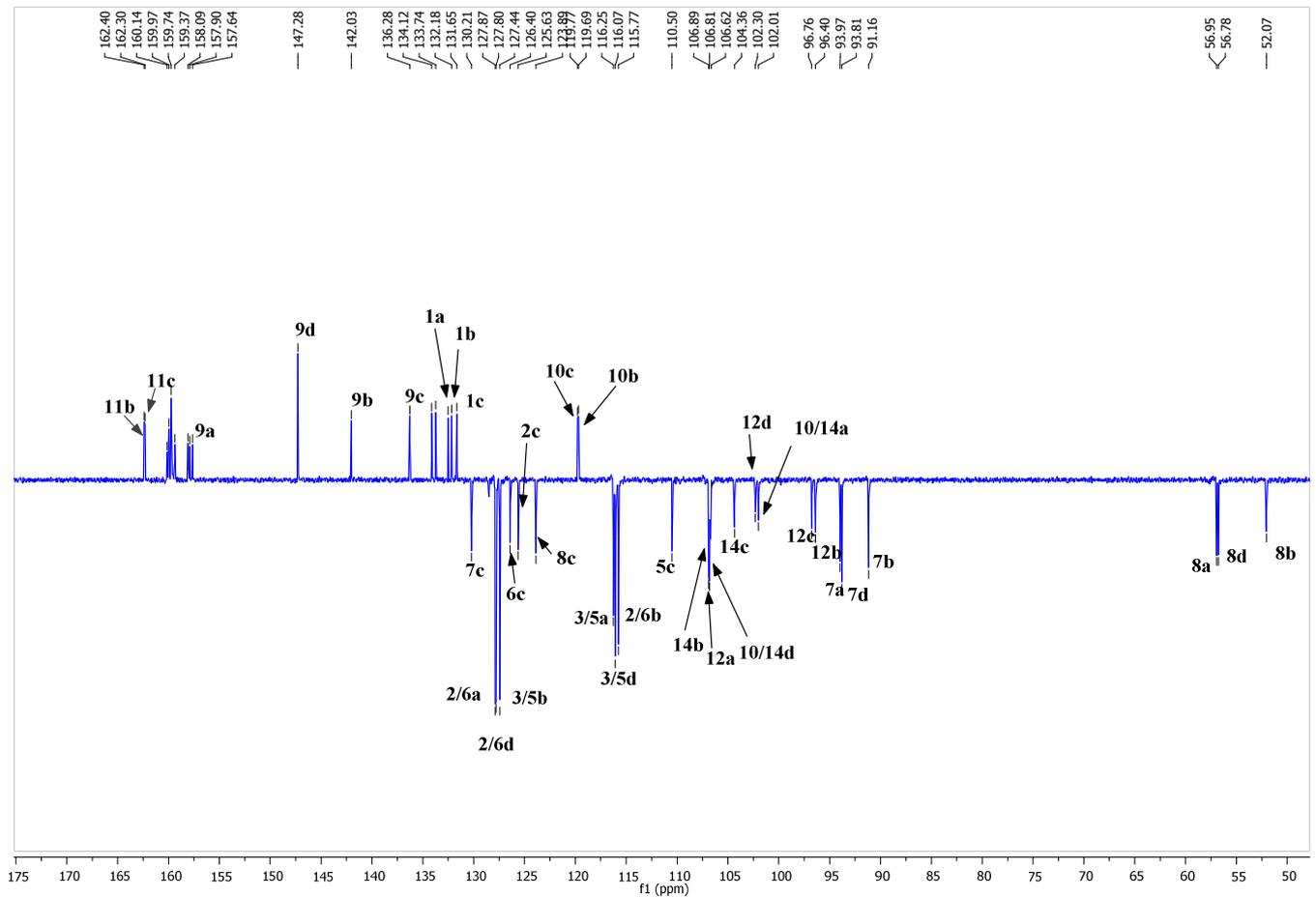


Figure38 : Spectre ^{13}C -RMN de la Vitisin C

Toutes les valeurs de protons et de carbones ont été attribuées d'après l'analyse des spectres de RMN 2D de corrélation homonucléaire COSY et hétéronucléaires HSQC et HMBC.

Dans le spectre COSY on observe des corrélations entre protons oléfinique H-8c /H-7c, entre H-7a/H-8a, H-7b/H-8b, H-7d/H-8d et entre les défèrent proton aromatique tel que on observe des corrélations entre H-2(6)a/H-3(5)a, H-2(6)d/H-3(5)d, H-6c/H-5c. Voir (fig39).

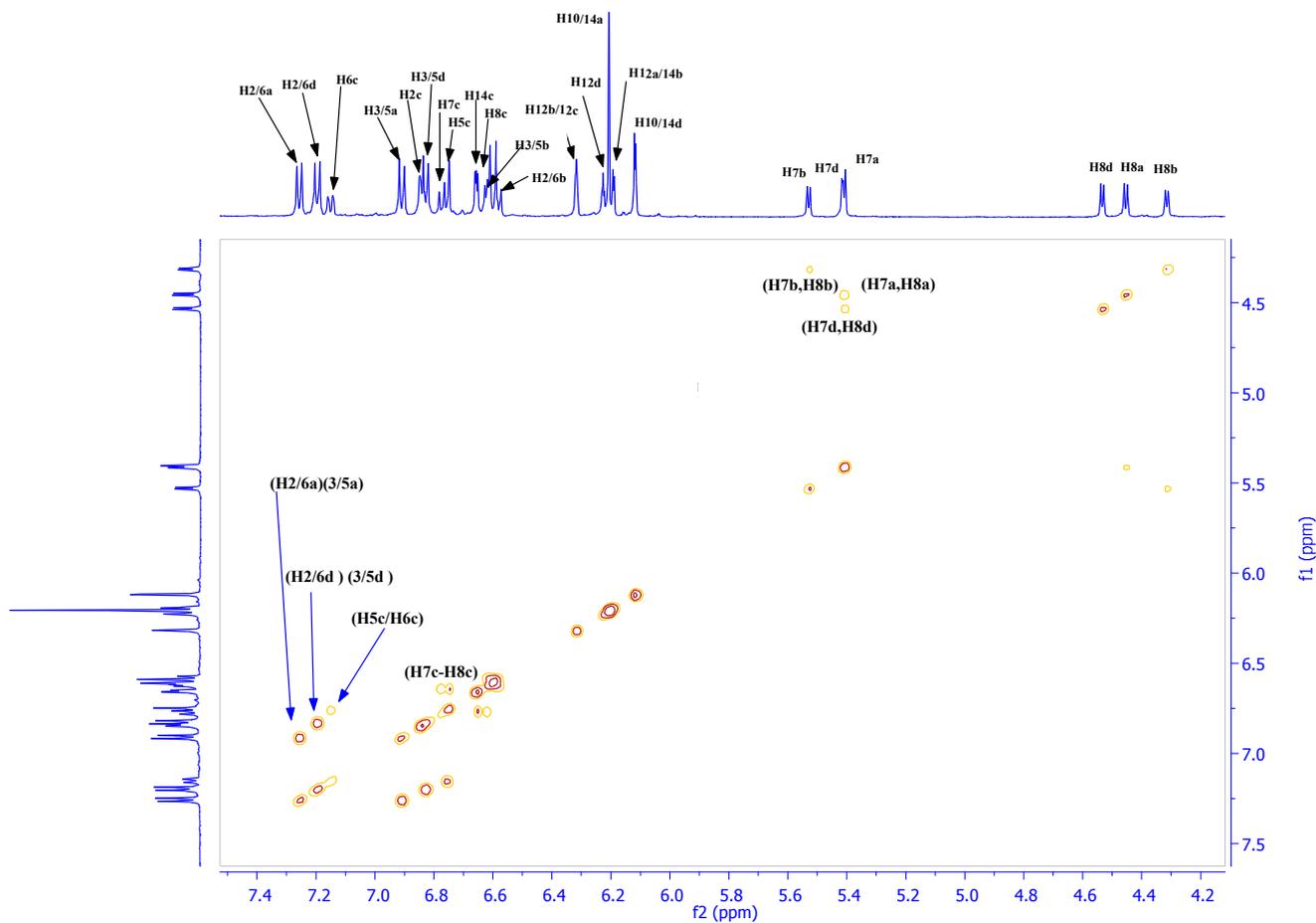


Figure39 : Spectre COSY de la Vitisin C

L'expérience HMBC (fig 41) montrant les couplages à longue distance permet l'attribution des signaux des carbones suivants :

C-2 (6)d/H-7d, C-10(14)d/H-8d, C-2(6)b/H-7b, C-10b/H-8b, C-2(6)a/H-7a, C-14b/H-8b C-10(14a)/H-8a, C-10c/H-7d, C-10b/ H-7a.

Les deux protons oléfiniques montre des taches de corrélation avec les carbones aromatiques adjacents H-8c/C-10(14)c, H-7c/C-2(6)c, H-8c/C-9c, H-7c/C-1c.

