Conception et synthèse de sondes moléculaires pour l'étude d'interactions polyphénol-protéine

Dong Tien Tran

▶ **To cite this version:**

Dong Tien Tran. Conception et synthèse de sondes moléculaires pour l'étude d'interactions polyphénol-protéine. Chimie organique. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0443 . tel-01424144

HAL Id: tel-01424144
https://theses.hal.science/tel-01424144

Submitted on 2 Jan 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

université de BORDEAUX

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

SPÉCIALITÉ : CHIMIE ORGANIQUE

Par **Dong Tien TRAN**

CONCEPTION ET SYNTHESE DE SONDES MOLECULAIRES POUR L'ETUDE D'INTERACTIONS POLYPHENOL-PROTEINE

Sous la direction du : Pr. Stéphane QUIDEAU
et Dr. Denis DEFFIEUX

Soutenue le 18 décembre 2015

Membres du jury :

M. SCHMITTER, Jean-Marie	Professeur, Université Bordeaux	Président
Mme CHEYNIER, Véronique	Directrice de Recherche INRA, Montpellier	Rapporteur
M. CHASSAING, Stefan	Maître de Conférences, ITAV Toulouse	Rapporteur
M. LHERBET, Christian	Chargé de Recherche, CNRS Toulouse	Examinateur
M. DEFFIEUX, Denis	Maître de Conférences, Université Bordeaux	Co-directeur de thèse
M. QUIDEAU, Stéphane	Professeur, Université Bordeaux	Directeur de thèse

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été réalisés à l'Institut Européen de Chimie et Biologie (IECB), au sein de l'équipe de recherche Synthèse et Activité des Substances Naturelles (SASN), sous la direction conjointe du Professeur Stéphane Quideau et du Docteur Denis Deffieux.

Tout d'abord, je tiens à remercier Monsieur le Professeur Stéphane QUIDEAU, sans qui je n'aurais pas pu présenter ces résultats, pour m'avoir acueilli au sein de son équipe et m'avoir initié à la synthèse organique, notamment dans le domaine des substances polyphénoliques et des sondes moléculaires, ainsi que pour m'avoir offert les moyens de mener à bien ces études et m'avoir fait confiance tout au long de ce travail.

Je tiens également à adresser mes remerciements à Monsieur le Docteur Denis Deffieux pour m'avoir encadré tout au long de ces quatre années de thèse, pour sa disponibilité, ses conseils scientifiques, ainsi que son soutien en phase de rédaction.

J'adresse mes sincères remerciements à Madame le Docteur Véronique Cheynier et à Monsieur le Docteur Stefan Chassaing pour le travail de rapporteur qu'ils ont effectué sur ce manuscrit de thèse, ainsi qu'à Monsieur le Docteur Christian Lherbet pour avoir accepté d'être examinateur de ces travaux. Mes remerciements s'adressent aussi à Monsieur le Professeur Jean-Marie Schmitter pour avoir accepté de présider le jury.

Je souhaite par ailleurs présenter mes remerciements au Ministère de l'Education et de la Formation du Gouvernement vietnamien pour leur support financier durant ces quatre années, à l'Ecole Normale Supérieure de l'Université Hué qui m'a permis de suivre cette formation.

Je souhaite également témoigner toute ma reconnaissance envers Axelle Grélard, Estelle Morvan, Yannick Chollet pour la formation en RMN et leurs conseils sur les caractérisations RMN; à Frédéric Rosu, Loïc Klinger et l'équipe du CESAMO pour leur aide et leur analyses en spectrométrie de masse; ainsi qu'à Laëtitia Minder qui m'a épaulée tout au long des analyses en SPR pendant des périodes contraintes.

J'adresse mes sincères remerciements à Sabrina Rousseau pour ses judicieux conseils en biologie, sa disponibilité et ses encouragements, également à Thierry Dakhli, le producteur de la LDOX, et à Myriam Mederic pour leur aides, leur gentillesse et leur humour.

Un peu plus loin, à Bordeaux Segalen, je voudrais adresser mes remerciements tout d'abord à Monsieur le Professeur Jean-Marie Schmitter pour m'avoir permis de m'intergrer au sein de la Plateforme Protéome-Centre Génomique Fonctionnelle Bordeaux et d'utiliser le

spectromètre MALDI pour les analyses protéomiques. Mes reconnaissances devoient encore être adresser à Stéphane Claverol, Anne-Marie Lomenech, Jean-William Dupuy pour les analyses par spectrométrie de masse, notamment à Stéphane Chaignepain, qui m'a transmis sa rigueur, ses connaissances scientifiques, m'a consacré son temps, sa disponibilité, sa bonne humeur, sa gentillesse et ses encouragements.

Ce travail n'aurait pu être effectué sans l'aide de l'ensemble de l'équipe Synthèse et Activités des Substances Naturelles. A ce titre, je tiens à remercier tout d'abord le Professeur Laurent Pouységu pour ses conseils scientifiques et ses encouragements, le Docteur Philippe Peixoto pour ses conseils avisés en chimie organique, Rémi Jacquet, l'expert des tannins hydrolysables et des HPLC de l'équipe, qui m'a beaucoup aidé à surmonter des difficultés lors des raffinages de sondes finales. Je souhaite ensuite remercier tous mes collègues d'étudiant et post-doc, avec qui j'ai partagé ma vie professionnelle et quotidienne durant ces quatre années au laboratoire pour les moments indéfectibles : Hélène, qui m'a initié à la synthèse des sondes et à la protéomique chimique, pour m'avoir transmis sa rigueur et avoir pris de son temps pour mon travail ; Mélanie et Cyril, ils sont tout près même s'ils ne sont plus à côté de moi ; Aude, Gloria, Emilie, Romain, Mourad, Pablo, Nourby, Miguel, Joyce ; Guillaume, Sofiane et Manon (merci pour vos participations dans ce projet et vos supports), Simon, Antoine, Kévin, Aitor : merci à tous pour l'ambiance agréable et conviviale qu'on a vécu dans le laboratoire !

En particulier, un grand merci à Simon, pour son enthousiasme et le temps qu'il m'a consacré, et également à toute sa grande famille, avec qui j'ai passé de bons Noëls, des souvenirs très chers pendant des séjours en France.

Je remercie aussi les membres des équipes voisines, les chimistes : les Antoine(s), Maëlle, Christos, Diane ; les biologistes « next the door » (Stéphanie, Camila, Hélène) pour leurs supports précieux de connaissances et matériaux en biologie.

Un grand merci à la communauté des étudiants vietnamiens à Bordeaux pour leur précieux soutien, pour leurs encouragements au quotidien ainsi que pour les moments de détente : Tien Chinh, Duc Chinh, Ngoc Tung, Ngoc Anh-Ngoc Huyen, Ba Danh-Minh Van, Thanh Tung-Kim Dung, Xuan Hong, Thuy Phuong, Duc Bao.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à mes parents, qui ont accepté de me voir partir loin et pendant une longue période, ainsi qu'à mes frères et ma sœur qui s'occupent d'eux en mon absence.

Sommaire

Remerciements **1**
Sommaire **3**
Liste des abréviations et formules **7**
Introduction générale **11**

Chapitre 1 - Polyphénols et interactions polyphénol-protéine

1. Généralités sur les polyphénols **15**
1.1. Les flavonoïdes - une classe majeure de polyphénols 16
1.1.1. Les flavonols *18*
1.1.2. Les flavan-3-ols *18*
1.1.3. Les proanthocyanidines *20*
1.2. Conformations des flavan-3-ols et des proanthocyanidines 22
2. Propriétés des polyphénols **25**
2.1. Propriétés antioxydantes/pro-oxydantes 25
2.2. Propriétés protectrices chez les plantes et impact sur la santé humaine 27
3. Interactions des polyphénols avec les protéines **29**
3.1. Généralité sur les protéines 29
3.2. Interaction polyphénol-protéine 31
4. Les outils utilisés pour l'étude des interactions polyphénol-protéine **32**
5. De la protéomique à la protéomique chimique **33**
5.1. La protéomique 34
5.1.1. Approche "bottom-up" *34*
5.1.2. Analyse des peptides par SM *35*
5.1.3. Identification des protéines et traitements informatiques *37*
5.2. La protéomique chimique 39
5.2.1. l'ABPP : un exemple de protéomique chimique *40*
5.2.2. Structure d'une sonde ABPP *40*
5.2.3. Principe de l'ABPP *42*
5.2.4. Quelques exemples d'ABPP *43*
5.2.5. Limitations et évolution de l'ABPP *45*
6. La technique SPR **50**
6.1. Principe de la résonance plasmonique de surface 50
6.2. Visualisation du signal SPR : le sensorgramme 51

6.3. Mise en œuvre de la technologie BIAcore 52
6.4. Expérience classique et expérience inverse 53
7. Objectif et stratégie 55

Chapitre 2 - Développement de sondes moléculaires porteuses de flavanols et application en protéomique chimique

1. Conception et synthèse de sondes moléculaires porteuses de flavanols 57
1.1. Conception des sondes de type A et B 57
1.2. Synthèse des sondes A et B considérées 62
1.2.1. Synthèse des sondes photoactivables (sondes A) 68
1.2.2. Synthèse des sondes activables par oxydation chimique (sondes B) 75
2. Evaluation de l'efficacité de capture des sondes A et B 76
2.1. Protocole de capture et résultats 76
2.2. Optimisation du taux de capture des sondes de type B 80
2.2.1. Durée d'incubation 80
2.2.2. Durée d'activation au $NaIO_4$ 81
2.2.3. Influence de la nature de l'oxydant et du nombre d'équivalent de sonde .. 82
3. Etude de la sélectivité de la sonde B1 85
3.1. Capture de la LDOX en compétition avec la BSA 85
3.2. Capture de la LDOX en présence de la catéchine 86
3.3. Capture de la LDOX dans un mélange protéique complexe 86
4. Identification du ou des site(s) de fixation sur la LDOX de la sonde B1 87
4.1. Analyse directe du protéolysat par MALDI-TOF sans enrichissement d'affinité .. 87
4.2. Analyse du protéolysat après enrichissement par affinité 90
5. Développement de sondes photoclivables pour la protéomique chimique 91
5.1. Conception et synthèse de sondes photoclivables (sonde C1) 91
5.1.1. Préparation du groupement photoclivable 92
5.1.2. Synthèse de la sonde photoclivable C1 93
5.1.3. Evaluation du clivage de la sonde C1 97
5.2. Conception et synthèse de sondes photoclivables (sonde C2) 101
5.2.1. Synthèse de la sonde photoclivable C2 101
5.2.2. Evaluation du photoclivage de la sonde C2 102
6. Conclusion 115

Chapitre 3 - Synthèse de sondes moléculaires pour l'étude des interactions polyphénol-protéine par la technique de Résonance Plasmonique de Surface

1. Synthèse selon la voie A des sondes porteuses de flavanols 119

1.1. Préparation de l'espaceur biotine-maléimide 119

1.2. Synthèse par la voie A d'une sonde moléculaire porteuse de la procyanidine B2. 122

1.2.1. Bibliographie sur la synthèse des proanthocyanidines de type B 122

1.2.2. Hémisynthèse et caractérisation de la procyanidine B2 128

1.2.3. Finalisation de la synthèse de la sonde moléculaire porteuse de la procyanidine B2 130

2. Synthèse de sondes moléculaires porteuses d'EGCG et de ses analogues 133

2.1. Approches synthétiques de l'EGCG - Etude bibliographique 134

2.1.1. Approche de cycloéthérification pour former la liaison C2-O1 135

2.1.2. Approche de cycloarylation pour former la liaison C4-Ar 137

2.1.3. Synthèse des précurseurs dérivés du phloroglucinolet de l'alcool cinnamique 142

2.2. Synthèse de sondes moléculaires 143

2.2.1. Analyse rétrosynthétique 143

2.2.2. Synthèse du précurseur A 144

2.2.3. Synthèse du précurseur B 147

2.2.4. Synthèse des dérivés gallocatéchine et épigallocatéchine 148

2.2.5. Fonctionnalisation de la gallocatéchine et épigallocatéchine-finalisation de sondes 153

3. Etude d'interactions polyphénol-protéine par SPR 159

3.1. Immobilisation de ligands polyphénols biotinylés sur la sensor chip CM5 159

3.2. Interaction entre les polyphénols immobilisés avec des protéines 160

4. Conclusions 161

Conclusion et perspectives 163

Chapitre 4 - Partie expérimentale

1. General information 165

1.1. Melting point (m.p.) 165

1.2. Infrared spectroscopy (IR) 166

1.3. Optical rotation ($[\alpha]_D$) 166

1.4. UV-Vis spectra (UV-Vis) 166

1.5. Circular Dichroism (CD) 166

1.6. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) 166
1.7. Mass Spectrometry (MS) 167
1.8. HPLC 167
2. Experimental procedures 168
3. Biological assays 258
3.1. Production and purification of recombinant LDOX 258
3.2. LDOX enzyme assays with (+)-catechin 258
3.3. Production and extraction of *E. coli* proteins 259
3.4. Staining 259
3.4.1. Coomassie® Brilliant Blue 259
3.4.2. Colloidal Coomassie® Blue 259
3.4.3. Silver staining 259
3.5. Western blot 260
3.6. Probes A1, B1, B2 and LDOX experiments 261
3.6.1. Capture assays with probes A1, B1, B2 and LDOX enzyme 261
3.6.2. Competitive affinity assays with free catechin and with BSA 262
3.6.3. Competitive affinity assays with LDOX and E. coli proteome 262
3.7. Sample preparation and in-gel digestion prior to MS analysis 263
3.8. nLC-MS/MS analysis 263
3.9. Database search and results processing 264
3.10. MALDI-TOF analysis - reaction capture of the LDOX by probe B1 265
3.11. Photocleavable probes experiments 266
3.11.1. Labeling of LDOX with photocleavable probes 266
3.11.2. Streptavidin affinity purification and photocleavage 267
3.11.3. SDS-PAGE of captured proteins 268
3.11.4. In-solution tryptic digestion of labeled proteins and preparation of peptides for photocleavage 268
4. Surface plasmon resonance procedures 269
4.1. Materials 263
4.2. Protein solutions 263
4.3. Polyphenol-biotin adduct solutions 269
4.4. Immobilization of polyphenol-biotin adducts on to SPR sensor chips using affinity capture method 270
4.5. Binding assays 270
Références bibliographiques 273

Liste des abréviations et formules

Les composés sont désignés par un chiffre arabe écrit en caractère gras. Les références bibliographiques, désignées par un chiffre arabe placé en exposant, sont regroupées à la fin de ce mémoire. Les abréviations et notations particulières utilisées dans ce manuscrit sont explicitées ci-dessous :

ABPP	Activity-/Affinity-based proteomic profiling
Ac	acétyle
AcOH	acide acétique
AIBN	2,2′-Azobis(2-methylpropionitrile)
Ar	aromatique
b.p.	boiling point
Bn	benzyle
Boc	*N*-(tert-Butoxycarbonyl)
Bu	butyle
calcd	calculated
CAS	Chemical Abstracts Service (number)
CCM/TLC	Chromatographie sur Couche Mince/Thin Layer Chromatography
CD	Dichroïsme circulaire (Circular Dichroism)
CDI	1,1′-Carbonyldiimidazole
CF	Chemical Formula
CI	Chemical Ionization
COSY	COrrelation SpectroscopY
dr	Ratio diastéréoisomérique
D_2O	eau deutérée
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène
DCC	dicyclohexylcarbodiimide
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DEAD	diéthyl azodicarboxylate
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DIAD	diisopropyl azodicarboxylate
DIBAL-H	Hydrure de diisobutylaluminum
DIC	*N*,*N*'-diisopropylcarbodiimide

DIPEA	*N*,*N*-diisopropylethylamine
DMAP	4-(diméthylamino)pyridine
DMF	*N*,*N*-diméthylformamide
DMP	Dess-Martin Periodinane
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DOPA	3,4-Dihydroxyphénylalanine
DSC	carbonate de *N*,*N*'-disuccinimidyl
DTT	DL-1,4-dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EDCI•HCl	Chlorhydrate de *N*-(3-diméthylaminopropyl)-*N*'-éthylcarbodiimide
ee	excès énantiomérique
EGCG	épigallocatéchine-3-gallate
EI	Electron Ionization
EM	Exact Mass
éq.	équivalent(s)
ESI-TOF	Electrospray Source Ionization-Time-of-Flight
Et_3N	triéthylamine
AcOEt	acétate d'éthyle
EtOH	éthanol
FDI	Field Desorption and Ionization
Fmoc	*N*-(9-Fluorénylméthoxycarbonyloxy)
HBTU	***N*,*N*,*N'*,*N'*-tétraméthyl-*O*-(1H-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate**
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Correlation
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
IR	Infra-Rouge/Infrared
J	Constante de couplage exprimée en Hertz
K_D	Constante de dissociation
LDOX	Leucoanthocyanidine dioxygénase
lit.	littérature
LRMS/HRMS	Low Resolution Mass Spectrometry/High Resolution Mass Spectrometry
L-Selectride	Lithium tri *sec*-butylborohydride

m.p.	melting point
MALDI	Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization
m-CPBA	L'acide 3-chloroperoxybenzoïque
MW	Molecular Weight
Na Asc	ascorbate de sodium
NBS	*N*-bromosuccinimide
NHS	*N*-hydroxysuccinimide
NIS	*N*-iodosuccinimide
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement SpectroscopY
o-/*m*-/*p*-	*ortho*-/ *méta*-/ *para*-
PA	Proanthocyanidine
PBS	"Phosphate buffer saline"
Pd/C	Palladium sur charbon
Ph_3CCl	chlorure de trityle
Ph_3P	triphénylphosphine
PPTS	pyridinium *p*-toluènesulfonate
PyBOP	(benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
rel. intensity	relative intensity
R*f*	Rapport frontal
RMN/NMR	Résonance Magnétique Nucléaire/Nuclair Magnetic Resonance
ROESY	Rotating-frame nuclear Overhauser Enhancement SpectroscopY
RX	Rayons X
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SM (ou MS)	Spectrométrie de masse (Mass Spectrometry)
SPR	Surface Plasmon Resonance
t.a./r.t.	température ambiante/room temperature
TBAF	fluorure de tétrabutylammonium
TBAI	iodure de tétrabutylammonium
TBSCl	Chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle
TBS-T	"Tris buffer saline" contenant du Tween 20
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride
TFA	acide trifluoroacétique (trifluoroacetic acid)
THF	tétrahydrofurane
TIS	triisopropylsilane
TOCSY	TOtally Correlated SpectroscopY

t_R	temps de rétention
Tris-HCl	Hydrochlorure de tris(hydroxyméthyl))aminométhane
TX	Thioxanthone
UV/Vis	Ultraviolet-Visible
δ	Déplacement chimique
Δ	Chauffage
ν_{max}	"frequency of maximal IR absorption"
λ_{max}	"wavelength of maximal UV absorption"

Les unités couramment utilisées sont listées ci-dessous :

°C	température en degrés Celsius
Å	Ångström
cm, mm, nm	centimètre, millimètre, nanomètre
Da/kDa	Dalton/kilodalton
g, mg, µg, ng	gramme, milligramme, microgramme, nanogramme
h, min	heure(s)/hour(s), minute(s)
Hz, MHz	Hertz, mégaHertz
$kcal.mol^{-1}$	kilocalorie par mole
L, mL, µL	litre, millilitre, microlitre
M, mM, µM	molaire (concentration en mole par litre), millimolaire, micromolaire
mL/min	millilitre par minute
mol%	pourcentage molaire
mol, mmol	mole, millimole
mW	milliwatt
ppm	partie par million
rpm	rotation par minute
Ua	unité arbitraire

Introduction générale

Les polyphénols végétaux prennent aujourd'hui une importance croissante non seulement auprès de la communauté scientifique mais aussi du grand public en raison de leur présence dans de nombreux végétaux de base pour la nourriture et de leurs nombreux effets biologiques remarquables pour la santé humaine.[1–8]

Depuis très longtemps, les extraits de plantes, riches en composés polyphénoliques ont largement été utilisés dans les médecines traditionnelles orientales. A l'heure actuelle, parallèlement au développement de méthodes thérapeutiques coûteuses, la tendance à retrouver des remèdes traditionels prend une place de plus en plus importante. La consommation régulière de 5 portions de fruits et légumes par jour est donc vivement recommandée dans le régime alimentaire occidental, principalement en raison des polyphénols qu'ils contiennent. En effet, ces substances naturelles, notamment connues pour leurs pouvoirs antioxydant et anti-radicalaire, joueraient des rôles importants dans la protection de la santé à long terme contre les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives, mais également certains cancers et diabètes.[1,6–11] En général, les effets biologiques des polyphénols sont attribués à leur propriété antioxydante. Cependant, il existe des preuves convaincantes qui montrent que les mécanismes par lesquels certains polyphénols exercent leurs effets protecteurs, voire curatifs, contre de nombreuses pathologies humaines ne sont pas simplement dus à leurs propriétés rédox vis-à-vis d'espèces radicalaires mais aussi à leur capacité à se lier spécifiquement à des protéines cibles (ou des peptides). Un tel mode d'action conduirait par exemple à l'inhibition d'enzymes, à la modulation de la fonction de récepteurs cellulaires ou de facteurs de transcriptions, ainsi qu'à la perturbation de l'agrégation de protéines ou de peptides pouvant réguler des fonctions cellulaires liées.[11–17] Cependant, par manque d'outils adéquats pour caractériser à l'échelle moléculaire ces interactions polyphénol-protéine, la nature des protéines impliquées et le mécanisme moléculaire responsable de ces interactions restent, à ce jour, sans réponse et l'incidence directe ou indirecte de ces interactions avec certaines protéines, très mal connue.

Dans le but d'apporter des informations pertinentes sur la ou les cibles protéiques qu'un polyphénol donné engage lors de l'expression de ses activités biologiques, voire d'effets toxiques éventuels, l'identification, la localisation *in cellulo* et la caractérisation des protéines impliquées mais également les modes d'action de ces polyphénols, permettraient de mieux comprendre et/ou de révéler les mécanismes biophysicochimiques et physiologiques

intervenant au niveau de l'action de ces molécules. Les réponses obtenues dans le cadre d'une telle étude contribuerait grandement au développement de nouveaux médicaments à base de molécules polyphénoliques.

L'objectif principal de cette thèse, située à l'interface de la chimie et de la biologie, est de concevoir, de synthétiser et d'évaluer de nouvelles sondes moléculaires porteuses de polyphénols comme substrats d'affinité en tant qu'outils de choix pour l'étude des interactions entre ces polyphénols et les protéines qui les génèrent ou qu'ils ciblent dans leur expression d'activités biologiques. Ces sondes polyvalentes pourront être utilisées soit pour identifier au sein d'un mélange complexe de protéines, une protéine ayant une affinité spécifique pour un polyphénol donné, soit pour étudier de manière qualitative les interactions d'un polyphénol avec une protéine donnée en temps réel par la technique de résonance plasmonique de surface (SPR).

Dans le premier cas, la structure des sondes doit spécifiquement permettre à la sonde de reconnaître puis de se lier de façon covalente à la protéine ciblée pour permettre ensuite d'isoler cette protéine et de l'identifier par l'analyse protéomique. Dans le deuxième cas, la structure des sondes doit permettre de les immobiliser sur une surface pour réaliser des analyses SPR. Les sondes envisagées dans cette étude devraient permettre de remplir ces deux fonctions.

Ce manuscrit de thèse se divise en quatre chapitres :

Le premier chapitre est consacré à une étude bibliographique se rapportant aux polyphénols et leurs propriétés. Un état de l'art sera fait sur l'interactions des polyphénols avec les protéines et les différentes techniques utilisés à ce jour pour les étudier.

Nous décrirons plus en détails par la suite les deux techniques développées dans cette étude, l'"Activity or Affinity-Based Proteomic Profiling" (ABPP) de protéomique chimique et la technique de résonance plasmonique de surface.

Le deuxième chapitre sera consacré à la conception, la synthèse et l'évaluation de trois types de sondes moléculaires porteuses de catéchine et d'épicatéchine appliquées en protéomique chimique. Les sondes photoactivables contenant un azoture aromatique (sondes de type A), les sondes activables par oxydation (sondes de type B) et les sondes possédant un lien photoclivable de type *o*-nitrobenzyle (sondes de type C) seront successivement présentées.

Le troisième chapitre présentera la synthèse de deux sondes comportant un espaceur portant une biotine terminale, pour étudier leurs interactions avec les protéines par la technique SPR. Ces deux sondes impliquent la synthèse de deux polyphénols importants de par leurs effets biologiques multiples, la procyanidine B2 et l'épigallocatéchine-3-gallate (EGCG).

Enfin, le quatrième chapitre de ce manuscrit regroupera les techniques expérimentales, les conditions opératoires et les données analytiques des différents composés synthétisés. Il comportera également la description des données concernant le matériel biologique, les méthodes d'études enzymatiques réalisées ainsi que les techniques SPR utilisées.

Ce travail a fait l'objet à ce jour de :

deux publications

1. H. Carrie, D. T. Tran, S. Rousseau, S. Chaignepain, J-M. Schmitter, D. Deffieux, S. Quideau. New affinity-based probes for capturing flavonoid-binding proteins, *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 9387-9389.

2. A. Watrelot, D. T. Tran, T. Buffeteau, D. Deffieux, C. Le Bourvellec, S. Quideau, C. Renard. Immobilization of flavan-3-ols onto sensor chips to study their interactions with proteins and pectins by SPR, soumise à Applied Surface Science.

et six communications par voie d'affichage

1. D. T. Tran, M. Doumas, D. Deffieux, S. Quideau, "Synthesis of (–)-epigallocatechin-3-gallate-bearing proteomic probe", IECB Young Scientist Symposium 2015, Pessac, France (5-6 juin 2015), **Prix du meilleur poster**.

2. D. T. Tran, M. Doumas, D. Deffieux, S. Quideau, "Synthèse d'une sonde protéomique porteuse d'épigallocatéchine-3-gallate", Scientifique de l'Institut des Sciences Moléculaires, Talence, France (03 juillet 2014).

3. D. T. Tran, M. Doumas, D. Deffieux, S. Quideau, "Synthèse d'une sonde protéomique porteuse d'épigallocatéchine-3-gallate", Quatrième Symposium Francophone de Synthèse Totale (SFST4), Montpellier, France (5-6 juin 2014).

4. D. T. Tran, D. M. Delannoy, A. Watrelot, D. Deffieux, S. Quideau, "Synthèse de dérivés polyphénoliques pour étudier les interactions Polyphénol-Protéine par la technique de

Résonance Plasmonique de Surface (RPS)", Journée Scientifique de l'Institut des Sciences Moléculaires, Talence, France (5 juillet 2013).

5. D. T. Tran, D. M. Delannoy, A. Watrelot, D. Deffieux, S. Quideau, "Des dérivés polyphénoliques et l'interaction Polyphénols - Protéines par des techniques de SPR (Surface Plasmon Résonance)", 15ème Journée de l'Ecole Doctorale des Sciences Chimiques, Talence, France (25 avril 2013).

6. D. T. Tran, H. Carrié, S. Rousseau, D. Deffieux, S. Quideau, "Développement de Sondes Moléculaires pour Elucider la Biosynthèse des Proanthocyanidines", Journée de Chimie du Grand-Sud-Ouest (GSO), Société Chimique de France (SCF), Pessac, France (30 novembre 2012).

Chapitre 1

Polyphénols et interactions polyphénol-protéine

Dans ce chapitre, nous décrirons les polyphénols et leurs propriétés physico-chimiques ainsi que leurs interactions avec les protéines. Nous détaillerons également les techniques utilisées pour évaluer ces interactions.

1. Généralités sur les polyphénols

Les polyphénols représentent une classe importante de substances naturelles. Ces produits du métabolisme secondaire des plantes sont largement présents dans le règne végétal. Les polyphénols végétaux (ou tannins végétaux) ont été définis par Haslam, en se basant sur la définition et la classification de Bate-Smith et Swain (1962) et White (1957), comme des molécules solubles dans l'eau, possédant une masse molaire comprise entre 500 et 3000-4000 Da, 12 à 16 groupements polyphénoliques et 5 à 7 cycles aromatiques par 1000 unités de masse molaire.[3] Selon ces auteurs, les polyphénols sont classés en différentes catégories. La première catégorie réunie les tannins hydrolysables, qui ont la particularité d'être hydrolysés par un traitement chimique (eau chaude acidifiée) ou enzymatique (les tannases). Cette famille inclut les ellagitannins et les gallotannins produisant lors de leur hydrolyse respectivement l'acide ellagique et l'acide gallique. Deuxièmement, les proanthocyanidines (ou tannins condensés) qui sont formés par des unités monomériques de flavanols, comme la catéchine ou l'épicatéchine. La troisième catégorie regroupe les phlorotannins, une nouvelle famille de polyphénols isolés d'algues brunes rouges marines.[3,18]

Le terme polyphénol est cependant souvent utilisé pour désigner des tannins de structures plus ou moins complexes, de hauts poids moléculaires et capables de faire précipiter des protéines en solution comme dans le cas du tannage de la peau des animaux. C'est pourquoi, notre équipe a apporté une nouvelle définition, permettant de mieux décrire l'ensemble des polyphénols : le terme polyphénol définit des métabolites secondaires de plantes qui dérivent exclusivement de la biosynthèse des phénylpropénoïdes dérivés de l'acide shikimique et/ou de celle des polycétides, et dont la structure dépourvue de groupes fonctionnels azotés, comporte

plus d'un cycle phénolique.[1] Cette définition permet non seulement d'aborder les polyphénols sous tous leurs aspects, quelles que soient leurs masses moléculaires ou leurs propriétés tannantes, mais également de les classer systématiquement en fonction de la structure chimique et de l'origine biosynthétique.

De cette définition, les polyphénols peuvent se regrouper en 5 grandes classes : les flavonoïdes, les tannins condensés, les tannins hydrolysables, les phlorotannins, les hydroxystilbénoïdes possèdant un squelette de motif C_6-C_2-C_6 et une sixième classe regroupant divers polyphénols dérivés d'acides phénoliques variés, comme par exemple l'acide caféique. (Figure 1).

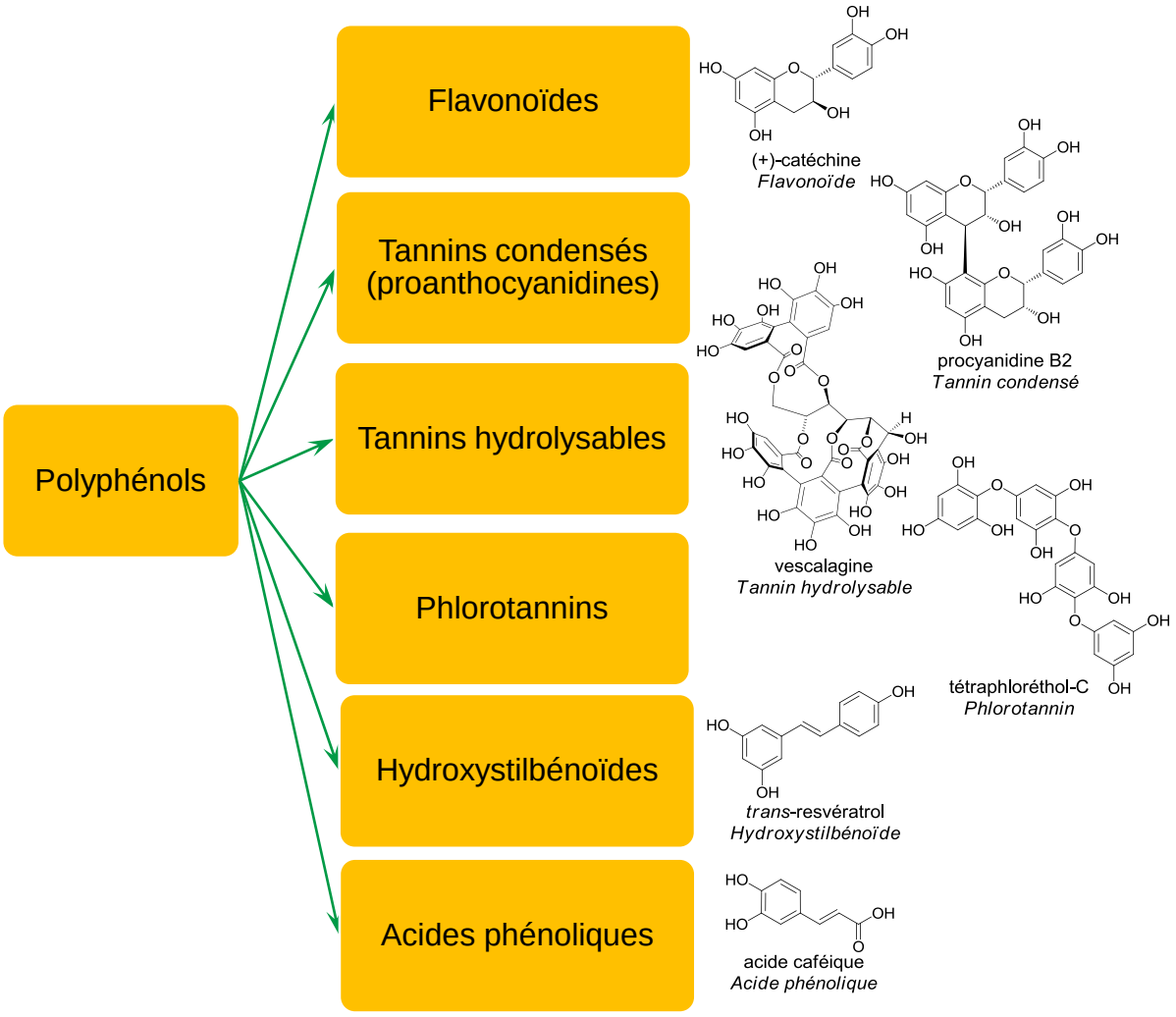


Figure 1. Les grandes classes de polyphénols trouvés chez les plantes et leurs représentants

1.1. Les flavonoïdes-une classe majeure de polyphénols

Les flavonoïdes désignent une classe structuralement très diversifiée de la famille des polyphénols et représenteraient la troisième famille la plus abondante de métabolites secondaires chez les végétaux après les alcaloïdes et les terpenoïdes.[10,19–26] Les flavonoïdes sont

présents dans de nombreux fruits, légumes, graines, fleurs, rhizômes, et donc dans diverses nouritures et boissons (comme le vin, le thé ou le chocolat) mais également dans de nombreuses herbes médicinales.[10,19,20,26]

Les flavonoïdes possèdent en général un squelette de base commun de type 2-phénylchromane ou noyau flavane. Ce dernier est composé de deux cycles aromatiques A et B liés par un cycle central C de type pyrane. Le cycle A peut être de type phloroglucinol ou de type résorcinol et le cycle B, biogénétiquement dérivé de la voie de l'acide shikimique, peut être mono-, di- ou trihydroxylé. L'hétérocycle C peut, quant à lui, exister sous trois formes : pyrane, pyrillium ou γ-pyrone. Une numérotation spécifique des flavonoïdes possèdant un hétérocycle C de type pyrane a été établie comme il est indiqué ci-après (Figure 2).

Selon l'état structural et le niveau d'oxydation du cycle C, les flavonoïdes se différencient en plusieurs sous-groupes : les flavones, les flavanones (ou dihydroflavones), les flavonols, les dihydroflavonols (DHFs), les flavan-3,4-diols, les flavan-3-ols, les anthocyanidines et les proanthocyanidines (Figure 2).

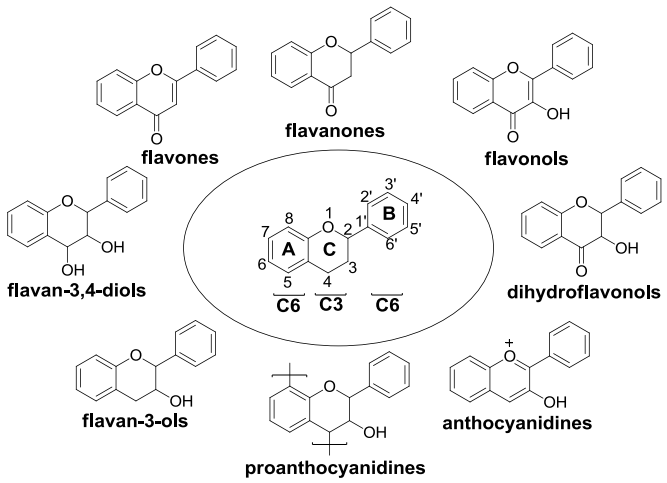


Figure 2. Structure de base des flavonoïdes et les principaux sous-groupes possédant un noyau flavane

Il existe cependant des exceptions à ce système : les chalcones qui possèdent un cycle C ouvert, les aurones dont le cycle C est de type furane et les isoflavones pour lesquelles le cycle B n'est pas en position 2 mais en position 3 (Figure 3).

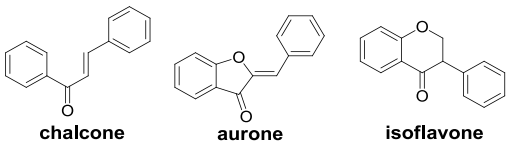
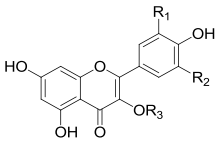


Figure 3. Structures de base des flavonoïdes sans noyau flavane

Au sein d'un même sous-groupe peuvent exister des subdivisions en fonction du nombre et de la position des substituants sur les noyaux de base de ces composés générés par hydroxylation, methylation, glycosylation, malonylation et sulfatation.[20] Par la suite, nous aborderons uniquement les flavonoïdes les plus concernés par ces travaux de thèse.

1.1.1. Les flavonols

Les flavonols se caractérisent par l'hétérocycle oxygéné C qui porte une double liaison entre C-2 et C-3, un groupement hydroxyle en C-3 et une fonction carbonyle en C-4. Les flavonols existent soit sous formes d'aglycones tels que la quercétine, le kaempférol, la myricétine ou encore l'isorhamnétine, soit sous formes glycosylées (glucose, xylose, arabinose, galactose et rhamnose) principalement en position C-3 mais également possible sur les groupements phénoliques (Figure 4).[20,27]



R_1	R_2	R_3	Nom
H	H	H	kaempférol
OH	H	H	quercétine
OH	OH	H	myricétine
OCH_3	H	H	isorhamnétine
OH	H	Glucose	isoquercitrine

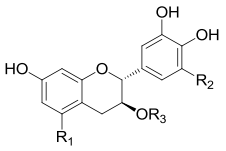
Figure 4. Exemple de structure de flavonols

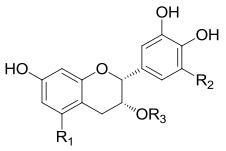
Les flavonols sont des pigments variant du blanc au jaune présents chez la plupart des végétaux. Chez la vigne, les flavonols sont stockés dans la pellicule des baies des raisins blancs ou rouges. Ils sont majoritairement présents dans la peau et peuvent être également retrouvés dans les pépins de pomme.

1.1.2. Les flavan-3-ols

Les flavan-3-ols représentent la plus grande classe de flavonoïdes monomériques et sont désignés sous le nom de catéchines. Ce sont les seuls flavonoïdes (avec les proanthocyanidines) présents majoritairement sous leur forme aglycone. Les monomères se différencient à la fois par le niveau d'hydroxylation des cycles A, B et par la stéréochimie des deux carbones asymétriques C-2 et C-3. La stéréochimie du carbone C-2 est généralement *R*, mais il existe quelques exceptions. Leur nomenclature dépend donc de la configuration de ces derniers. Le

nom trivial de ces composés est donné à l'isomère de configuration (2*R*,3*S*). Le préfixe épi- est ajouté pour désigner les épimères de ces composés, tandis que le préfixe *ent*- est ajouté pour leurs énantiomères. Par exemple, les formes dihydroxylées en C-3' et C-4' (type catéchol du cycle B), l'épimère de la (+)-(2*R*,3*S*)-catéchine est désigné par le terme la (–)-(2*R*,3*R*)-épicatéchine et leurs énantiomères respectifs sont la (–)-*ent*-catéchine et la (+)-*ent*-épicatéchine. Ces deux monomères en configuration 2*R* sont les plus abondants chez les plantes alimentaires, tandis que ceux en configuration 2*S* sont plus rares.[3] De la même façon, les formes trihydroxylées regroupent la (+)-gallocatéchine, la (–)-épigallocatéchine et leurs deux énantiomères. Il existe également les formes monohydroxylées en C-7 (type résorcinol du cycle A), regroupant le robinétinidol et le fisétinidol (Figure 5).[3,19,20,22,27]





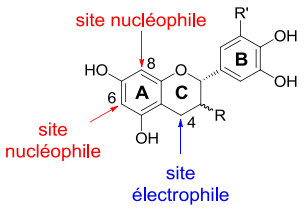
R_1	R_2	R_3	Nom	R_1	R_2	R_3	Nom
OH	H	H	(+)-catéchine	OH	H	H	(–)-épicatéchine
OH	OH	H	(+)-gallocatéchine	OH	OH	H	(–)-épigallocatéchine
OH	H	Galloyl	(+)-catéchine-3-gallate	OH	H	Galloyl	(–)-épicatéchine-3-gallate
OH	OH	Galloyl	(+)-gallocatéchine-3-gallate	OH	OH	Galloyl	(–)-épigallocatéchine-3-gallate
H	H	H	(–)-fisétinidol	H	OH	H	(+)-épirobinétinidol

Figure 5. Structure des principaux flavan-3-ols

Les flavan-3-ols, notament les catéchines et les épicatéchines, ont été trouvés dans plusieurs fruits et plus particulièrement dans la peau, comme les abricots (*Prunus armeniaca*), les cerises aigres (*P. cerasus*), les raisins (*Vitis vinefera*), les mûres (*Rubus* spp.), les pommes, et les myrtilles.[19,20] Les catéchines, épicatéchines et leurs analogues, comme les gallocatéchines sont également présents en forte concentration dans les feuilles de thé vert (*Camellia sinensis*) et les fèves de cacao (*Theobroma cacao*). La (+)-catéchine et les prodelphinidines B sont des composants majeurs trouvés dans l'orge et le malt. Par contre, la (+)-catéchine, la (–)-épicatéchine, la (+)-gallocatéchine et la (–)-épigallocatéchine sont les plus abondants dans les baies de raisin. Le thé vert est la seule boisson riche en (+)-gallocatéchine, (–)-épigallocatéchine, (–)-épicatéchine-3-gallate, (–)-épigallocatéchine-3-gallate (EGCG) à côté de la (+)-catéchine et de la (–)-épicatéchine.[20]

1.1.3. Les proanthocyanidines

Les proanthocyanidines (PAs), également appelées tannins condensés, sont des composés également très largement répandus dans le règne végétal, comme dans les fruits, les baies et les graines. Ils sont principalement connus pour leur utilisation en tant qu'agents tannants pour la peau des animaux et leur rôle dans la saveur et l'astringence de certaines boissons comme le thé, le vin et les jus de fruits. D'un point de vue structural, les PAs sont des oligomères ou polymères d'unités monomériques flavan-3-ols.[1,3,20] Les principales unités monomériques sont la (+)-(2*R*,3*S*)-catéchine, la (–)-(2*R*,3*R*)-épicatéchine, la (+)-(2*R*,3*S*)-gallocatéchine et la (–)-(2*R*,3*R*)-épigallocatéchine, dont la stéréochimie du carbone C-2 la plus commune est la configuration 2*R*. Chimiquement, les flavan-3-ols sont réactifs du fait du caractère électrophile de leur carbone C-4 activé, qui réagit avec les carbones nucléophiles C-6 ou C-8 du cycle A, toujours en position *trans* par rapport au groupement hydroxyle en position C-3 du monomère supérieur donnant un lien α avec une catéchine et un lien β avec une épicatéchine (Figures 6 et 7). La répétition du même mécanisme conduit à la formation d'oligomères et de polymères. Le système de nomenclature le plus souvent utilisé a été initialement suggéré par Hemingway,[28] puis étendu par Porter.[29] Les PAs doivent donc leur nom au fait que les unités d'extension sont converties en anthocyanidines correspondantes colorées lors d'un clivage en conditions acidifiées chaudes et d'oxydation.[3,20,23,28]



(+)-catéchine	R=β-OH, R'=H
(–)-épicatéchine	R=α-OH, R'=H
(+)-gallocatéchine	R=β-OH, R'=OH
(–)-épigallocatéchine	R=α-OH, R'=OH

Figure 6. Structure et réactivités des principaux monomères des proanthocyanidines

Les PAs présentent une diversité structurale importante, relative à la nature des flavan-3-ols de départ et des unités d'extention, à la position et la stéréochimie de la liaison interflavane entre ces unités, au nombre d'unités monomériques : les oligomères, contenant de deux à une dizaine d'unités, les polymères, notés en degré de polymérisation (DP), et enfin à la présence ou l'absence de modifications telles que l'acylation du groupement hydroxyle en position C3 (souvent substituée par de l'acide gallique). Selon les différents degrés d'hydroxylation sur les cycles A et B des monomères constitutifs, les tanins condensés se divisent en plusieurs classes. Parmi elles, on peut citer les prodelphinidines, constituées d'unités (épi)gallocatéchine, et les procyanidines, dérivées de l'(épi)catéchine. De la nature des liaisons interflavaniques entre les monomères, lorsque celles-ci sont de type C-C, reliant le carbone C-4 de l'unité supérieure au

carbone C-8 ou C-6 de l'unité inférieure (C4-C8 ou C4-C6), les PAs sont dites de type B. Les structures chimiques des principaux dimères de type B sont détaillées dans la figure 7. Les PAs de type A possèdent une liaison éther supplémentaire entre le carbone C-2 de l'unité supérieure et le carbone en position C-5 ou C-7 du cycle A de l'unité inférieure (C2-O-C5 ou C2-O-C7.[3,20,23,27,30,31]

Les procyanidines de type B par rapport à celles de type A prédominent dans la nature. Parmi celles-ci, les dimères les plus communs sont les PA B1, B2, B3 et B4, constituées de deux unités catéchine et/ou épicatéchine liées en C4-C8 selon une configuration α pour la B3 et la B4 et β pour la B1 et la B2 (Figure 7). Ces procyanidines sont largement présentes dans de nombreux fruits et légumes. Par exemple, on trouve de façon prépondérante la procyanidine B1 dans les raisins, les sorghos et les canneberges, la B2 dans les pommes, les grains de cacao, les cerises, la B3 dans les fraises, les houblons, les fleurs de saules, et la B4 dans les mûres et les framboises.[30,31]

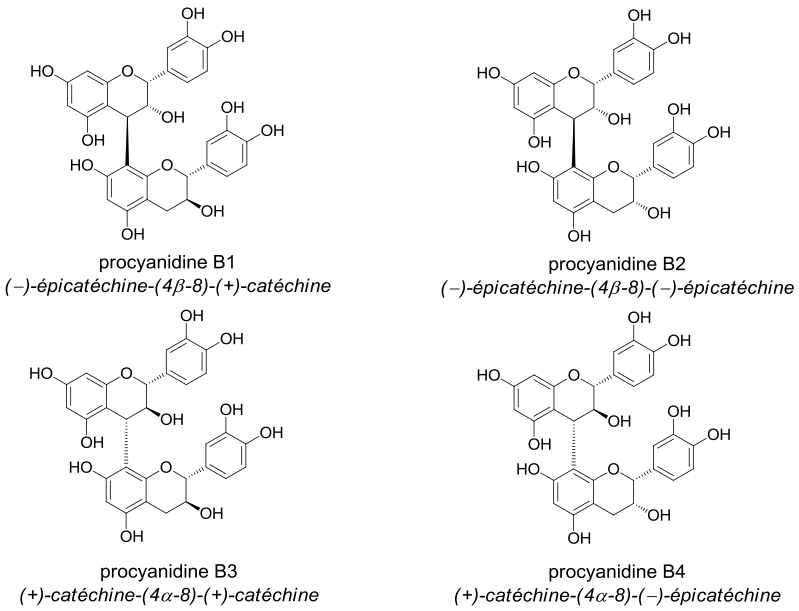
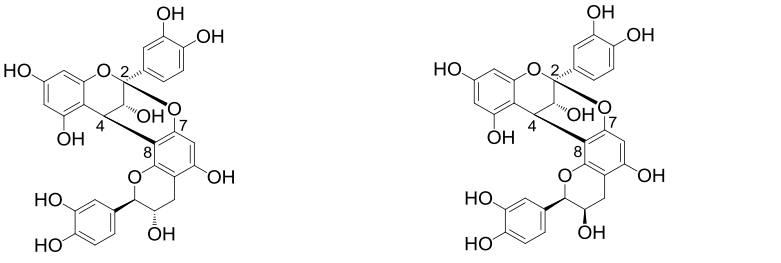


Figure 7. Structures de quelques procyanidines de type B

En revanche, les procyanidines de type A se trouvent moins fréquemment. Les deux premières isolées de plantes sont la A1 isolée de la canneberge de montagne et la A2 isolée des coquilles de marron d'Inde et des graines d'avocat (Figure 8).[3]

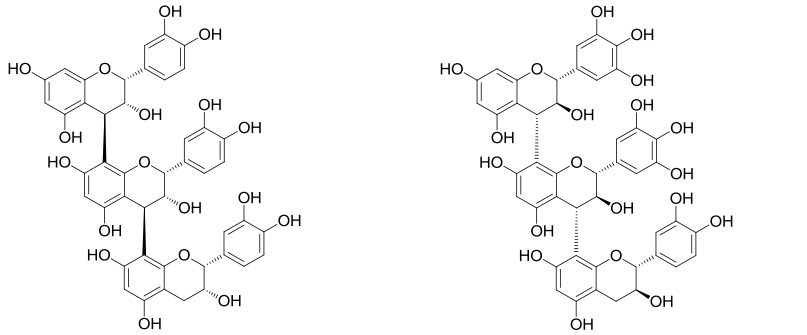


procyanidine A1
(–)-épicatéchine-(4β-8,2β-O-7)-(+)-catéchine

procyanidine A2
(–)-épicatéchine-(4β-8,2β-O-7)-(–)-épicatéchine

Figure 8. Exemples de procyanidines de type A

Il existe également des PAs de la série C : ces composés sont constitués de trois unités monomériques reliées par deux liaisons interflavanes de type C4-C8 et C4-C6. Nous citerons à titre d'exemple de la procyanidine C1 ((–)-épicatéchine-(4β-8)-(–)-épicatéchine-(4β-8)-(–)-épicatéchine) trouvée dans les pépins de raisin,[32] et la prodelphinidine C2 ((+)-gallocatéchine-(4α-8)-(+)-gallocatéchine-(4α-8)-(+)-catéchine) trouvée dans le malt (Figure 9).[33]



procyanidine C1
(–)-épicatéchine-(4β-8)-(–)-épicatéchine-(4β-8)-(–)-épicatéchine

prodelphinidine C2
(+)-gallocatéchine-(4α-8)-(+)-gallocatéchine-(4α-8)-(+)-catéchine

Figure 9. Exemples de proanthocyanidines de type C

1.2. Conformations des flavan-3-ols et des proanthocyanidines

La structure conformationnelle de l'hétérocycle pyrane C propre aux flavan-3-ols a été étudiée, notamment par Clark-Lewis *et al.*,[34] Porter et *al.*,[35,36] et Hemingway et *al.*[37] Trois conformations possibles sont proposées : demi-chaise, fauteuil C2 et fauteuil C3 (Figure 10). Dans la conformation demi-chaise, les carbones C2 et C3 se trouvent de part et d'autre du plan formé par le cycle A (représenté par la ligne en pointillé). Ces deux carbones possèdent de vraies liaisons axiales et équatoriales tandis que celles du carbone C4 sont pseudo-axiales et pseudo-équatoriales. La conformation appelée fauteuil C2 ou C3 présente le carbone C2 ou C3 en dehors du plan formé par le cycle A (Figure 10).[3,35,38,39]

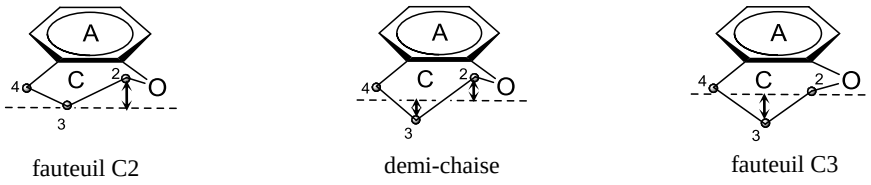


Figure 10. Conformations du cycle C d'un flavane

De plus, le cycle B en position C2 peut se trouver soit en position axiale (conformère A) soit en position équatoriale (conformère E), comme décrit ci-dessous suivant une représentation demi-chaise (Figure 11) :

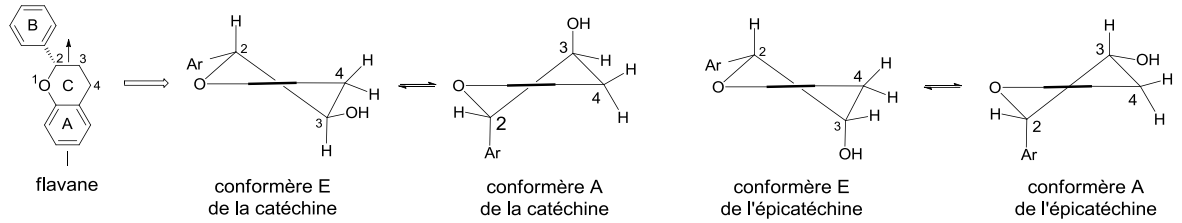


Figure 11. Equilibre entre les conformères A et E de la catéchine et de l'épicatéchine

La barrière énergétique entre ces deux conformères étant égale à 5-6 kcal.mol^{-1}, un équilibre rapide existe en solution entre ces deux conformations. L'équation de Karplus et les constantes de couplages en RMN du proton permettent de décrire les proportions de chacune des deux formes. Il en est déduit que le conformère E est privilégié. Par exemple, en solution, aqueuse, le ratio des conformères E:A est de 62:38 pour la catéchine et de 86:14 pour l'épicatéchine. La substitution sur l'atome de carbone en position C-4 (de la catéchine et de l'épicatéchine) par un groupement hydroxyle ou aryle favorise fortement la conformation E.[3,34,36]

La structure moléculaire des PAs est plus complexe. Cela est dû aux conformations de l'hétérocycle C et à la stéréochimie des liaisons interflavanes. Ces liaisons peuvent adopter deux stéréochimies différentes contrôlées par la nature des monomères constitutifs : lorsque l'unité supérieure des PAs naturelles est une (gallo)catéchine, la liaison interflavane est α (type 4α-6 ou 4α-8, donc de configuration 2*R*,3*S*,4*S*) tandis que quand l'unité supérieure est une épi(gallo)catéchine, la liaison interflavane est β (type 4β-6 ou 4β-8, donc de configuration 2*R*,3*R*,4*R*). De plus, une gêne stérique autour de la liaison interflavane provoque un empêchement à la libre rotation et conduit à des rotamères. L'étude de structures moléculaires des procyanidines dimériques menée par Haslam et *al.* a pu différencier deux structures conformationnelles majeures à rotation réduite pour les procyanidines B1 et B2 (de type C4β-

C8) et B3 et B4 (de type C4α-C8), chaque paire de rotamères étant caractérisée par l'angle dièdre C3-C4-C8-C7 (Figure 12).[38,39]

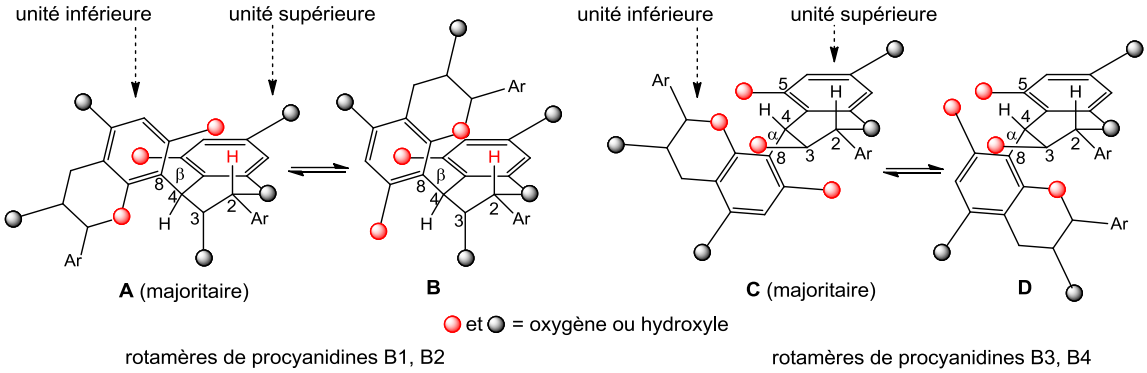


Figure 12. Rotamères des procyanidines dimériques de type B

Haslam et *al*. a montré que le rotamère **A** prédomine pour les procyanidines B1 et B2 ainsi que le rotamère **C** dans le cas des procyanidines B3 et B4 (Figure 12).[39,3] En effet, la modélisation moléculaire a permis de mettre en évidence dans le cas des procyanidines B1 et B2, une contrainte à la libre rotation liée à des interactions stériques entre l'hydrogène en position C-2 de l'unité flavan-3-ol supérieure et le groupement hydroxyle en position *ortho* de la liaison interflavane du cycle A de l'unité flavan-3-ol inférieure. Par contre, dans le cas des procyanidines B3 et B4, les substituants oxygénés en positions C-3 et C-5 de l'unité flavan-3-ol supérieure et ceux en position *ortho* de la liaison interflavane du cycle A de l'unité flavan-3-ol inférieure sont essentiellement responsables des encombrements stériques (Figure 12). La barrière énergétique de conversion entre deux rotamères est trop faible (de l'ordre de 15-20 kcal.mol^{-1}) pour les séparer mais suffisante pour les distinguer par RMN du proton.[39] La proportion de deux formes rotamères dépend de la procyanidine et de la nature des substituants, et peut varier également selon la nature du solvant et la température.[39,40]

2. Propriétés des polyphénols

Les polyphénols ont des effets bénéfiques à la fois chez les plantes et chez les animaux. Un aperçu non exhaustif de leurs principales propriétés est proposé ci-après (Figure 13) :

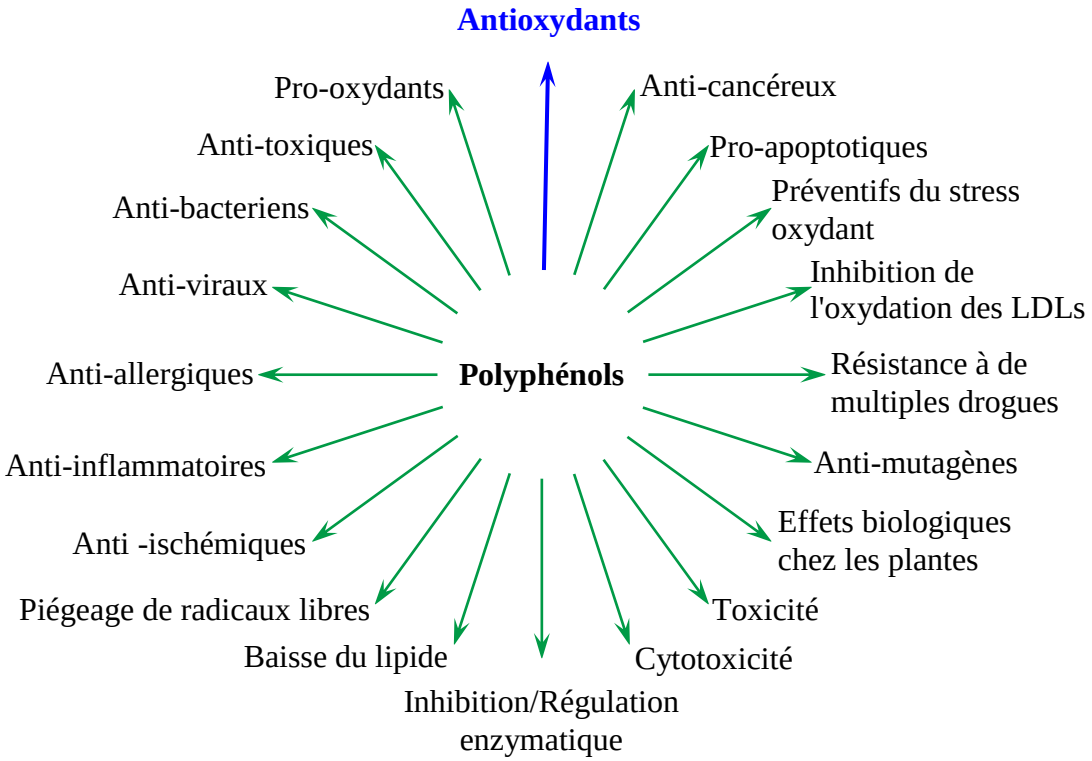


Figure 13. Propriétés des polyphénols

(*Source* : Productline Catalog, Polyphenols : Flavonoids-Stilbenoids-Phenolic Acids, www.alexis-biochemicals.com)

2.1. Propriétés antioxydantes/pro-oxydantes

Une des propriétés chimiques importantes des composés phénoliques, constitués d'une unité phényle comportant au moins un groupement hydroxyle (ArOH), est leur capacité de libérer un atome d'hydrogène (l'énergie de dissociation d'une liaison O-H est d'environ 87-90 kcal.mol^{-1}) qui peut ensuite piéger des radicaux libres générés par oxydation (anion superoxide $O_2^{\bullet -}$, radical hydroxyle $OH^{\bullet}$, radical $R^{\bullet}$) et ainsi bloquer les réactions radicalaires en chaîne. Ce processus fondamental confère aux polyphénols d'origine végétale leur propriété bénéfique antioxydante. Deux mécanismes sont proposés pour l'expliquer. Le premier est basé sur la capacité des polyphénols à transférer un atome d'hydrogène à un radical libre (hydrogen-atom transfer) (Schéma 1, à gauche). L'efficacité de l'action antioxydante dans ce cas va dépendre essentiellement de la vitesse de transfert de l'atome d'hydrogène du phénol au radical (pKa) et

de la stabilité du radical phénoxyle ArO$^{\bullet}$ généré (délocalisation électronique, effet inductif, liaison hydrogène). Le second mécanisme possible est le transfert d'un électron du groupement phénolique au radical, provoquant la formation d'un anion R^{-} et d'un cation radical $ArOH^{\bullet+}$. Dans ce processus, l'activité antioxydante va dépendre de la stabilité du cation radical d'une part, et du potentiel d'ionisation du (poly)phénol d'autre part (Schéma 1, à droite).[1]

Schéma 1. Mécanismes impliqués dans l'activité antioxydante des (poly)phénols

La présence de deux groupes hydroxyles adjacents sur un cycle phényle (catéchol ou pyrogallol) permettant la chélation de certains métaux (fer, cuivre, manganèse, magnésium, calcium,...) contribue également aux propriétés antioxydantes ainsi qu'à la pigmentation des plantes.[1,3] Malheureusement, certains polyphénols ont également une action pro-oxydante par transfert d'électrons à des ions métalliques.[1,27,41,42] Les procédés d'oxydation des fonctions phénoliques de types catéchol (1,2-dihydroxybenzène) et/ou pyrogallol (1,2,3-trihydroxybenzène) conduisent à la formation d'*ortho*-quinones et/ou d'α-hydroxy-*ortho*-quinones (Schéma 2). Les unités catéchols et pyrogallols peuvent former un radical phénoxy, comme dans le cas des phényles monohydroxylés, qui, dans ce cas, est stabilisé par des liaisons hydrogène formées avec les groupements hydroxyles situés en *ortho*. Ce radical est facilement déprotoné en semiquinone, qui forme la quinone résultante par perte d'un électron qui peut générer une espèce radicalaire nocive. Cette espèce électrophile peut ensuite intervenir dans des réactions de Diels-Alder, des réactions nucléophiles et/ou électrophiles également nocives (modification de l'ADN par exemple).[1,41]

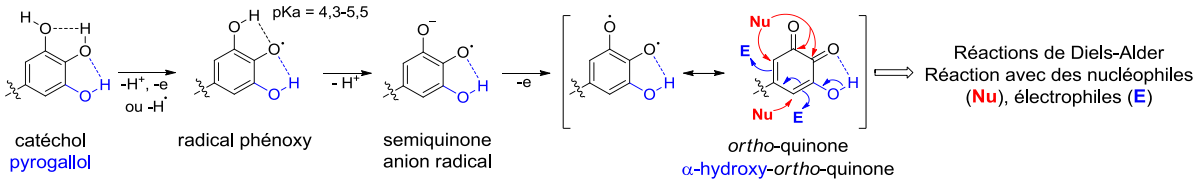


Schéma 2. Déhydrogénation oxydative des catéchols et pyrogallols

Une fonction phénol possède aussi des propriétés amphiphiles qui combinent le caractère hydrophile de son substituant hydroxyle avec le caractère hydrophobe de son noyau aromatique. En effet, le groupement hydroxyle phénolique est à la fois un donneur et un accepteur de liaisons hydrogène et le cycle aromatique peut développer des interactions fortes de type Van der Waals. Ces propriétés hydrophobes "empilement π" et la formation de liaisons hydrogène sont souvent

des effets complémentaires qui confèrent aux polyphénols la capacité d'interagir physiquement avec d'autres biomolécules dont les protéines.[1]

2.2. Propriétés protectrices chez les plantes et impact sur la santé humaine

Parmi les polyphénols, les flavonoïdes largement présents dans le règne végétal participent à la protection de la plante contre les attaques extérieures des microorganismes en jouant le rôle d'antibiotique, d'anti-fongique ou d'anti-bactérien, mais aussi contre les animaux herbivores en ayant une action répulsive dûe à leur propriété d'astringence. Ces composés préservent également la plante des dommages de l'ADN causés par les radiations solaires (UV-B). Certains flavonoïdes, en particulier les anthocyanes, sont responsables de produire une vaste gamme de couleurs dans le règne végétal permettant d'attirer certains insectes pour faciliter le processus de pollinisation des plantes.[23,43–45]

Les flavanoïdes présents dans de nombreux fruits et légumes, constituent également des molécules de base au niveau alimentaire. A ce titre, ils sont responsables des propriétés organoleptiques majeures de produits d'origine végétale, y compris la sensation d'astringence et d'amertume en bouche qui est attribuée à leur capacité d'interaction avec les protéines riches en proline de la salive.

Des sources végétales riches en polyphénols sont utilisées comme agents anti-microbiens et anti-viraux depuis plusieurs siècles en médecine traditionnelle chinoise[44,46] et récemment, de nombreuses études épidémiologiques suggèrent que le régime alimentaire riche en composés polyphénoliques apporte un effet protecteur contre les maladies cardiovasculaires et le cancer.[2–4,9,19] En France, la consommation modérée de vin rouge est reconnue pour avoir certains effets bénéfiques sur la santé bien que l'éthanol soit responsable de différentes pathologies. La diminution du nombre de maladies coronariennes observées chez les buveurs de vin, malgré une alimentation riche en acides gras saturés, est communément appelée le "French paradox". Les polyphénols dérivés de raisins contribuent très probablement à cet effet protecteur *via* leurs activités anti-oxydantes (protection contre l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (low-density lipoproteins, LDLs)), l'inhibition de l'activité plaquettaire et leurs propriétés vasodilatatrices.[1,27] A l'heure actuelle, les polyphénols sont considérés comme de sérieux candidats dans la prévention et le traitement de nombreuses maladies humaines grâce à leurs activités biologiques et pharmacologiques importantes et variées : inhibiteur enzymatique, neuroprotecteur, cardioprotecteur, anti-microbien, anti-viral, anti-inflammatoire, anti-cancéreux, anti-oxydant, anti-ulcère, anti-diarrhée,...[1,8,20,27,44–48] Les PAs et l'épigallocatéchine-3-gallate sembleraient jouer un rôle central au niveau de ces différentes propriétés

pharmacologiques comme en atteste le vif intérêt de la communauté scientifique au cours de ces dernières années.

Les PAs ont récemment été identifiées, selon des études *in vivo*, comme agents anti-radicalaires, antiviraux contre notamment les virus de l'herpes et du VIH, antibactériens, antitumoraux, inhibiteurs enzymatiques.[4,6,20,23,44,45,47,49] La consommation des extraits de pépins de raisin riches en proanthocyanidines chez des souris atteintes de la maladie d'Alzheimer a permis d'inhiber la formation de plaques séniles β-amyloïdes et d'atténuer l'inflammation du cerveau.[50] De plus, il a été montré que certains PAs, extraits de l'espèce cinnamomum ou du vin par exemple, selon des études *in vitro*, se lient de façon spécifique à un peptide représentatif de la région riche en proline PR2 de phosphorylation de tau (Gly 201-Thr 220) et de fait semblent inhiber l'agrégation de la protéine tau en neurofibrilles responsables de la maladie d'Alzheimer.[11,51]

La (–)-(2*R*,3*R*)-épigallocatéchine-3-gallate, appelée plus communément EGCG présente également des propriétés anti-oxydantes et possède de multiples effets bénéfiques pour la santé (Figure 14).