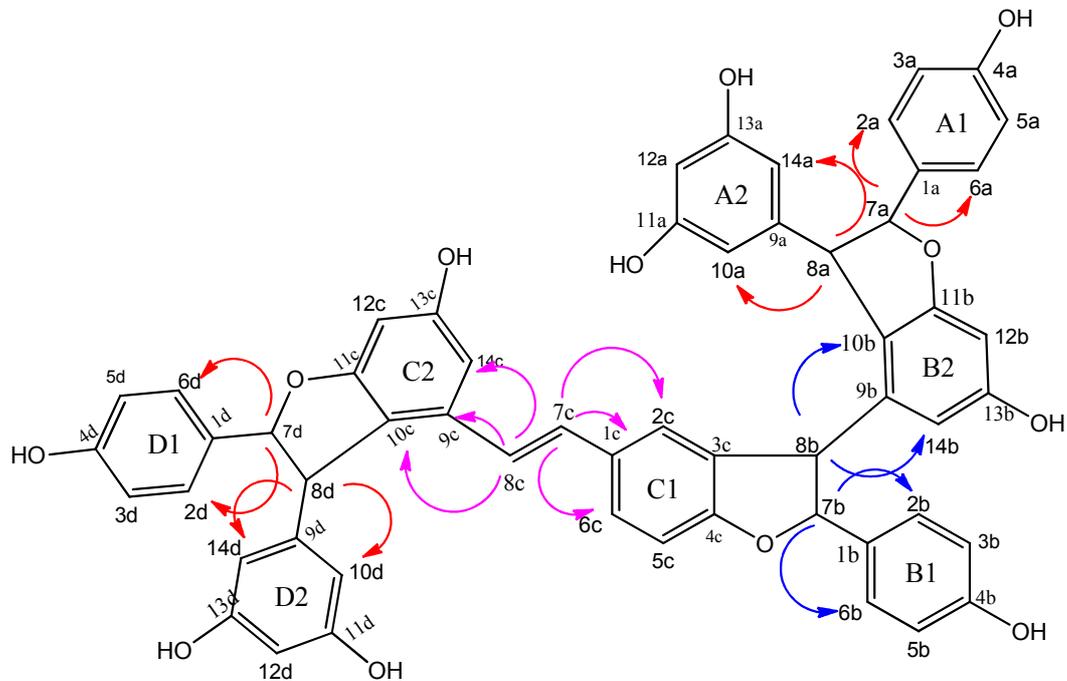


Figure 40 : corrélation à longue distance(HMBC)du composé C

Spectre ZN17 HMBC Tétramère

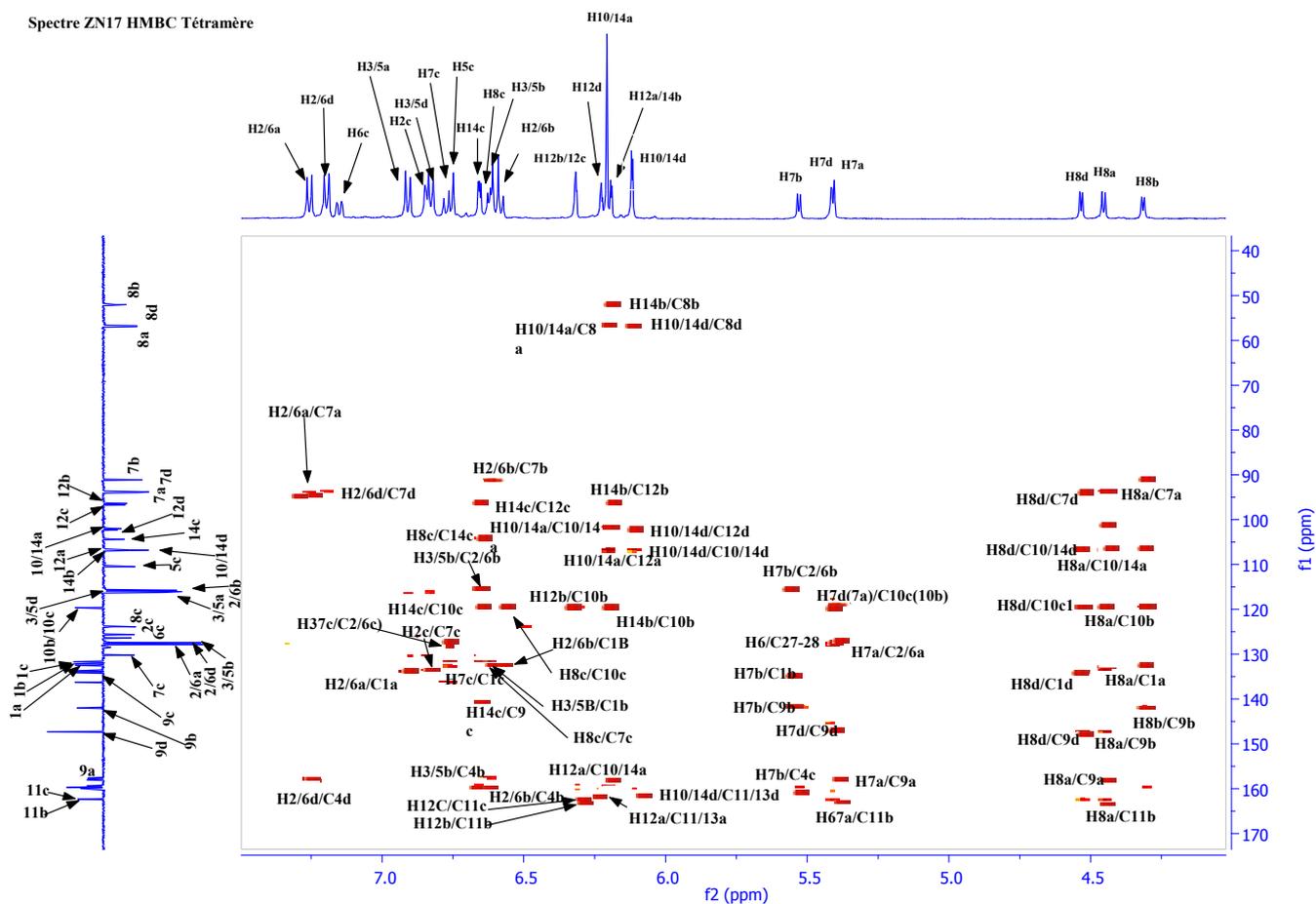


Figure 41 : Spectre HMBC de la Vitisin C

L'expérience de corrélation directe carbone- proton ou HSQC (fig 42) montre les couplages entre :

- le proton H-8b et son carbone C-8b résonnant à 52.07ppm.
- le proton H-8a et son carbone C-8a résonnant à 56.95ppm.
- le proton H-8d et son carbone C-8d résonnant à 56.78ppm.
- le proton H-7a et son carbone C-7a résonnant à 93.97ppm.
- le proton H-7d et son carbone C-7d résonnant à 93.81 ppm.
- le proton H-7b et son carbone C-7b résonnant à 91.16 ppm
- le proton H-8c et son carbone C-8c résonnant à 123.89 ppm.
- le proton H-7c et son carbone C-7c résonnant à 125.63 ppm.

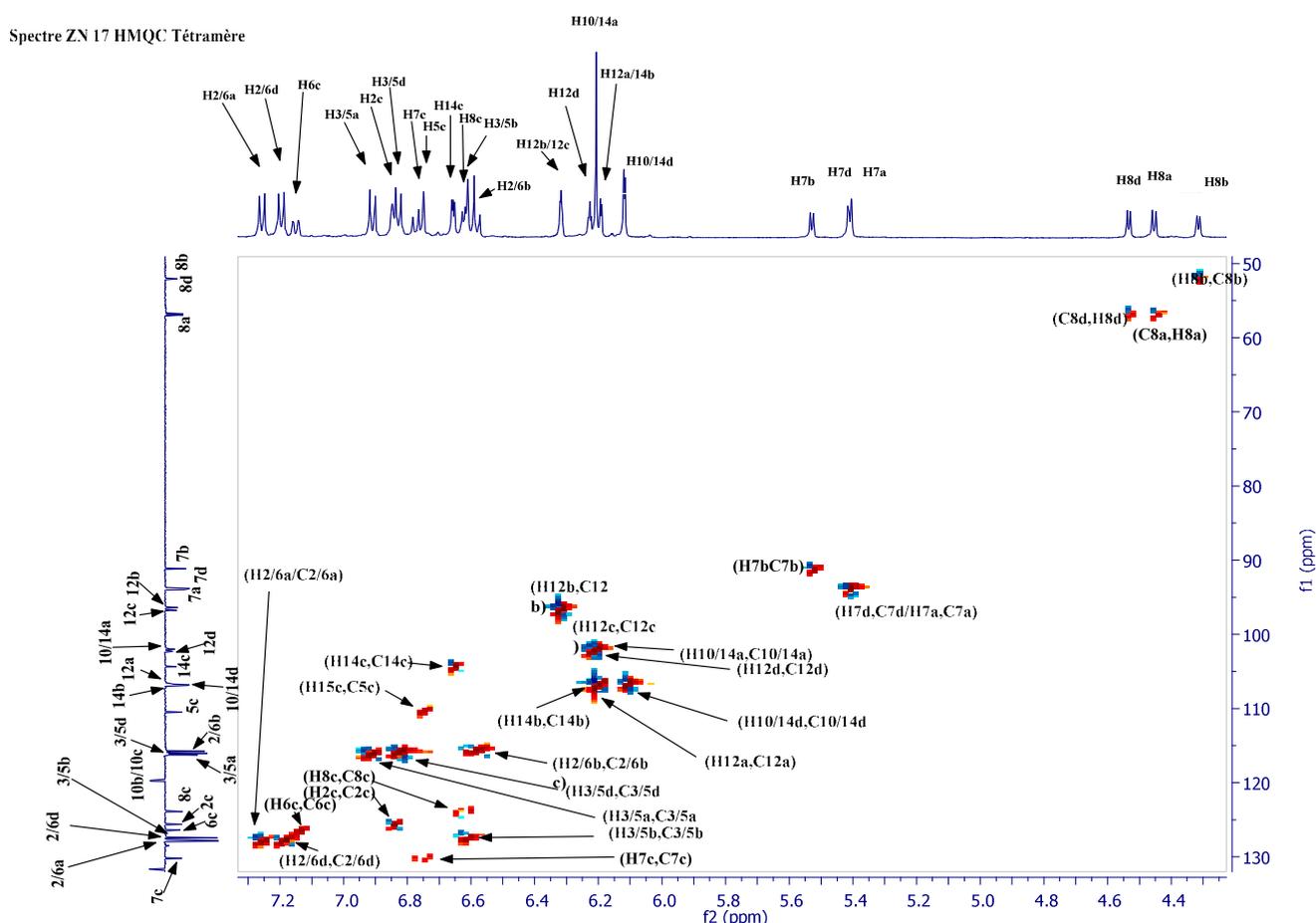
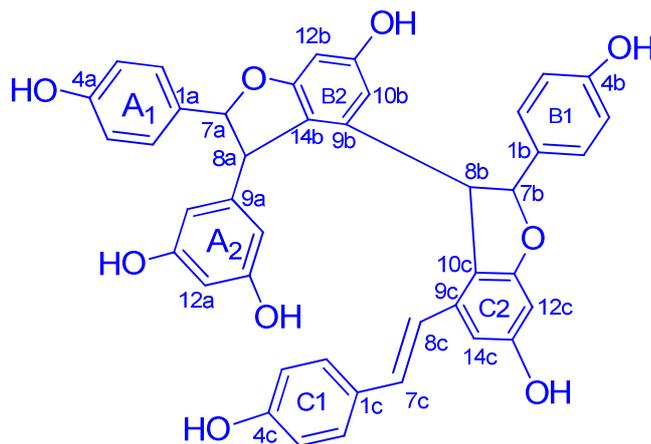


Figure 42 : Spectre HMQC de la Vitisin C

Figure 43 : Comparaison des données spectroscopiques H-RMN et ^{13}C -RMN de la Vitisin C avec A. C. Breuil¹¹⁷

		Vitisin C				Données de Junko et al ⁴	
	δ H (ppm)	J (HZ)	δ^{13} C (ppm)		δ H (ppm)	J (HZ)	δ^{13} C (ppm)
1a			132.18				133.9
2a,6a	7.25d	8.5	127.87		7.13d	8.4	128.2
3a,5a	6.90d	8.5	116.25		6.76d	8.4	116.3
4a			142.03				158.5
7a	5.42d	5.4	93.97		5.36d	6.2	94.8
8a	4.45d	5.4	56.95		4.33d	6.2	58.2
9a			157.64				147.2
10a,14a	6.21br		102.01		6.14d	1.5	107.5
11a,13a			159.37				160.0
12a	6.19d	2.1	106.81		6.13t	1.5	102.3
1b			132.18				132.7
2b,6b	6.58d	8.5	115.77		6.58d	8.8	127.8
3b,5b	6.62d	8.5	127.44		6.52d	8.8	116.0
4b			159.37				158.0
7b	5.54d	4.7	91.16		5.42d	5.1	92.2
8b	4.31d	4.7	52.07		4.25d	5.1	53.0
9b			142.03				142.5
10b			119.69				120.0
11b			162.40				162.7
12b	6.66d	2.06	96.40		6.28d	2.2	96.7
13b			158.09				160.5
14b	6.19d	2.1	106.89		6.09d	2.2	107.5
1c			130.21				132.7
2c	6.85d	1.6	125.63		6.65d	1.8	125.5
3c			133.74				132.3
4c			160.14				160.2
5c	6.75d	8.2	110.50		6.68d	8.4	110.7
6c	7.17dd	8.3, 1.5	126.40		6.98dd	8.4, 1.8	126.8
7c	6.76d	16.4	130.21		6.50d	16.5	124.2
8c	6.63d	16.4	123.89		6.68d	16.5	130.5
9c			136.78				136.8
10c			119.77				120.1
11c			162.30				162.8
12c	6.66d	2.06	96.76		6.24d	1.8	96.9
13c			159.97				159.6
14c	6.32d	2.06	104.36		6.58d	1.8	104.6
1d			134.12				134.6
2d,6d	7.19d	8.6	127.80		7.18d	8.4	127.8
3d,5d	6.90d	8.6	116.07		6.52d	8.4	116.5
4d			157.90				158.3
7d	5.42d	4.5	93.81		5.33d	4.8	94.7
8d	4.53d	4.6	56.78		4.36d	4.8	57.9
9d			147.78				147.7
10d,14d	6.13d	2.1	106.62		5.98d	2.2	107.0
11d,13d			159.97				160.1
12d	6.25t	2.1	102.30		6.06t	2.2	102.5

V. 2- A. 6. Détermination structurale du composé N :



Composé (N)

Nos données RMN voir tableau (fig 49) ont été comparées avec celles de S. De Marino et al¹¹⁸ qui ont identifié pour la première fois le trimère de resvératrol dans les racines du genre *Foeniculum vulgare*.