(–)-(2*R*,3*R*)-épigallocatéchine-3-gallate (EGCG)

Figure 14. La (–)-épigallocatéchine-3-gallate présente dans les feuilles de thé vert (*Camellia sinensis)*

Cette molécule de la famille des flavonoïdes, principal polyphénol du thé vert (*Camellia sinensis)*, a été largement étudiée pour ses activités biologiques variées en tant qu'agent anti-oxydant, anti-inflammatoire, cardioprotecteur,[13,14,16,20,52–54] anti-fibrillogéniques (préventif ou thérapeutique pour les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson),[55,56] antitumoral (inhibiteur du protéasome et réinducteur d'apoptose dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses comme celles du poumon, du côlon, de la prostate et du cancer de la peau).[57–61] Plus particulièrement, il a été montré que l'EGCG inhibe l'expression de protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL, tout en augmentant l'expression des protéines Bax et Bak pro-apoptotiques.[62,63] Des travaux ont également montré que l'EGCG était capable de prévenir l'obésité et le diabète.[64–66]

Outre leur capacité de neutraliser les radicaux libres et les espèces oxygénées réactives responsables des dommages oxydatifs de l'ADN, des protéines et des lipides pouvant entraîner la mort cellulaire,[1,8,20,27,44–48] les effets bénéfiques sur la santé humaine des polyphénols sont en partie liés à leur capacité à se lier de manière spécifique à différentes protéines.[1,11–16,47,49,61,67,68]

3. Interactions des polyphénols avec les protéines

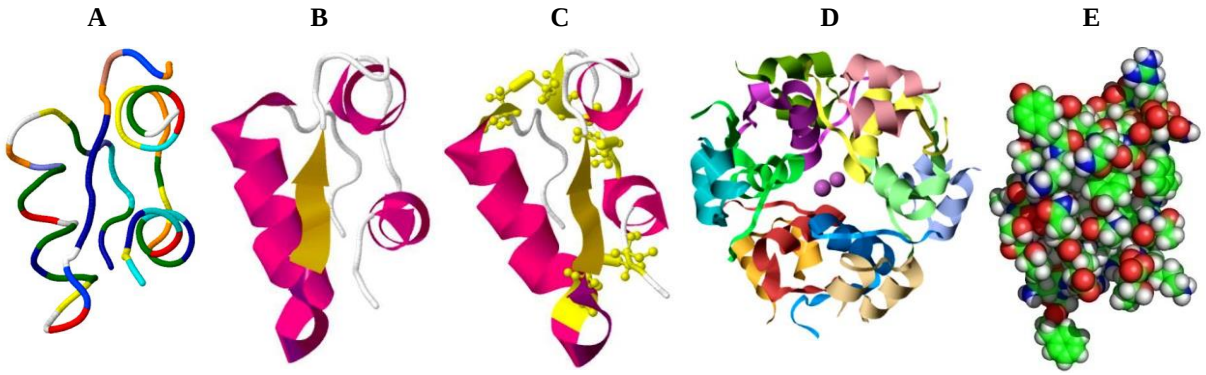
La capacité des polyphénols à interagir avec des protéines de façon spécifique ou non, dépend de leurs caractéristiques structurales ainsi que de leurs propriétés physico-chimiques. Etant donné la grande variété de structures des polyphénols, ces composés constituent de bons candidats pour interagir avec des protéines de manière ciblée. Dans cette partie, nous allons présenter brièvement dans un premier temps les protéines et leurs classifications selon leurs structures et leurs fonctions, ainsi que les interactions polyphénol-protéine. Nous aborderons dans un second temps les méthodes utilisées pour étudier ces interactions polyphénol-protéine en s'attardant plus spécifiquement sur deux techniques utilisées dans nos travaux : la protéomique chimique et la technique SPR.

3.1. Généralité sur les protéines

Le terme protéine vient du grec ancien *prôtos* qui signifie premier ou essentiel et fait probablement référence au fait que les protéines sont indispensables à la vie et qu'elles constituent souvent la part majoritaire du poids sec des cellules (environ 60%). Les protéines sont des macromolécules caractérisées par un enchaînement d'acides aminés reliés de manière covalente par des liaisons peptidiques. Cette organisation linéaire appelée structure primaire est constituée d'une séquence d'acides aminés (il en existe vingt différents) dont l'assemblage est contrôlé par le code génétique (Figure 15, A). Selon la séquence des résidus constituant cette structure primaire, la protéine peut adopter différentes structures secondaires, les principales étant les hélices α, les feuillets β ou les coudes. La structure secondaire résulte d'un repliement local de la protéine créé par des interactions stériques et électrostatiques et stabilisée par des liaisons hydrogène entre les acides aminés. Il en existe plusieurs variétés, et il est courant qu'une protéine possède globalement plusieurs types de structures secondaires (Figure 15, B). Après une succession de repliements locaux, la protéine subit un repliement à l'échelle de la molécule toute entière qui lui donne sa structure tertiaire et son activité biologique. Ce repliement est stabilisé par tout un ensemble d'interactions conduisant le plus souvent à l'enfouissement des acides aminés hydrophobes de la protéine, la formation d'éventuelles liaisons disulfures (entre

deux résidus cystéines distantes), d'interactions ioniques, de liaisons hydrogènes (Figure 15, C). Finalement, l'interaction de plusieurs protéines (deux chaînes peptidiques ou plus), appelées dans ce cas sous-unités protéiques, conduit à une structure quaternaire. Cette structure concerne un petit nombre de protéines de grande taille issues de l'agrégation de plus petites. La structure quaternaire de ces super-protéines constituées de sous-unités protéiques incorpore parfois d'autres molécules organiques ou des atomes métalliques (Figure 15, D).[69,70]

Il existe différents types de représentations tridimensionnelle des protéines (Figure 15), deux d'entre elles parmi les plus fréquentes sont la représentation "diagramme de ruban" (ribbon diagram en anglais) permettant de faire apparaître les structures secondaires des protéines (Figure 15, B-D), et le modèle moléculaire "espace réellement occupé" de Corey-Pauling-Koltun (space-filling model en anglais), nommée d'après le nom de ses inventeurs : Robert Corey, Linus Pauling et Walter Koltun, permettant d'appréhender l'encombrement stérique de la molécule (Figure 15, E).[71]



A	B	C	D	E
Structure primaire d'une molécule d'insuline correspondant au squelette carboné des acides aminés.	Structure secondaire présentée en "diagramme de ruban" révélant des arrangements hélices α (rouge), feuillets β (jaune) et coudes (blanc).	Structure tertiaire d'un monomère d'insuline. Bâtons en jaune : les ponts disulfures reliant entre eux les deux chaînes polypeptidiques.	Structure quaternaire d'un hexamère d'insuline. Des sphères violettes sont des ions de zinc.	Modèle moléculaire "espace réellement occupé" de Corey-Pauling-Koltun d'un monomère d'insuline.

Figure 15. Quatre niveaux d'organisation de protéines (A-D) et différentes représentations tridimensionnelle de protéines

(Exemplifié par la molécule d'insuline constituée de 2 chaînes polypeptidiques A et B, possédant respectivement 21 et 30 acides aminés, reliées entre elles par 2 ponts disulfures et 1 pont disulfure intra-chaîne dans la chaîne A)
Source : images obtenues avec le logiciel Jsmol (http://www.biotopics.co.uk/jsmol/insulin.html#) et Wikipedia (https://en.wikipedia.org/wiki/Insulin#/media/File:InsulinMonomer.jpg).

Les protéines sont au coeur de quasiment tous les processus biologiques. Individuellement ou associées sous forme de complexes, elles représentent une part essentielle de tout organisme vivant. Les tâches qu'elles réalisent sont basées sur leurs structures et toute

modification de ces structures ou séquences a une influence importante sur leurs activités biologiques. Trois grands groupes de protéines se distinguent en fonction de leurs structures tertiaires ou quaternaires : les protéines globulaires (protéines compactes), les protéines fibreuses (protéines allongées en forme de tiges) et les protéines membranaires. Presque toutes les protéines globulaires sont solubles et ce sont souvent des enzymes, qui catalysent des réactions biochimiques du métabolisme. Parmi ces protéines enzymatiques, on peut citer par exemple la trypsine, les ligases ou encore les ADN polymérases. Elles permettent aussi de réguler certains processus biologiques comme dans le cas de l'insuline, ou de jouer un rôle de transporteur comme dans le cas de l'hémoglobine et de la myoglobine responsables du transfert d'oxygène dans le sang et les muscles. Sous la forme de fibres ou d'autres associations contractiles, les protéines jouent souvent un rôle structural, à l'instar du tropocollagène, constituant principal des tissus conjonctifs, ou de la kératine, constituant protéique des poils et des ongles. Elles peuvent aussi gérer le mécanisme de nombreux processus de mouvement comme l'actine ou la myosine dans le muscle. Les protéines membranaires sont souvent des récepteurs ou des canaux permettant aux molécules polaires ou électriquement chargées de traverser la membrane. Les protéines ne sont cependant pas des molécules entièrement rigides. Elles sont susceptibles d'adopter plusieurs conformations apparentées en réalisant leurs fonctions biologiques. La transition d'une de ces conformations à une autre est appelée changement conformationnel. En solution, les protéines subissent également de nombreux changements conformationnels en raison de la vibration thermique et de la collision avec d'autres molécules.[69]

3.2. Interaction polyphénol-protéine

L'élucidation des mécanismes de formation et la nature des interactions polyphénol-protéine n'est pas un sujet d'étude récent. Les premières recherches effectuées sur les interactions entre les protéines et les polyphénols se sont axées sur la compréhension des modes d'association lors de la précipitation des protéines par les polyphénols (système de défense des plantes, propriété d'astringence ou pouvoir tannant). Des études ont aussi été réalisées sur les conséquences de telles associations aux protéines sur les activités biologiques des polyphénols, y compris leur pouvoir antioxydant et leur biodisponibilité. Il en est ressorti que les effets hydrophobes (empilement π) du cycle phénolique et la stabilisation de ces associations par des liaisons hydrogène des groupements hydroxyles phénoliques sont généralement considérés comme les causes prédominantes de liaison avec les protéines et que la nature et la force des interactions entre polyphénols et protéines dépendent essentiellement de la structure et des propriétés physico-chimiques des polyphénols impliqués.[1]

Quelques études ont montré que certaines protéines telles que la F1-ATPase bovine, la kinase B, la caséine kinase 2, le récepteur tumoral laminin, la topoisomérase IIα ou même l'actine du cytosquelette s'associent de manière sélective voire spécifique à des polyphénols (e.g., resvératrol, picéatannol, quercétine, myricétine, acide ellagique, l'épigallocatéchine-3-gallate (EGCG), vescaline ou vescalagine) avec, dans certains cas, des constantes de dissociation de l'ordre de l'échelle nanomolaire.[13,68,72–77]

4. Les outils utilisés pour l'étude des interactions polyphénol-protéine

Au cours des dernières décennies, une grande variété d'outils et de méthodes a été développée permettant de caractériser les interactions entre un polyphénol et une protéine.[78–82]

Parmi ces techniques, l'**électrophorèse capillaire**[83] ou sur **gel de polyacrylamide** (en conditions natives ou dénaturantes)[84] peut mettre en évidence la formation de divers complexes polyphénol-protéine solubles dans l'eau. La **microcalorimétrie** (ou **calorimétrie de titration isotherme**) vise à mesurer les changements d'enthalpie impliqués au sein des interactions biomoléculaires réversibles.[85,86] La **dialyse à l'équilibre** permet l'étude des systèmes biomoléculaires à l'état d'équilibre en solution.[87] La **précipitation**,[88,89] la **diffusion dynamique de la lumière** (DLS) et la **microscopie électronique** (EM) permettent d'étudier la distribution des tailles des molécules ou des particules et donc de caractériser les précipités.[90] Le **dichroïsme circulaire** (CD) vise à analyser les changements de structure secondaire et tertiaire des protéine causés par leurs interactions avec des polyphénols.[91–93] La **turbidimétrie** et la **néphélométrie** sont des techniques qui permettent de mesurer la concentration des particules en suspension par photométrie.[94,95] Tout comme la **spectrophotométrie UV-Visible**, vise à mettre en évidence les capacités d'absorption des composés, ainsi que celles des complexes formés entre molécules.[96] La **fluorescence** tire avantageusement parti de la capacité d'extinction de fluorescence des protéines possédant des résidus aromatiques tels que le tryptophane à proximité de molécules polyphénoliques.[91–93,97,98] La **spectrométrie IR**, quant à elle, permet de visualiser les changements conformationnels attribués à des interactions polyphénol-protéine.[92] La **chromatographie d'affinité**, une technique développée ces dernières années, vise à immobiliser un polyphénol sur un support solide et à étudier les interactions de ce ligand avec différentes protéines.[99] La **spectrométrie de masse**, basée sur les sources d'ionisation douces, permet l'analyse des complexes polyphénol-protéines.[100,101] Les techniques susmentionnées permettent uniquement la détermination des stoechiométries des complexes formés et/ou la mesure des forces d'interactions, sans identification des régions

concernées. Deux techniques permettent d'accéder à ce type d'information : la **diffraction des rayons X par des cristaux** (RX) et la **résonance magnétique nucléaire** (RMN). Basée sur l'interaction entre les rayons X et les électrons des monocristaux du complexe polyphénol-protéine étudié, la **diffraction des rayons X** permet de déterminer l'arrangement tridimensionnel des atomes de la structure du complexe y compris ceux impliqués dans l'interaction spécifique. Néanmoins, cette co-cristallisation nécessite une quantité importante de protéine purifiée pour obtenir des cristaux du complexe susceptibles de diffracter à haute résolution. La structure observée dans ces conditions n'est cependant pas forcément représentative de la structure apparentée en solution.[102,103] Par rapport à la cristallographie, la **RMN** permet d'observer la protéine en solution, dans un environnement similaire à celui *in vivo* où elle réalise ses activités biologiques impliquant souvent des conformations dynamiques. Les mesures réalisées à une et deux dimensions permettent de remonter directement à la structure primaire mais également aux structures secondaire et tertiaire à l'aide de modélisations.[104–107] Cette combinaison d'analyses est essentielle et permet d'apporter des informations complémentaires.[92,93,108] En revanche, cette technique nécessite une quantité importante de protéines et un solvant deutéré compatible. D'autres inconvénients résident dans la restriction de la taille et de la pureté des molécules étudiées pour limiter les nombreux recouvrements de signaux.

Dans le cadre de l'étude des interactions spécifiques entre les polyphénols et les protéines, ainsi que de l'identification des protéines qu'un polyphénol cible lors de l'expression de son activité biologique, nous détaillerons par la suite deux techniques utilisées lors de ces travaux de thèse, il s'agit de la **protéomique chimique** et de la **résonance plasmonique de surface** (SPR).

5. De la protéomique à la protéomique chimique

Aujourd'hui, la protéomique chimique est une technique mature permettant de simplifier les analyses protéomiques. Elle permet de cibler certaines protéines et d'identifier leurs fonctions à la fois *in vitro, in cellulo* mais également *in vivo*. Cette technique contribue à mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans certains processus biologiques normaux ou pathologiques et de développer de nouvelles applications biomédicales et biotechnologiques.[109–114] Dans cette partie, après une brève présentation du principe de la protéomique et des techniques de spectrométrie de masse associées, une description plus détaillée de la technologie de protéomique chimique "Activity ou Affinity-Based Protein Profiling (ABPP)", sera faite.

5.1. La protéomique

La protéomique permet l'étude du protéome, c'est-à-dire l'étude de l'ensemble des protéines codées par un génome qui peuvent être exprimées et modifiées par un organisme vivant dans sa globalité, un tissu, une cellule ou un compartiment cellulaire pour un état physiologique et à un instant donné.[115] Ces termes "protéomique" et "protéome" ont été proposés par Wilkins et *al*. au début des années 90 et reflètent les termes "génomique" et "génome" qui décrivent l'étude de la collection entière de gènes dans un organisme.[70,116,117] De manière générale, l'approche protéomique consiste à séparer préalablement un mélange protéique complexe par une variété de techniques chromatographiques et/ou d'électrophorèse, à protéolyser éventuellement les protéines isolées et à les analyser par spectrométrie de masse avant leur identification.[118,116] Cette analyse est devenue très performante grâce au développement de techniques séparatives et de nouvelles générations de spectromètres de masse associés à des outils de recherche bioinformatique et à la disponibilité de séquences génomiques et protéiques répertoriées dans de nombreuses bases de données.

En ce qui concerne les méthodologies mises en œuvre pour l'analyse d'un protéome, il existe deux stratégies d'analyse basées sur la Spectrométrie de Masse (SM) :[119,120]

- L'analyse dite "top-down" : après séparation des protéines, celles-ci sont étudiées sans protéolyse enzymatique préalable conduisant à une complexité réduite par rapport aux espèces présentes dans un protéolysat.[119–121] Certaines études ont permis d'identifier jusqu'à 1 000 protéines intactes provenant d'échantillons complexes.[122]

- L'analyse dite "bottom-up" : la caractérisation des protéines se fait *via* l'analyse des peptides résultant de leur protéolyse. Cette méthode est l'approche la plus classique pour l'identification de protéines dans un mélange complexe et sera uniquement détaillée ci-après.[112,119,123,124]

5.1.1. Approche "bottom-up"

Dans l'approche "bottom-up", le mélange de protéines extraites de la cellule ou du tissu est soit directement clivé en solution à l'aide de protéases,[125,126] le plus souvent la trypsine qui coupe ces protéines au niveau des résidus de lysine et d'arginine,[127–130] soit les protéines sont préalablement séparées par des techniques d'électrophorèse (capillaire ou sur gel SDS-PAGE mono- ou bidimensionnel) et/ou des techniques de chromatographie (liquide ou d'affinité), la technique la plus couramment utilisée étant l'électrophorèse sur gel.[112,118,131,132] Dans le premier

cas, la technique dite "shotgun" consiste à séparer le mélange complexe de peptides résultant par un système de chromatographie liquide couplé à l'analyse par SM.

Le "shotgun" a été rendu possible grâce aux évolutions de la SM. Ces avancées ont eu comme moteur les innovations dans le domaine de la mécanique, de l'électronique et de l'informatique permettant de développer des spectromètres de masse toujours plus performants. Nous mentionnerons, notamment, l'apparition des analyseurs de masse de type Orbitrap qui ont significativement amélioré la sensibilité des analyses protéomiques.[133] En pratique dans cette approche, si le tampon d'extraction est compatible avec l'analyse en masse, le mélange de protéines extraites est directement protéolysé en solution et les peptides résultants sont analysés par chromatographie liquide associée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS en anglais). Si le tampon d'extraction n'est pas compatible avec l'analyse de masse ou s'il n'est pas dialysable, une étape de migration courte sur gel d'électrophorèse monodimensionnel permet d'éliminer la plupart des constituants préjudiciables à l'analyse. Les protéines ayant migrés mais non séparées sont alors protéolysées dans le gel et les peptides obtenus extraits et analysés. [134]

Dans le second cas, les protéines sont préalablement séparées sur gel. Les taches d'intérêts observées après coloration sont découpées et protéolysées, les peptides obtenus d'une même protéine sont extraits puis séparés et analysés selon le même principe que précédemment.[129,130]

5.1.2. Analyse des peptides par SM

Les peptides générés de tailles spécifiques sont analysés par SM à l'aide d'un spectromètre de masse MALDI-TOF couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI) et un analyseur à temps de vol (TOF) ou d'un spectromètre de masse ESI utilisant une source d'ionisation par électronébulisation (ElectroSpray). Ici, deux types d'analyses peuvent être sollicitées : une simple analyse SM dite de cartographie peptidique, appelée également "mass fingerprint",[135] et/ou une analyse SM en tandem appelée TOF/TOF ou MS/MS en anglais.[136] Cette dernière, en plus de déterminer la masse des peptides analysés, permet d'obtenir leur séquence en acides aminés apportant ainsi des informations complémentaires et augmentant la fiabilité de l'identification des protéines. Dans le cas de mélanges complexes, cette approche est la plus appropriée.

L'analyse par SM permet de mesurer la masse moléculaire d'un composé et d'obtenir également des données structurales. Ce type d'analyse mesure le rapport masse-sur-charge (*m/z*) d'une molécule ionisée et de ses fragments. La SM fournit des informations qualitatives et quantitatives sur la composition atomique et moléculaire.

Depuis plus d'une dizaine d'années, le développement de méthodes d'ionisation douce telles que l'ESI et le MALDI a permis l'essor de la SM dans le monde de la biologie. La SM est devenue une technique de référence dans l'identification des protéines, dans l'analyse fine de leurs séquences et de leurs éventuelles modifications post-traductionnelles. Les techniques d'ionisation ESI et MALDI couplées à des analyseurs de plus en plus résolutifs et de plus en plus sensibles rendent en effet possible l'analyse de quantités très faibles (quelques femtomoles à subfemtomoles) de produits.[115,119,137,138]

L'ionisation par électronébulisation (ESI)

Développée par le groupe de John B. Fenn (prix Nobel de Chimie en 2002), afin de permettre l'ionisation des macromolécules biologiques, l'électrospray ou électronébulisation est la technique d'ionisation la plus utilisée. Elle permet d'étudier des échantillons liquides et leurs évolutions en milieu biologique avec une grande sensibilité. De plus, elle peut être facilement couplée à des techniques séparatives (chromatographie liquide, électrophorèse capillaire). Mais la raison principale de son succès réside dans le fait que lors du processus d'électronébulisation, l'énergie interne ajoutée aux ions peut être contrôlée afin de ne pas entraîner de fragmentation moléculaire. Cette technique permet, par ailleurs, d'obtenir des ions multichargés, permettant alors d'analyser des composés biologiques de plus en plus lourds, de plus en plus complexes et avec une précision de mesure de masse remarquable.[116,137,139]

L'ionisation/désorption par laser assistée par une matrice et associée à un analyseur à temps de vol (MALDI- TOF)

La technique MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation – time-of-flight mass spectrometry) est basée également sur une source d'ionisation douce. Son introduction est due au travail de deux groupes, celui de Koichi Tanaka (prix Nobel de Chimie en 2002) et celui de Michael Karas et Franz Hillenkamp qui publièrent séparément en 1988 des travaux sur l'ionisation de molécules ayant des masses moléculaires supérieures à 100 000 Da.[140,141] Aujourd'hui, elle est devenue une technique de choix pour l'étude de molécules de hauts poids moléculaires comme les biopolymères (peptides, protéines, oligonucléotides) et les polymères synthétiques. Elle est de ce fait très employée pour l'étude d'échantillons biologiques. Les spectres obtenus sont principalement composés d'ions monochargés accompagnés uniquement de quelques espèces di- ou tri-chargées ce qui simplifie l'analyse. La relative simplicité des spectres MALDI-TOF permet donc l'analyse de mélanges complexes. Cette technique a également l'avantage de tolérer certains sels, tampons ou détergents.[100,116,118,142–144]

5.1.3. Identification des protéines et traitements informatiques

Les données expérimentales issues de l'analyse des peptides par SM sont comparées aux données obtenues *in silico* à l'aide d'outils bio-informatiques. La première étape consiste à comparer les différentes données générées par SM avec celles présentes dans les différentes bases informatiques de données protéiques (par exemple, NCBI, US National Center for Biotechnology Information, ou Swiss-Prot, Swiss Institute of Bioinformatics, European Bioinformatics Institute,...).[131,142,110,145] Les recherches dans ces bases de données se font par l'intermédiaire de quelques algorithmes commerciaux ou libres d'accès sur internet comme SEQUEST développé par ThermoScientific (http://www.thermoscientific.com), MASCOT développé par Matrix Science (http://www.matrixscience.com), Protein Prospector (http://prospector.ucsf.edu/) ou encore des sites comme ExPASy (http://www.expasy.org). Ces différents algorithmes permettent d'identifier la ou les protéines, si celles-ci sont déjà référencées dans les bases de données. L'identification est basée sur un score qui dépend entre autre du nombre de peptides ou de fragments SM/SM qui sont attribuées à la protéine, ou du nombre d'entrées de la banque. La deuxième étape, consiste à annoter les protéines identifiées, en d'autres termes à déterminer leur fonction. Pour cela, les séquences protéiques obtenues lors de l'identification des protéines vont être comparées aux séquences répertoriées appartenant à des protéines dont les fonctions sont connues par alignement de séquence BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool).[146] Cette recherche se fait par l'intermédiaire de programmes disponibles en ligne sur NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), UniProt (http://www.uniprot.org/blast/) ou FASTA (http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/). Les différents alignements de séquence ainsi réalisés permettent l'annotation des protéines étudiées par homologie de séquence notée en pourcentage, même si celles-ci proviennent de différentes espèces. Plus le pourcentage est élevé, plus l'annotation de la protéine est fiable.

Au niveau des applications de la protéomique, on peut citer par exemple la recherche de biomarqueurs protéiques pour le développement de test clinique dans le domaine médical. L'objectif est de trouver la ou les protéines associées à une pathologie ou à une réaction toxique sans avoir au départ connaissance de ces biomarqueurs. La recherche de ces biomarqueurs peut se faire en comparant deux échantillons issus par exemple d'une cellule saine par rapport à une cellule malade. L'analyse en SM des peptides issus de ces deux échantillons permet par différence d'identifier les biomarqueurs protéiques. Cependant, à ce jour, les méthodes de SM ne peuvent analyser individuellement que 2 000 peptides à la fois alors qu'on estime entre 10 000 et 35 000, le nombre de protéines dans une cellule humaine. Un protéome constitué de 10 000 protéines peut générer après digestion environ 350 000 peptides. Par conséquent, les

peptides doivent être séparés avant l'analyse en SM. Cependant, pour de nombreux protéomes, le nombre de peptides surpasse la capacité résolutive des techniques séparatives courantes.[147]

Mais le frein majeur à ce type d'approche réside principalement au niveau de la gamme très importante d'expression des protéines (dynamic range of protein expression) qui conduit à une absence de détection des protéines les moins abondantes, masquées par la présence des protéines les plus abondantes. Les protéines présentent une gamme de concentration très étendue pouvant aller d'un facteur 10^5 dans une bactérie à 10^7-10^8 dans une cellule humaine et pouvant atteindre 10^{12} dans le plasma humain.[148] Pour bien se fixer les idées, dans un échantillons de plasma humain, les 10 protéines les plus abondantes représentent 90% des protéines totales dont l'albumine qui a elle seule représente plus de 50% des protéines. 22 protéines représentent 99% des protéines totales et les biomarqueurs recherchés sont en général dans le 1% restant (Figure 16).[149] Or, la couverture de la gamme dynamique d'expression protéique par la spectrométrie de masse est limitée à 10^{12}-10^7, on prend donc rapidement conscience du défi scientifique que constituent la recherche et l'identification de ces marqueurs protéiques.

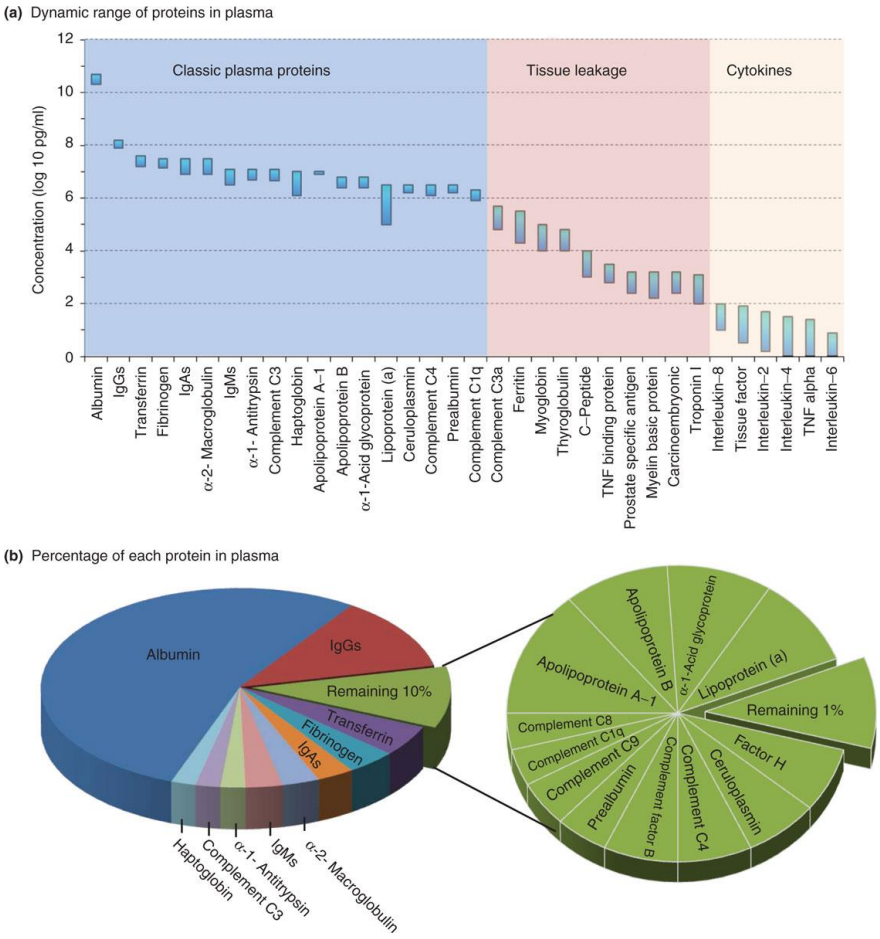


Figure 16. Gamme dynamique et pourcentage des protéines présentes dans le plasma sanguin[149]

La protéomique doit donc faire face à une complexité des extraits protéiques pour laquelle la résolution quantitative ainsi que l'identification de toutes les protéines présentes ne sont pas réalisables et elle peut donc conduire à une absence d'information si une protéine recherchée est en très faible abondance.

5.2. La protéomique chimique

La protéomique chimique permet de réduire la complexité d'un protéome, en ne ciblant à priori que les protéines d'intérêt. Les protéines en faible abondance sont ainsi concentrées et leur analyse protéomique facilitée. Le principe repose sur l'utilisation de petites molécules ou ligands (un peptide ou un composé naturel de type métabolite secondaire, par exemple) fixées sur un support solide. Dans ce contexte et historiquement, une première approche a été considérée : les colonnes d'affinité,[99,150] pour lesquelles un ligand d'affinité est immobilisé sur une résine. Cependant, cette méthode présente certaines limites : il faut disposer d'un matériel protéique relativement abondant pour disposer après séparation de suffisamment de matériel protéique pour l'analyse. De plus, il est nécessaire que les protéines et/ou complexes protéiques diffusent bien dans la résine (notion de "cut off"), et que leur affinité avec le substrat d'intérêt soit suffisamment importante pour que les protéines retenues ne soient pas éliminées lors des lavages.

Une deuxième approche, développée plus récemment, permet de s'affranchir des problèmes susceptibles d'être rencontrés lors de l'utilisation des colonnes d'affinité : l'utilisation **en solution** de sondes moléculaires modulables équipées d'un ligand ayant une affinité pour la ou les protéines ciblées. Ces sondes permettent d'isoler ou de localiser des protéines ciblées dans un protéome, mais également d'identifier le site d'interaction du ligand sur ces protéines d'intérêt. Dans cette approche, ce n'est pas la protéine qui diffuse vers le ligand, mais le contraire. Cette deuxième approche a été développé par différentes équipes et peut porter différents noms, comme l'Activity- or Affinity Based Probe Profiling (ABPP) développée par les équipes de Cravatt[114,151–155] et de Bogyo[156–158] ou la Capture Compound Mass Spectrometry (CCMS) développée par Köster.[110,159]

5.2.1. l'ABPP : un exemple de protéomique chimique

Introduite dans les années 90 par J. C. Powers,[160] la technologie ABPP consiste à analyser des protéomes à l'aide de sondes capables de reconnaître une ou plusieurs protéines d'intérêt, d'établir une liaison covalente avec celles-ci et qui permettent dans un deuxième temps d'isoler ou de localiser la protéine ciblée dans un mélange complexe de protéines.[161]

Deux objectifs d'étude sont envisageables à l'aide de cette approche :[110–112]

- l'étude d'une famille particulière d'enzymes à partir de leurs activités ("Activity-Based Protein Profiling").[154,158,161,162]

- l'étude d'un ensemble de protéines ayant de l'affinité pour une petite molécule bioactive appelé ligand ("Affinity-Based Protein Profiling").[110,159]

Dans les deux cas, l'approche repose sur l'affinité des sondes moléculaires pour les protéines ciblées.

5.2.2. Structure d'une sonde ABPP

Ces sondes sont composées généralement de trois éléments structuraux : une fonction d'affinité, capable de reconnaître la ou les protéine(s) ciblée(s), une fonction de réactivité, qui permet de former un lien covalent avec la ou les protéine(s) ciblée(s) et une fonction de détection et/ou purification ou "tag", afin de faciliter la purification ou la détection de ces protéines. Ces trois éléments sont réunis par un linker ou espaceur, de nature ou de longueur variables (Figure 17).[154,162]

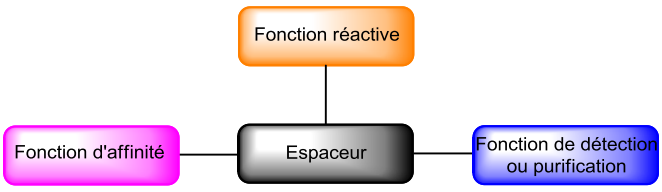


Figure 17. Structure des sondes ABPP pour la détection de protéine

La fonction d'affinité

Cette fonction permet de reconnaitre la ou les protéine(s) d'intérêt(s) en ayant des interactions plus ou moins forte avec une zone privilégiée de cette (ou de ces) protéine(s). Elle peut également se loger au sein d'un site actif dans le cas d'une enzyme. La fonction d'affinité

peut être d'origine synthétique[163] ou naturelle.[164–166] Il peut, par exemple, s'agir de peptides,[167,168] de médicaments[159,169] ou d'un substrat naturel de l'enzyme étudiée.[170,171]

La fonction réactive

Cette fonction permet d'établir un lien covalent entre la sonde et la ou les protéine(s) d'intérêt(s). Afin que ce lien puisse s'établir au moment voulu, cette fonction doit être activée par un stimulus extérieur. Nous citerons comme exemple les fonctions activables sous irradiation UV, appelées également fonctions photoactivables (benzophénone,[172] azoture d'aryle,[167,170,173–178] diazirine[169,171,179–181]), capables, une fois activées, de donner naissance à un groupement fonctionnel photogénéré réactif qui s'insère dans des liaisons de types C-H ou N-H de la protéine.[182]

La fonction de détection/purification

Cette fonction a pour but de repérer ou d'isoler de façon simple et efficace le complexe protéine/sonde formé dans un mélange de protéines afin de faciliter son analyse. Il existe dans la littérature plusieurs types de "tag" pouvant être employés pour la visualisation et l'enrichissement de protéines, y compris des isotopes (radioactifs ou stables), des fluorophores, la biotine, et très récemment les poignées "clickable", telles que des acétylènes et des azotures permettant des marquages en tandem bioorthogonaux à l'aide d'une réaction chimique comme la cycloaddition de Huisgen catalysée au cuivre ou la ligation de Staudinger.[154,157,158,162,164] La fonction de purification/détection la plus couramment utilisée est la biotine, qui permet de séparer le complexe protéine/sonde à l'aide de billes recouvertes d'avidine ou de streptavidine ($K_D \sim 10^{-15}$ M).[183,184] Le complexe biotinylé peut être par la suite détecté grâce à une migration sur gel SDS-PAGE suivi d'une expérience de Western blot en utilisant des anticorps d'antibiotine.[185]

L'espaceur polyfonctionnel

Cet espaceur permet de lier les différentes fonctions de la sonde entre elles. Afin d'assurer une bonne solubilité de la sonde dans les milieux biologiques aqueux, l'espaceur est en général hydrophile. Pour cela, une chaîne polyéthylène glycol (PEG) est habituellement utilisée. Des ramifications alkyles peuvent être ajoutées afin de faciliter la fixation des différentes fonctions. L'espaceur et ses ramifications doivent être choisis avec attention afin que la fonction d'affinité et la fonction réactive ne soient ni trop proches (éventuelles contraintes stériques) ni trop

éloignées l'une de l'autre (perte d'efficacité de la sonde).[157,159,164,171] De plus, la fonction de détection/purification doit être suffisamment éloignée de ces deux dernières afin de ne pas interagir avec celles-ci.

5.2.3. Principe de l'ABPP

L'identification de la protéine et/ou de son site d'interaction est basée sur les étapes suivantes (Figure 18) :

1) La sonde est mise à incuber avec un extrait protéique. Au cours de cette étape, la ou les protéine(s) d'intérêt(s) vont interagir de façon réversible avec la fonction d'affinité de la sonde.

2) La fonction réactive, située à proximité de la fonction d'affinité mais également de la protéine ciblée, est alors activée (irradiation lumineuse par exemple) de façon à former un lien covalent avec la protéine.

3) Le mélange est ensuite enrichi soit en peptides "étiquetés" (après protéolyse du mélange) soit en protéines "étiquetées" à l'aide de la fonction de détection/purification préalablement immobilisée sur un support solide d'affinité suivie des séquences de lavages pour éliminer les autres constituants du milieu protéique. Pour la première option, le mélange est directement clivé à l'aide d'une protéase, générant ainsi un mélange peptidique complexe qui est purifié, élué du support d'affinité en conditions adéquates puis analysé par SM. Pour la deuxième option, les protéines "étiquetées" sont d'abord purifiées puis séparées par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE). Le gel ainsi obtenu est ensuite incisé, les protéines présentes en sont extraites, éventuellement protéolysées puis analysées par SM.

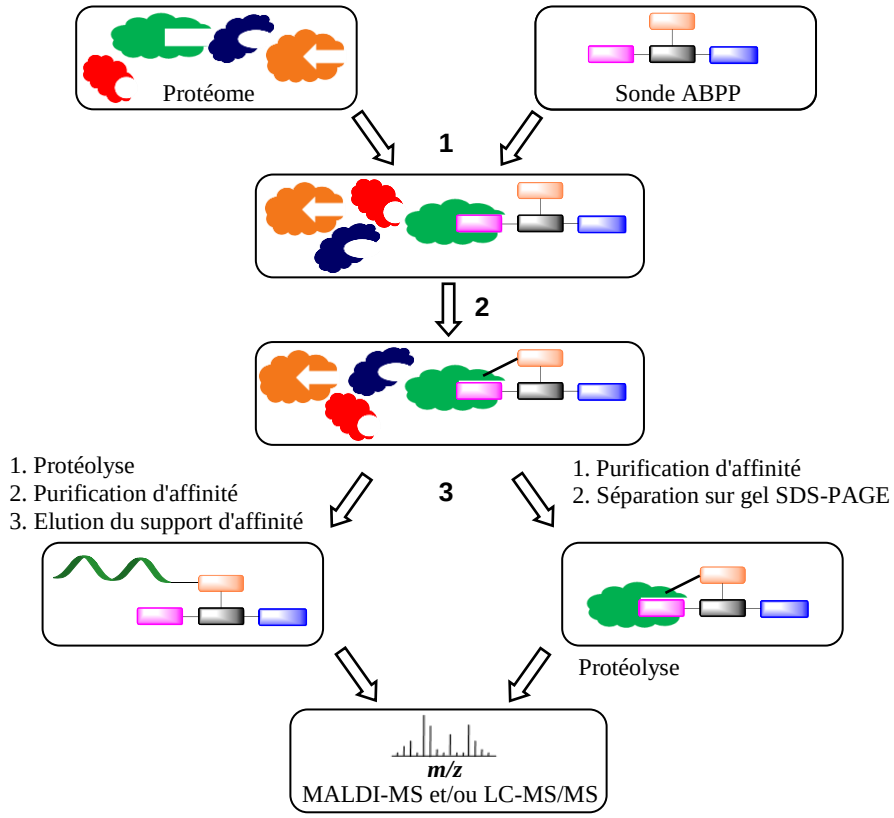


Figure 18. Schéma illustrant la méthodologie des sondes ABPP

Dans le premier cas, l'enrichissement de peptides "étiquetés" avec la sonde moléculaire permet l'identification de la protéine ciblée mais également des sites d'interactions (en particulier, le site actif dans le cas d'une enzyme). Dans ce cas, la distance séparant le ligand de la fonction réactive qui établie le lien covalent doit être prise en considération lors de l'analyse structurale. Cette technique est aussi appelée "Active Site Peptide Profiling" (ASPP)[154,162] ou "Mapping Enzyme Active Sites".[186,187]

Dans la seconde approche, un mélange de peptides étiquetés et non-étiquetés est obtenu et permet uniquement l'identification de la ou des protéine(s) ciblée(s). La combinaison des deux approches permet une identification et une caractérisation précise des protéines étudiées.

5.2.4. Quelques exemples d'ABPP

Cette méthodologie a été utilisée avec succès dans de nombreuses études d'interactions entre des protéines d'intérêt et des ligands bioactifs.[151] Cependant, peu d'études ont été réalisées avec des molécules naturelles comme fonctions d'affinité[164–166] et encore plus rarement avec un polyphénol.[165]

Nous ne citerons ici que trois études publiées en 2011 particulièrement pertinentes par rapport à nos objectifs.

Une première étude menée par Wirsing et *al.* décrit l'utilisation d'une sonde ABPP appliquée à la capture de méthyltransférases dans des extraits bruts de protéines issus de fleur d'*Arabidopsis Thaliana*. Cette sonde est composée d'une biotine comme fonction de purification, d'une adénosylhomocystéine comme fonction d'affinité et d'un azoture d'aryle comme fonction réactive (Figure 19). Ici, l'activation de l'azoture d'aryle sous irradiation UV entraîne la formation d'un nitrène réactif. Ce dernier va assurer la formation du lien covalent entre la sonde et la ou les protéine(s) retenues par la sonde.[177]

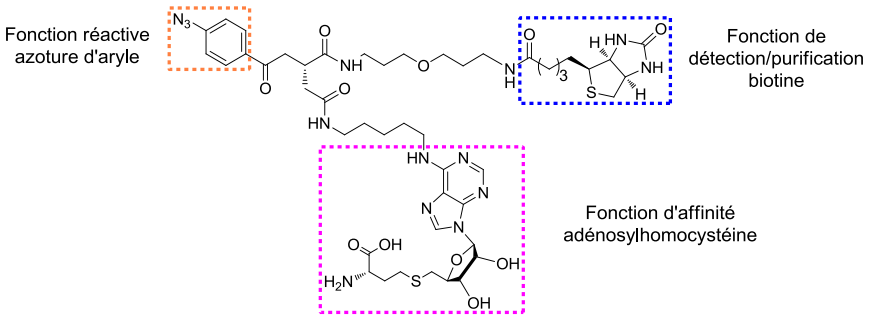


Figure 19. Structure de la sonde d'ABPP proposée par Wirsing et *al*.[177]

La mise en jeu de cette sonde a permis d'identifier trois méthyltransférases à partir de 200 µg d'extrait brut protéique avec une couverture de séquence pouvant aller jusqu'à 42%. Il faut préciser que l'observation de ces protéines n'avait pas pu être réalisée à l'aide d'une approche de protéomique classique.

Dans la seconde étude, Fisher et *al.* décrivent l'utilisation d'une sonde biotinylée comportant une staurosporine comme fonction d'affinité et un phénylazoture comme fonction réactive pour l'étude de kinases (Figure 20). Les captures ont été menées sur 400 µg d'un extrait brut de protéines issu de cellules cancéreuses de foie (HepG2) et ont permis d'isoler 98 kinases dont 66 se sont trouvées enrichies par rapport aux extraits analysés avant capture.[188]

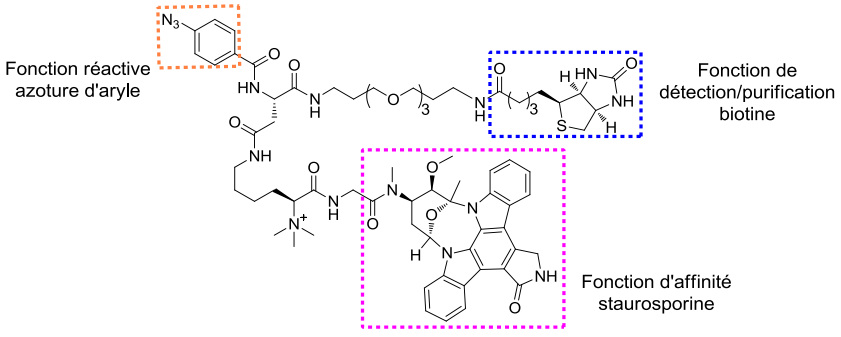


Figure 20. Structure de la sonde d'affinité proposée par Fischer et al.[188]

La dernière étude rapportée par Taylor et *al*. concerne l'utilisation d'une stratégie ABPP pour identifier les enzymes présentant une affinité pour un flavonoïde, la quercétine dans des cellules immortalisées de lymphocytes humains (Jurkatcells). La sonde utilisée est une version simplifiée, sur laquelle la fonction réactive et la fonction d'affinité sont assurées par une seule molécule, ici la quercétine. L'activation de celle-ci sous irradiation UV (320-400 nm) permet de former un lien covalent avec les protéines retenues par la sonde (Figure 21).[165] Bien que ce mécanisme ne soit pas encore précisé, l'implication du fragment photogénéré **B**, probablement *via* son intermédiaire du type **A** proposé précédemment par Seddon et Douglas,[189] a pu être mise en évidence par les analyses en spectrométrie de masse.

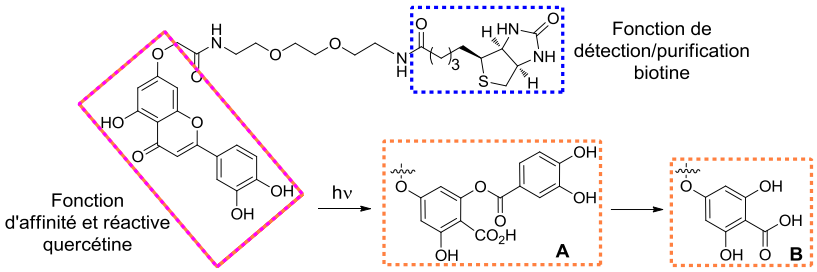


Figure 21. Structure de la sonde d'ABPP proposée par Taylor et *al*.[165]

La capacité de cette sonde à capturer des protéines d'intérêt a tout d'abord été mise en évidence par la rétention d'une kinase (casein kinase II, CK2), connue pour son affinité avec la quercétine, en présence d'ATP. Une faible quantité de cette protéine (4 µg) est suffisante pour observer cette capture sur gel SDS-PAGE. Enfin, l'utilisation de cette sonde avec des extraits de protéines issus de cellules immortalisées (Jurkatcells) a permis la mise en évidence de plusieurs cibles potentielles de la quercétine. Cependant, certaines protéines, telle que la casein kinase II, connue pour interagir avec la quercétine, n'ont pu être détectées dans les mélanges après capture.[165]

5.2.5. Limitations et évolution de l'ABPP

La méthodologie ABPP est bien adaptée à l'identification des cibles biologiques d'un ligand donné. Néanmoins, certains verrous techniques doivent encore être levés. Un des défis majeurs reste l'enrichissement de protéines ou de peptides en quantités très minoritaires au sein de mélanges complexes. Cet enrichissement, qui en général s'appuie sur la très forte interaction non covalente biotine-(strept)avidine (K_D = 10^{-15} M),[183,184] constitue le système le plus utilisé en protéomique. Si cette très forte interaction est un atout indéniable pour isoler et donc enrichir

la sonde liée à la protéine ou au peptide ciblé, elle pose en revanche un problème lors de la récupération de cette protéine ou de ce peptide pour réaliser son analyse. Cette étape nécessite en effet des conditions drastiques (solution 8 M guanidine.HCl tamponnée à pH = 1.5[190,191] ou une solution bouillante de SDS[192] par exemple), qui peuvent conduire à une dénaturation des protéines ou des peptides récupérés et à une contamination de l'échantillon final par des monomères de (strept)avidine provenant du support d'affinité.[193] De plus, malgré plusieurs lavages préalables, les échantillons récupérés après dénaturation sont très souvent pollués par de nombreuses protéines ou peptides non ciblés ayant des interactions avec la (strept)avidine (protéines nativement biotinylés ou en concentration très importante par exemple).[194] La présence de ces différentes protéines ou peptides parasites perturbe l'analyse en masse. Cette contrainte liée à la présence du motif biotine au sein des sondes moléculaires d'affinité a récemment été souligné par Kim et *al.*,[195] mais également par Bai et *al.*[196]

Afin de répondre à cette problématique, différentes stratégies peuvent être envisagées, comme par exemple l'utilisation d'analogues de biotine moins affins[197,198] ou encore l'emploi de mutants de la (strept)avidine.[199–201] Cependant, si l'affinité n'est pas assez importante, il y a un risque de perdre une quantité importante de protéines capturées, lors des séquences de lavage. Une autre alternative consiste à incorporer dans la sonde une fonction clivable située entre la fonction de purification (biotine) et la fonction d'affinité (Figure 22).

Figure 22. Sonde possédant une fonction clivable

Cette stratégie permet, d'une part, de conserver tous les avantages du support d'affinité biotine-(strep)avidine pour l'enrichissement et d'autre part, elle permet de couper sélectivement l'espaceur portant la biotine dans des conditions douces et biocompatibles conduisant uniquement à la libération de la ou des protéines capturées et facilitant de ce fait l'analyse protéomique (Figure 23).[202,203]

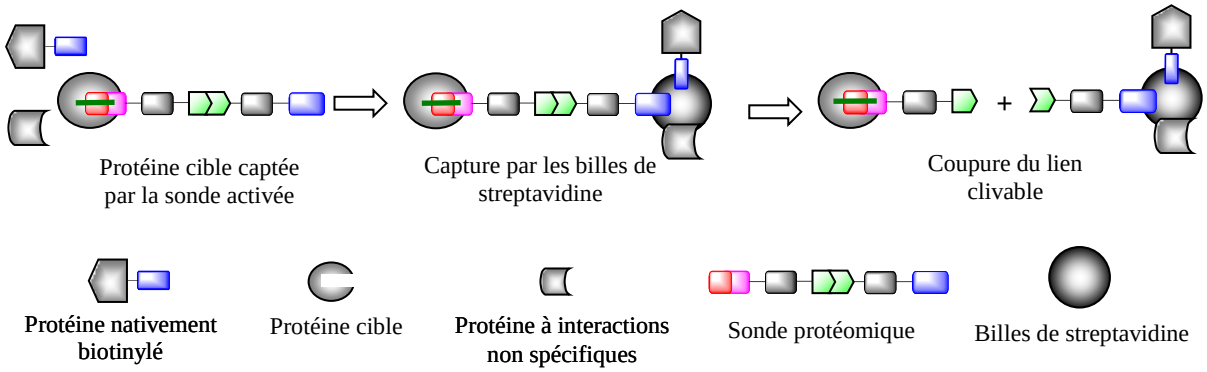


Figure 23. Principe d'utilisation d'une sonde protéomique portant une fonction clivable

Il existe actuellement dans la littérature un grand nombre de liens clivables pouvant être utilisés en protéomique chimique. Ils peuvent généralement être classés en trois groupes selon les stimuli de clivage utilisés : enzymatiques, chimiques ou photochimiques. Parmi tous ces liens, nous présenterons, dans la liste ci-après, quelques exemples non exhaustifs ayant montré des résultats probants (Tableau 1).[194,202,204]

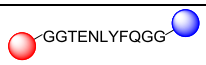
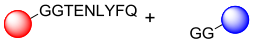
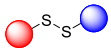
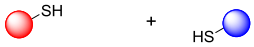
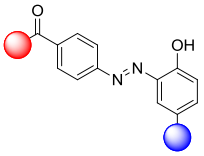
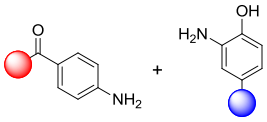
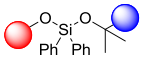
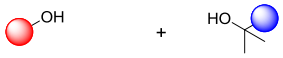
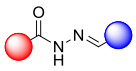
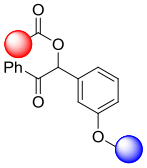
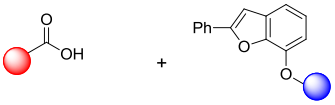
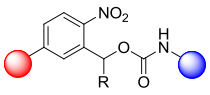
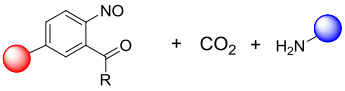
Entrée	Lien clivable	Réactif	Produits	Référence
1		*Tobacco etch virus* (Protéase TEV)		Weerapana et *al.*[205]
2		DTT, thiols, TCEP		Szychowski et *al.*[194]
3		$Na_2S_2O_4$		Leriche et *al.*[206] Felicetta et al.[207] Szychowski et *al.*[194]
4		Acide formique		Szychowski et *al.*[194]
5		Acylhydrazine		Park et *al.*[208] Dirksen et *al.*[209]
6		*hν*		Kim et *al.*[195]
7	 R = CH_3, Ph, penta-1,3-diène	*hν*		Olejnik et *al.*[210–214] Bai et *al.*[196] Szychowski et *al.*[194] Handwerger et Diamond[215] Wang et *al.*[216]

Tableau 1. Exemples de liens clivables utilisés en protéomique chimique

Parmi ces différentes stratégies de coupure, l'utilisation de groupements photoclivables de la famille des 2-nitrobenzyles (Figure 24)[217–222] s'est avérée particulièrement efficace dans de nombreuses applications en synthèse organique et en biochimie. Initialement décrits par Barltrop et *al.* dans les années 1960,[223] puis développés par Patchornik et *al.*,[224] ces motifs font désormais référence en tant que groupements protecteurs photolabiles. Plusieurs fonctions, telles que les fonctions hydroxyles (alcool, phénol), thiol, acide carboxylique, phosphate, peuvent en effet être protégées par le groupement *o*-nitrobenzyle (NB, R=H) ou nitrophényléthyle (NPE, R=CH_3).[220,225] A partir de ces molécules, Cameron et Fréchet ont

développé des dérivés d'alcool *o*-nitrobenzylique comme le 2-nitrobenzyloxycarbonyl (NBOC, R=H) et α-méthyl-2-nitrobenzyloxycarbonyl (MeNBOC, R=CH_3) notamment pour la protection des amines (Figure 25).[226]

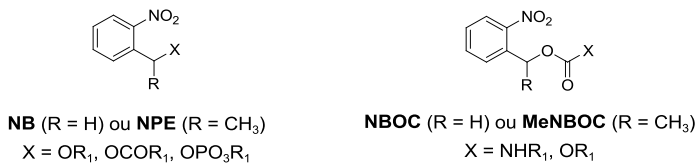


Figure 25. Structure de NB, NPE, NBOC, MeNBOC et leurs dérivés

Le mécanisme de photolyse des groupements NB ou NPE a récemment été étudié par Wirz et *al.*[227,228] Le processus photochimique primaire consiste en une abstraction intramoléculaire d'un proton par le groupement nitro à l'état excité, suivie de la formation d'un intermédiaire de type *aci*-nitro (schéma 3). Celui-ci subit un réarrangement conduisant au dérivé nitroso. Dans le cas de composés de type NBOC, le même mécanisme est impliqué et le produit libéré subit une décarboxylation rapide pour donner le composé final déprotégé. La photolyse d'un carbamate de 2-nitrobenzyle permet de récupérer l'amine et simultanément de libérer le dérivé 2-nitrosobenzaldéhyde (R=H) et du dioxyde de carbone. La formation non souhaitée d'imines entre l'amine générée et l'aldéhyde du dérivé nitroso peut être limitée par l'utilisation de substituant alkyle ou aryle (R=CH_3, Ph) en position benzylique de l'alcool du 2-nitrobenzyle (Schéma 3).[225]

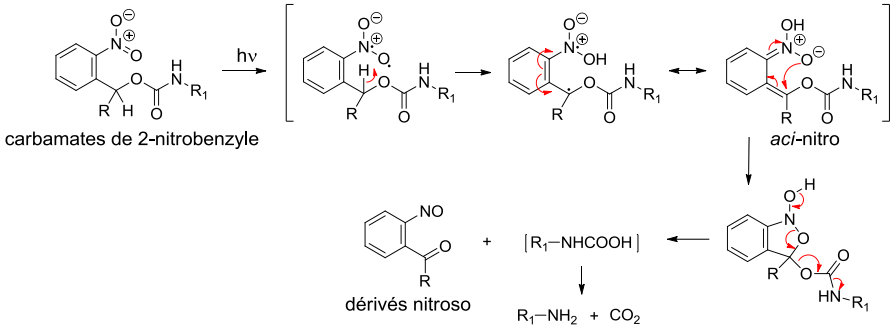


Schéma 3. Mécanisme de photolyse de carbamates de 2-nitrobenzyle

Parmi les groupements photoclivables, les dérivés d'alcool 2-nitrobenzyle et en particulier leurs carbamates (Tableau 1, entrée 7) ont largement été utilisés en biologie structurale et en protéomique chimique au cours de ces dernières années. Leurs stabilités dans des conditions oxydo/réductrices et acido/basiques en font des groupes protecteurs de choix. De plus, leur mode de clivage orthogonal par irradiation à une longueur d'onde dans le proche UV à 330-365 nm reste compatible à la fois avec la sauvegarde du matériel biologique mais également vis à vis des supports solides (pas de dégagement de chaleur, profil d'émission étroit).[215,217,229] Ce

type de groupement à structure modulable a par ailleurs déjà montré son efficacité en protéomique chimique pour la détermination de peptides.[195,210,211,216,230] Les premiers travaux réalisés dans ce domaine ont été décrits par Senter et *al*. en 1985.[231] Il s'agit de la préparation d'un espaceur comportant un alcool *o*-nitrobenzylique lié à une toxine et un anticorps. L'irradiation sous UV de cet ensemble moléculaire à basse énergie provoque la libération de la toxine sous forme totalement active.

Depuis 1995, plusieurs sondes possédant un lien photoclivable dérivé du 1-(5-(aminométhyl)-2-nitrophényl)éthanol ont été développées par le groupe de K. J. Rothschild.[210–214] Le groupement hydroxyle sert à installer, *via* un carbamate, un ester de *N*-hydroxysuccinimidyl (NHS) comme fonction réactive en vue de fixer spécifiquement ce groupement hydroxyle à des peptides, amines primaires ou des oligonucléotides. Le groupement amino est lui couplé, *via* un espaceur à chaînes alkyles ou PEG plus ou moins longues, à une biotine. Après les étapes de fixation et d'enrichissement faisant appel à un support solide à base de strep(avidine), les cibles biologiques sont relarguées lors d'une irradiation sous UV à 365 nm (Schéma 4).

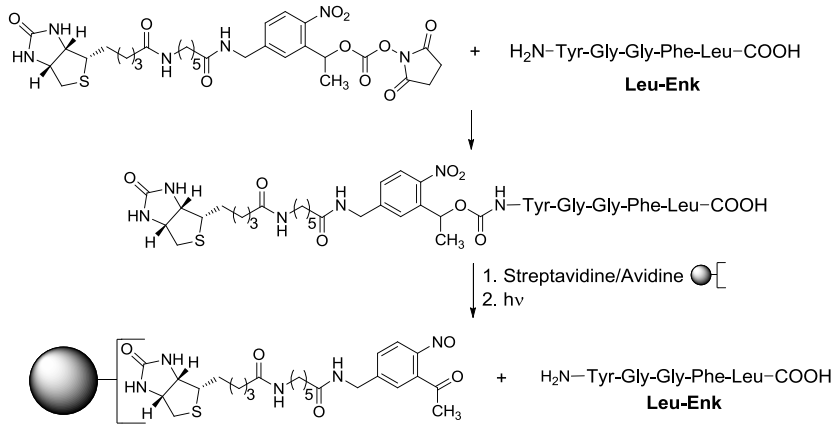


Schéma 4. Exemple de sonde développée par le groupe de K. J. Rothschild

Handwerger et Diamond[215] mais également Bai et *al*.[196] ont récemment conçu et synthétisé des sondes similaires permettant d'isoler des acides nucléiques, en ajoutant respectivement soit un espaceur biocompatible de type polyéthylènimine, soit un analogue nucléotidique comme fonction réactive.

6. La technique SPR

La résonance plasmonique de surface (ou surface plasmon resonance (SPR) en anglais) résulte de l'excitation, par une onde évanescente, d'un mode d'oscillation collective d'électrons libres à la surface d'une couche mince métallique. Ce phénomène a été observé pour la première fois au début du vingtième siècle par R. W. Wood,[232] et rend compte de la modification d'une surface. Depuis, de nombreuses avancées technologiques ont permis le développement de diverses applications. Grâce à l'évolution de l'appareillage et de la technologie des biopuces permettant de caractériser et quantifier une large variété d'interactions biomoléculaires, la SPR est devenue notamment un outil idéal pour l'étude des interactions entre différentes molécules dans les domaines de la biodétection et de la biopharmaceutique.[233–237]

6.1. Principe de la résonance plasmonique de surface

Cette technique optique et physique est basée sur l'analyse d'un angle de résonance (Figure 26). La première condition à respecter est une réflexion totale, afin qu'il n'y ait pas de lumière réfractée. Un faisceau de lumière polarisée monochromatique illumine une interface d'indice de réfraction différent de celle de la puce de détection (sensor chip), constitué d'une plaque de verre recouverte d'une fine couche d'or, et la lumière est réfléchie ou réfractée. Les photons du rayon incident entrent en résonance avec les électrons libres excités de la surface d'or, on parle donc de résonance plasmonique de surface, ce qui crée une onde évanescente qui se propage perpendiculairement dans le milieu où l'indice de réfraction est le plus bas, sur quelques nanomètres (champ évanescent). L'onde évanescente induit une diminution de l'intensité de la lumière réfléchie. Ces plasmons changent avec les modifications de la surface de la puce ce qui entraîne un changement de l'angle de résonance (θ). Cette variation en fonction du temps est detectée à l'aide d'une barette de diodes et le signal collecté est traduit en un sensorgramme.[233,234,236,237]

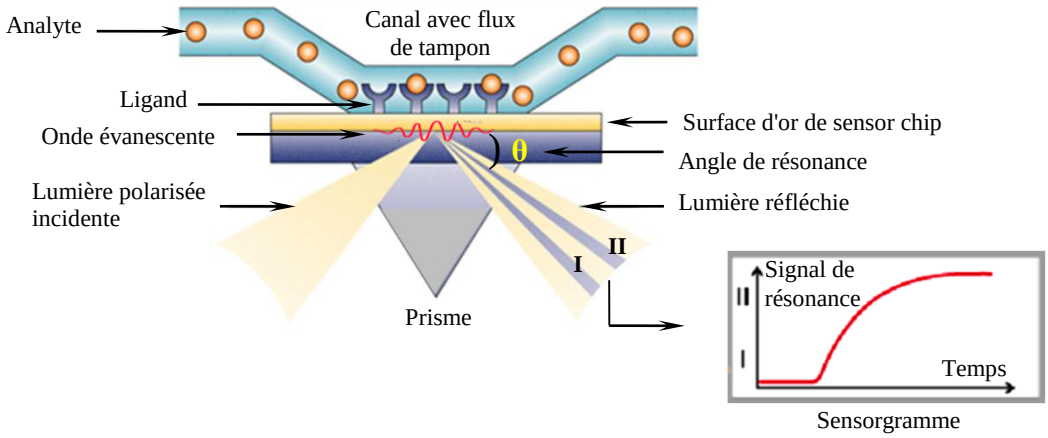


Figure 26. Principe de fonctionnement de la résonance plasmonique de surface

Cette technique permet la détection et la quantification en temps réel et sans marquage des interactions non-covalentes entre molécules. Cette approche consiste à définir des interactions entre deux molécules dans un système dynamique sous flux continu de tampon (le tampon de course) : un des interactants est immobilisé sur la puce (appelé ligand) et l'autre interactant mobile dans un tampon (appelé analyte) circule au contact de cette surface *via* un système d'écoulement microfluidique. Les signaux de réponse sont proportionnels à la masse moléculaire des molécules fixées sur la surface.

6.2. Visualisation du signal SPR : le sensorgramme

En fonction des modifications de la surface de la puce, l'angle de résonance change et la mesure des variations de cet angle en fonction du temps donne naissance à un sensorgramme. Le sensorgramme peut présenter plusieurs étapes de modification de surface (Figure 27). Au départ, seul le tampon de course est au contact de la surface modifiée par le ligand du sensor chip fournissant un angle de résonance stable associé à un nombre d'unité de résonance (RU) stable. Puis, l'analyte est injecté et s'associe avec le ligand immobilisé sur la surface ce qui entraîne une augmentation du nombre d'unités de résonance et permet de recueillir des données cinétiques d'association avec le ligand. Une fois l'injection terminée, le retour du tampon de course provoque le décrochage de l'analyte ayant interagi avec le ligand qui provoque une diminution du nombre de RU; de même, l'enregistrement en temps réel des valeurs de réflectivité permet de décrire la cinétique de la phase de dissociation entre les deux partenaires impliqués. Pour un retour à la surface initiale contenant le ligand, une phase de régénération est réalisée à l'aide d'un régénérant, entraînant une chute d'unité de résonance. Par modélisation et en suivant le modèle de Langmuir, il est alors possible de retrouver les constantes d'association

et de dissociation pour le couple ligand/analyte et par extension la constante d'équilibre de la réaction, aussi nommée constante d'affinité.

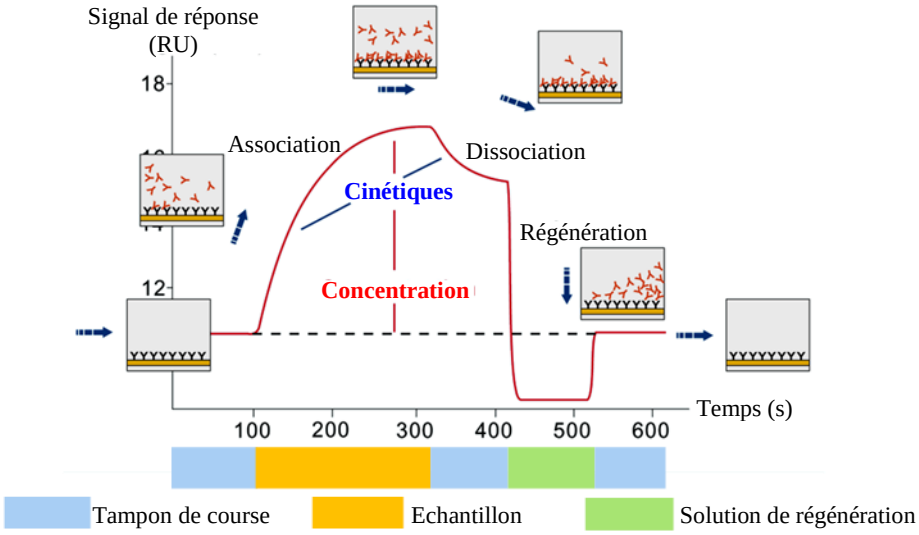


Figure 27. Sensorgramme typique d'une interaction moléculaire présentant les différentes phases d'une expérience en SPR

6.3. Mise en œuvre de la technologie BIAcore

Le système BIAcore (GE Healthcare) dont les appareillages sont commercialisés depuis 1990, est très utilisé dans les laboratoires de recherche. Cette technologie, basée sur le phénomène de SPR, peut être appliquée à une grande diversité d'analytes : petites molécules (> 100 Da) ou macromolécules purifiées (polypeptides, protéines, ou acides nucléiques) mais également des mélanges complexes comme par exemple les vésicules lipidiques, les particules virales, les lysats bactériens ou cellulaires. Ces analyses peuvent s'effectuer en milieu aqueux, mais aussi en milieux biologiques complexes et troubles, et dans certains cas pour des raisons de stabilité ou de solubilité, en présence d'additifs spécifiques, comme les solvants organiques (DMSO, CH_3CN) ou de fortes concentrations en sels. Les innovations techniques pour répondre à des hautes exigences en matière de sensibilité, d'efficacité et de flexibilité permettent aujourd'hui de détecter des interactions avec une très faible affinité (de l'ordre du millimolaire à picomolaire) de façon rapide et précise. Enfin, l'avantage très important de cette technologie réside dans l'observation en temps réel de la formation ou non de complexes sans la nécessité de marquage des interactants. La SPR permet donc de déterminer la cinétique (la vitesse de formation du complexe et la stabilité de celui-ci) et l'affinité (les constantes d'association et de dissociation) des interactions entre les deux partenaires.[233–240]

6.4. Expérience classique et expérience inverse

Récemment, des études réalisées au sein de l'équipe ont montré que la SPR permettait de discriminer efficacement des interactions spécifiques polyphénol-protéines par rapport à des non-spécifiques en modifiant la stratégie d'immobilisation du ligand sur la surface de sensor chip.[77,241,242]

Dans une expérience SPR classique, la protéine est immobilisée à la surface du sensor chip, soit par un couplage covalent soit par une capture d'affinité, puis son interaction est étudiée avec le polyphénol mis en circulation dans un flux de tampon de course. Dans ces conditions, le polyphénol a tendance à se lier massivement à la surface de la protéine de manière non spécifique en raison de sa petite taille et de la quantité en excès de ce polyphénol par rapport à celle de la protéine étudiée (Figure 28A). Ce phénomène ne permet donc pas de détecter d'éventuelles interactions spécifiques de la molécule polyphénolique avec la protéine. Ce verrou peut être levé si le polyphénol est immobilisé à la surface tandis que la protéine est mise en circulation. Le développement de ce dispositif original a permis de discriminer les interactions spécifiques des non-spécifiques d'une série de polyphénols et de protéines ciblées. Cette stratégie, dite d'expérience "inverse" (Figure 28B), a été validée notamment par l'étude de l'interaction du couple vescaline-topoisomérase IIα (TopIIα).[77]

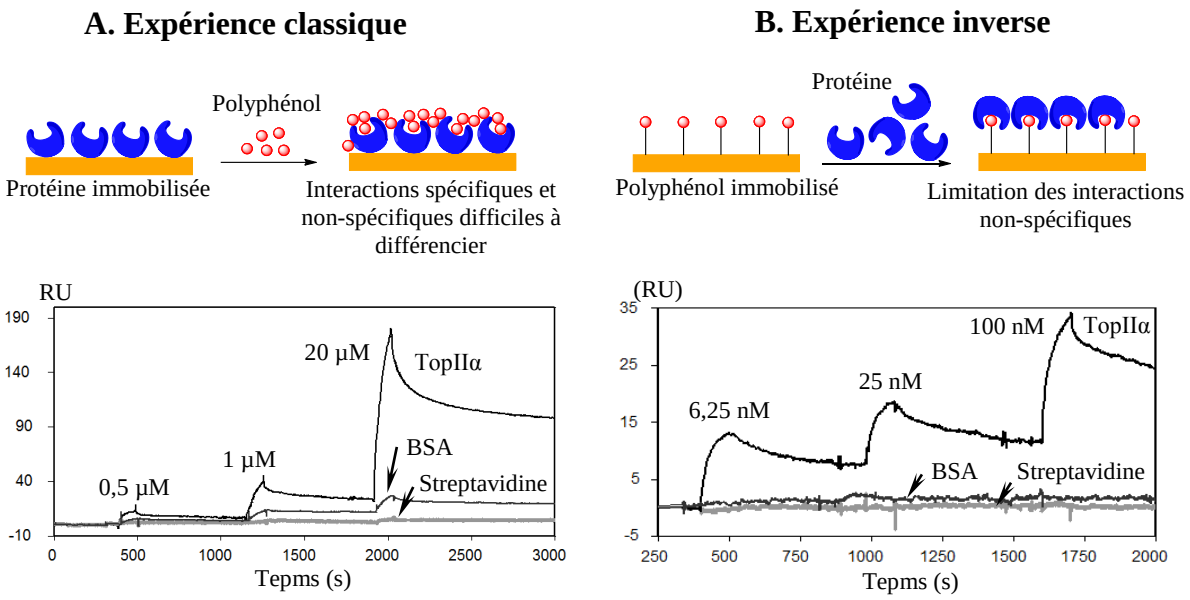


Figure 28. Expérience classique versus expérience inverse

Dans une première stratégie, la TopIIα humaine a été immobilisée à la surface pour étudier ses interactions avec la vescaline en solution. La BSA et la streptavidine, deux protéines

connues pour ne pas avoir d'affinité particulière pour la vescaline, ont également été utilisées comme contrôles négatifs. L'analyse d'interactions par SPR a montré l'association de la vescaline avec les trois protéines, dont préférentiellement avec la TopIIα, comme prévue. Cependant, les unités de résonance obtenues pour cette dernière interaction (175 RU) sont beaucoup plus élevées que celles attendues (22 RU estimées pour une association "simple"). Ces résultats pourraient être la conséquence de l'accumulation de manière non-spécifique du polyphénol sur la surface de la protéine (Figure 28A).