Dans le spectre RMN-¹H (fig 44) du composé N on observe trois séries de deux protons aromatiques qui forment un système A₂B₂ couplant entre eux avec la même constante de couplage formant deux doublets à 7.18 [2H, d, J=8.8 Hz, H-2a(6a)] et 6.80 ppm [2H, d, J=8.8 Hz, H-3a(5a)] typique d'un couplage en méta sur le cycle aromatique (A1), vers 7.25 [2H, d, J=8.8 Hz, H-2b(6b)], 6.80[2H, d, J=8.8 Hz, H-2b(6b)] pour le cycle (B1) et vers 7.24[2H, d, J=8.8 Hz, H-2c(6c)], 6.85 [2H, d, J=8.8 Hz, H-3c(5c)] pour le cycle (C1). On observe aussi trois autres protons aromatiques qui forment un système A₂B pour le cycle trisubstitué 1,3,5(A2) à 6.26[1H, t, J=2.4 Hz, H-12a] , 6.22 [2H, d, J=2.4 Hz, H-10a(14a)] , deux autres protons aromatiques forment un système AB, couple en position méta pour le cycle (B2) vers 6.38 (1H, br , s, H-10b), 6.16 (1H, br , s, H-12b) et 6.28 (1H, br , s, H-12c), 6.65 (1H, br , s, H-14c) pour le cycle (C2), ainsi deux doublets qui caractérisent les deux protons oléfiniques trans vers 6.94(1H, d, J=16.16Hz, H-7c), 6.79 (1H, d, J=16.16Hz, H-8c), et enfin on trouve les deux groupes méthynes qui sont couplés entre eux à 5.42 (1 H, d, J= 5.4 Hz, H-7a), 4.35 (1 H, d, J= 5.4 Hz, H-8a), 5.52 (1 H, d, J= 4.9 Hz, H-7b), 4.61 (1 H, d, J= 4.9 Hz, H-8b).

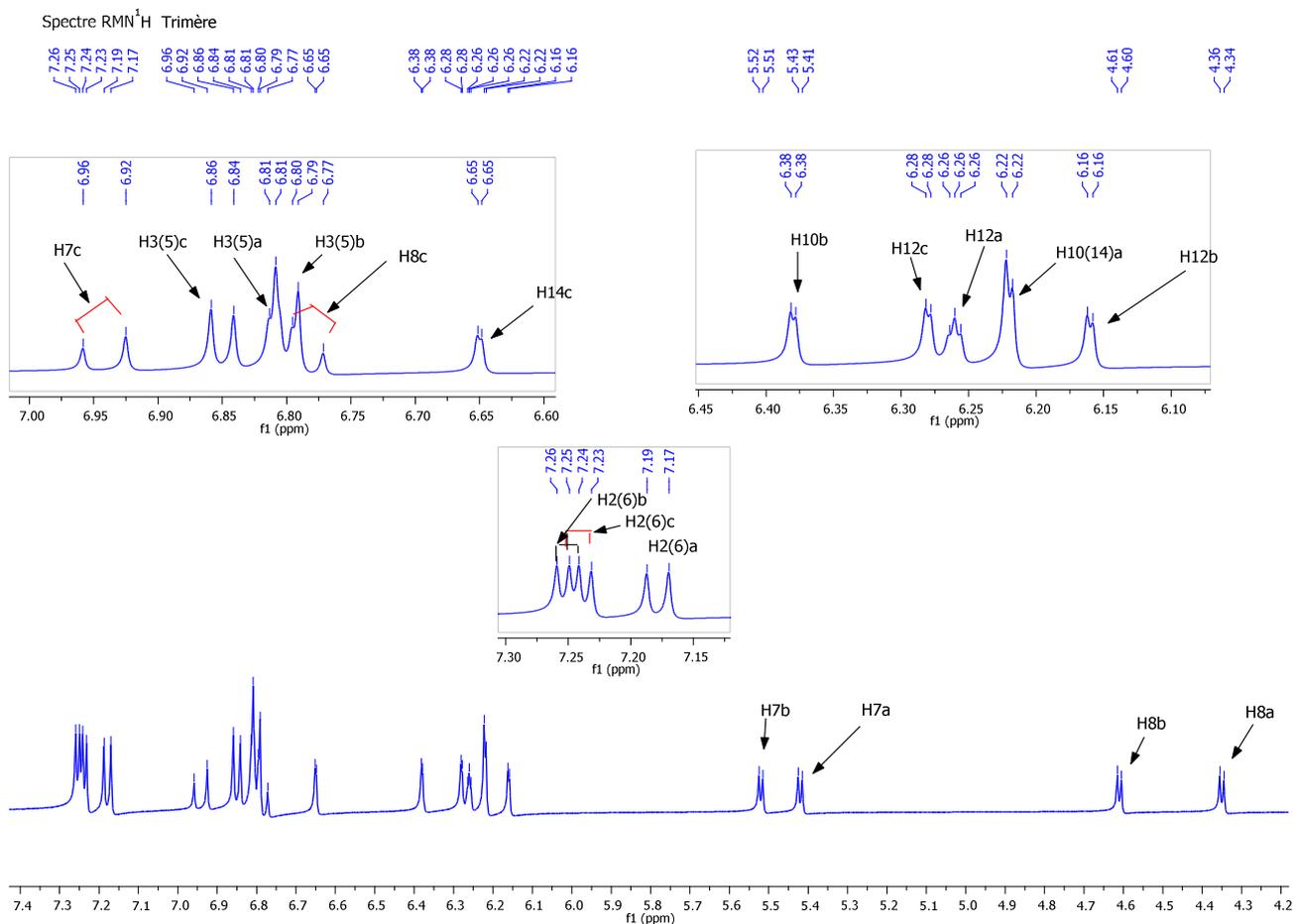


Figure 44 : spectre ¹H-RMN du Trimère resvératrol

L'étude du spectre JMOD et ¹³C du composé **N** apporte des informations complémentaires en affichant quarante et deux signaux (fig45).

Nous observons quinze carbones quaternaires aromatiques ainsi que vingt et cinq CH aromatiques et deux CH oléfinique.

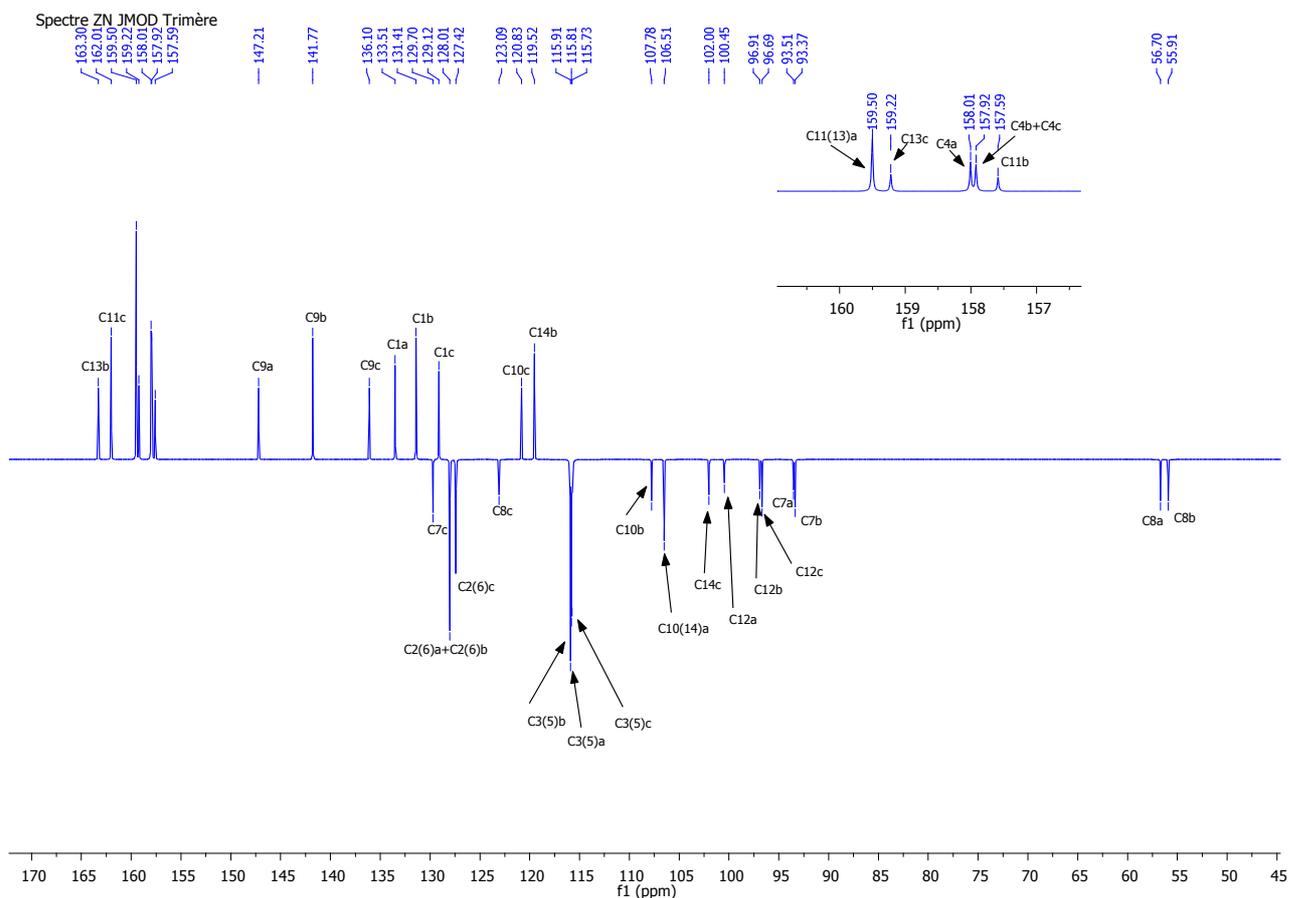


Figure 45 : Spectre JMOD du Trimère resvératrol

Toutes les valeurs de protons et de carbones ont été attribuées d'après l'analyse des spectres de RMN 2D de corrélation homonucléaire COSY et hétéronucléaires HSQC et HMBC.

Dans le spectre COSY on observe des corrélations entre protons oléfinique H-7c /H-8c, entre H-8a/H-7a, H-8b/H-7b, et entre les défient proton aromatique tel que on observe des corrélations entre H-2(6)b/H-3(5)b, H-3(5)a/H-12(6)a, H-2(6)c/H-3(5)c. voir (fig46).