Dans la stratégie inverse, la vescaline est fixée sur la surface de la puce. Cette immobilisation nécessite au préalable une modification de ce polyphénol en son dérivé sulfhydryledeoxythioéther correspondant permettant de le fixer à la puce par un couplage thiol-or (Schéma 5).

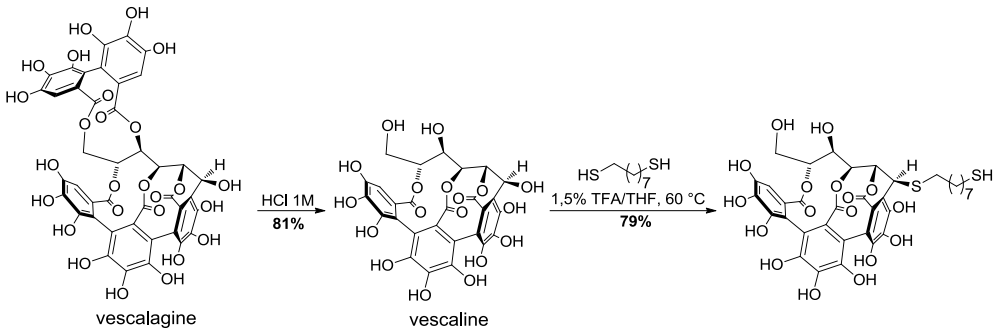


Schéma 5. Préparation et modification de la vescaline en vue de son immobilisation sur une puce de détection

Les analyses SPR entre la vescaline immobilisée avec la TopIIα, la BSA et la streptavidine montrent une augmentation de RU de type dose-dépendante pour l'association de la TopIIα avec la vescaline au cours des trois injections successives suggérant une interaction spécifique entre ces deux partenaires et l'absence d'interaction de la BSA et de la streptavidine pour la vescaline. Cependant, la faible valeur du signal obtenu (35 RU) lorsque la TopIIα est injectée avec une concentration de 100 nM ne correspond pas à une association "simple" ligand-analyte. Cette réponse plus faible que celle attendue pourrait être liée à l'encombrement stérique causé par une trop forte densité de vescaline immobilisée et/ou la taille de la protéine (Figure 28B).[77] Cette approche "inverse" qui permet de discriminer les interactions spécifiques et non-spécifiques a été privilégiée lors de cette étude.

7. Objectif et stratégie

L'étude des interactions polyphénol-protéine pour permettre l'identification des cibles biologiques des polyphénols et la compréhension des mécanismes moléculaires responsables de leurs propriétés nécessite le développement de techniques et d'outils moléculaires. Ce travail de thèse qui s'inscrit dans ce contexte scientifique, a consisté à développer des sondes moléculaires porteuses de flavanols et à les tester pour des applications en protéomique chimique ABPP et en SPR.

Une première étude a consisté à développer des sondes ABPP porteuses de la (2*R*,3*S*)-catéchine et de la (2*R*,3*R*)-épicatéchine en tant que fonctions d'affinité. Ces sondes, notamment leurs efficacités de capture et leurs sélectivités, ont été étudiées à l'aide d'une enzyme modèle, la leucoanthocyanidine dioxygénase (LDOX) aussi appelée anthocyanidine synthase (ANS) impliquée dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes. Cette enzyme est particulièrement adaptée à cette étude compte tenu qu'elle reconnaît spécifiquement ces deux flavanols.[99,243]

Une deuxième étude a consisté à développer des sondes porteuses de la procyanidine B2 et de l'EGCG pour une utilisation en SPR. La synthèse de ces sondes nécessite de disposer de composés polyphénoliques purs. La plupart des polyphénols "simples", tels que les flavonoïdes, sont disponibles dans le commerce et d'autres sont accessibles dans des formes plus ou moins pures par extraction/purification à partir de leurs sources naturelles. Pour la procyanidine B2 et l'EGCG, les sources naturelles de ces molécules sont généralement constituées d'un mélange de composés étroitement liés et difficilement séparables. Pour cette raison, le développement de méthodes de synthèse stéréocontrôlées, efficaces en terme de rendement et répétables, a constitué un objectif important de ce travail.

Chapitre 2

Développement de sondes moléculaires porteuses de flavanols et application en protéomique chimique

1. Conception et synthèse de sondes moléculaires porteuses de flavanols

Deux types de sondes ont été considérés. Le premier type est basé sur un design classique très souvent rencontré dans la littérature et qui implique une fonction photoactivable (sondes de type A). Le second type de sonde exploite avantageusement la réactivité intrinsèque des flavanols et plus spécifiquement celle de leur cycle B pour établir le lien covalent avec une protéine (sondes de type B). La synthèse et la réactivité comparée de ces deux types de sondes porteuses d'une unité catéchine ou épicatéchine sont décrites dans ce chapitre en vue d'une application potentielle en protéomique chimique de type ABPP.

1.1. Conception des sondes de type A et B

Les sondes de type A sont basées sur un design classique, impliquant trois fonctions indépendantes : une biotine comme fonction de détection/purification, un flavanol comme fonction d'affinité et un groupement photoactivable comme fonction réactive. Ces trois éléments sont réunis par une cystéine utilisée comme espaceur trifonctionnel (Figure 29).

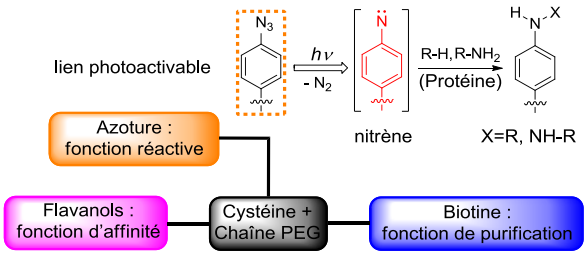


Figure 29. Représentation schématique d'une sonde photoactivable porteuse d'un flavanol– sonde de type A

Les sondes présentant une fonction photoactivable ont été très souvent utilisées au cours de ces dernières années pour l'analyse d'interaction protéine/protéine ou protéine/petite molécule bioactive. Parmi les groupements photoactivables (ou photoréactifs) développés,[244,245] les trois fonctions les plus couramment utilisées pour la capture de protéines sont les dérivés azotures aromatiques, les diazirines ou les benzophénones (Figure 30).[172,179,182,245] Il est important de noter qu'il n'existe pas de groupement photoactivable idéal, chacun présente ses avantages et ses inconvénients.

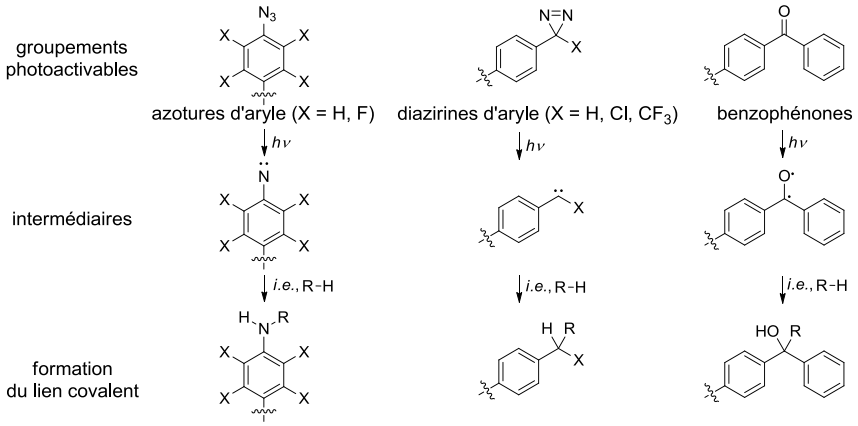


Figure 30. Exemples de groupements photoactivables et leur mode d'activation sous irradiation UV

Parmi ces motifs photosensibles, le groupement azoture aromatique a été privilégié dans le cadre de cette étude. Lorsque l'azoture est exposé sous UV à une longueur d'onde proche de 300 nm, ce composé se décompose en diazote et donne naissance à un intermédiaire radicalaire instable et hautement réactif : un nitrène. Ce dernier peut s'additioner sur des doubles liaisons ou s'insérer dans des liaisons C-H, S-H ou N-H de la protéine situées à son voisinage (Schéma 6).[245,246] Malgré sa réactivité photochimique complexe, ce dérivé est très souvent utilisé pour la capture de protéines impliquant des stratégies ABPP ou CCMS en raison de sa haute réactivité et de sa stabilité relative dans les milieux biologiques.[167,170,173–178,245]

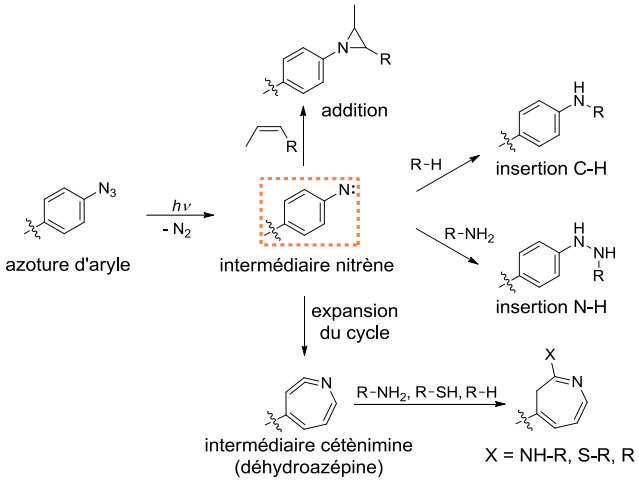


Schéma 6. Activation des azotures d'aryle : intermédiaire et réactivité

Schofield et *al*. ont récemment utilisé une sonde comportant un dérivé d'azoture d'aryle comme fonction réactive pour étudier l'interaction de fragments peptidiques issus d'un facteur de transcription induit en conditions hypoxiques (HIF-1α/2α) et le complexe von Hippel Lindau elongin C/B (VCB).[167] La formation du lien covalent entre la sonde et le complexe VCB, est assurée par l'azoture d'aryle sous irradiation à 365 nm. Les adduits formés entre la sonde et le complexe d'intérêt ont été clairement mis en évidence par spectrométrie de masse et par Western blot. Des analyses de capture ont également été menées sur des extraits bruts de protéines et montrent un enrichissement du milieu en protéine cible.[167] Sur la base de cette étude, nous avons envisagé de synthétiser des sondes photoactivables comportant ce type d'azoture aromatique. Le greffage de cet azoture peut s'effectuer sur une unité d'ancrage trifonctionnelle, comme la cystéine à une distance raisonnable des autres fonctions pour maintenir la reconnaissance du flavanol pour la protéine ciblée et ne pas perturber l'interaction biotine-(strept)avidine. L'espacement est assuré par des chaînes alkyles et PEG pour faciliter la solubilité de la sonde dans les milieux biologiques (Figure 29).

Le deuxième type de sondes que nous avons considéré repose sur la réactivité chimique intrinsèque sous oxydation de nombreux polyphénols présentant un motif catéchol ou pyrogallol (sondes de type B). Les flavanols choisis dans cette étude (la catéchine et l'épicatéchine) possèdent un motif catécholique au niveau de leur cycle B. Ce motif catéchol en présence d'un agent d'oxydation tel que $NaIO_4$, s'oxyde en une *ortho*-quinone électrophile qui peut réagir avec une source de nucléophile. Si cet intermédiaire est généré à proximité d'une protéine, les résidus nucléophiles de la protéine (-SH, -NH_2,...) peuvent réagir avec cet intermédiaire *via* des additions de type Michaël permettant d'établir un lien covalent entre la sonde et la protéine ciblée (Figure 31).

Ces sondes activables par oxydation chimique présentent l'avantage d'être particulièrement simples dans leur design et leur construction puisque les flavanols font à la fois office de fonction réactive et d'affinité. Ces sondes originales comporteront donc simplement un flavanol lié par une chaîne PEG à la biotine, utilisée comme fonction de détection/purification (Figure 31).

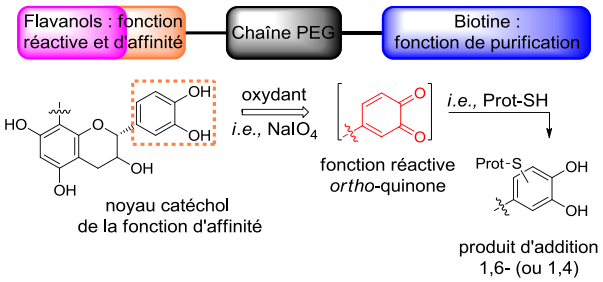


Figure 31. Représentation schématique de sondes activables par oxydation chimique porteuses de flavanols-sondes de type B

Cette stratégie de capture sous oxydation *in situ* s'inspire d'études antérieures réalisées par Kodadek et *al*.[168,247–249] et relatives à une nouvelle méthode de capture de protéines appelée "chemical oxidative cross-linking". Cette capture est basée sur l'oxydation de la 3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA)**,** préalablement incorporée dans la sonde ABPP en tant que fonction réactive, avec du periodate de sodium ($NaIO_4$) utilisé comme activateur (Figure 31). Cette méthodologie impliquant l'oxydation d'un motif catéchol a été validée pour la première fois en 2004 par Kodadek lors de la capture de la protéine de levure Gal80 (His6-Gal_{80}P) par un peptide biotinylé présentant une affinité particulière pour cette protéine.[168] Lors de cette étude, la sonde "Gal_{80}-$DOPA^{Bioitin}$ BP" a été préparée en remplaçant la tyrosine *N*-terminale de ce peptide par la DOPA. L'adduit formé a été confirmé et visualisé par Western blot révélé à l'aide de neutravidine couplée à une peroxidase (Figure 32).

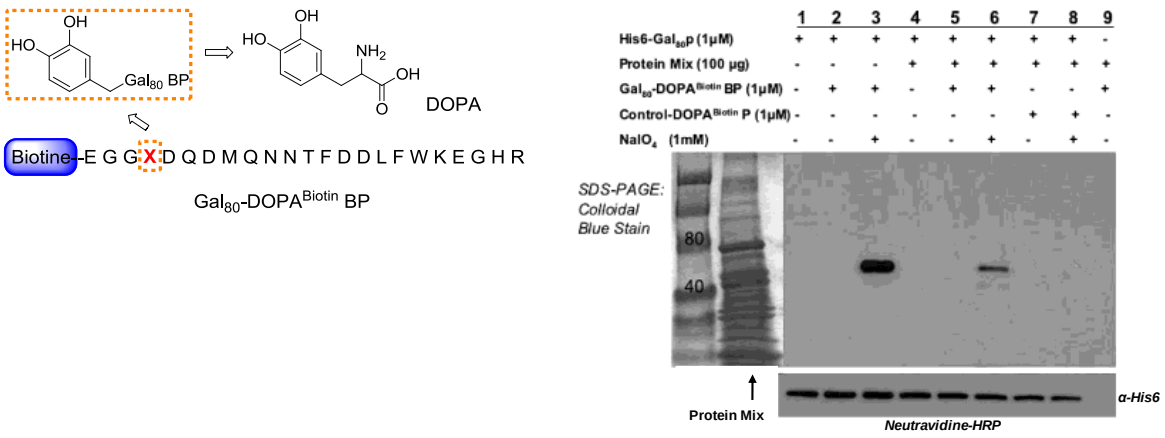


Figure 32. Sonde ABPP utilisant la DOPA comme fonction réactive (à gauche) et son utilisation pour la capture de la protéine Gal80p en conditions oxydantes (Western blot à droite)[168]

Sur la figure 32 du Western blot, nous pouvons constater que la protéine Gal80 est détectée *via* le peptide biotinylé uniquement quand ce dernier est activé à l'aide de $NaIO_4$ (piste 3). De plus, lorsque la protéine Gal80 est mise en compétition avec des protéines ne possédant pas d'affinité particulière pour le peptide Gal_{80}-$DOPA^{Biotin}$ BP, seule la protéine Gal80 est capturée (piste 6). L'efficacité et la sélectivité de la capture de la protéine d'intérêt par cette sonde en milieu oxydant ont donc été démontrées.[168]

La nature des adduits formés entre la DOPA sous activation de $NaIO_4$ et les résidus nucléophiles d'une protéine susceptibles de réagir, a été mis en évidence, par des expériences menées sur des acides nucléiques peptidiques (Peptide NucleicAcid, PNA).[247,248] Ces adduits ont été caractérisés par HPLC et MALDI-TOF.[248] Seuls certains acides aminés (l'histidine, la lysine, la cystéine ou les acides aminés terminaux possédant une fonction NH_2 ou COOH libre) à proximité de l'*ortho*-quinone générée sont capables de former un lien covalent avec celle-ci, suggérant un effet entropique lors de cette étape (Schéma 7). Parmi ces acides aminés, la cystéine est la plus réactive. L'addition de cette dernière sur la DOPA est observée même en l'absence de $NaIO_4$. L'oxydation de la DOPA par l'oxygène résiduel du milieu réactionnel pourrait expliquer ce résultat.

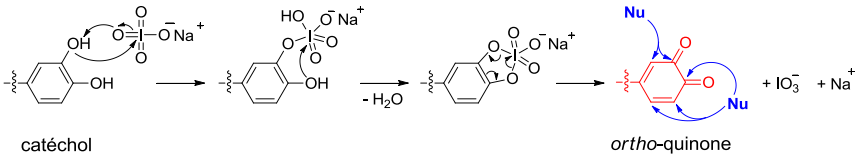


Schéma 7. Mécanisme proposé pour l'activation de la DOPA par $NaIO_4$[247,248]

Kodadek a mis également en évidence l'absence d'oxydation notable de composés du type 1,2-diol, tels que l'éthylène glycol, le lactose ou le triphosphate d'adénosine, dans la gamme de concentration de $NaIO_4$ utilisée. Seule l'oxydation d'acides aminés soufrés a été détectée (la cystéine et la méthionine). Ces études semblent donc indiquer qu'il est possible d'activer sélectivement des motifs catéchol pour capturer des protéines à l'aide de $NaIO_4$ en présence de carbohydrates *in cellulo* ou dans des extraits bruts.[248] Par ailleurs, l'activation du motif catéchol peut également être réalisée à l'aide d'oxydant théoriquement plus sélectif comme le ferricyanure de potassium, $K_3Fe(CN)_6$ sans impacter l'intégrité des thiols ou des 1,2-diols. Récemment, Francis et *al.* ont rapporté l'utilisation de cet oxydant pour coupler des dérivés d'*o*-aminophénol ou catécholique à des substrats comportant des motifs de type aniline ou des protéines comportant des acides aminés *N*-terminal.[250–252] L'ensemble des caractérisations en RMN, RX, HPLC et LC-MS a permis de mettre en évidence l'implication d'un intermédiaire du

type *o*-iminoquinone ou *o*-quinone. Dans le cas d'*o*-aminophénols, l'oxydation au ferricyanure conduit uniquement au produit **A** tandis que l'oxydation au periodate de sodium peut mener majoritairement à la formation d'un cycle contracté **B**.[252] Par contre, dans le cas d'un substrat catéchol seul le composé **A** est observé quel que soit l'oxydant utilisé (Schéma 8).[250–252]

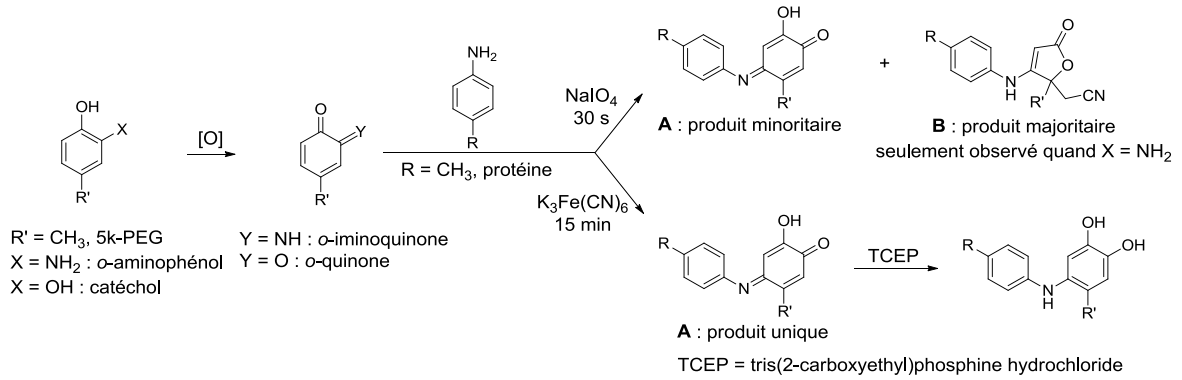


Schéma 8. Couplage de l'aniline à un *o*-aminophénol ou un catéchol en conditions oxydantes

Concernant plus spécifiquement la formation d'adduits de flavanols activés par des ions ferriques, une étude réalisée au laboratoire par le Dr. Emilie Petit a permis la synthèse et la caractérisation complète d'adduits formés entre la catéchine ou l'épicatéchine en présence de chlorure ferrique, et des thiols d'intérêt œnologique tels que le 3-sulfanylhexan-1-ol (3-SH) ou le 2-furanylméthanethiol (2-FMT). Ces adduits confirment la formation d'une *o*-quinone intermédiaire qui réagit avec les nucléophiles présents dans le milieu *via* des additions de type Michaël (Schéma 9).[253]

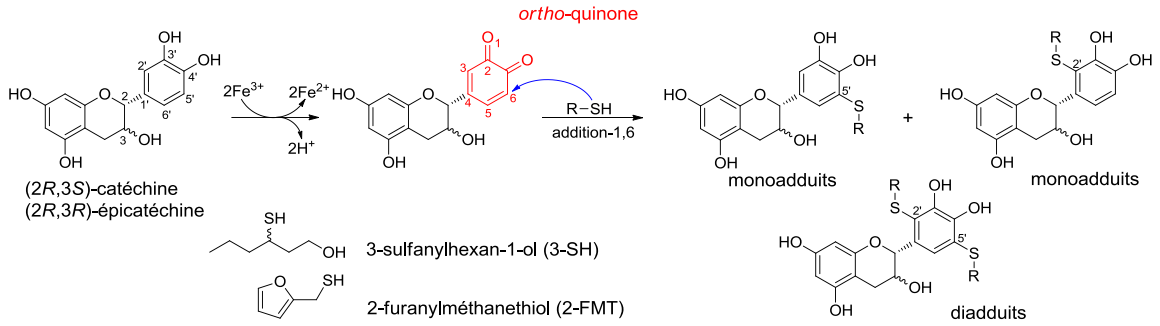


Schéma 9. Déshydrogénation oxydative de la catéchine ou de l'épicatéchine et formation d'adduits avec des thiols d'intérêt œnologique

1.2. Synthèse des sondes A et B considérées

Sur la base de cette étude bibliographique concernant les deux modes d'activation considérés, la synthèse des sondes porteuses de flavanols a été entreprise. Pour les deux types de sondes, un aménagement fonctionnel préalable des flavanols est cependant nécessaire pour assurer la connexion avec le reste de la sonde. La première étape consiste donc à fonctionnaliser

les flavanols considérés pour pouvoir les fixer sur les sondes d'affinité A ou B. Cette étape est particulièrement importante car les modifications structurales engendrées par cette dérivatisation peuvent grandement perturber l'interaction spécifique du polyphénol avec sa ou ses protéines cibles. Dans le cas d'un flavanol, différents sites de fixation de la sonde peuvent être considérés (Figure 33).

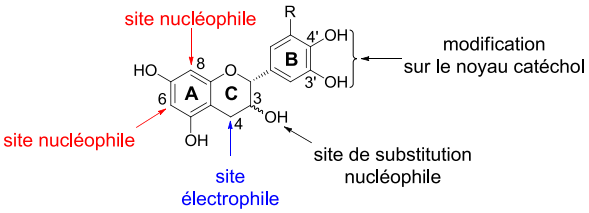


Figure 33. Positions dérivatisables des flavan-3-ols

Les travaux antérieurs effectués au laboratoire,[99,150] en accord avec les études cristallographiques menées par le groupe de Schofield,[103,104,254] ont montré que les fonctions hydroxyles des flavanols ne doivent pas être modifiées. En effet, ces fonctions peuvent jouer un rôle majeur dans certaines interactions protéiques. Elles permettent en particulier d'ancrer les flavanols dans les sites actifs des enzymes impliquées dans la biosynthèse des flavonoïdes et notamment dans celui de la LDOX (Figure 34).

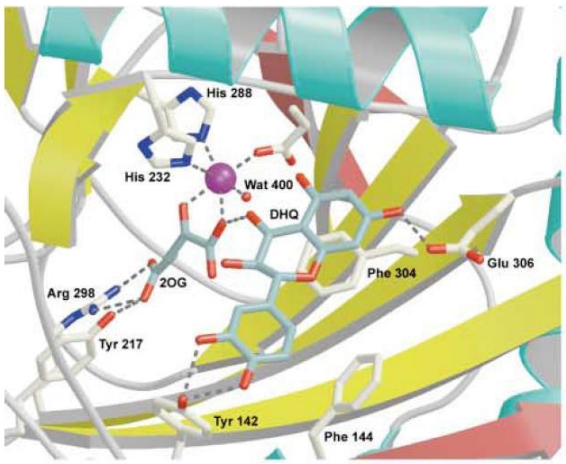


Figure 34. Structure cristallographique du complexe LDOX-DHQ-co-substrats (1GP6)[103]

Précédemment au laboratoire, une stratégie de synthèse a permis d'introduire un espaceur sur le cycle A de flavanols.[99,150] Cette stratégie tire avantageusement parti du caractère nucléophile du carbone 8 de ces molécules pour la fixation d'un espaceur possédant un acide carboxylique terminal. L'acide résultant est intramoléculairement lactonisé avant d'être couplé à la sonde.[99,150,255] Seule cette modification a été envisagée dans le cadre de notre étude. Dans le cas de la catéchine et

de l'épicatéchine modifiées, la rétrosynthèse permettant d'obtenir la dérivatisation considérée est présentée ci-après (Schéma 10) :

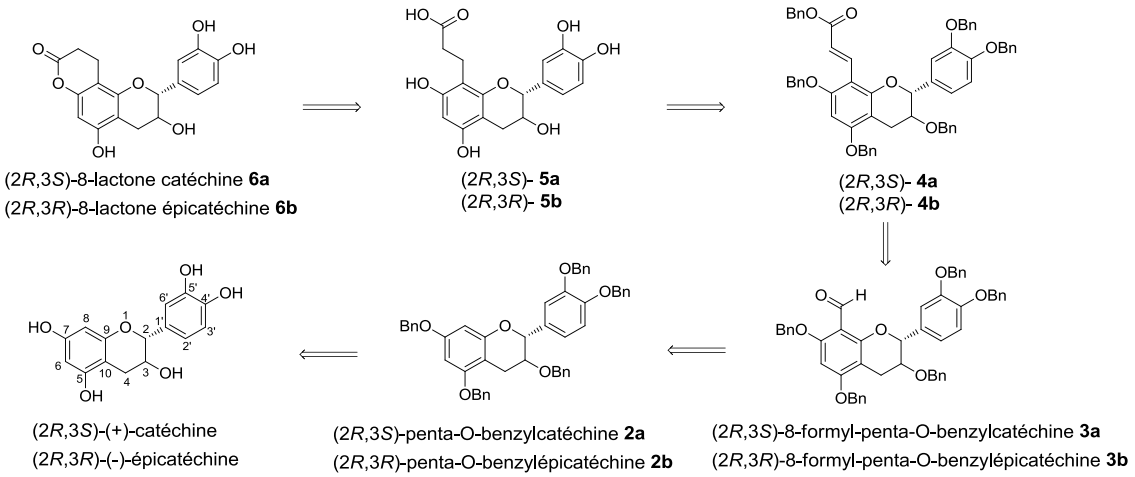


Schéma 10. Analyse rétrosynthétique pour la synthèse des flavan-3-ols modifiés

Comme la plupart des polyphénols, la (+)-catéchine et la (–)-épicatéchine sont sensibles à l'oxygène.[1] Comme il a été vu précédemment, une oxydation du noyau catéchol en présence d'oxygène résiduel peut produire des *o*-quinones très réactives pouvant conduire en particulier à des réactions d'oligomérisation. Ces flavanols sont également instables en dehors de la zone de pH 5-8:[256–258] les réactions d'oligomérisation se produisent en milieu acide, alors que l'ouverture du cycle pyrane C en milieu basique, provoque la formation d'acide catéchinique ou conduit aux énantiomères non naturels après épimérisation en position C-2 *via* la formation d'une méthylène quinone qui requiert la présence d'un groupement hydroxyle en position C-4' (Schéma 11).[256,257,259] Par ailleurs, l'exploitation de la nucléophilie du carbone en position 8 nécessite d'annihiler la réactivité des fonctions hydroxyles de ces flavanols. Il est donc nécessaire de protéger préalablement les fonctions phénols mais également alcool secondaire en position 3 avant transformation.[260,261] De plus, cette protection préalable permet d'améliorer la régiosélectivité du couplage en position C-8.[262,263]

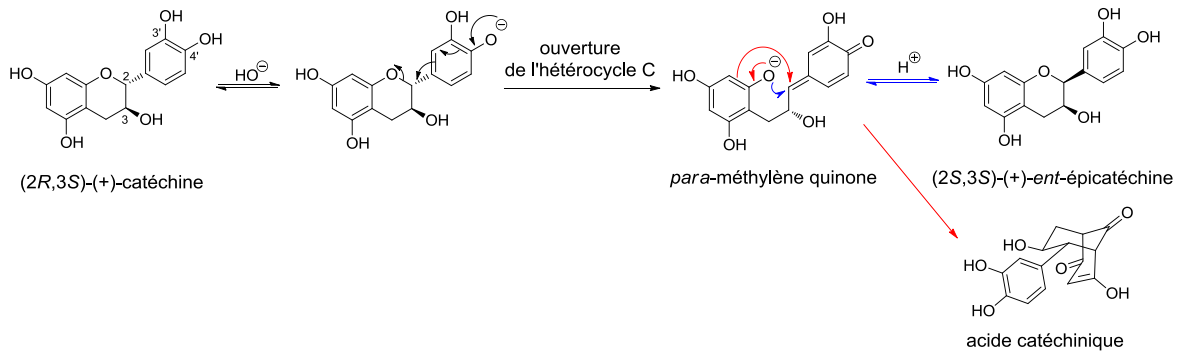


Schéma 11. Evolution de la catéchine en condition basique

Plusieurs groupements protecteurs de fonctions phénols ont été décrits dans la littérature. Actuellement la majorité des travaux et en particulier ceux réalisés au sein de l'équipe, font appel au groupement benzyle, qui présente une grande stabilité lors de la dérivatisation et d'une déprotection efficace.[99,150,242,255,259,264,265]

La benzylation des phénols de la (+)-catéchine et de la (–)-épicatéchine, toutes deux commerciales a été réalisée dans du DMF anhydre, en présence de bromure de benzyle et de carbonate de potassium. Cette première étape conduit aux dérivés catéchine et épicatéchine tétrabenzylés **1a** et **1b** avec des rendements de 76% et 73% respectivement. Ces composés sont ensuite déprotonés au niveau de l'alcool en position 3 par une base plus forte telle que l'hydrure de sodium avant d'être benzylés à nouveau dans les mêmes conditions. Les (+)-catéchine et (–)-épicatéchine pentabenzylées **2a** et **2b** ont ainsi été obtenues avec des rendements respectifs de 94% et 95% (Schéma 12).

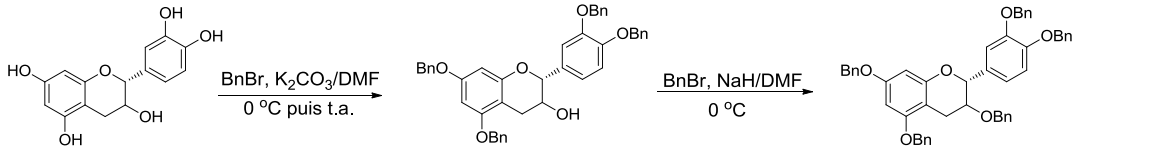


Schéma 12. Protection totale de la (+)-catéchine et de la (–)-épicatéchine par des groupements benzyliques

Une fonction aldéhyde est ensuite introduite par une réaction de substitution électrophile aromatique sur le carbone 8 du cycle A des composés pentabenzylés **2a**-**b**. Cette formylation régiosélective sur le carbone le plus nucléophile, *via* une réaction classique de Vilsmeier-Haack décrite par Boyer et *al.*,[264] est réalisée en présence de $POCl_3$ dans du DMF, et mène aux produits formylés **3a**-**b** avec des rendements respectifs de 81% et 54% (Schéma 13).