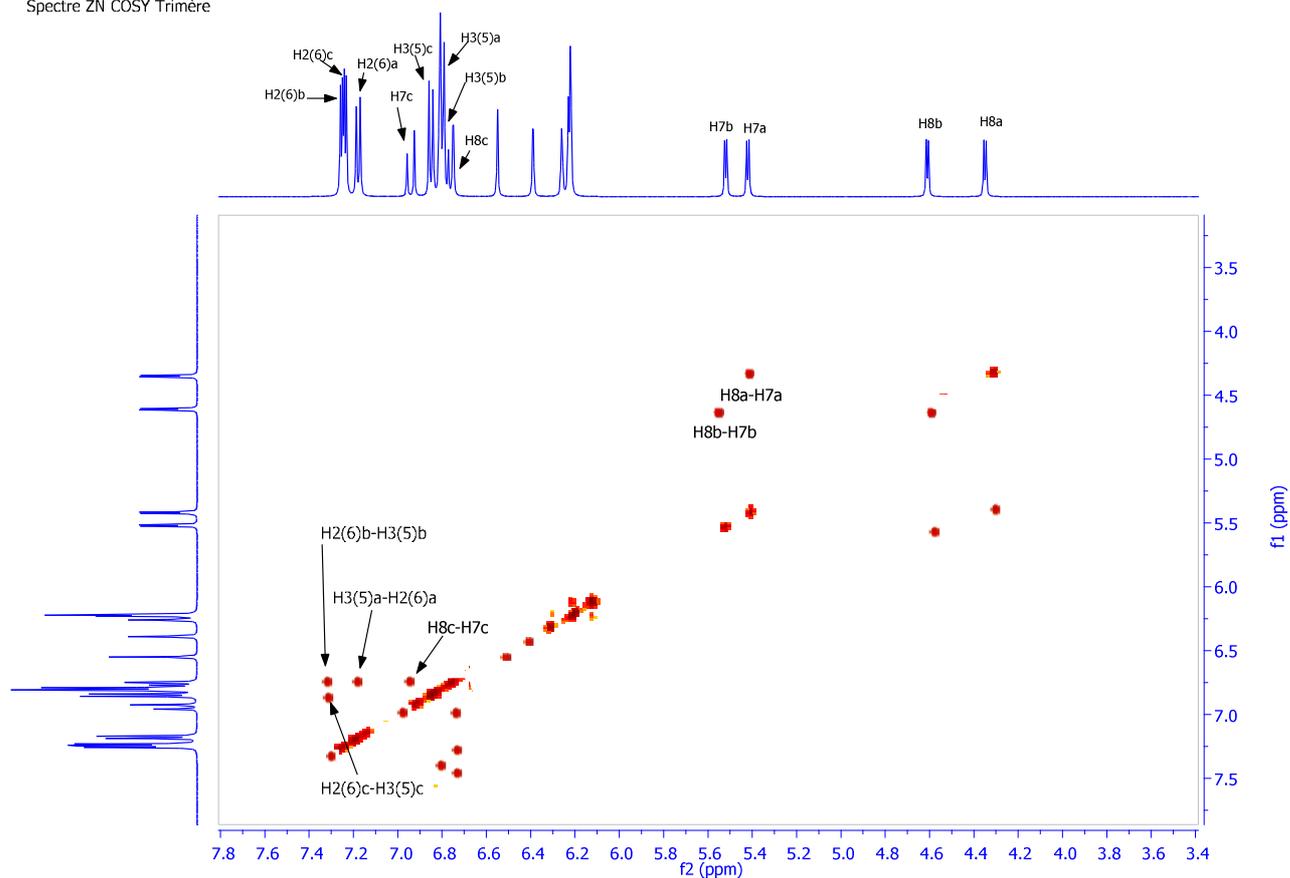


Figure 46 : Spectre COSY du Trimère resvératrol

L'expérience HMBC (fig47) montrant les couplages à longue distance permet l'attribution des signaux des carbones suivants : C-2(6) a /H-7a, C-10(14) a/H-8a, C-10(14) b /H-8b, C-2(6) b/H-7b, C-9b /H-8b.

Les deux protons oléfiniques montrent des taches de corrélation avec les carbones aromatiques adjacents H-7c/C-2(6)c, H-7c/C-1c, H-8c/ C-10(14)c, H-8c/C-9c.

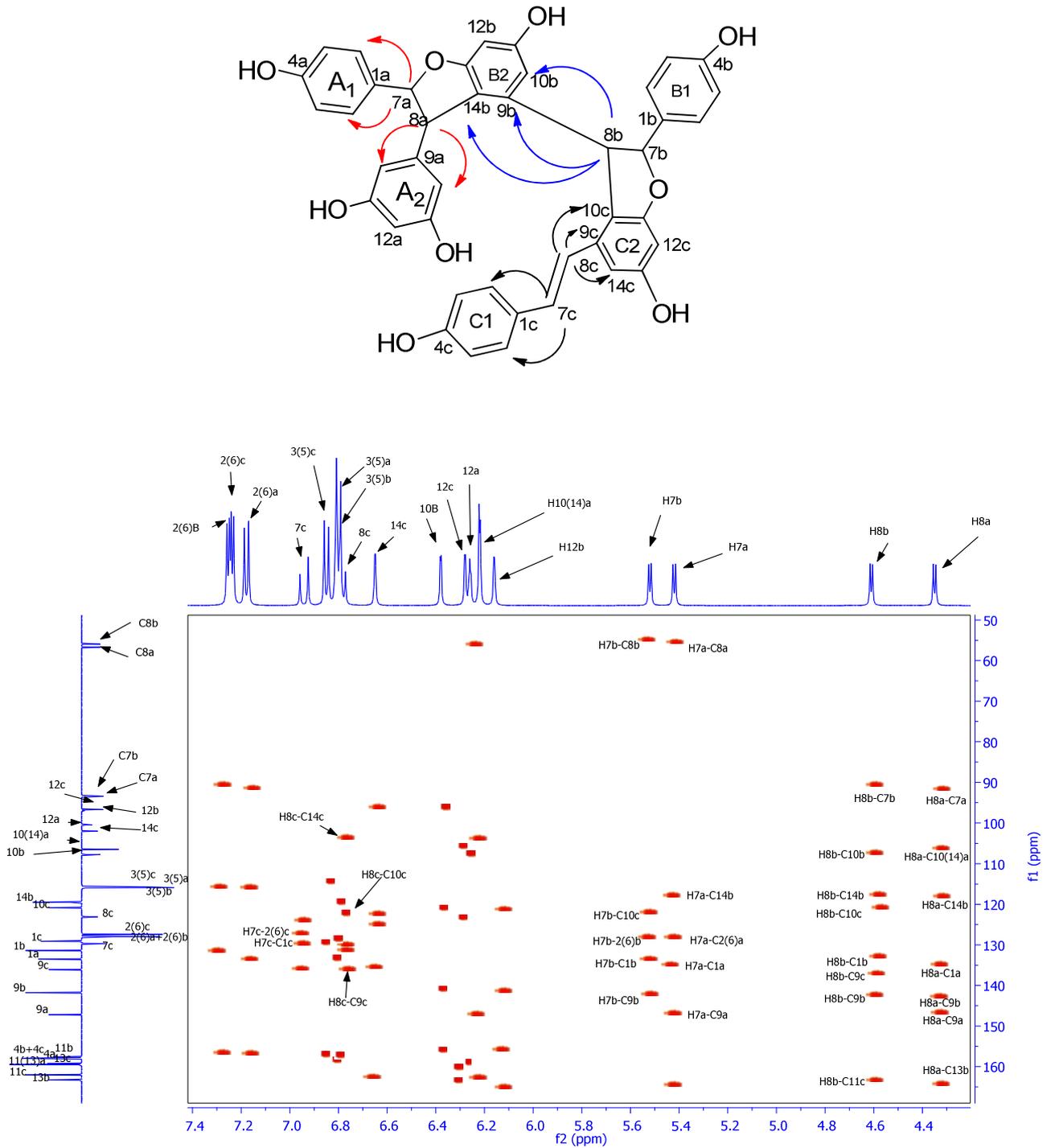


Figure 47 : Spectre HMBC du Trimère resvératrol

L'expérience de corrélation directe carbone- proton ou HSQC (fig 48) montre les couplages entre :

- le proton H-8a et son carbone C-8a résonnant à 56.70 ppm.
- le proton H-8bd et son carbone C-8b résonnant à 55.19ppm.
- le proton H-7a et son carbone C-7a résonnant à 93.51ppm.
- le proton H-7b et son carbone C-7b résonnant à 93.37ppm.
- le proton H-8c et son carbone C-8c résonnant à 123.09 ppm.
- le proton H-7c et son carbone C-7c résonnant à 129.12 ppm
- le proton H-2(6)a et son carbone C-2(6)a résonnant à 128.01 ppm .
- le proton H-2(6)b et son carbone C-2(6)b résonnant à 128.01 ppm.
- le proton H-2(6)c et son carbone C-2(6)c résonnant à 127.42 ppm.

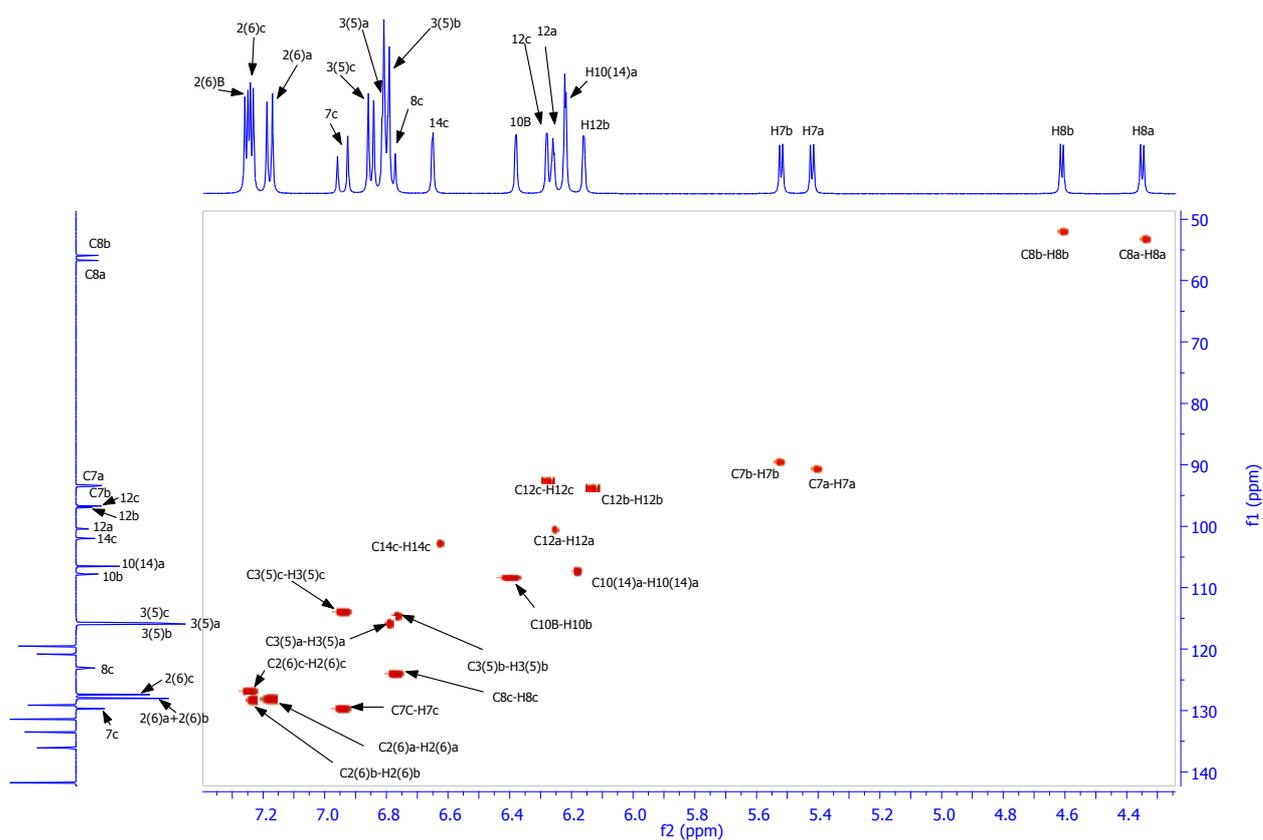
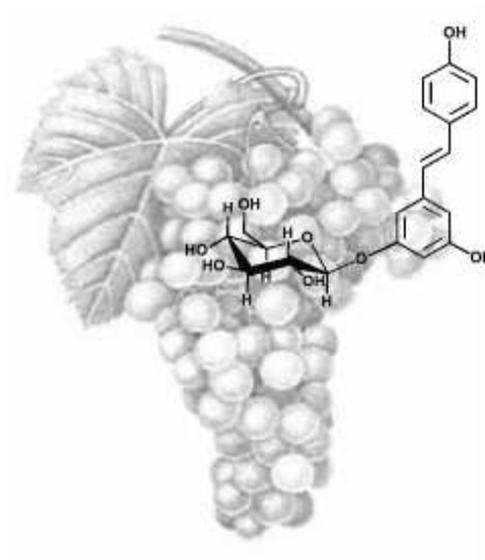