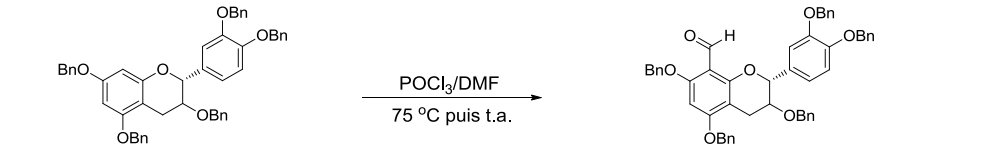
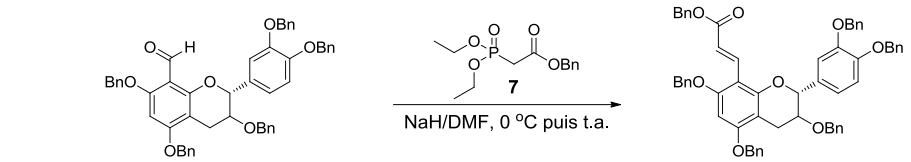


Schéma 13. Formylation régiosélective en position 8 des composés pentabenzylées

A partir de cette fonction aldéhyde, un petit espaceur à deux atomes de carbone est introduit sur ces flavan-3-ols. Cette élongation, repose sur la création d'une double liaison carbone-carbone sur le groupement aldéhyde en position 8 du cycle A. Elle est réalisée *via* une

réaction de condensation de Horner-Wadsworth-Emmons[266] entre les aldéhydes aromatiques **3a-b** préalablement obtenus, et le diéthylphosphonoacétate de benzyle (**7**) en présence d'hydrure de sodium dans du DMF. Les dérivés fonctionnalisés **4a-b** sont obtenus avec des rendements de 79% et 80% respectivement (Schéma 14).[255]

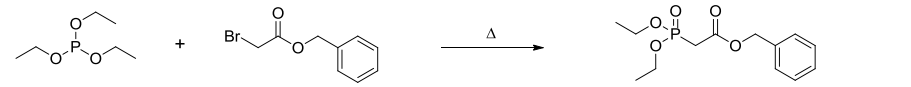


(2*R*,3*S*)-8-formyl-penta-*O*-benzylcatéchine **3a**
(2*R*,3*R*)-8-formyl-penta-*O*-benzylépicatéchine **3b**

(2*R*,3*S*)- **4a** (79%)
(2*R*, 3*R*)- **4b** (80%)

Schéma 14. Réaction de Horner-Wadsworth-Emmons en présence du diéthylphosphonoacétate de benzyle

Pour réaliser cette synthèse, le diéthylphosphonoacétate de benzyle (**7**) non-commercial est synthétisé *via* la réaction d'Arbuzov par distillation de la triéthoxyphosphine en présence de 2-bromocétate de benzyle, selon la procédure décrite par O'Leary et *al.*[267] avec un rendement de 80% (Schéma 15).[255]



triéthyl phosphite — 2-bromocétate de benzyle — diéthylphosphonoacétate de benzyle **7** (80%)

Schéma 15. Synthèse du diéthylphosphonoacétate de benzyle

Une procédure alternative peut-être considérée pour former la double liaison carbone-carbone permettant de s'affranchir à la fois de la synthèse de diéthylphosphonoacétate de benzyle et de l'utilisation d'hydrure de sodium en quantité stoechiométrique. Il s'agit de la réaction de Doebner-Knoevenagel qui est une modification de la condensation de Knoevenagel.[268] Lors de cette réaction, un composé carbonylé réagit avec un équivalent de malonate de monobenzyle (**8**) en présence d'une base faible, généralement la DMAP, utilisée en quantité catalytique. L'intermédiaire formé subit ensuite une décarboxylation permettant l'accès à l'ester (*E*)-α,β-insaturé désiré. Lors de cette synthèse, le composé **8** est facilement préparé par l'action de l'alcool benzylique sur l'acide de Meldrum (2,2-diméthyl-1,3-dioxane-4,6-dione) avec un bon rendement de 85% (Schéma 16).[269]

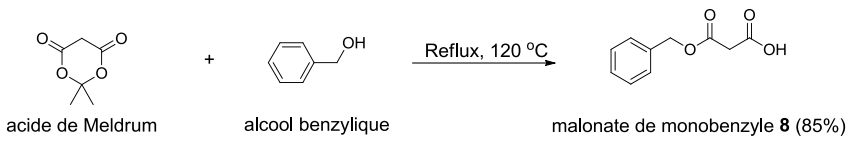


Schéma 16. Synthèse du malonate de monobenzyle

Cette alternative impliquant le malonate de monobenzyle permet d'obtenir les esters (*E*)-α,β-insaturés **4a-b** avec des rendements comparables à la méthode de Horner-Wadsworth-Emmons (Schéma 17). Seule la stéréochimie *E* est obtenue pour chacune des versions. Cette stéréochimie est déduite de la mesure de la constante de couplage des protons vinyliques caractéristique d'une configuration *trans* ($^3J_{trans}$=16.2 Hz).

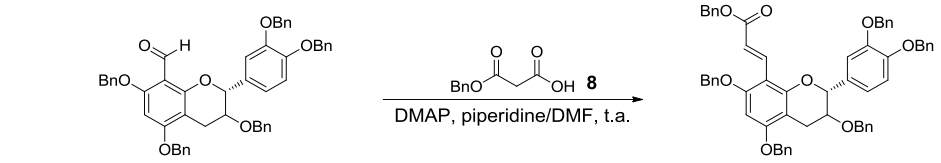


Schéma 17. Réaction de Doebner-Knoevenagel en présence du malonate de monobenzyle

Une fois les produits perbenzylés **4a-b** obtenus, la déprotection des groupements *O*-benzyles et la réduction simultanée de la double liaison de l'espaceur sont effectuées par hydrogénolyse en présence de Pd/C (10% de Pd en masse). Les dérivés fonctionnalisés **5a-b** sont ainsi obtenus avec des rendements quantitatifs. Il est à noter que les manipulations supérieures à 30 °C sur ces produits totalement déprotégés mènent systématiquement à une lactonisation partielle, pouvant compliquer la caractérisation de ces deux acides. Finalement, la lactonisation des composés **5a-b** est effectuée dans du DMF anhydre par l'attaque intramoléculaire du groupement hydroxyle en position 7 sur l'acide activé grâce à l'EDCI•HCl. On notera qu'à l'issue de cette étape, les lactones fraîchement formées sont sensibles aux attaques de nucléophiles comme le MeOH par exemple. De plus, leur solubilité dans l'AcOEt chute dramatiquement une fois que le DMF est complètement évaporé. Les tentatives de purification de ces lactones sur gel de silice conduisent toujours à une perte notable du matériel engagé. La méthode la plus adaptée pour isoler ces produits consiste en une dilution au préalable du mélange réactionnel dans de l'AcOEt avant de faire des lavages à l'aide d'une solution aqueuse saturée de chlorure d'ammonium. Les lactones catéchine et épicatéchine **6a** et **6b** sont alors directement obtenues après évaporation avec de bons rendements, prêtes à être fixées au linker des sondes d'affinité (Schéma 18).

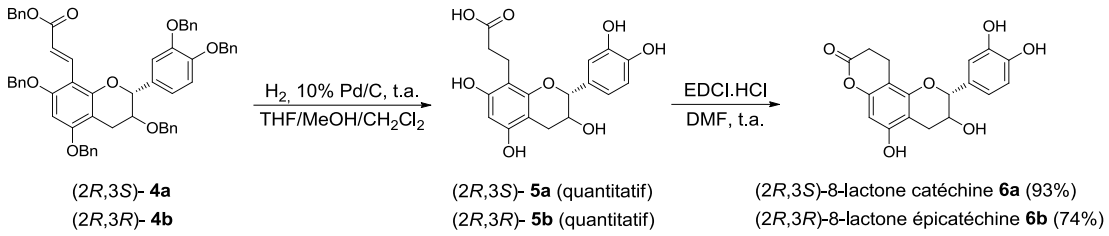


Schéma 18. Synthèse des flavan-3-ols fonctionnalisés *via* une hydrogénolyse sur 10% de Pd/C suivie d'une lactonisation intramoléculaire

1.2.1. Synthèse des sondes photoactivables (sondes A)

Afin de synthétiser ces sondes, la cystéine a été choisie comme élément d'ancrage des trois fonctions constitutives. Cet acide aminé comporte trois groupes fonctionnels: un groupe acide carboxylique permettant la connection à la biotine *via* une chaîne PEG, une fonction thiol permettant de fixer un azoture et une amine primaire capable de réagir avec la lactone catéchine **6a** ou épicatéchine **6b** modifiée. La synthèse envisagée de ce type de sonde est décrite ci-après (Figure 35) :

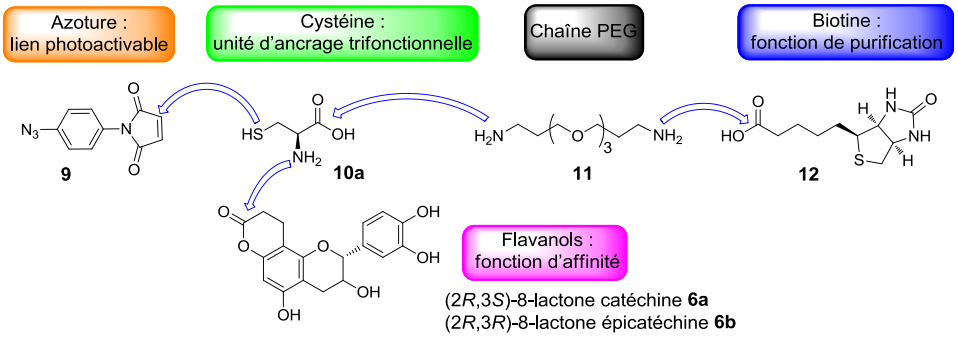


Figure 35. Unités constitutives des sondes A

Ce type de sonde nécessite au préalable la synthèse de la fonction photoactivable. Celle-ci a été réalisée selon une procédure décrite par Rotili et *al.* à partir de la *p*-phénylènediamine commerciale.[167] Une monoprotection de ce composé est tout d'abord réalisée par un groupement *tert*-butoxycarbonyle (Boc),[270] suivie de l'addition de l'anhydride maléique sur l'amine libre du composé préalablement monoprotégé **13**. Le dérivé d'acide maléamique **14** ainsi formé est ensuite engagé dans une cyclodéshydratation pour former le composé **15** avec un très bon rendement. Ce dernier est enfin déprotégé à l'aide de l'acide trifluoroacétique (TFA) suivi d'une diazotation avant l'installation de la fonction azoture *via* une substitution nucléophile aromatique par l'azoture de sodium. Le produit photoactivable attendu **9** est obtenu avec un rendement global de 8% (Schéma 19). Le faible rendement obtenu lors de la dernière étape est probablement lié à une diazotation partielle entraînant des difficultés de purification.

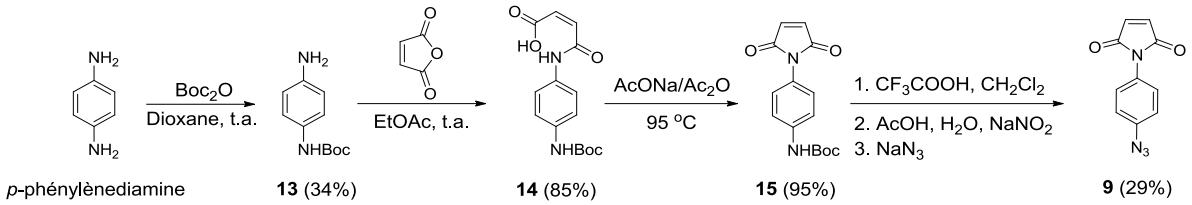


Schéma 19. Synthèse de la fonction photoactivable

La synthèse de la fonction réactive réalisée, l'installation des différentes fonctions de la sonde sur la cystéine (**10a**) nécessite une protection orthogonale de cette dernière. Trois dérivés cystéine peuvent être considérés : la Boc-*S*-benzyl-L-cystéine (**10b**), la Fmoc-*S*-trityl-L-cystéine **(10c)** et un dimère de celle-ci, la di-Boc-L-cystine **(10d)** (Figure 36).

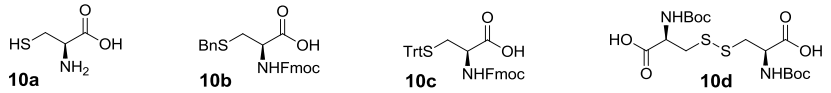


Figure 36. Cystéine (10a) et ses trois dérivés considérés

La synthèse de la sonde impliquant la Boc-*S*-benzyl-L-cystéine (**10b**) n'a pas abouti, la déprotection du groupement benzylique dans les condition de Gowda et *al.*[271] s'étant avérée inefficace malgré plusieurs essais.[255] L'utilisation de la Fmoc-*S*-trityl-L-cystéine (**10c**) nous a apporté des résultats préliminaires encourageants mais n'a pas été développée par la suite.[272] Seules les synthèses impliquant le dérivé cystine (**10d**) utilisée comme unité centrale d'ancrage trifonctionnel ont abouti et sont décrites par la suite.

La cystine est un acide aminé composé de deux acides aminés cystéine liés par un pont disulfure. Cette constitution permet de conserver la protection de la fonction thiol tout au long d'une synthèse symétrique et de cliver le pont disulfure en fin de séquence par simple traitement au DL-dithiothréitol (DTT) avant la fixation à l'azoture **9**.[273] La fonction amine protégée par un groupement Boc est libérée en milieu acide pour permettre sa fixation au polyphénol lactonisé. Cependant, des expériences préliminaires réalisées par le Dr Hélène Carrié au laboratoire ont démontré l'impossibilité d'installer directement la catéchine ou l'épicatéchine modifiée sur le groupement amine régénéré du dérivé cystine **19** déprotégé en raison très probablement de l'encombrement stérique présent en position α de la fonction amine.[255] L'introduction d'un espaceur à 6 atomes de carbone, l'acide 6-(Fmoc-amino)hexanoïque (**16**) a donc été considérée pour favoriser l'attaque de l'amine libre sur les lactones polyphénoliques **6a-b**. L'accès aux sondes A **22a-b**, à partir de la **di-Boc-L-cystine** (**10d**), a été envisagé selon le schéma rétrosynthétique suivant (Schéma 20) :

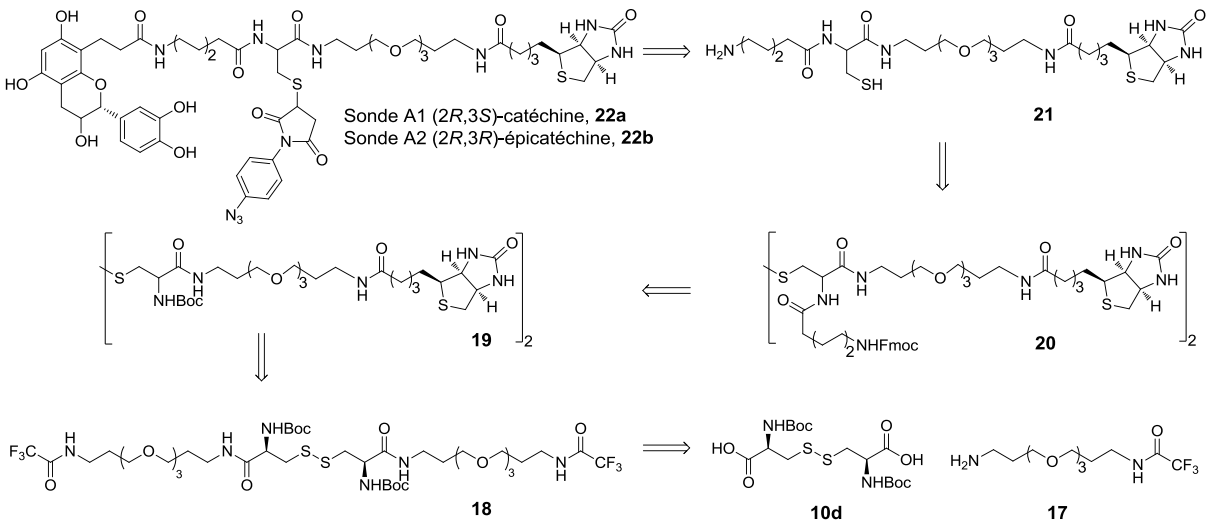


Schéma 20. Rétrosynthèse pour l'accès aux sondes A à partir de la di-Boc-L-cystine (10d)

La synthèse débute par la monoprotection du polyéthylène glycol diaminé commercial **11**, à l'aide d'un groupement trifluoroacétate selon des conditions expérimentales décrites par Fixon-Owoo et *al*. pour la monoprotection d'une chaîne PEG similaire.[274] Cette monoprotection a cependant été réalisée à –65 °C au lieu de –78 °C comme préconisé par Fixon-Owoo et *al*. Cette température permet la complète solubilité de la diamine de départ dans le THF et maintient une certaine sélectivité de la réaction. Cette première étape conduit à un rendement modeste du produit monoprotégé (44%). Trois raisons peuvent être avancées. Tout d'abord, la chimiosélectivité de cette étape est limitée de par la présence de deux fonctions amines équivalentes sur le composé de départ. D'autre part, la purification du composé monoprotégé sur gel de silice est délicate et nécessite la neutralisation préalable de la silice par une solution d'hydroxyde d'ammonium pour assurer la bonne migration de l'amine libre. Enfin, le produit monoprotégé **17** n'est pas stable lorsqu'il est concentré. Il se dégrade partiellement durant les phases d'évaporation des solvants après son extraction. Il est donc préférable de conserver **17** en solution dans le THF. L'étape suivante consiste à opérer un double couplage de **17** sur la di-Boc-**L**-cystine (**10d**) à l'aide des agents de couplage, HBTU et HOBt.[273] Après purification, le produit désiré **18** est isolé avec un rendement de 53%. Les deux fonctions trifluoroacétate du composé **18** sont par la suite déprotégées à l'aide de carbonate de potassium dans le mélange $MeOH/H_2O$ en suivant un protocole décrit par Bergeron et McManis.[275] Les deux fonctions amines primaires libérées au sein du composé **23** obtenu sont ensuite couplées avec la fonction acide de la biotine (**12**) en utilisant du PyBOP comme agent de couplage conduisant au produit **19** avec un bon rendement de 64% (Schéma 21).[276]

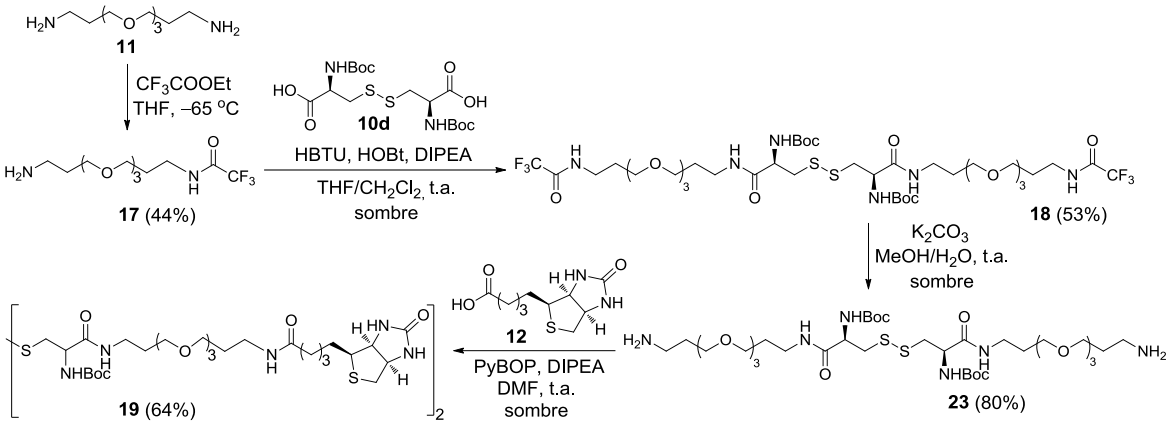


Schéma 21. Synthèse des sondes A à l'aide de la di-Boc-L-cystine

La synthèse se poursuit avec la déprotection des groupements Boc du composé **19** à l'aide de l'acide trifluoroacétique (TFA) dans du CH_2Cl_2. Le couplage des ammoniums obtenus avec l'espaceur **16** ne conduit qu'à des rendements relativement modestes, malgré une activation préalable par de la DIPEA. L'efficacité de ce couplage est grandement amélioré lorsque les ammoniums sont traités avant couplage par une solution basique pour régénérer les formes amine.[273,275] Ce traitement peut être réalisé soit à l'aide de bicarbonate de sodium dans du CH_2Cl_2 ou du MeOH, soit à l'aide de carbonate de potassium dans du MeOH deutéré. Ces dernières conditions ont permis d'obtenir la diamine **24** avec un rendement quasi-quantitatif (Schéma 22).

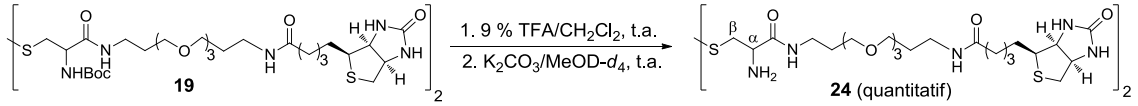


Schéma 22. Déprotection des groupements Boc suivie d'un traitement en milieu basique

L'acide 6-(Fmoc-amino)hexanoïque (**16**) est couplé efficacement à la diamine **24** à l'aide de l'HBTU/DIPEA dans du DMF, pour former le produit **20** avec un rendement de 67%.[277] On notera que ce produit **20** est difficile à purifier. Il comporte à la fois des groupements hydrophiles et hydrophobes qui conduisent à des difficultés de solubilité dans les solvants usuels. La déprotection subséquente des groupements Fmoc du composé **20** est par la suite réalisée dans du DMF à l'aide d'une quantité modérée de pipéridine (Schéma 23).

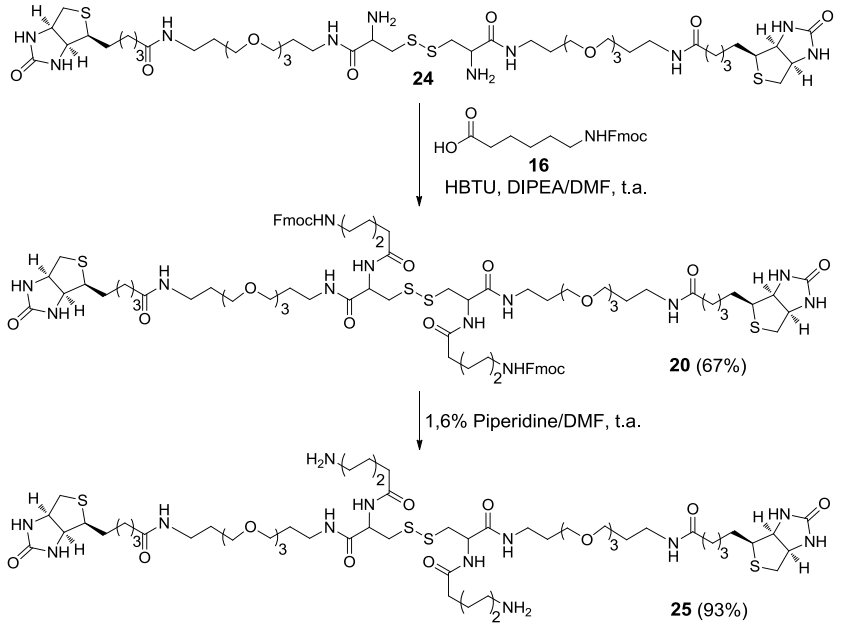


Schéma 23. Introduction de l'espaceur 16 suivie d'une déprotection des groupements Fmoc

Sur la diamine **25** générée, une tentative de couplage avec la lactone catéchine **6a** dans du DMF anhydre a été réalisée, tout d'abord à 40 °C puis à 50 °C et finalement à l'aide de plusieurs cycles d'activation par µ-ondes à 50-100 W à 50 °C. Aucun couplage n'a cependant été observé (Schéma 24).

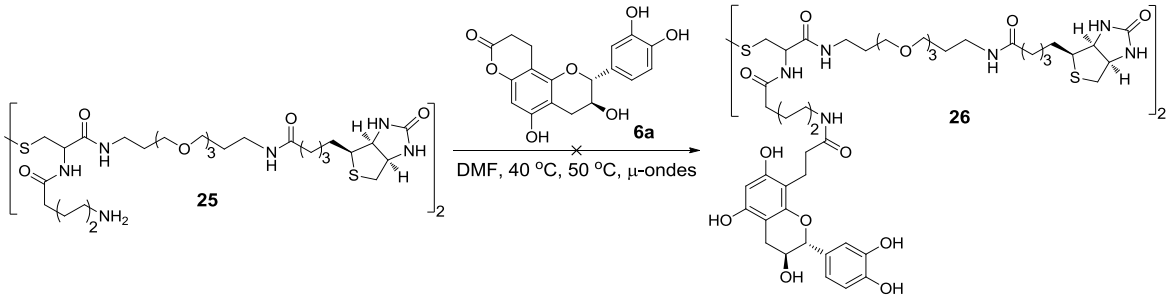


Schéma 24. Tentative de double couplage de la diamine 25 avec la lactone catéchine 6a

Ce manque de réactivité peut être attribué à une trop faible réactivité des fonctions amines. Un repliement intramoléculaire, stabilisé par des liaisons hydrogène et des interactions non covalentes des différentes chaînes du composé **25**, pourrait être à l'origine de l'absence de réactivité observée.

Une étape préalable de clivage du pont disulfure en milieu réducteur du composé **25** a donc été envisagée à l'aide de DTT et de triéthylamine pour séparer les deux parties symétriques de la molécule et limiter les phénomènes de repliment.[273] Cependant, afin d'éviter le risque de reformation du pont disulfure, le thiol obtenu **21** n'est pas isolé. Après simple évaporation des solvants et volatiles, il est directement mis à réagir avec la lactone catéchine **6a** dans du DMF

anhydre. Après confirmation de la disparition complète de la lactone **6a** et du composé **21** par suivi CCM, la fonction réactive **9** est immédiatement introduite dans le milieu pour établir en suivant une addition de Michaël avec la fonction thiol libre.[167] La sonde photoactivable catéchine **22a** appelée sonde A1, a ainsi été obtenue avec un rendement global sur ces trois dernières étapes de 34% (Schéma 25).

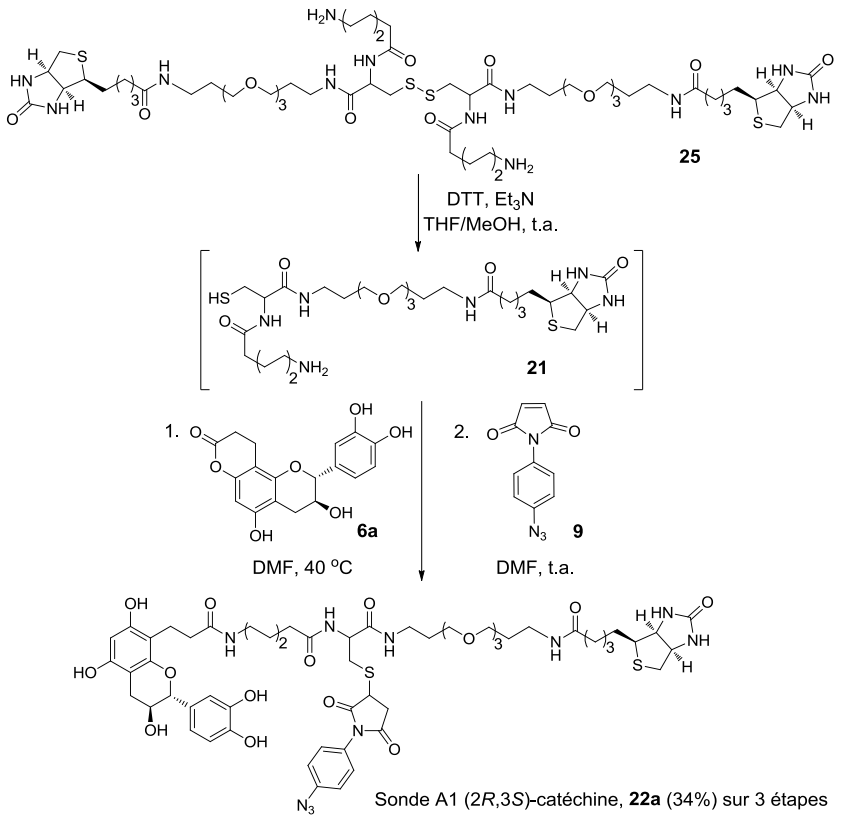


Schéma 25. Dernières étapes de la synthèse de la sonde photoactivable catéchine A1 (22a)

La sonde version épicatéchine **22b** a été préparée selon la même séquence réactionnelle. La lactone épicatéchine **6b** a tout d'abord été installée sur l'amine du composé **21** préalablement obtenu par traitement réducteur. A l'issue de cette étape, l'addition de la fonction réactive **9** n'a pas permis d'obtenir le produit de couplage attendu. Une oxydation concomitante de la fonction thiol au cours de cette étape a conduit majoritairement au produit disulfuré **27**. Un nouveau traitement réducteur a donc été effectué dans du DMF pour régénérer le thiol, suivi d'un rajout de la fonction réactive **9**. Dans ces conditions et après purification sur silice, la sonde photoactivable épicatéchine **22b**, appelée sonde A2, est récupérée avec un rendement global de 12%. Les spectres RMN du proton et du carbone ont cependant montré la présence d'une petite quantité d'impureté inséparable. Une purification supplémentaire par HPLC semi-préparative en phase inverse ($MeOH/H_2O$/0.1% HCOOH) a permis d'éliminer l'impureté mais la sonde n'est pas restée stable au cours de cette purification (Schéma 26).

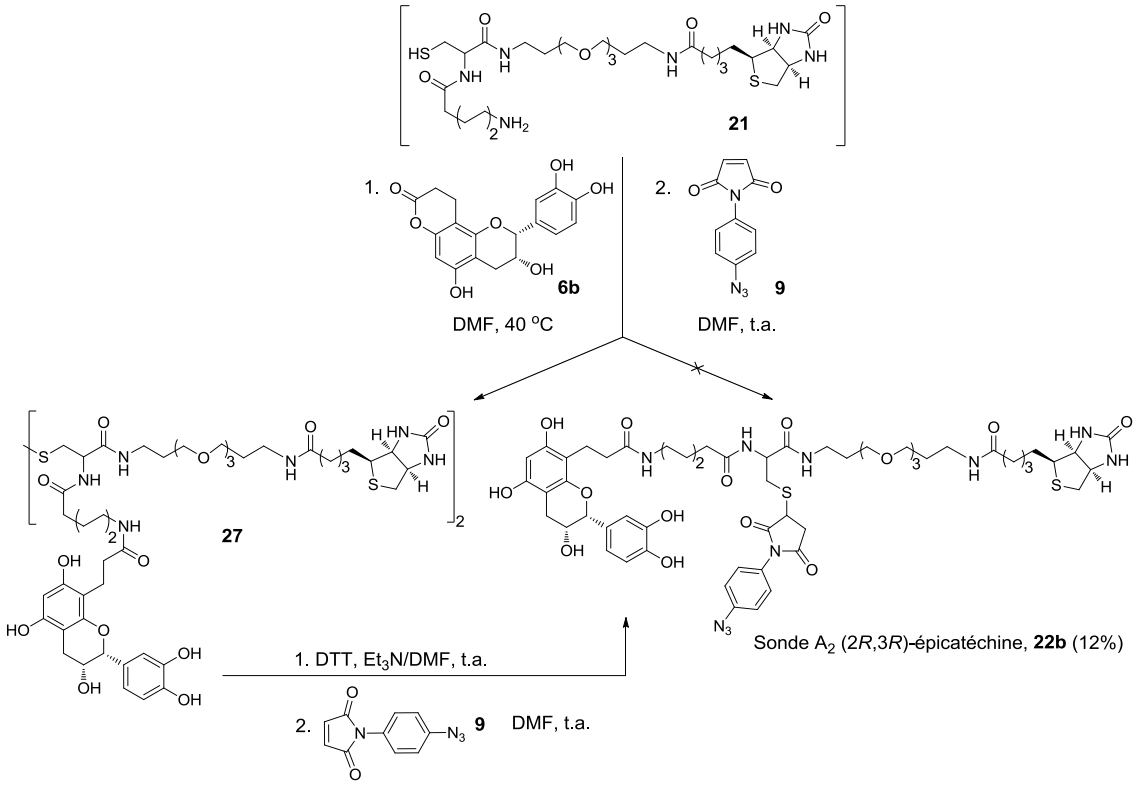


Schéma 26. Dernières étapes de la synthèse de la sonde photoactivable épicatéchine A2 (22b)

La synthèse des sondes A réalisée, la réactivité du groupement azoture sous irradiation a été évaluée. Seule la sonde A1 version catéchine **22a** a été utilisée dans cette étude.

L'identification du maximum d'absorption de la sonde A1 a été réalisée par le Dr Hélène Carrié.[255] Le spectre d'absorption d'une solution de sonde A1 dans de l'éthanol révèle un maximum d'absorption à 266 nm. En accord avec ce résultat, une irradiation à 312 nm à l'aide d'une lampe à filtre de type photolyse a été privilégiée pour préserver l'intégrité du matériel protéique sensible à des longueurs d'onde plus faibles (e.i., 254 nm). L'irradiation de la sonde A1 dans ces conditions a montré qu'une exposition d'une dizaine de minutes suffit pour activer la fonction réactive de façon efficace (Figure 37).

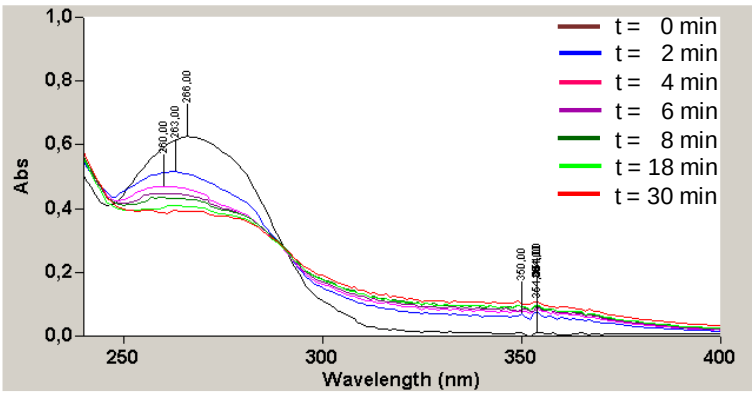


Figure 37. Suivi de l'absorbance UV de la sonde A1 sous irradiation à 312 nm

1.2.2. Synthèse des sondes activables par oxydation chimique (sondes B)

Les sondes activables par oxydation chimique, appelées sondes B, comportent un flavanol jouant à la fois le rôle de fonction réactive et d'affinité, connecté à une chaîne PEG elle-même liée à une biotine, utilisée comme fonction de purification (Figure 38).

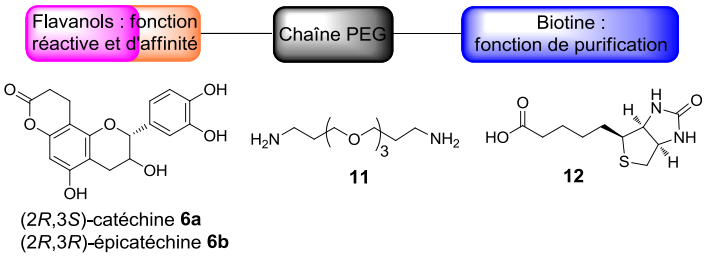


Figure 38. Structure des sondes activables par oxydation chimique (sondes B)

La synthèse de ces sondes est réalisée à travers une succession de couplages impliquant les trois blocs moléculaires à assembler selon le schéma décrit ci-après (Schéma 27) :

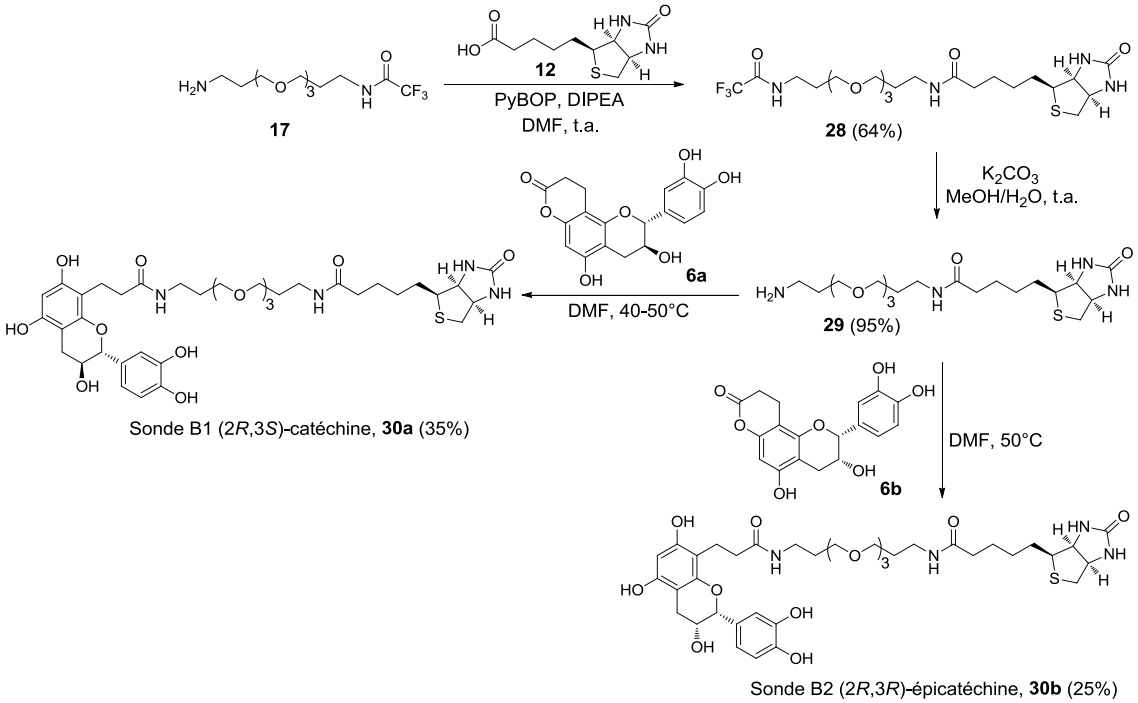


Schéma 27. Synthèse des sondes activables par oxydation chimique (sondes B)

La chaîne PEG monoprotégée **17** est tout d'abord couplée dans du DMF anhydre à la biotine (**12**) préalablement activée à l'aide de PyBOP et en présence de la DIPEA.[274,276] Le groupement protecteur trifluoroacétamide de la chaîne PEG biotinylée résultante **28** est par la suite déprotégé à l'aide de carbonate de potassium dans un mélange MeOH/H_2O, permettant de libérer l'amine primaire du composé **29** avec un bon rendement de 95% après purification sur

silice.[275] Enfin, la catéchine et l'épicatéchine sont couplées au produit **29** par une simple attaque nucléophile de la fonction amine sur la fonction lactone des polyphénols modifiés **6a** et **6b**. Les sondes B1 incluant la catéchine (**30a**) et B2 incluant l'épicatéchine (**30b**) ont été obtenues avec un rendement respectif de 35% et de 25%.

2. Evaluation de l'efficacité de capture des sondes A et B

Disposant des deux types de sondes, l'aptitude à capturer une protéine par ces sondes a été évaluée. Cette étude a été menée à l'aide d'une protéine modèle : la LDOX. Cette enzyme intervenant dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes est produite au laboratoire et a déjà été utilisée par notre équipe pour valider des outils de protéomique chimique.[150] Lors de ces études, une interaction spécifique pour la catéchine et l'épicatéchine ainsi que pour leurs versions modifiées au niveau du carbone 8 de leur cycle A, a été démontrée.[99]

La compatibilité de cette enzyme avec les conditions d'irradiation des sondes A a été étudiée. Pour ce faire, une solution de LDOX a été irradiée sous 312 nm pour vérifier la stabilité de cette protéine. L'analyse sur gel d'électrophorèse des échantillons issus de l'irradiation sous 312 nm a révélé une légère dégradation de la LDOX au-delà de 5 minutes d'irradiation et de plus de la moitié de celle-ci après une demi-heure. Le temps d'irradiation maximum de la LDOX sans dégradation excessive a été évalué entre 15 et 20 minutes.

2.1. Protocole de capture et résultats

Une série de tests de capture de la LDOX par les sondes A1 et B a été menée selon un protocole de capture inspiré de protocoles décrits dans la littérature relatifs à une activation des sondes photochimiques (sonde A)[167,176,181] ou par oxydation (sondes B).[168,248] De plus, des contrôles négatifs ont été réalisés en présence d'ascorbate de sodium pour limiter l'oxydation de la catéchine et de l'épicatéchine par de l'oxygène résiduel. Des études menées par Chen et *al*. ont montré que l'ajout d'acide ascorbique dans des solutions de catéchines issues du thé vert permettait d'augmenter la stabilité de ces dernières vis-à-vis de l'oxydation.[278] A partir de ces essais, un protocole efficace de capture a été mis au point. Il est schématisé ci-après (Figure 39) :

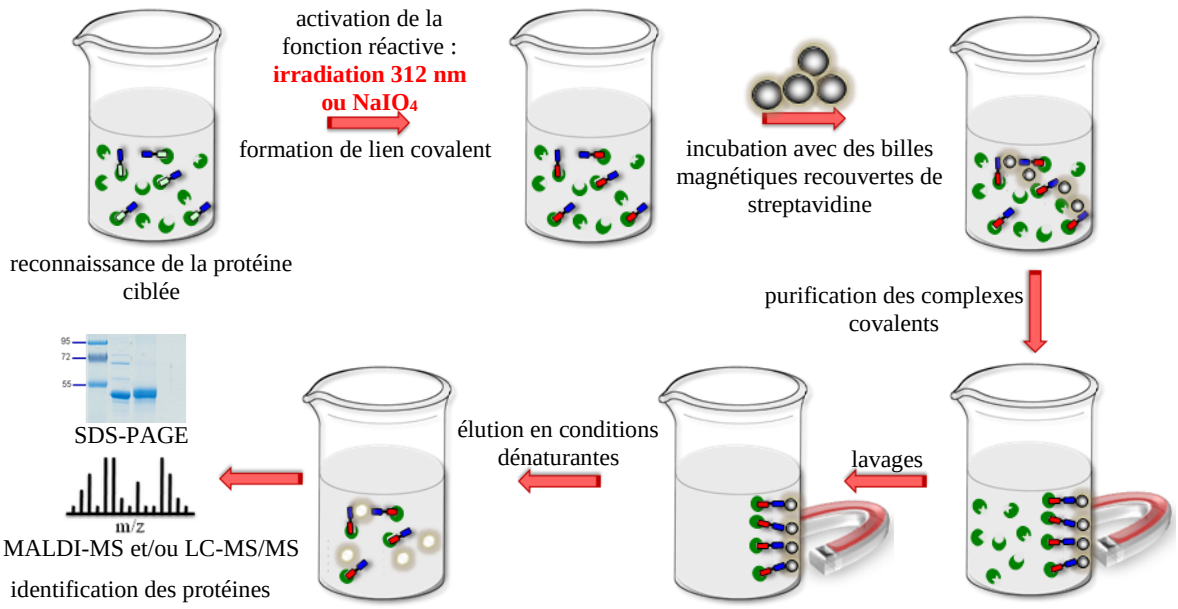


Figure 39. Mise au point du protocole de capture par les sondes

Pour chaque capture, une dizaine de µg de LDOX sont incubés en présence de 1,8 éq de sonde dans un tampon phosphate (pH 7,0) contenant 0,5 mM de DTT et 0,05 % d'octyl-β-D-glucopyranoside (appelé tampon de capture). Pour les témoins négatifs (LDOX + sondes sans activation), une solution d'ascorbate de sodium (Na Asc) est ajoutée permettant de stabiliser les flavanols. Après 3 heures d'incubation, la sonde A1 est activée sous irradiation à 312 nm à 0 °C durant 20 minutes tandis que les sondes B sont activées par l'ajout d'une solution de $NaIO_4$ à une concentration finale de 5 mM. Dans le cas des sondes B, l'arrêt de l'oxydation est réalisé au bout de 20 minutes par l'addition d'une solution de DTT à une concentration finale de 50 mM. Les complexes covalents formés selon les deux stratégies sont ensuite capturés sur billes magnétiques recouvertes de streptavidine. Différents lavages sont alors réalisés afin d'éliminer les protéines retenues de façon non covalente. Une dernière étape d'élution en conditions dénaturantes (tampon Laemmli, 95 °C) permet de décrocher les complexes des billes magnétiques puis un tiers de la solution (10 µL) est déposée sur gel d'électrophorèse (Figure 40). La formation du lien covalent entre la sonde et la protéine cible a été mise en évidence par Western blot, visualisé par le complexe anticorps anti-biotine-souris/anticorps anti-souris-HRP permettant de révéler uniquement les protéines biotinylées par les sondes.

Les résultats obtenus démontrent l'efficacité de captures et valident les contrôles négatifs (Figure 40). Pour les témoins négatifs : la LDOX n'est pas retenue en l'absence de sondes (pistes 1 et 5) ou en présence de sondes mais en l'absence d'activation par $NaIO_4$ ou irradiation sous UV (pistes 2 et 6).

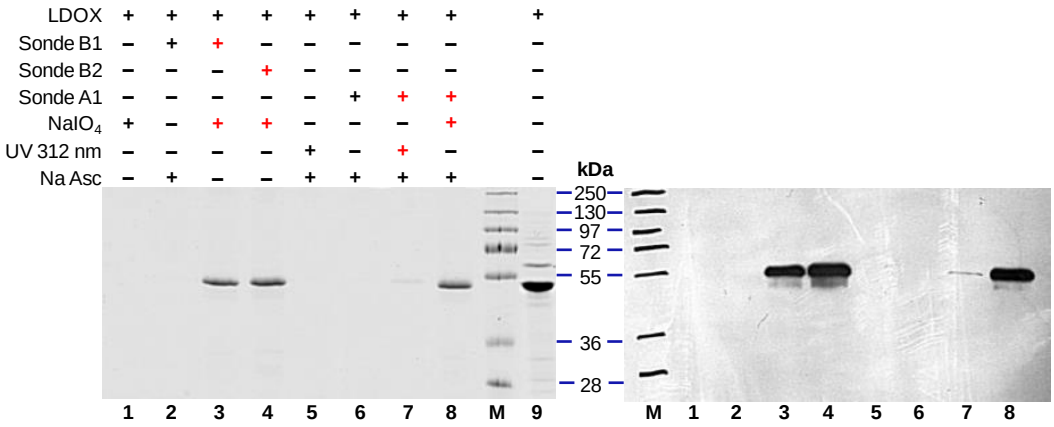


Figure 40. Visualisation de la capture de la LDOX par les sondes A et B sur gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coommassie® (à gauche) et sur membrane de Western Blot (à droite)

1 : LDOX + $NaIO_4$; 2 : LDOX + sonde B1 + Na Asc ; 3 : LDOX + sonde B1 + $NaIO_4$; 4 : LDOX + sonde B2 + $NaIO_4$; 5 : LDOX + UV + Na Asc ; 6 : LDOX + sonde A1 + Na Asc ; 7 : LDOX + sonde A1 + Na Asc + UV ; 8 : LDOX + sonde A1 + Na Asc + $NaIO_4$; M : Marqueurs de tailles; 9 : LDOX partiellement purifiée.

Pour les tests de capture : la LDOX est retenue de façon significative et identique dans toutes les captures en conditions oxydantes, quelle que soit la sonde engagée (type A ou B, pistes 3, 4 et 8). En revanche, la quantité de LDOX capturée par la sonde A1 à l'aide de l'azoture sous irradiation est nettement inférieure à celle obtenue par les sondes en conditions oxydantes (piste 7). On notera que la faible efficacité de capture observée pour la sonde A1 n'est pas liée à un encombrement stérique occasionné par la présence du groupe azoture additionnel et qui aurait pu limiter l'étape d'affinité (pistes 7 et 8). De plus, une analyse par Western blot de ces mêmes échantillons a permis de confirmer le lien covalent établi entre les différentes sondes et la protéine (pistes 3, 4, 7 et 8, Figure 40). Ce lient covalent peut également être démontrée par spectrométrie de masse et plus particulièrement par une analyse MALDI-TOF. Par exemple, le complexe sonde B1-LDOX obtenu dans le cas de la sonde B1 et de la LDOX donne naissance à un nouveau signal différent de celui de la LDOX. Ce signal présente un incrément de masse de 812 Da, proche des 806 Da attendus, et correspond à la présence de la sonde sur la LDOX (Figure 41). Cette légère différence entre la masse obtenue et théorique pour la sonde est due aux erreurs de mesure liées à la technologie.

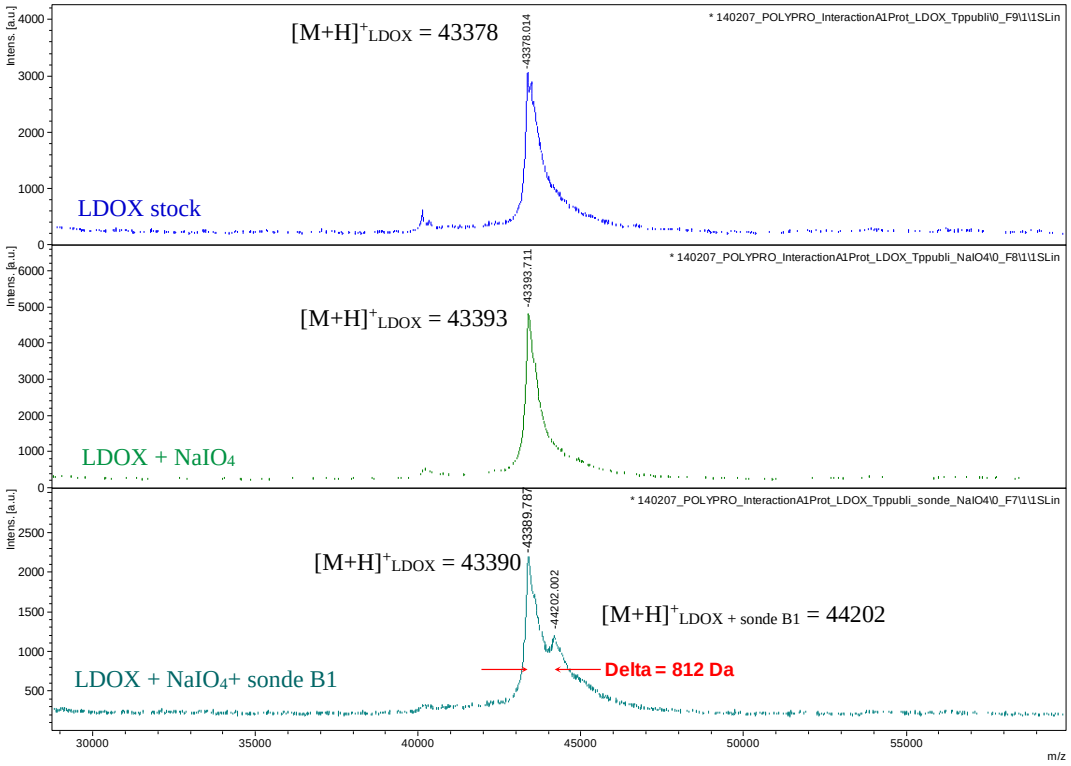


Figure 41. Mise en évidence par MALDI-TOF de la fixation de la sonde B1 sur la LDOX

L'intensité des spots présents sur le gel SDS-PAGE de la figure 40 étant proportionnelle à la quantité de protéine, la mesure des aires relatives aux intensité des spots à l'aide du logiciel ImageJ, permet de quantifier la différence relative de capture entre une activation par oxydation et une activation par UV : la capture par voie oxydante apparaît comme étant 30 fois supérieure à la capture par voie d'irradiation (Figure 42).

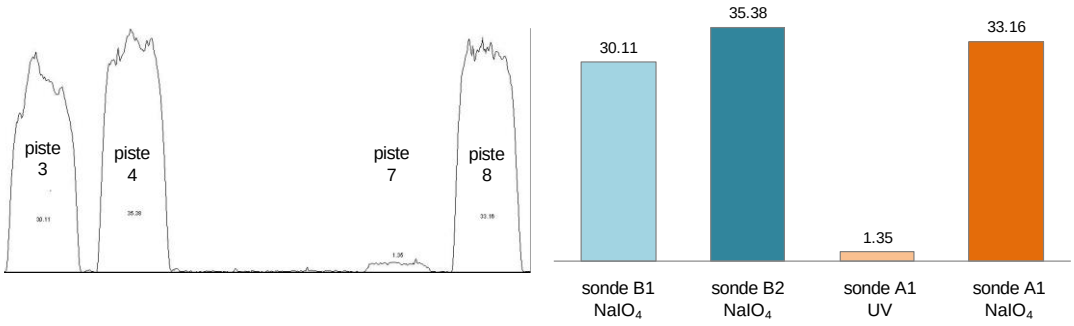


Figure 42. Comparaison relative de capture de la LDOX par les sondes en conditions oxydantes et sous irradiation

Il est également possible de quantifier le taux de capture de la LDOX par la sonde B1 en conditions oxydantes à partir d'une gamme de concentration de LDOX établie sur gel SDS-PAGE. Pour cela, différentes quantités connues de LDOX sont déposées sur un gel d'électrophorèse. L'intensité des taches exprimée en Unités arbitraires (aU), après migration et

coloration, est mesurée à l'aide du logiciel ImageJ. A partir de ces données, une droite d'étalonnage obtenue par régression linéaire, a été établie et permet d'estimer la quantité de LDOX en fonction de l'intensité de la tache obtenue sur le gel (Figure 43).

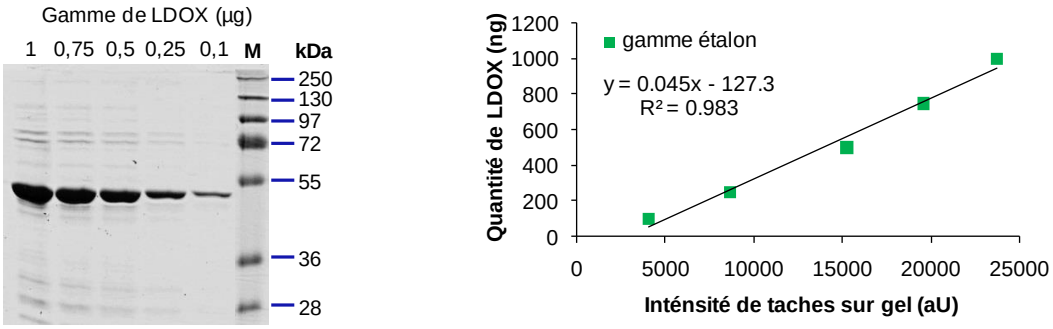


Figure 43. Gamme de concentration de la LDOX sur gel SDS-PAGE et la droite de régression établie à l'aide du logiciel ImageJ

Le taux de capture de la LDOX par la sonde B1 en conditions oxydantes a ainsi été estimé à 8%.

Les sondes activées par oxydation se sont donc révélées plus efficaces pour capturer la LDOX que la sonde photoactivable dans les conditions expérimentales utilisées. Ce constat doit cependant être relativisé. Une seule fonction photoréactive a été testée, d'autres motifs comme par exemple une diazirine aurait pu donner de meilleurs résultats. De plus, les conditions expérimentales de photolyse n'ont pas été optimisées. Quoiqu'il en soit, les résultats très prometteurs obtenus avec les sondes de type B nous ont conduit à privilégier par la suite le développement de ce type de sonde.

2.2. Optimisation du taux de capture des sondes de type B

Dans le but d'améliorer le taux de capture des sondes B, l'influence des durées d'incubation et d'activation mais également la nature de l'agent d'oxydation ont été étudiées sur la sonde B1.

2.2.1. Durée d'incubation

Les premiers essais ont eu pour but d'évaluer d'une part la durée d'incubation conduisant au meilleur taux de capture et d'autre part d'estimer l'importance de l'oxydation des sondes par l'oxygène résiduel en l'absence de $NaIO_4$. Pour cela, la sonde B1 (1,8 éq) a été mise en solution avec la LDOX partiellement purifiée (1 éq) dans 100 µL de tampon de capture. L'incubation a été réalisée avec une légère agitation durant 30, 60, 120 et 180 minutes. A l'issue de cette incubation de durée variable, une activation à l'aide de $NaIO_4$ a été appliquée pendant 15

minutes (pistes b, Figure 44). Pour évaluer l'autooxydation potentielle de la sonde, l'expérience de capture est réalisée en l'absence de $NaIO_4$ et d'ascorbate de sodium (pistes a). Les étapes d'enrichissement et d'élution sont identiques à celles décrites précédemment. L'analyse par gel d'électrophorèse coloré au bleu de Coomassie ne révèle aucune LDOX capturée en l'absence d'une activation adéquate même pour de longues incubations réalisées sans ajout d'ascorbate de sodium (pistes a). Une incubation de 30 minutes suivie de l'activation par $NaIO_4$ est suffisamment efficace pour établir un lien covalent entre la sonde et la LDOX (piste 1b). Il semble que des temps d'incubation plus longs n'apportent pas d'amélioration au niveau du taux de capture (pistes 2b, 3b et 4b, Figure 44).

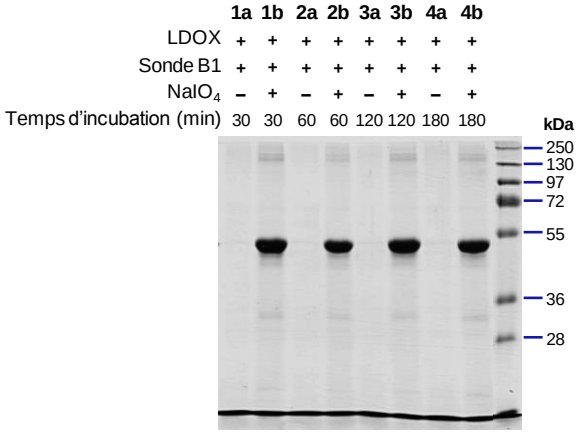
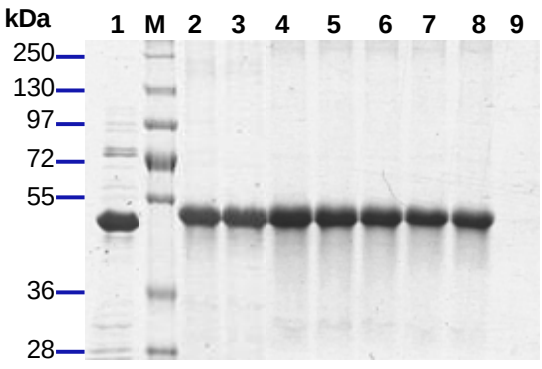


Figure 44. Evaluation du temps d'incubation et de l'oxydation résiduelle sur l'efficacité de capture par la sonde B1

2.2.2. Durée d'activation au $NaIO_4$

Par la suite la durée d'activation au $NaIO_4$ de la sonde B1 a également été étudiée. Cette série d'expériences a été réalisée en présence de LDOX dans des conditions expérimentales identiques à celles décrites précédemment. L'arrêt de l'oxydation par l'ajout d'une solution de DTT a été réalisé au bout de 1, 2, 5, 15, 20, 30 et 60 minutes. Un témoin négatif de capture sans $NaIO_4$ a également été désactivé dans les mêmes conditions au bout de 60 minutes (Figure 45).



Piste 1 : LDOX partiellement purifiée
Piste M : Marqueurs de taille
Piste 2 : LDOX + $NaIO_4$ + sonde B1 : 1 min d'oxydation
Piste 3 : LDOX + $NaIO_4$ + sonde B1 : 2 min d'oxydation
Piste 4 : LDOX + $NaIO_4$ + sonde B1 : 5 min d'oxydation
Piste 5 : LDOX + $NaIO_4$ + sonde B1 : 15 min d'oxydation
Piste 6 : LDOX + $NaIO_4$ + sonde B1 : 20 min d'oxydation
Piste 7 : LDOX + $NaIO_4$ + sonde B1 : 30 min d'oxydation
Piste 8 : LDOX + $NaIO_4$ + sonde B1 : 60 min d'oxydation
Piste 9 : LDOX + sonde B1 : 60 min

Figure 45. Influence du temps d'oxydation sur la capture de la LDOX par la sonde B1

L'analyse des complexes décrochés des billes sur gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (Figure 45) montre une capture efficace dès les premières minutes d'activation de la sonde (pistes 2, 3 et 4). De plus, il n'y a pas de différences significatives en fonction du temps d'activation (pistes 2 à 9). En revanche, la LDOX n'est pas capturée en l'absence de $NaIO_4$ (piste 10). Une activation au $NaIO_4$ d'une durée de 5-15 minutes a donc été privilégiée dans la suite de cette étude sans nécessité de durées d'oxydation plus longues susceptibles de dégrader ou de modifier un matériel biologique. On notera que la formation du sulfoxyde de biotine en conditions oxydantes ne diminue que très peu l'affinité de sonde pour le support (strept)avidine.[279–281]

De ces deux dernières études il ressort qu'une durée de 30 minutes pour l'étape d'incubation et de 15 minutes pour l'étape d'activation sont suffisantes pour assurer une capture maximale de la protéine ciblée. De ces différents essais, un taux de capture moyen de 13% a été déterminé. Ce taux de capture bien que modeste est largement suffisant pour disposer d'une quantité protéique suffisante pour assurer une analyse protéomique.

2.2.3. Influence de la nature de l'oxydant et du nombre d'équivalent de sonde

L'influence de la nature de l'oxydant et le nombre d'équivalent de sonde ont également été évalués. Pour ces nouvelles expériences de capture, $K_3Fe(CN)_6$ dans des conditions décrites par Francis et *al.*[250] est comparé à une activation au $NaIO_4$ en faisant varier dans les deux cas le nombre d'équivalents de la sonde B1. L'analyse des adduits formés a été réalisée par spectrométrie de masse MALDI.

Dans chacun des tests effectués, 1 éq de LDOX est mis à incuber en présence de 2, 5, 7,5 ou 10 équivalents de sonde B1 pendant 30 minutes. Passé ce temps, l'activation de la sonde est réalisée soit par une solution de $NaIO_4$ (50 équivalents par rapport à la sonde) soit par une solution de $K_3Fe(CN)_6$ (10 équivalents par rapport à la sonde). L'activation par $NaIO_4$ est arrêtée au bout de 5 minutes à l'aide de DTT, tandis que l'activation par $K_3Fe(CN)_6$ est stoppée au bout de 30 minutes à l'aide d'une solution de TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride). En parallèle, des contrôles sans sonde (en présence d'une quantité maximale d'oxydant) ou sans oxydant (en présence de 10 équivalents de sonde) sont également réalisés rigoureusement dans les mêmes conditions. Les mélanges réactionnels ainsi obtenus sont ensuite dilués avec une solution 0.1% TFA/50% CH_3CN/H_2O, mélangés avec une matrice d'acide sinapinique et déposés sur la cible de MALDI. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant (Tableau 2) :

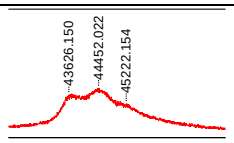
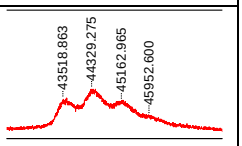
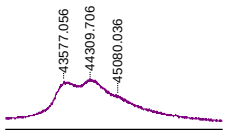
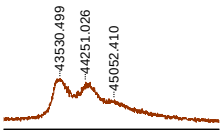
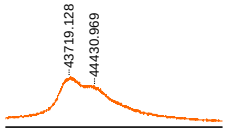
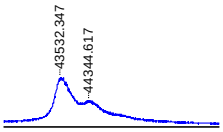
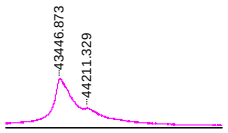
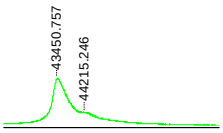
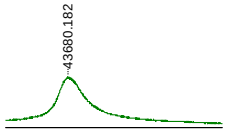
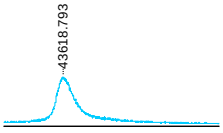
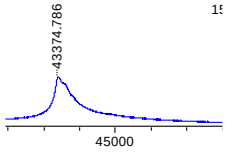
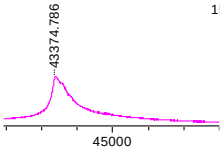
	A	B	C
	Conditions	LDOX ([M+H]$^+$ ~43,4 kDa) sonde B1 activée par 50 éq. de $NaIO_4$	LDOX ([M+H]$^+$ ~43,4 kDa) sonde B1 activée par 10 éq. de $K_3Fe(CN)_6$
1	10 éq. de sonde B1		
2	7,5 éq. de sonde B1		
3	5 éq. de sonde B1		
4	2 éq. de sonde B1		
5	50 éq. de $NaIO_4$ ou 10 éq. de $K_3Fe(CN)_6$ sans sonde		
6	10 éq. de sonde B1 sans oxydant		

Tableau 2. Mise en évidence par MALDI-TOF de la fixation de la sonde B1 sur la LDOX en présence de $NaIO_4$ et $K_3Fe(CN)_6$ comme agent d'oxydation

Tout d'abord, les contrôles négatifs dans lesquels l'oxydant ou la sonde n'a pas été ajouté sont validés (lignes 5 et 6). Ni épaulement, ni élargissement n'est observé quel que soit l'agent d'oxydation utilisé. En présence d'oxydant et de la sonde B1, de nouveaux pics individualisés sont observés dès que 2 équivalents de sonde B1 sont utilisés. Les différences observées sont en cohérence avec l'incrément de masse lié à la sonde B1. Les pics supplémentaires qui correspondent aux différents adduits sont en augmentation en fonction du nombre d'équivalent de sonde utilisé et ce pour les deux oxydants utilisés (lignes 1, 2, 3 et 4, colonnes B et C). Il semble cependant qu'en présence d'un excès de sonde, $K_3Fe(CN)_6$ favorise davantage la formation de différents adduits par rapport à $NaIO_4$ (lignes 1 et 2, colonnes B et C).

L'activation par le ferricyanure de potassium étant opérationnelle et comparable à celle réalisée en présence de $NaIO_4$, l'influence du temps d'oxydation de $K_3Fe(CN)_6$ a été étudiée. Cette étude n'a été réalisée qu'en présence de 7,5 et 10 équivalents de sonde. Pour cela, une

solution de TCEP est ajoutée pour arrêter l'oxydation au bout de 5, 10, 15, 20 et 25 minutes, les autres facteurs restant identiques (Tableau 3).

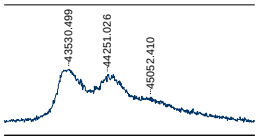
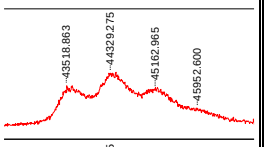
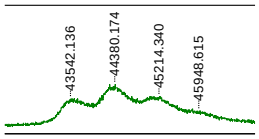
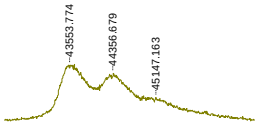
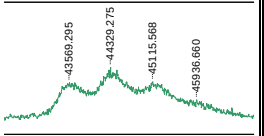
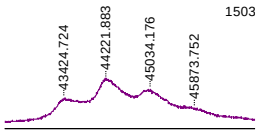
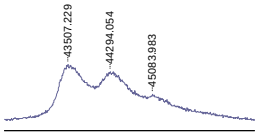
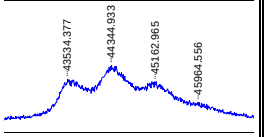
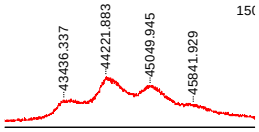
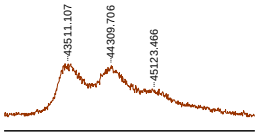
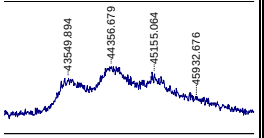
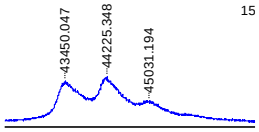
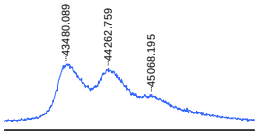
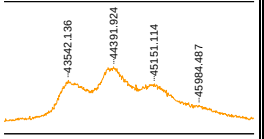
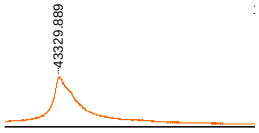
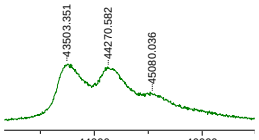
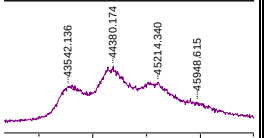
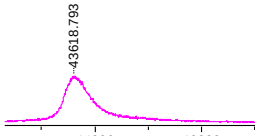
	A	B	C	D	E
	Temps d'activation par $K_3Fe(CN)_6$	LDOX ($[M+H]^+$=43,4 kDa) + 7,5 éq. de sonde B1	LDOX ($[M+H]^+$=43,4 kDa) + 10 éq. de sonde B1	Nombre d'éq de $K_3Fe(CN)_6$ utilisé (par rapport à la sonde)	LDOX ($[M+H]^+$=43,4 kDa) + 10 éq. de sonde B1
1	30 minutes			10 éq.	
2	25 minutes			7,5 éq.	
3	20 minutes			5 éq.	
4	15 minutes			2,5 éq.	
5	10 minutes			LDOX + 10 éq. de sonde B1	
6	5 minutes			LDOX + 10 éq. de $K_3Fe(CN)_6$	

Tableau 3. Optimisation du temps d'activation et de la quantité de ferricyanure de potassium

Les analyses par MALDI n'indiquent pas de différences notables quel que soit le temps d'oxydation. Les adduits sont en effet formés au bout de 5 minutes d'incubation avec l'oxydant et n'évoluent plus (colonnes B et C, Tableau 3). On constate cependant que le nombre de polyadduits formés augmente avec le nombre d'équivalent de la sonde B1. Une activation de 5 minutes à l'aide de $K_3Fe(CN)_6$ semble donc suffisante et la présence de 10 équivalents de sonde permet de bien visualiser la formation de tous les adduits.

Ces conditions optimisées sont alors appliquées pour étudier l'influence du nombre d'équivalents de $K_3Fe(CN)_6$ en présence de 10 équivalents de sonde. En présence de 2,5 équivalents de ferricyanure, le monoadduit est préférentiellement observé et la moitié de la

LDOX est convertie (ligne 4, colonne E, Tableau 3). En présence de 5 équivalents et plus de ferricyanure, l'intensité du pic de la LDOX diminue et les pics correspondants aux mono et diadduit accompagné d'un épaulement correspondant au triadduit augmentent ; le pic du monoadduit reste le plus important et il n'y pas de différence marquante entre ces différentes quantités de ferricyanure (lignes 1, 2 et 3, colonne E, Tableau 3). La formation de monoadduit sonde-LDOX est quant à elle privilégiée lorsque 5 à 7,5 éq. de sondes sont activées par 2,5 éq. de $K_3Fe(CN)_6$.