Figure 48 : Spectre HMQC du Trimère resvératrol

Figure 49 : Comparaison des données spectroscopiques H-RMN et 13C-RMN du Trimère (N) C avec A. C. Marino¹¹⁸

	Trimère (N)			Données de S. De Marino et al ¹¹⁶		
	δ H (ppm)	J (HZ)	δ^{13} C (ppm)	δ H (ppm)	J (HZ)	δ^{13} C (ppm)
1a			133.51			135.1
2a,6a	7.16d	8.8	128.01	7.08d	8.5	127.1
3a,5a	6.74d	8.8	115.81	6.82d	8.5	116.0
4a			158.01			158.2
7a	5.42d	6.0	93.51	5.21d	3.0	93.8
8a	4.35d	6.0	56.70	4.11d	3.0	57.2
9a			147.21			148.6
10a	6.22d	2.0	106.51	5.902S		106.80
11a			159.50			160.20
12a	6.26t	2.0	100.45	6.38t	2.0	103.40
13a			159.50			159.30
14a	6.22d	2.0	106.51	5.96s		109.20
1b			131.41			133.90
2b,6b	7.25d	8.4	128.01	6.33d	8.4	127.20
3b,5b	6.80d	8.4	115.91	6.50d	8.4	116.0
4b			157.92			156.80
7b	5.51d	4.0	93.37	5.23d	2.3	92.80
8b	4.60d	4.0	55.91	3.76d	2.3	53.0
9b			141.77			143.70
10b	6.38br.s		107.78	6.10d	2	107.40
11b			157.59			159.60
12b	6.16br.s		96.91	6.23d	2	95.00
13b			163.30			162.10
14b			119.52			119.80
1c			129.12			125.60
2c,6c	7.24d	8.4	127.42	6.61d	8.6	131.00
3c,5c	6.85d	8.4	115.73	6.44d	8.6	115.80
4c			157.92			157.40
7c	6.94d	16	129.70	5.66d	12.2	131.00
8c	6.78d	16	123.09	5.81d	12.2	126.00
9c			136.10			137.00
10c			120.83			121.80
11c			162.01			160.03
12c	6.28br.s		96.69	6.07d	1.8	95.50
13c			159.22			159.60
14c	6.65br.s		102.00	6.24d	1.8	108.00

CONCLUSION



Conclusion

Suites aux travaux antérieurs réalisés au laboratoire et la mise en évidence par chromatographie centrifuge de partage et chromatographie liquide haute performance de stilbénes dans la vigne, le travail qui nous à confié concerne « purification de quelques stilbénes dans la « *vitis- vineféra* chardonnay »

Dans la première partie de ce mémoire et après bref rappel sur la nature des composés phénoliques présent dans la vigne, nous avons choisi fort naturellement d'orienter notre recherche bibliographique sur les différentes méthodes de purifications et les techniques d'isolement des stilbénes connus dans la vigne, qui s'avèrent peu nombreuse (chromatographie liquide haute performance semi-préparative et chromatographie de partage centrifuge).

Dans la deuxième partie de ce mémoire ont été rapportés les résultats personnels, la mise au point d'une méthode de séparation et de purification des composés phénoliques, alliant la chromatographie centrifuge de partage et la chromatographie haute performance nous à permit l'isolation de huit substances pures.

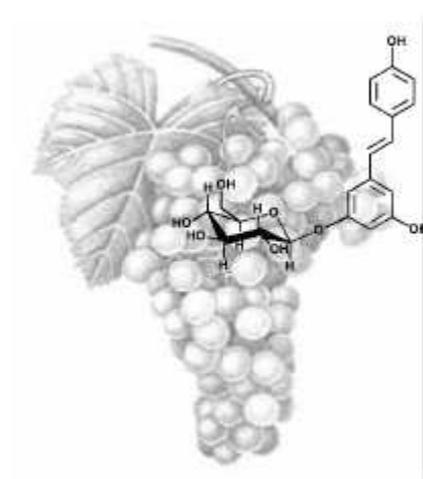
Dans la troisième partie, la caractérisation et l'identification de ces substances par les méthodes spectroscopiques nous permettent d'affirmer que les deux composés A et B correspondent respectivement à la picéatannol et l'ampilopsine, nous avons détecter des produits *trans* resvératrol glycosylées qui sont C et D , deux dimères K et L correspondent aux resveratrol et l' ϵ -viniférine.

Nous avons identifié, pour la première fois dans la plante étudié les composés M et N qui sont qui le tétramère trimère du resvératrol ne correspondent pas à des composés déjà identifiés dans notre plante.

Ces traveaux sur l'isolement de polyphénols à partir de la vigne ne peuvent qu'encourager d'autres investigations pour l'identification de nouvelles structures polyphénoliques.

Compte tenu de diverses propriétés pharmacologiques accordées aux stilbénes, il est nécessaire d'envisager une étude biologique des nouvelles molécules stilbéniques. Il serait également intéressant de savoir si ces substances possèdent des activités biologiques.

PARTIE EXPERIMENTALE



VII. PARTIE EXPERIMENTALE

VII.1 - GENERALITES

Le plan adopté dans la présentation de ces résultats expérimentaux est le même que celui emprunté au cours de la partie théorique.

VII.1. A –Méthodes chromatographiques

a) – chromatographie sur couche mince (CCM)

Les conditions d'analyses sur CCM sont les suivantes :

- support : silice 60 F254 (MERCK, Référence 5554) sur feuille d'aluminium, 0.2 mm
- solvant de migration :
CHCl₃/MeOH/CH₃COOH (v/v/v = 85/15/3)
- solvant de révélation ;
H₂SO₄/EtOH/anisaldehyde (v/v/v =5/90/5)

La révélation s'effectue par pulvérisation suivi du chauffage de la plaque à 300°C.

b) – chromatographie liquide haute performance semi préparative (HPLC)

L'échantillon analysé est dissous dans un mélange MeOH / H₂O (v/v= 1/1) et filtré sur un filtre Millipore (0.45µm), et injecté sur une *pré*-colonne C18 de 2.5cm de longueur et de 5mm de diamètre interne, et une colonne de 25cm de longueur avec un diamètre interne de 8mm en utilisant une phase mobile constituée de deux solvant A et B (A : H₂O à 0.0025% de TFA et B : ACN).

L'injection s'effectue à un débit de 1 ml/min. Les gradients d'élution varient en fonction de l'extrait analysé.

c) – Chromatographie de partage centrifuge (CPC)

Les séparations par CPC sont réalisées sur un appareil FCP 200 (Fast Centrifugal Partition Chromatograph 200ml) avec une vitesse de rotation de 1000 tr/min la phase mobile est délivrée par deux pompes GILSON 321 à un débit de 3ml/min. les phases mobiles et stationnaire sont choisies selon des systèmes biphasiques quaternaires : n-heptane, acétate d'éthyle, méthanol, eau. Suivant les cas, la phase

inférieure ou la phase supérieure des systèmes sélectionnés sont d'abord utilisée comme phase mobile, puis au cours du fractionnement le sens de rotation est inversé et l'autre phase est utilisée comme éluant.

Les fractions sont recueillies par un collecteur automatique FC 204, et rassemblées selon les résultats des analyses par CCM.

VII. 2- Spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ont été mesurés à 500 MHz (¹H) et 125 MHz (¹³C) avec un spectromètre Unity Inova 500 (Varian) contenant une sonde multi-nucléaire (5 mm i.d.).

Les spectres NOE et DEPT, ainsi que les expériences bidimensionnelles NOESY, COSY, HSQC, HMBC et HSQC-TOCSY, ont été enregistrés à l'aide de séquences impulsionsnelles spécifiques fournies par Varian. Les échantillons ont été dissous dans des solvants deutérés CD₃OD ou CDCl₃. Les déplacements chimiques δ ont été exprimés en ppm par rapport au signal du tétraméthylsilane (TMS), utilisé comme référence interne

VII. 3- Matériel végétal et extraction

La plante *vitis vinifera* (chardonnay) à été récolté durant le mois de février 2005 dans la campagne *Ardenne*.

Les rafles de cette plante sont broyées en poudre semi fine grossière (tamis maille 1.5 mm) afin d'améliorer l'extraction, on augmente ainsi la surface d'échange entre le solvant et la matière brut, ce qui permet un meilleur rendement.

Les rafles broyées (500g) sont introduites dans une colonne qui est complétée avec un mélange acétone/eau (60/40), la macération dure environ 24h à température ambiante et à l'abri de la lumière afin d'éviter de détruire certaines molécules photosensibles, puis la solution mère filtrée est récupérée.

Une seconde extraction à l'éther de pétrole (2l .3fois) après élimination de l'acétone sur la solution aqueuse afin d'éliminer la chlorophylle.

La phase aqueuse récupérée est alors soumise à une extraction à l'acétate d'éthyle (2l.3 fois) afin d'extraire les polyphénols, la phase organique est évaporée et lyophilisée.

VII. 4 – Fractionnement par chromatographie de partage centrifuge (CPC)

En utilisant le système de solvant **K** (heptane, acétate d'éthyle, méthanol, eau : 1,2,1,2), un premier fractionnement est fait sur 8g de l'MTBE par 4 CPC. 132 fractions Le regroupement de ces fractions est réalisé par CCM (fig 50))

Fractions	Poids (mg)
12-15 * (ascendant)	690
16-19*	1768.8
20-21	507.8
22-29*	2811.6
30-44	274.8
45-52	269.6
53-65	110.4
66-88	460.3
89-104 * (descendant)	960
105-106*	831.20
107-109	100.2
110-113	84.4
114-117	54
118-132	7.6

Figure 50 : Fractionnement de l'extrait MTBE CPC (sys K)

VII.4.1 - Purification des fractions par chromatographie liquide haute Performance (HPLC)

VII. 4.1 .a - Purification des fractions 22-29

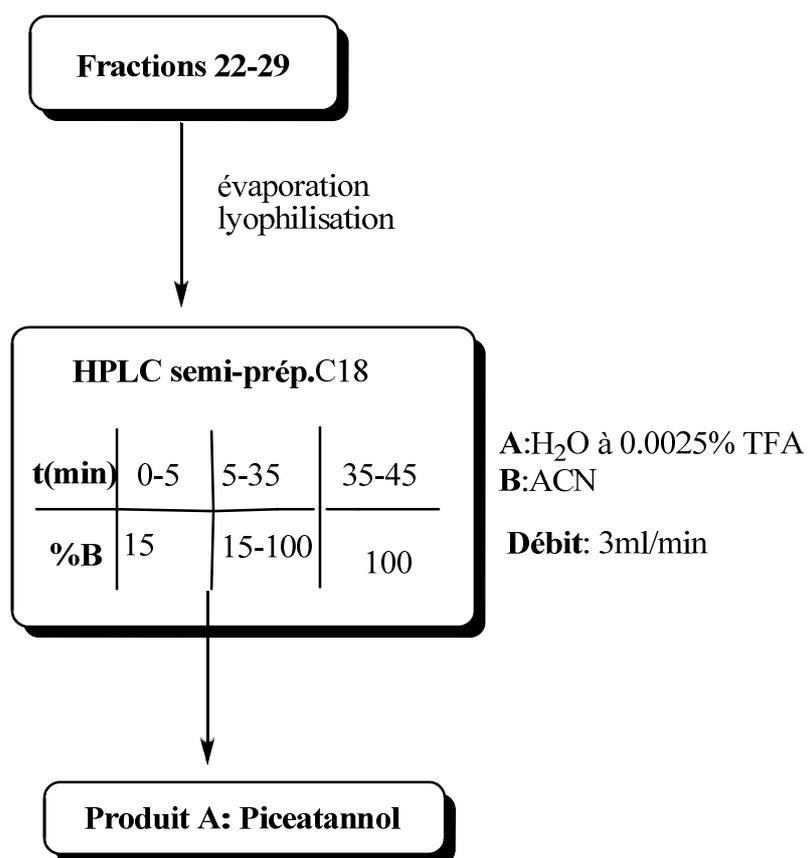


Figure 51 : Purification des fractions 22-29

VII. 4.1 .b - Purification des fractions 89-104 et 105-106

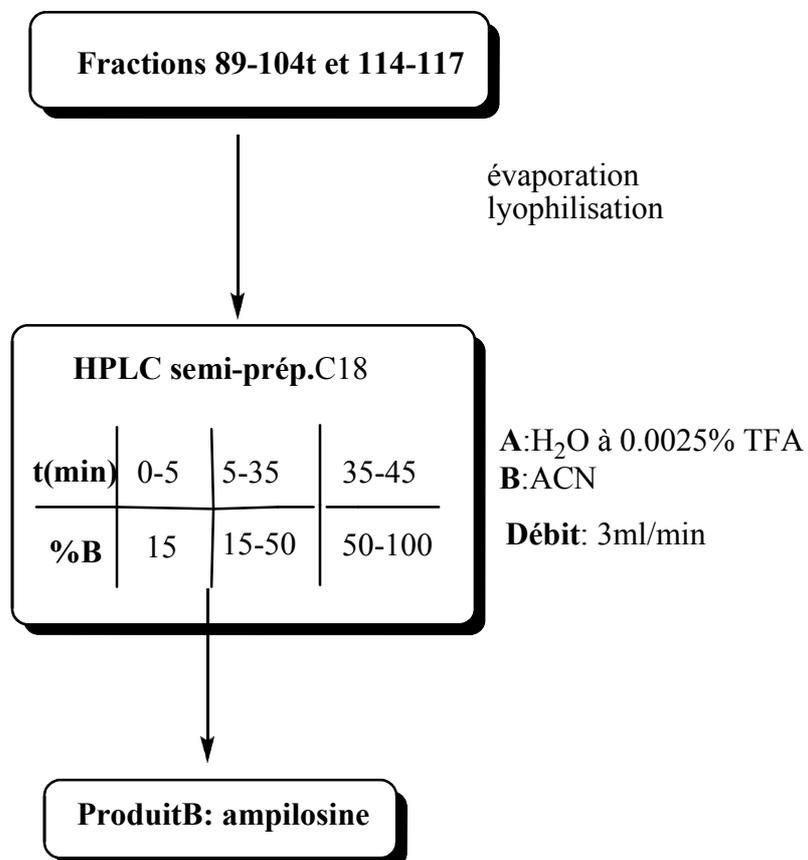


Figure 52 : Purification des fractions 89-104et 114-117

VII. 3.1 .c - Purification des fractions 16-19

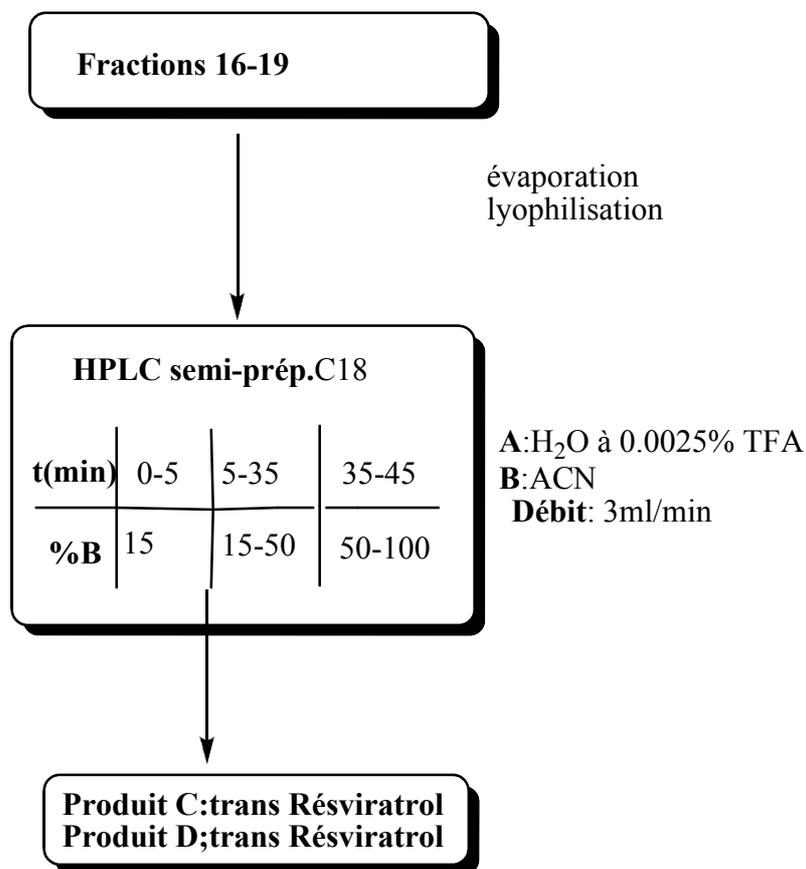


Figure 53 : Purification des fractions 16-19

VII. 4.1 .d - Purification des fractions 12-15

En utilisant le système de solvant M (heptane, acétate d'éthyle, méthanol, eau :5,6,5,6), le fractionnement est fait sur les fractions 12-15.donne 132 fractions . Le regroupement de ces fractions est réalisé par CCM (fig 54)

Fractions	Poids (mg)
12-15 (ascendant)	65.1
16-20	20.5
21-24	54.8
25-53*	120.3
54-60	76.3
61-93*	234.2
94-103	13.2
104-107 (descendant)	50.9
108-110	8.3
111-112	15.3
113-117	9.45
118-120	11.01
121-132	9

Figure 54: Fractionnement des fractions 12-15 CPC (sys M)

VII. 4.1 .d - Purification des fractions 12-1

1) Purification des fractions 25-53

Fractions 25-53

évaporation
lyophilisation

HPLC semi-prép.C18

t(min)	0-10	10-29	29-43	43-64
%B	5-10	10-20	20-50	50-100

A:H₂O à 0.0025% TFA
B:ACN

Débit: 3ml/min

**K:Resvéatrol
L:viniferine
M:viticine c 'nouveau produit)**

Figure 55 : Purification des fractions 25-53

2) Purification des fractions 61-93

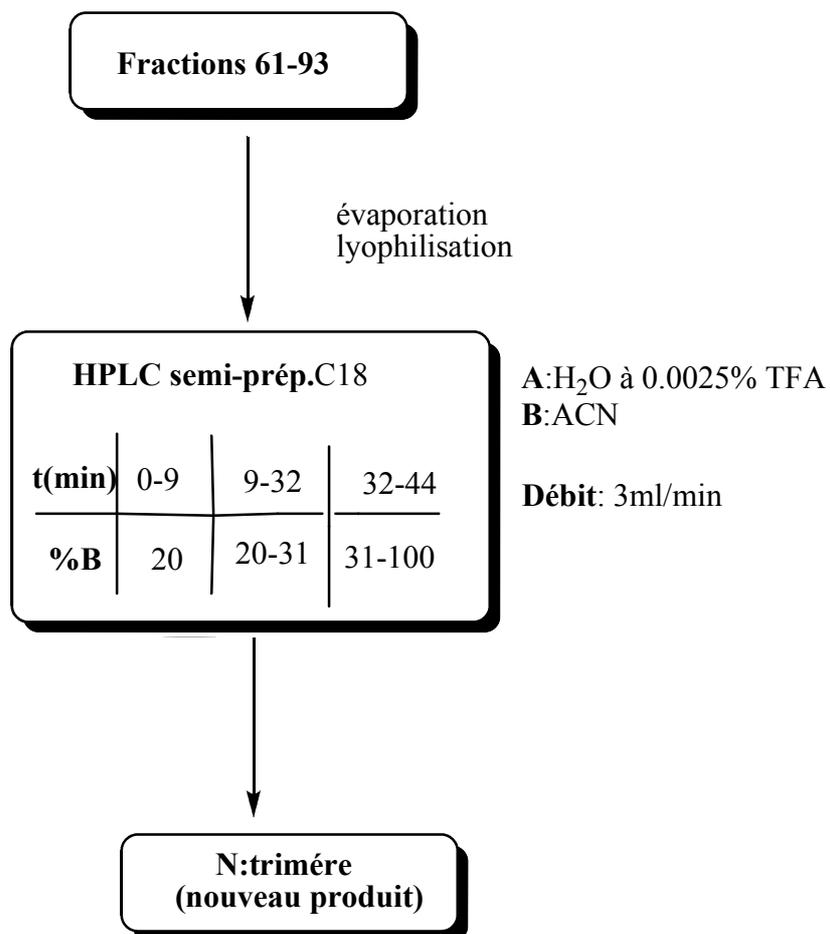
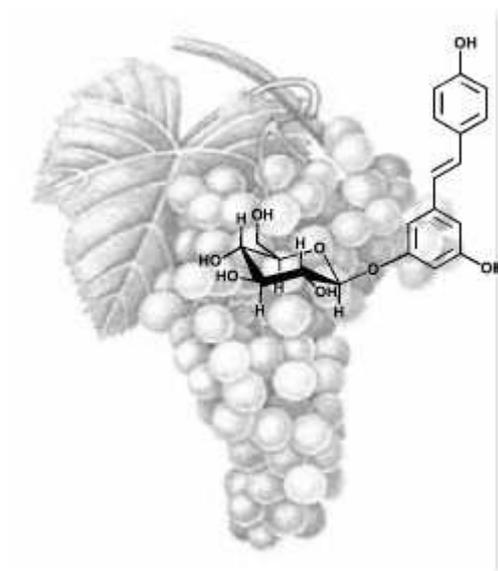


Figure 56: Purification des fractions 61-93

BIBLIOGRAPHIE



BIBLIOGRAPHIE

- 1 HOSTETTMANN, K., POTTERAT, O. & WOLFENDER, J.-L. (1998b). the Potential of Higher Plants as a Source of New Drugs. *Chimia* 52, 10-17.
- 2 FRANKEL E., KANNER J., PARKS E., KINSELLA J.; Inhibition of oxidation of human low- density lipoprotein by phenolic substances in red wine; *Lancet*, 1993,341,454-457
- 3 SHAHIDIF ., AMAROWICZ R., Chromatographic separation of individual tea catechins and evaluation of their antioxidant activity ; Brouillard R., Jay M., Scalbert A .Eds., polyphenols 94.XIIth International Conference on Polyphenols, INRA Editions Paris, 1994,185-186
- 4 UCHIDA S ., EDAMATSU R ., HIRAMATSU M., MORI A ., NONAKA G.I ., NISHIOKA I ., NIWA M ., OZAKI M., OZAKI M., Condensed tannins scavenge active oxygen free radicals ; *Med. Sci. Res.*, 1987 , 15, 831-832.
- 5 J. ; Les procyanidines du vin. Action inhibitrice sur les radicaux libres oxygénés ; in : Ribereau-Gayon P., Lonvaud A. Eds., “*Actualités Œnologiques 89 ; comptes rendus du IV^{ème} Symposium International d’Œnologie, Bordeaux, 15-17 juin 1989* “ , Dunod, Paris, 1990, 392-397.
- 6 RICARDO DA SILVA J.M., DARMON N., FERNANDEZ Y., MITJAVILA S.; Oxigen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds ; *J.Agric. Food Chem.*, 1991, 39, 1549-1552.
- 7 BAHUET L.; Dérivatisation des oligomères procyanidoliques et prevention antiradicalaire cutanée ; Thèse de pharmacie, Bordeaux 2, n° 68, 1994.
- 8 VERCAUTEREN J., WEBER J.F., BIGNON J., BISSON J.L.; Polyphenol derivative compositions and preparation thereof, (Brevet WO94-29404, (PCT), 1994).
- 9 GAVINET –JEANNIN C., GROULT N. GODEAU G ., ROBERT A.M. , ROBERT L.; Mode d’action des oligomères procyanidoliques sur la paroi vasculaire ; Communication au Symposium satellite “Endotelon et Unité circulatoire“, Congrès international d’Angiologie , Toulouse (1988).
- 10 BASPEYRAS M. ; Propriétés des vin ; Thèse de Médecine, Bordeaux 2, n° 97, 1999.
- 11 MASQUELIER J.; Les constituants du vinprésentant une action hypocholestérolémiant, C. R. Congrès Médical International pour l’Etude Scientifiques du vin et du Raisin, Bordeaux (1961).

- 12 BARRIERE B. Vin et athérosclérose ; Thèse Pharmacie Bordeaux 2, 1981.
- 13 MELZER R., FRICKE U., HOLZL J. ; Vasoactive properties of procyanidins from *Hypericum perforatum* L. in isolated porcine coronary arteries ; *Arzneimittelforsch/Drug Res.*, 1991, 41, 481-483.
- 14 NAKASHIMA H., MURAKAMI T., YAMAMOTO N., SAKAGAMI H., TANUMA S., HATANO T., OKUDA T.; Inhibition of human immunodeficiency viral replication by tannins and related compounds ; *Antivir . Res.*, 1992, 18, 91-103.
- 15 SCALBERT A. ; Antimicrobial properties of tannins ; *Phytochemistry*, 1991, 30, 3875-3883.
- 16 BASPEYRAS M. , Propriétés bénéfiques des vins rouges bordelais., thèse Doct ., Méd., bordeaux, 1985.
- 17 MASQUELIER J., Les constituants du vin présentant une action Hypocholestérolémiante., C.R., Congrès Médical International pour l'étude Scientifique du vin et du Raisin. Bordeaux, 1961.
- 18 BARRIERE B. , Vin et athérosclérose., Thèse Doct, Pharm., Bordeaux 1981
- 19 MELZER R., FRIKE U., HOLZU J.; Vasoactive properties of ^rocyanidins from *Hypericum perforatum* L.in isolated porcine coronary arteries.; *Arzneim.Forsch.* 1991, 41, (1), 481-483.
- 20 BAX A., DAVIS (D.G). ; Practical aspects of two dimensional transverse NOE Spectroscopy., *J. Magn.Reson.* 1985, 63, 207-213.
- 21 FULCRAND H.,CAMERIA DOS-SANTOS (P.J.C°., SARNI-MANCHADO P. Structure of new anthocyaninderived wine pigments.. *Chem. Soc.erkin Trans.I*, 1996, 7, 735-739.
- 22 RIBEREAU6GAYON J., PEYNAUD E ., SUDRAUD P., RIBEREAU-GAYON P., *Traité d' œnologie . Sciences et techniques du vin. Tome I. (Editions Dunod, Paris , 1972).*
- 23 CASTINO M.; Connaissance de la composition du raisin et du vin – passage au vin des substances non transformées par la fermentation – apparition dans le vin des substances nées lors de la fermentation ; *Bull. O.I.V.*, 1988, 689-690, 540-553.
- 24 RICARDO DASILVA J.M., DARMON N., FENANDEZ Y., MITJAVILA S.; Oxigen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins From grape seeds.; *J.Agric. Food Chem.*, 1991, 39,1549-1552.
- 25 LANGCAKE P., PRYCE R.J., A new class of phytoalexins. *Experientia.*, 1977, 33, 151-152.

- 26 LANGCAKE P., PRYCE R.J., The production of resveratrol and the veniferins by Grapesvines in response to ultraviolet irradiation. *Phytochem.*; 1977., 16, 1193-1196.
- 27 BOURZEIX K.,WEILLAND DHEREDIA N., A study of catechins and procyanidins of grape clusters, the wine and other by-product of the wine. *Bulletin de l'O.I.V.*, 669-970, 1986, 1173-154.
- 28 REMY S., Les tannins du vin rouge: caractérisation de structures natives et dérivées. 1999, Thèse de l'INRA (Montpellier).
- 29 OHM H., BOEING H., HEMPEL J., Flavonols, flavones and anthocyanins as natural antioxidants in food and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft* ,1998 37(2), 147-63.
- 30 HERTOOG M.G.L., HOLLMAN P.C.H.,VANDE PUTTE B., Content of potentially Anticarcinogenic flavonoides of tea infusions, wine and fruit juices. *Journal of Agricultural and food chemistry* , 1993, 41, 1242-6.
- 31 VINSON J.A., DABBAGH Y .A., SERRY M.M., Plant flavonoides, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using in vitro oxidation model for heart disease. *Journal of Agricultural and Food chemistry*. 1995, 43, 2800-62.
- 32 ACAILLE-DUBOIS M., WAGNER H., Importance pharmacologique des dérivés phénoliques .*Acta Botanica Gallica.*, 1996, 143(6), 555-62.
- 33 P. RIBEREAU- GAYON, Les composés phénoliques des végétaux., 1968.
- 34 DOS-SANTOS (P.J.C.), BRILLOUET(J.M). , CHEYNIER V., MOUTENET M., Detection and partial characterization of new anthocyanin-derived pigments in wine. - *J. Sci.food agric.*, 1996, 70, 204-208.
- 35 NAGAYAMA K., KUMAR A., WUTHRICH k., ERNST (R.R.); Experimental techniques of two-dimensional correlated spectroscopy.,*J. Magn. Reson* 1986.31.258- 263
- 36 CASTAGNINO C., VERCAUTEREN J., CASTAVINOL., a new series of Polyphénolic structures from Bordeaux red wines- *Tetrahedron lett.*, 1996, 37, 7739-7742.
- 37 LECOQ C., LALLEMAND (J.Y) .,;Precise Carbon -13 N.M.R. Multiplicity Determination.,*J. Chem. Soc ., Chem. Commun.*, 1981, 4, 150-152
- 38 PEZET R. and PONT V., Activite antifongique dans les baies de *Vitis vinifera*: effets d'acides organiques et du pterostilbene. *Revue Suisse de Viticulture d'Arboriculture et d'Horticulture.*, 1988,20(5), 303-309.
- 39 H. LYR., Mechanism of action of aromatic hydrocarbon fungicides, in "Modern

- Selective Fungicides " (H. Lyr, Ed.), Longman, (1987).
- 40 OKUDA T., Novel aspects of tannins-renewed concepts and structure-activity relationships. *Current Organic Chemistry* 3, 1999. 609-22.
- 41 OKUDA T., YOSHIDA., and HATANO T., Correlation of oxidative transformations of hydrolyzable tannins and plant evolution. *Phytochemistry.*; 2000, 55, 513-529.
- 42 Xu, H. X. KADOTA S., KUROKAWA M., SHIRAKI K., MATSUMOTO T and NAMBA T
A new hydrolyzable tannin from *Geum japonicum* and its antiviral activity. *Heterocycles* 1994, 38(1),. 167-75.
- 43 DERBA A., PEARSON H., LAZARUS (S.A) and KEEN (C.L). Inhibition of in vitro low-density lipoprotein oxidation by oligomeric procyanidins present in chocolate and cocoas. *Methods in Enzymology* 2001, 335,. 350-60.
- 44 OKUDA T., YOSHIDA., and HATANO T. Ellagitannins as active constituents of medicinal plants. *Planta Medica.*; 1989, 55(117),. 122.
- 45 CHEYNIER V.,RIGAUD J.,RICARDO6DE6SILVA M.; Structure of proanthocyanidin oligomers isolated from grape seeds in relation to some of their chemical properties, in "Plant Polyphenols, synthesis, properties and significance" P.E.Laks, Ed.), Plenum Press, New-York (1992).
- 46 POTTERAT O., . Antioxydants and free radical scavengers of natural origin. *Current Organic Chemistry.*, 1997? 1,. 415-40.
- 47 LAKENBRNK C., ENGELHARDT U.,and WARY V. Identification of two novel proanthocyanidins in green tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999, 47, 4621-4.
- 48 K. G. B. Torrsell, Natural product chemistry. A mechanistic biosynthetic and ecological approach, Taylor and Francis, (1997).
- 49 URSINI F., RAPUZZI I., TONIOLOR., TUBARO F BONTEMPELLI G. ;
Characterization of antioxidant effect of procyanidins. *Methods in Enzymology*
Methods in Enzymology. 2001 335,. 338-50.
- 50 RICARDO-DA-SILVIA J.M., CHEYNIER V., SOUQUET J.M ., MOUTENET M
Interaction of grape seed procyanidin with various proteins in relation to wine fining. *Journal of Sciences and Food Agriculture* . 1991, 57,. 111-25.
- 51 POTTERAT O., Antioxydants and free radical scavengers of natural origin. *Current Organic Chemistry*1997 , 1,. 415-40
- 52 AMALFITANO C., EVIDETE A., SURICO G., TELGI S., BERTELLI E.andMUGNI L

- Phenols and stilbene polyphenols in the wood of esca-diseased grapevines, *Phytopathol. Mediterr.* 2000,39, 178-183.
- 53 DOLE M., MACK L., HINES R.L., MOBLEY. R.C FERGUSON L.D and ALICE M.B Molecular beams of macroions. *J. Chem. Phys.*,1968, 49, 2240-2249
- 54 IRIBANE J.V.,andTHOMSON B.A. Evaporation of small ions from charged droplets. *J. Chem. Phys.*,1976, 64, 2287-2294
- 55 FREMONT L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci.*,2000, 66, 663-673.
- 56 ATTEN M.J., MILSON T.,HOLIAN O., Resveratrol-induced inactivation of human gastric adenocarcinoma cells through a protein kinase C-mediated mechanism. *Biochem. Pharmacol.*,2001, 62, 1423-1432.
- 57 JANG M., PEZZUTO J.M., Effect of resveratrol on 12-Otetradecanoylphorbol 13-acetate-induced oxidative events and gene. expression in mouse skin. *Cancer Let.*,1998, 134, 81-89.
- 58 YAN K.X., TAKAYA Y and NIWA M. Two new stilbenes tetramers from the stem of *V. vinifera* "Kyohou". *Tetrahedron*,2002, 58, 6931-6935.
- 59 WAFFO-TEGUO P ., DECENDI A., VERCAUTEREN J., DEFFIEUX and MERILLON J.M *Trans*-resveratrol-3-O- β -glucoside (piceid) in cell suspension cultures of *V. vinifera*. *Phytochem.*,1996, 42, 1591-1593.
- 60 WAFFO-TEGUO P ., DECENDI A.,DEFFIEUX G and MERILLON J.M The accumulation of stilbene glucosides in *V. vinifera* cell suspension cultures. *J. Nat. Prod.*,1996, 59, 1189-1191
- 61 WAFFO-TEGUO P., FAUCONNEAU B., DEFFIEUX G and MERILLON J.M Isolationidentification and antioxidant activity of three stilbene glucosides newly extracted from *V. vinifera* cell cultures. *J. Nat. Prod.*,1998, 61, 655-657
- 62 DECENDI A., WAFFO-TEGUO P., RICHARD T.,KRISA S. VERCAUTEREN J and MERILLON J.M. Galloylated catechins and stilbene diglucosides in *V. vinifera* cell suspension cultures. *Phytochem.*,2002, 60,795-798
- 63 LINS A.P., RIBEIRO M.N., and GOTTIEB H.E. Resveratrol oligomers from *Gnetum* species. *J. Nat. Prod.* 1982, 45, 754-761
- 64 OSHIMA Y and UENO Y., Ampelopsins D, E, H and *cis*-ampelopsin E, oligostilbenes from *Ampelopsis brevipedunculata* var. *hancei* roots *Phytochem* 1993, 33, 179-182.
- 65 PRYSE R.Jand LANGCAKE P. α -viniferin: an antifungal resveratrol trimer from grapevines. *Phytochem.*, 1977, 16, 1452-1454

- 66 HUANG K S., LIN M.,and KONG M. Four novel oligostilbenes from the roots of *Vitis amurensis*. *Tetrahedron*, 2000, 56, 1321-1329
- 67 KORHAMMAR S., RENIERO F and MATTIVI F. An oligostilbene from *Vitis* roots. *Phytochem.*, 1995, 38, 1501-1504.
- 68 OHYAMA M., ICHISE M., TANAKA T and BURAND J. , first naturally occurring Resveratrol pentamer isolated from *Sophora davidii*. *Tetrahedron Let.*, 1996,37, 5155-51
- 69 WAFFO-TEGUO P ., LEE D.,MERILLION J M., PEZZUTO JM and KINGHON A Two new stilbene dimer glucosides from Grape(*V. vinifera*) Cell cultures. *J. Nat. Prod.*, 2001, 64, 136-138.
- 70 VAN DER KAADEN J E., HEMSCHEID .K andMOOBERY S.L . Mappain, a new cytotoxic prenylated stilbene from *Macaranga mappia*. *J. Nat. Prod*,2001 64, 103-105.
- 71 HART J H., Role of Phytostilbenes in decay and disease resistance. *Ann. Rev Rev. Phytopathol.*,1981, 19, 437-458
- 72 SOTHEESWARAN S.,TOBAYASHI Y .Distribution of resveratrol oligomers in plants. *Phytochem.*, 1993, 32, 1083-1092.
- 73 .BAVARESCO L., FREGONI M.,TREVISAN M., MATTIVI F., VRHOVSEK U The occurrence of the stilbene piceatannol in grapes. *Vitis*,2002, 3, 133-136.
- 74 FANAS A and NIWA M . Absolute structures of new Hydroxystilbenoids vitisin C and viniferal, from *V. vinifera* "Kyohou". *Tetrahedron*, 1996,52, 9991-9998.
- 75 MOREL M., GOLBERG(D.M)., HAN(S.E)., Beyond alcohol : Beverage consumption and cardiovascular mortality. *Clinica Chimica Acta*, 1995, 237, 155-187,
- 76 RENAUD S., De LORGERIL M., Wine, alcohol, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 1992, 339, 1523-1526
- 77 HIRASUMA (T.J)., SHULER(M.L)., LACKNEY (V.K)., SPANSWICK (R.M) Enhanced anthocyanin production in grape cell cultures. *Plant* , 1992, 339, 1523-1526
- 78 HIROSE M., KODAMA T., YAMAKAWA T., KOMAMINE A.; Accumulation of Betacyanin in *Phytolacca americana* Cells and of Anthocyanin in *Vitis* sp. Cells in Relation to Cell Division in Suspension Cultures. *Plant. Cell. Physiol.*, 1990, 31, 267-271.
- 79 WAFFO TEGUO P.; *J. Nat. Prod.*, 1998, *Sous presse*..
- 80 MOFFLI M., STREIT W., FENGEL D.; Purified tannins from quebracho colorado.

- Phytochemistry*, 1994, 36 n°2, 481-4.
- 81 FAUCONNEAU B., WAFFO TEGUO P., HUGUET F., BARRIER L., DECENDI A., MERILLION (J. M.); Comparative study of radical scavenger and antioxidant Properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using *in vitro* tests *Life Sciences*, 1997, 61, 2103-2110
- 82 FITTPATRIK H., ., DECENDI A., MERILLION (J. M)..; Condensed tannin and anthocyanin production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *Plant Cell Reports*, 1996, 15, 762-765.
- 83 ANDRIAMBELOSON B., FRANKEL (E.N.), KANNER J., GERMAN (J.B.), PARKS E ., Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*, 1993, 341: 454-457
- 84 FRELSON., GOLBERG(D.M.), KARUMANCHI A., YAN J., DIMANDIS (E.p); Assay of resveratrol glucosides and isomers in wine by direct-injection high-performance liquid chromatography *J. of Chromatogr.*, 1995, 708, 89-98.
- 85 HOLLMAN F., SIEMANN (E.H.), CREASY(L.L.), Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1992, 43 (1), 49-52.
- 86 PAGANGA Y., RICE E., WATERHOUSE(A.L.); Wine and Heart disease. *Chemistry & Industry.*, 1995, 338-341
- 87 HUNG (M.T.), FERRARO T., Phenolic compounds in food and cancer In Huang (M.T.), Ho (C.T.), Lee (C.Y.) eds. Phenolic prevention compounds in food and their effects on health, 1992, 8-34.
- 88 URAYAMA W. , TOBAYASHI Y., KOSUGE Y., YANO H., NUNOGAKI Y. , NUNOGAKI K., A new centrifugal countercurrent chromatograph and its application. *J Chromatogr* 1982, 239-643.
- 89 ITO Y., SANDLIN J., BOWERS W.C. . High-Speed preparative counter-current Chromatography (CCC) with a coil planet centrifuge.; *J Chromatogr* ., 1982 , 244, 247
- 90 UCAULT A.P., CHEVOLOT L., Counter-current chromatography: Instrumentation, solvent selection and some recent application to natural product purification.; *J Chromatogr A* ., 1988, 808, 3-22.
- 91 RENAULT J-H ., NUZILLARD J-M., INTES O., MACTUK A.? Solvents systems In: Countercurrent Chromatography-The support-Free Liquid Stationary Phase . Ed: Berthod A., Amsterdam : Elsevier Science B.V., 2002, 49-83.
- 92 Centrifugal Partition Chromatography. Ed FOUCAULT A.P., New York: Marcel Dekker, Inc. 1995 (Chromatographic Science Series ; 68).

- 93 YUT ., CHUAN CHEN Y., Supercritical fluids as mobile phases in CCC.
In: Countercurrent Chromatography- The support-free Liquid Stationary Phase .Ed
A. Berthod., Amsterdam: Elsevier Science B.V; 2002, 353-377.
- 94 RTHOD A., BRUIZ-ANGEL M.J., CARDA-BROCH S., Elution-
extusioncountercurrent chromatography. Use of the liquid nature of the stationary phase
to extend the hydrophobicity window., Anal Chem 2003; 75(21), 5886_5894.
- 95 MARSTON A., HOSTETTMANN K.. Developments in the application of counter-
Current chromatography to analysis., J Chromatogr A 2006; 1112,181-194
- 96 ARCHAL L.; INTES O., FOUCAULT A.P., LEGRAND J., NUZILLARD J-M.,
RENAUT J-H.. Rational improvement of centrifugalpartition chromatographic settings
for the production of 5-n-alkylresorcinols from wheat bran lipids extract I- Flooding
condition- optimizingthe injection step ; J Chromatogr A 2003 ; 1005 (1-2) :51-62.
- 97 BRENT F., GUIDO P. ; Departement of natural science , Rosary college of Arts and
Sciences,
Dominican University,
- 98 DURANT P., FOUCAULT A., LEGRAND J., DE LA POYPE F., DE LA POYPE R
. Wine and Heart disease. Chemistry & Industry, 1995, 338-341.
- 99 CANET D., La RMN. Concepts et méthodes .(InterEditions, Paris, 1991).
- 100 MARTIN G.E., ZEKTZER A.S., Two-Dimensional NMR Methods for Establishing
Molecular Connectivity. A chemist's guide to experiment selection, performance, and
interpretation . (VCH Publishers, NEW York, Weinheim, 1988)
- 101 S J.k.M., Modern NMR Spectroscopy. A guide for chemists. Second edition.
(Oxford University Press, Oxford, New York, Toronto, 1993).
- 102 NER J., Ampere International Summer School, Basko Polje, Jugosliavia(1971).
- 103 NAGAYAMMA K., KUMAR A., WUTHRICH K., ERNST R.R. ; Experimental
Techniques of two- ditional correlated spectroscopy ; J. Magen. Reson., 1980, 40,
321-334.
- 104 BAX A., DAVIS D.G. ; Pratical aspects of two-dimensional transverse NOE
Spectroscopy ; J. Magn. Reson., 1985, 63, 207-213.
- 105 BAX A., SUBRAMAMANIAN S. ; Sensitivity-enhanced two-dimentional
heteronuclear shift correlation NMR spectroscopy ; J. Magn. Reson., 1986
67, 565,569.
- 106 BAX A., SUMMERS M.F. ; ^1H and ^{13}C assignments from sensitivy-enhanced
detection of heteronuclear multiple-bond connectivity by 2D multiple quantum NMR ;

- J. Amer. Chem. Soc., 1986, 108, 2093-2094.
- 107 HUANG K.S., LIN M., CHENG G.F. ; Anti-inflammatory tetramers of resveratrol from the roots of *Vitis amurensis* and the conformations of the seven-membered ring in some oligostilbenes. *Phytochem.*, 2001, 58, 357-362.
- 108 TAKAYA Y., YAN K.X., TERASHIMA K., ITO J., NIWA M., Chemical determination of absolute structures of resveratrol dimers, ampelopsins A, B, D and F. *Tetrahedron* ., 2002, 58, 7259-7265 .
- 109 IBRAHIM I., TOSHIYUKI T., *Helvetica Chimica Acta* ., 2002, 85, 2394-2402.
- 110 SHENG H., XUE N., *Phytochemistry*., 2008, 69, 772-782.
- 111 IBRAHIM I., TOSHIYUKI T., MIYUKI F., ZULFIGAR A., NAKAYA K., KENCHICHI L., SHIRATAKI M., MURATA Y., DAMAED D., Gifu Pharmaceutical University, Gifu, Japan., *Heterocycles*., 2001, 55(11), 2123-2130.
- 112 LANGCAKE P., PRYCE R-J., Oxidative dimerisation of 4-hydroxystilbenes in vitro: Production of a grapevine phytoalexin mimic. *Journal of the American Society Chemical Communications* 7, 1977. 208-10.
- 113 BREUIL A C., ADRIAN M., MEUNIER P., BESSIS R., JEANDET P., Metabolism stilbene phytoalexins by *Botrytis cinerea*: Characterisation of a resveratrol dehydrodimer *Tetrahedron Letters*., 39, 1998, 537-40.
- 114 LIN M., LIANG X., Lin, M., Li, J.-B., Li, S.-Z., Yu, D. Q., and Liang, X. T. A dimeric stilbene from *Gnetum parvifolium*. *Phytochemistry*.1992, 32(2), 633-8
- 115 W.-W., DING L.-S., Li, B.-G., CHEN, Y-Z., Oligostilbenes from *Vitis heyneana* *Phytochemistry*., 1996? 42(4),. 1163-5.
- 116 LANGCAKE P., PRYCE R-J., A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia*., 1977, 33, 151-2.
- 117 ITO., M. N~WA., Absolute Structures of New Hydroxystilbenoids, Vitisin C and Viniferal, from *Vitis vinifera* 'Kyohou'. *Tetrahedron*., 1996, 52, 9991-9998.
- 118 SIMON M., FULVIO G. ; *Phytpchemistry*., 2007, 1805-1812.