En conclusion, ces analyses par MALDI-TOF permettent de confirmer la fixation de la sonde B1 sur la LDOX à l'aide de $NaIO_4$ mais également à l'aide de $K_3Fe(CN)_6$ comme alternative.

3. Etude de la sélectivité de la sonde B1

L'efficacité de capture étant démontré, l'étude suivante a consisté à vérifier la sélectivité de la sonde en présence de protéines de nature différentes.

3.1. Capture de la LDOX en compétition avec la BSA

Pour cette étude, l'albumine de sérum bovin (BSA), a été choisie. Cette protéine ne présente pas d'affinité particulière pour les flavanols et elle est couramment utilisée comme témoin négatif lors d'études d'interactions protéine/protéine ou protéine/petite molécule.[242,282] Les sondes catéchine B1 et épicatéchine B2 ont été mises en jeu. Un mélange LDOX/BSA a été mis en compétition en présence de la sonde B1 ou B2 dans le rapport suivant : BSA : 1 / LDOX : 1 / sonde : 1,8. En parallèle, des captures similaires ont également été réalisées sur la LDOX seule (avec les sondes B1 et B2) et sur la BSA seule (avec sonde B1) pour comparaison. Après une incubation de 30 minutes dans 100 µL de tampon de capture suivie de l'activation par $NaIO_4$ et de l'enrichissement sur billes, les complexes formés ont été élués et analysés par gel SDS-PAGE (Figure 46). En l'absence de compétition, la LDOX ou la BSA sont capturées par la sonde B1 (pistes 2 et 7). En revanche, dans un mélange LDOX-BSA, les sondes B1 et B2 capturent de façon majoritaire la LDOX, protéine pour laquelle une affinité importante des sondes est attendue. La quantité de LDOX capturée dans ce cas semble identique à celle obtenue en l'absence de BSA (comparaison des pistes 4 et 8, 5 et 9, Figure 46).

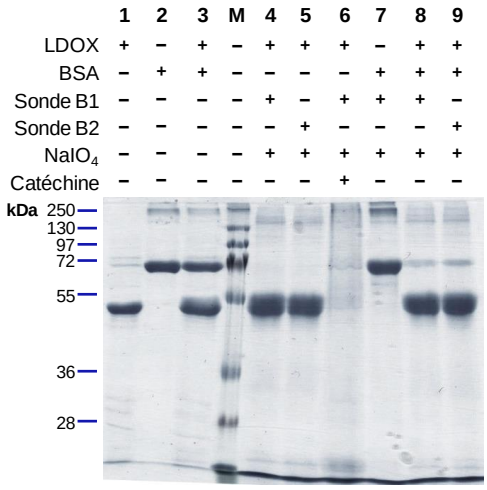


Figure 46. Capture sélective et compétitive de la LDOX par les sondes B en présence de BSA

3.2. Capture de la LDOX en présence de la catéchine

Pour confirmer cette affinité particulière des sondes B catéchine et épicatéchine pour la LDOX, la sonde B1 (1,8 éq.) a été incubée pendant 30 minutes avec la LDOX (1 éq.) en présence de catéchine (180 éq.). Après l'étape d'activation et d'enrichissement dans des conditions opératoires similaires à celles décrites précédemment, l'analyse par gel SDS-PAGE révèle la disparition de la bande correspondant à la LDOX capturée (Figure 46, comparaison des pistes 4 et 6). Cette absence de capture peut s'expliquer par une saturation du site actif de la LDOX par la catéchine qui empêche la sonde B1 catéchine d'établir une interaction avec cette protéine lors de la phase d'incubation.

L'ensemble de ces résultats confirme la capacité des sondes B1 et B2 à capturer la LDOX de façon sélective et efficace en conditions oxydantes. Cette efficacité et cette sélectivité à capturer la LDOX ont par la suite été évaluées dans un mélange protéique complexe dans lequel la LDOX est largement minoritaire.

3.3. Capture de la LDOX dans un mélange protéique complexe

Pour cette étude, la LDOX a été ajoutée de façon minoritaire (moins de 0,5% en masse) à un brut protéique extrait de bactérie *E. coli*. Ce dernier a préalablement subi un traitement préliminaire sur le support d'affinité en vue d'éliminer les protéines naturellement biotinylées et celles retenues par des interactions non spécifiques sur ce support. Des essais préliminaires ont montré l'impossibilité de visualiser le résultat de la capture par la sonde B1 pour des mélanges protéiques contenant moins de 1% en LDOX que ce soit par gel SDS-PAGE coloré au nitrate d'argent ou par Western blot. L'identification des protéines capturées a donc été réalisée par la technique "shotgun" beaucoup plus sensible. Cette technique d'analyse

protéomique a permis d'identifier la LDOX parmi moins de 50 protéines bactériennes capturées grâce à la sonde B1 par rapport à environ de 500 protéines détectées en l'absence de cette dernière.

4. Identification du ou des site(s) de fixation sur la LDOX de la sonde B1

Dans le but de déterminer le ou les peptides de la LDOX lié(s) à la sonde B1, une analyse par spectrométrie de masse MALDI en mode réflectron a été réalisée. Des échantillons préparés et analysés sur lesquels la fixation de la sonde a été démontrée sous forme de mono-adduit (B1-LDOX) ont été protéolysés en solution et comparés aux peptides obtenus par protéolyse de la LDOX pour déterminer les peptides modifiés.

4.1. Analyse directe du protéolysat par MALDI-TOF sans enrichissement d'affinité

Des captures de la LDOX (1 éq.) en présence de sonde B1 (5 éq.) sous activation de $NaIO_4$ (50 éq. par rapport à la sonde) ou de $K_3Fe(CN)_6$ (2,5 éq. par rapport à la sonde) ont tout d'abord été réalisées et validées par MALDI (Figure 47). Les contrôles négatifs (sans sonde ou sans oxydant) ont été effectués en parallèle et tous les échantillons sont été réalisés en triplicat.

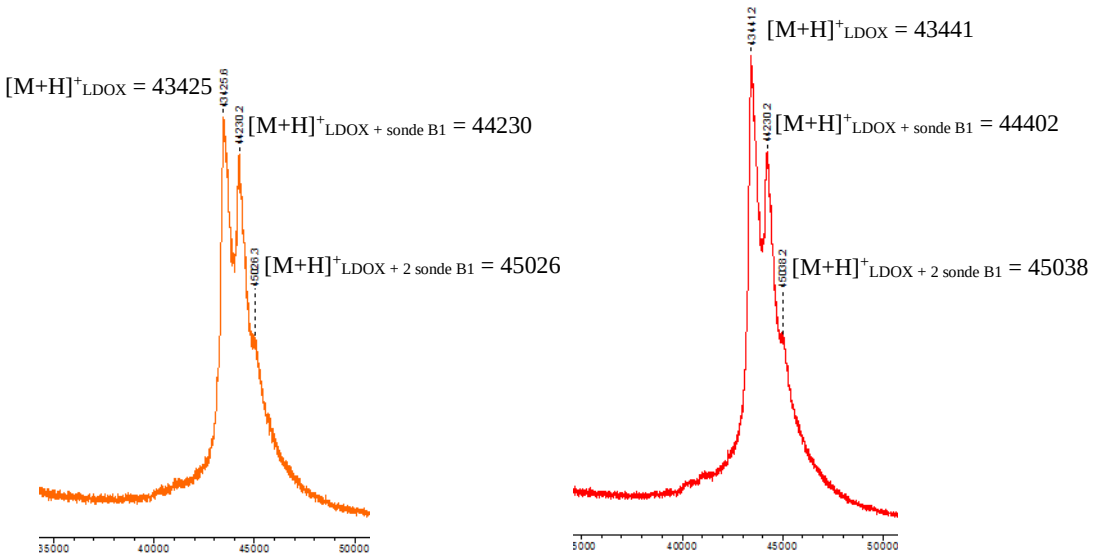


Figure 47. Analyse par MALDI-TOF de captures de la LDOX par 5 éq. de sonde B1 à l'aide de $NaIO_4$ (à gauche) et de $K_3Fe(CN)_6$ (à droite)

Un aliquot de chaque échantillon, correspondant à 100 pmoles de protéine, est engagé dans une protéolyse en solution par la trypsine (au ratio enzyme/substrat = 1:50) à 37 °C sur la nuit. La trypsinolyse est arrêtée par chauffage dénaturant à 100 °C pendant 10 minutes.[126,283]

Le protéolysat obtenu est ensuite dessalé et analysé en mode réflectron en MALDI. Les résultats obtenus nous ont permis d'obtenir des cartes peptidiques de la LDOX conduisant à une couverture de séquence d'environ 60% ne permettant pas de visualiser l'ensemble des peptides (Figures 48 et 49). La comparaison des cartes peptidiques de la LDOX + sonde B1 + $NaIO_4$ ou + $K_3Fe(CN)_6$ avec celles des contrôles LDOX seule, LDOX + $NaIO_4$ ou LDOX + $K_3Fe(CN)_6$ ne permet pas d'identifier des peptides susceptibles d'avoir été modifiés. En effet aucune espèce peptidique nouvelle n'apparaît après addition de la sonde et avec l'un ou l'autre des deux agents d'oxydation ($NaIO_4$ et $K_3Fe(CN)_6$). De même, la recherche de peptides modifiés portant un incrément de masse correspondant à la fixation de la sonde ou à une partie de celle-ci (nous avons en effet montré que la sonde pouvait se fragmenter au cours de l'analyse par MS) n'a également pas abouti.

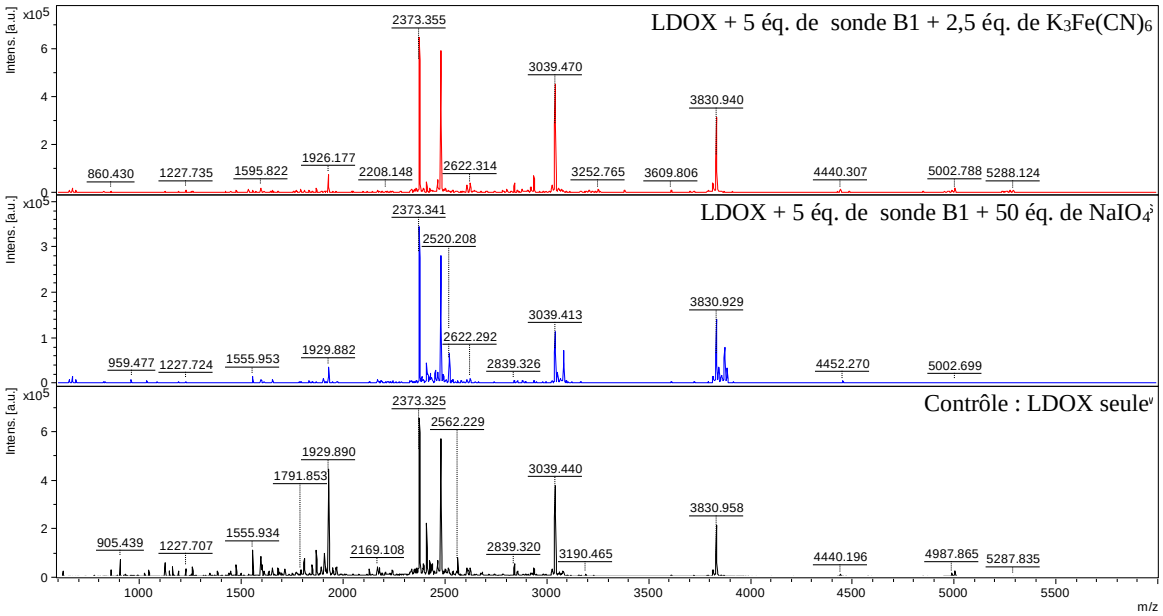


Figure 48. Analyse par MALDI-TOF du protéolysat des complexes sonde-LDOX et LDOX seule

Couverture de séquence de la LDOX seule : 61%

MRGSHHHHHHGSGSGSGIEGRPYIGTGSACR**MVTSVAPR**VESLSSSGIQSIPK**EYIRPQE**
ELTSIGNVFEEEKKDEGPQVPTIDLKDIESEDEVVRERCREELKKAAMEWGVMHLVNHGI
SDDLINRVK**VAGETFFNLPMEEKEK**YANDQASGKIAGYGSK**LANNASGQLEWEDYFFHLI**
FPEDKRDMTIWPKTPSDYVPATCEYSVKLRSLATK**ILSVLSLGLGLEEGRLEKEVGGMEE**
LLLQKKINYYPKCPQPELALGVEAHTDVSALTFILHNMVPGLQLFYEGK**WVTAKCVPNSI**
IMHIGDTIEILSNGKYKSILHRGLVNKEKVR**ISWAVFCEPPKEKIILKPLPETVSETEPP**
LFPPRTFSQHIQHKLFRKTQEALLSK

Couverture de séquence de la LDOX + $NaIO_4$ + sonde : 59%

MRGSHHHHHHGSGSGSGIEGRPYIGTGSACR**MVTSVAPR**VESLSSSGIQSIPK**EYIRPQE**
ELTSIGNVFEEEKKDEGPQVPTIDLKDIESEDEVVRERCREELKKAAMEWGVMHLVNHGI
SDDLINRVK**VAGETFFNLPMEEKEK**YANDQASGKIAGYGSK**LANNASGQLEWEDYFFHLI**
FPEDKRDMTIWPKTPSDYVPATCEYSVKLRSLATK**ILSVLSLGLGLEEGRLEKEVGGMEE**
LLLQKKINYYPKCPQPELALGVEAHTDVSALTFILHNMVPGLQLFYEGK**WVTAKCVPNSI**
IMHIGDTIEILSNGKYKSILHRGLVNKEKVR**ISWAVFCEPPKEKIILKPLPETVSETEPP**
LFPPRTFSQHIQHKLFRKTQEALLSK

Couverture de séquence de la LDOX + $K_3Fe(CN)_6$ + sonde : 65%

MRGSHHHHHHGSGSGSGIEGRPYIGTGSACR**MVTSVAPR**VESLSSSGIQSIPK**EYIRPQE**
ELTSIGNVFEEEKKDEGPQVPTIDLKDIESEDEVVRERCREELKKAAMEWGVMHLVNHGI
SDDLINRVKVAGETFFNLPMEEKEKYANDQASGKIAGYGSK**LANNASGQLEWEDYFFHLI**
FPEDKRDMTIWPKTPSDYVPATCEYSVKLRSLATK**ILSVLSLGLGLEEGRLEKEVGGMEE**
LLLQKKINYYPKCPQPELALGVEAHTDVSALTFILHNMVPGLQLFYEGK**WVTAKCVPNSI**
IMHIGDTIEILSNGKYKSILHRGLVNK**EKVRISWAVFCEPPKEKIILKPLPETVSETEPP**
LFPPRTFSQHIQHKLFRKTQEALLSK

Figure 49. Couverture de séquence de la LDOX dans les échantillons LDOX seule et LDOX + sonde (en rouge et en gras sont représentés les peptides détectés par MALDI-TOF)

Pour expliquer ces résultats, à ce stade, nous proposons quelques hypothèses suivies de pistes d'amélioration :

- La couverture de séquence de la protéine n'est pas suffisante pour visualiser les peptides modifiés par la sonde. Comme 40% de la séquence n'a pas pu être détectée lors de l'analyse des peptides, l'hypothèse la plus probable est que la sonde se soit fixée sur une portion de la séquence qui n'est pas détectée. En effet si le(s) peptide(s) cible(s) n'est (ou ne sont) pas détecté(s) avant fixation de la sonde il n'y a aucune raison pour que celui-ci soit détecté lorsqu'il porte la sonde. Nous envisageons de résoudre ce problème en utilisant en parallèle une ou plusieurs autres protéases possédant des spécificités de coupure différentes et complémentaires de celles de la trypsine.

- Par ailleurs l'analyse MALDI présente des avantages mais également un inconvénient. Elle permet la détection en théorie de l'ensemble des peptides présents dans l'échantillon mais

uniquement si ces peptides ont été ionisés avec une efficacité suffisante. Au cours de la phase d'ionisation, des phénomènes de compétition d'ionisation peuvent favoriser certains peptides au détriment d'autres conduisant à des cartes peptidiques incomplètes. Dans le cas des échantillons des complexes sonde-LDOX comportant une proportion importante de LDOX non capturée par la sonde, les peptides modifiés ne représentent qu'une petite fraction des peptides ionisés. La présence de ces nombreux peptides non modifiés pourrait gêner l'ionisation des peptides modifiés moins abondants et peut être moins facilement ionisables au point qu'ils ne sont pas détectés. De plus, l'influence négative de la biotine sur l'efficacité d'ionisation des peptides au cours d'analyses par MS a déjà été décrite par Kim et *al.*,[195] et Bai et *al.*[196] La biotine devrait donc idéalement être libérée des peptides avant l'analyse par MS.

- L'enrichissement au moyen des billes magnétiques de la LDOX par la sonde ou des peptides modifiés en ayant réalisé au préalable une protéolyse devrait simplifier le protéolysat obtenu et devrait permettre la détection des peptides d'intérêt. De même, une analyse ESI-TOF peut s'avérer complémentaire de par son mode d'ionisation différent, même si les mêmes phénomènes de compétition à l'ionisation existent aussi en ionisation par électronébullisation (ESI). Un couplage LC-MS/MS peut également être envisagé pour séparer les différents peptides obtenus et diminuer ainsi la complexité de l'échantillon à l'étape d'ionisation en augmentant la probabilité de voir les peptides peu abondants ou faiblement ionisés.

4.2. Analyse du protéolysat après enrichissement par affinité

Dans cette étude, trois aliquots identiques de 200 pmoles de LDOX, ont été préparés avec 1000 pmoles de sonde et activés par $NaIO_4$. Après l'étape de capture, les aliquots sont incubés avec des billes magnétiques recouvertes de streptavidine, puis plusieurs lavages sont réalisés. Les billes obtenues sont regroupées et traitées avec du tampon Laemmli pour permettre l'élution. Cet éluat est déposé en trois dépôts rigoureusement identiques sur le même gel d'électrophorèse SDS-PAGE afin de mener en triplicat les étapes qui suivent : migration électrophorétique limitée à la première partie du gel (gel de concentration qui ne sépare pas les protéines mais qui les concentre), excision des bandes du gel portant les protéines concentrées, suivie d'une protéolyse sur gel par la trypsine. Les peptides extraits du gel sont alors analysés par MALDI-MS et par LC-MS/MS (sur LTQ-Orbitrap, Thermo Electron). Le résultat de ces captures est cependant en cours d'analyse.

5. Développement de sondes photoclivables pour la protéomique chimique

Les résultats préliminaires décrits précédemment ouvrent donc l'accès à la détermination des cibles protéiques mais également aux zones d'interactions de celles-ci avec des polyphénols. Néanmoins, les difficultés rencontrées pour déterminer les zones d'interactions entre la protéine et la sonde B1 liées au manque de pureté des échantillons obtenus, nous ont conduits à poursuivre le développement de ce type de sonde en incorporant dans celle-ci un groupement photoclivable. Cette nouvelle fonction clivable située entre la fonction de purification (biotine) et la fonction d'affinité permettra de couper sélectivement l'espaceur portant la biotine dans des conditions douces et biocompatibles conduisant uniquement à la libération de la protéine ou du peptide capturés.

5.1. Conception et synthèse de sondes photoclivables (sonde C1)

Sur la base de l'étude bibliographique présentée dans le chapitre 1 (5.2.5), le groupement d'alcool *o*-nitrobenzylique dont la réactivité est orthogonale à celle d'un polyphénol, a été choisi pour développer une version photoclivable des sondes B (sondes de type C). Ce groupement doit permettre de couper sélectivement l'espaceur portant la biotine dans des conditions douces et biocompatibles pour libérer uniquement la protéine ou le peptide capturé et faciliter ainsi l'analyse protéomique (Figure 50). Ces sondes sont composées de trois unités fonctionnelles : un flavan-3-ol (e.g., catéchine) jouant à la fois le rôle de fonction d'affinité et de fonction réactive, une biotine comme fonction de purification, et un lien photosensible entre ces deux dernières. Des espaceurs à chaînes alkyles ou PEG plus ou moins longues seront considérés afin de minimiser l'impact stérique de la présence du groupe photoclivable sur les interactions entre le polyphénol et les protéines ciblées mais également entre la biotine et la streptavidine. Par ailleurs la fonction photoclivable doit être suffisamment éloignée du support solide et donc de la biotine pour permettre sa photolyse.

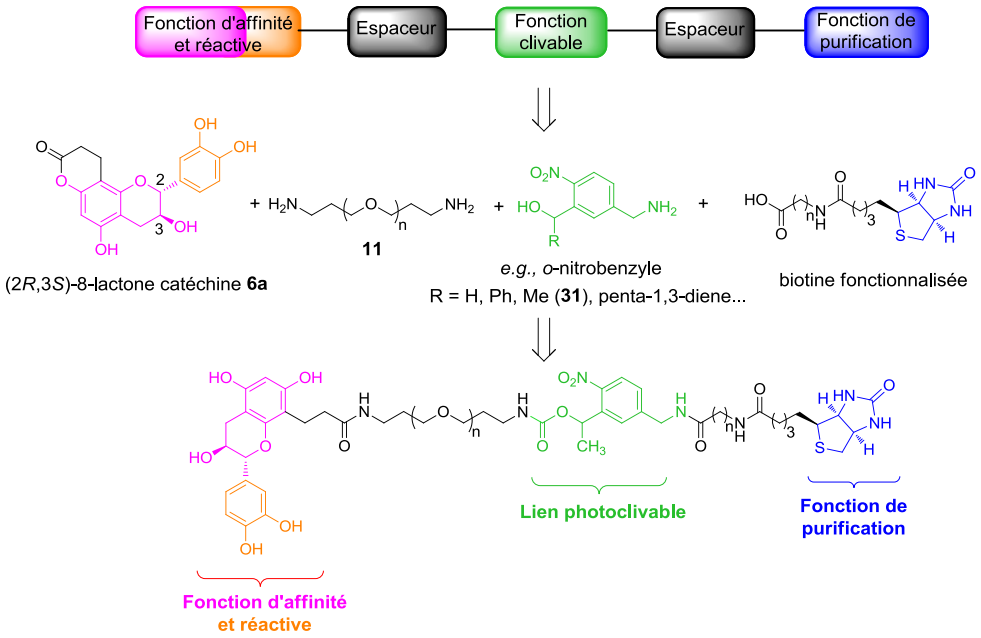


Figure 50. Sondes photoclivables, exemple de la sonde catéchine

5.1.1. Préparation du groupement photoclivable

L'alcool *o*-nitrobenzylique **31** peut être synthétisé à partir de différents précurseurs commercialement disponibles.[194,210,284,285] En général, un tel dérivé dispose d'une fonction amine primaire en vue de le coupler avec la biotine modifiée, et d'un alcool benzylique en position *ortho* par rapport au groupement nitro. Cet alcool, préalablement activé en général par le carbonate de *N*,*N*'-disuccinimidyle (DSC), sert à former un carbamate lors de la réaction de couplage avec une amine. En se basant sur ce principe, la synthèse d'un lien photoclivable simple (R=CH_3) **31** a dans un premier temps, été envisagée. La synthèse indépendante de ce groupement permet de l'incorporer à la sonde d'affinité à différents stades de sa construction en fonction du parcours synthétique choisi.

La séquence réactionnelle choisie pour préparer ce lien photoclivable a été adaptée de différents protocoles.[194,284,285] Elle est présentée ci-après (Schéma 28) :

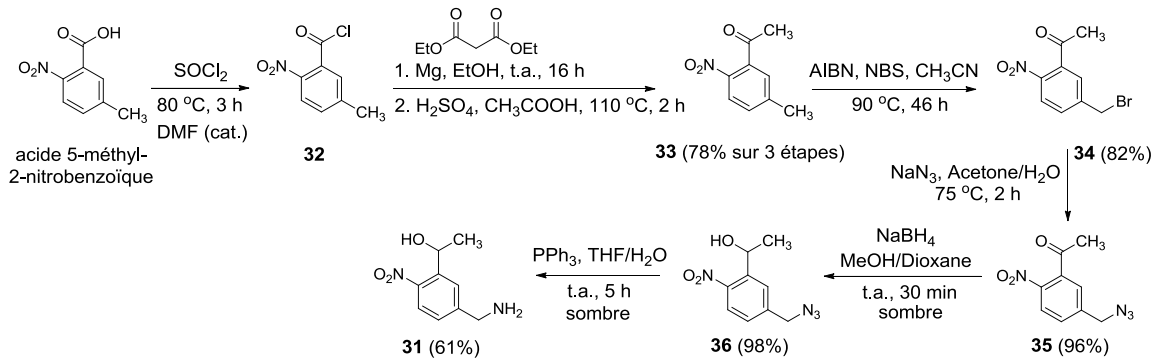


Schéma 28. Schéma réactionnel de la synthèse du 1-(5-(aminométhyl)-2-nitrophényl)éthanol (31)

Tout d'abord, la 1-(5-(aminométhyl)-2-nitrophényl)éthanone (**33**) est préparée en trois étapes avec un rendement global de 78% à partir de l'acide 5-méthyl-2-nitrobenzoïque commercial en utilisant un protocole décrit par Saran et Burke.[284] La première étape consiste en une conversion de l'acide carboxylique en son chlorure d'acide **32** en présence de chlorure de thionyle et de DMF en quantité catalytique. La deuxième étape consiste à réaliser une synthèse malonique sur ce composé **32.** Le malonate de diéthyle est ainsi préalablement déprotoné à l'aide de magnésium et d'éthanol puis l'anion du diester formé conduit à une substitution nucléophile sur le composé **32.** Le diester obtenu est par la suite hydrolysé sous forme de diacide puis la décarboxylation de celui-ci fournit le produit attendu **33**.

Les étapes suivantes consistent en une bromation suivant un mécanisme de Wohl-Ziegler suivie d'une substitution nucléophile à l'aide de l'azoture de sodium en adaptant les protocoles respectivement décrits par Kammari*et al*.[285] et Szychowski *et al*.[194] L'initiateur de radicaux, l'azobisisobutyronitrile (AIBN), est clivé sous l'effet de la chaleur et réagit avec le *N*-bromosuccinimide (NBS) pour former un radical qui conduit à une abstraction d'un atome d'hydrogène de la position benzylique de la molécule **33**. Le NBS transfère le brome au nouveau radical formé pour donner le dérivé bromé **34**, qui est par la suite substitué par le groupement azoture conduisant au composé **35** avec un rendement de 79% sur les 2 étapes.

La synthèse est complétée par la réduction des fonctions cétone et azoture, réalisée de façon orthogonale pour éviter la condensation de la fonction cétone et de l'amine formée. Selon une procédure décrite par Szychowski *et al*.,[194] la cétone **35** est tout d'abord réduite à l'aide de $NaBH_4$ pour conduire à l'alcool **36**, qui est par la suite engagé dans les conditions de réaction de Staudinger. L'azoture réagit avec la triphénylphosphine pour former un phosphazène qui élimine une molécule d'azote pour conduire à l'iminophosphorane. Ce dernier est hydrolysé pour conduire à l'amine primaire **31** avec un rendement de 60% sur les 2 étapes.

5.1.2. Synthèse de la sonde photoclivable C1

Dans un premier temps, une sonde simple possédant un lien photoclivable a été synthétisée de façon à ce que ce groupement soit positionné directement entre la biotine et la chaîne PEG de la sonde B1 (Figure 50). Tout d'abord, pour favoriser le couplage du 1-(5-(aminométhyl)-2-nitrophényl)éthanol (**31**) avec la biotine (**12**), cet acide est activé par estérification avec le *N*-hydroxysuccinimide (NHS). Cette étape est facilitée si le mélange NHS avec la biotine est réalisé en présence de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) dans du DMF anhydre.[286,287] Dans ces conditions l'ester désiré **37** est directement obtenu avec un rendement quantitatif après filtration du sous-produit urée et l'élimination de l'excès de NHS par trituration

dans un mélange acétone/Et_2O (1:1). La cinétique de cette étape peut être accélérée en présence d'une base de Hünig comme l'Et_3N et un léger chauffage à 50°C. L'aminolyse de l'ester NHS **37** est par la suite réalisée avec l'amine **31** dans du DMF anhydre en présence d'Et_3N.[288] Au bout d'une heure à température ambiante, l'amide **38** est obtenu avec un rendement de 87% après purification sur silice (Schéma 29).

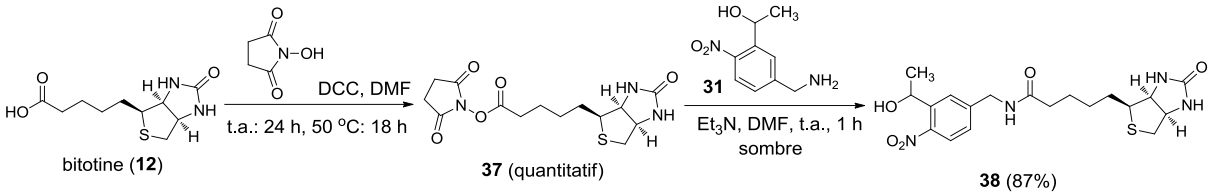


Schéma 29. Installation du lien photoclivable 31 sur la biotine activée 37

La synthèse se poursuit en incorporant le produit **38** à la chaîne PEG monoprotégée **17** à travers un lien carbamate. De façon générale, l'alkoxycarbonylation d'amines peut être réalisée par l'activation de la fonction alcool grâce au 4-nitrophénylchloroformate (**b**),[289–291] au 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI, **c**)[292,293] ou au carbonate de *N*,*N*'-dissuccinimidyle (DSC, **a**), très souvent utilisé.[194,210,284,294] Ce type de réaction impliquant le DSC nécessite en général de mettre en solution l'alcool avec ce réactif puis d'ajouter la Et_3N. L'amine primaire est ensuite introduite au mélange réactionnel pour se coupler à l'intermédiaire formé *in situ*. Notre première tentative de couplage réalisée à l'aide du DSC en présence de Et_3N à partir de l'alcool **38** et de l'amine **17** n'a cependant pas généré le produit attendu **39** malgré plusieurs essais successifs. Les réactifs 4-nitrophénylchloroformate (**b**) et le CDI (**c**) ont alors été testés, mais sans succès, dans tous les cas, le produit de départ **38** étant récupéré (Schéma 30).

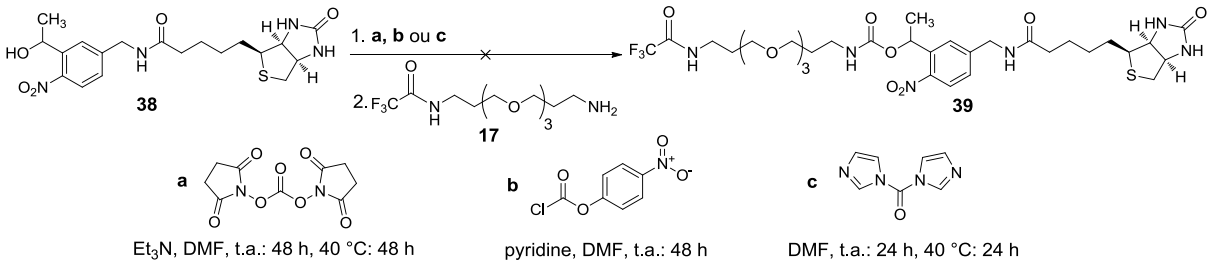


Schéma 30. Différentes tentatives de formation du carbamate 39

L'absence de réactivité dans notre cas a dans un premier temps été attribuée à la présence de la biotine susceptible de perturber cette activation. Pour vérifier cette hypothèse, deux alternatives ont été envisagées. Dans un premier temps, l'acide 6-aminohexanoïque a été installé sur la biotine pour éloigner cette dernière de la fonction photoclivable. Le dérivé acide terminal **40** ainsi obtenu est activé sous la forme d'un ester NHS **41** puis couplé au composé **31** pour

former le produit **42**. L'activation par DSC/Et_3N de ce nouveau composé **42** en présence de l'amine **17**, s'est de nouveau soldée par un échec (Schéma 31).

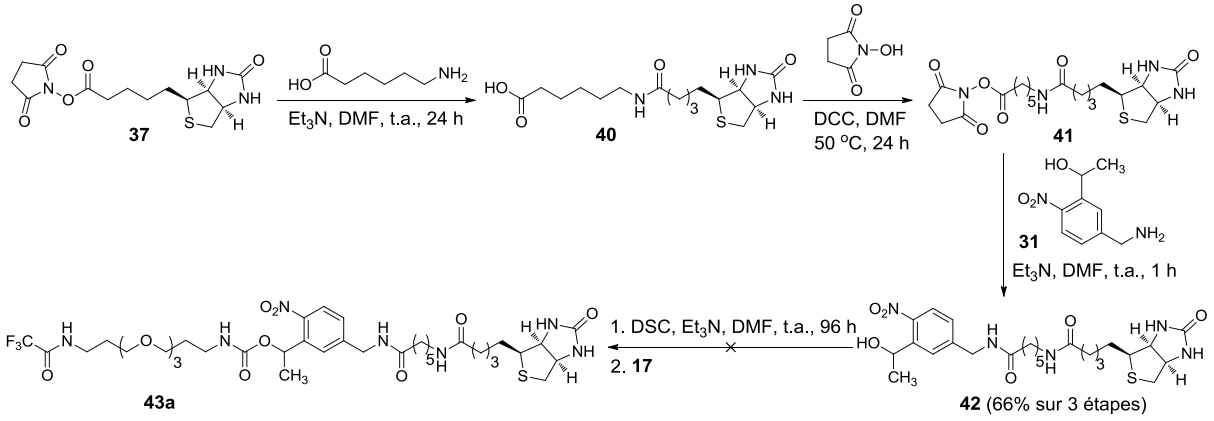


Schéma 31. Introduction d'un espaceur suivie d'une activation par le DSC/Et_3N

Une deuxième alternative a été envisagée consistant en l'activation de la fonction alcool du lien photoclivable pour former un carbamate avant la biotinylation. Le dérivé alcool benzylique **36** a été choisi pour être activé par le DSC/Et_3N. Malheureusement, ce composé **36** disposant d'un groupement azoture s'est avéré instable dans les conditions utilisées (Schéma 32).

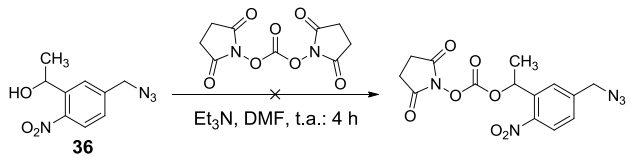


Schéma 32. Tentative d'activation du lien photoclivable 36

Cette instabilité liée à la présence du groupement azoture du produit **36**, nous a contraint à considérer son précurseur, le dérivé bromé **34**. La fonction cétone de ce dérivé est rapidement réduite à l'aide de $NaBH_4$ puis l'alcool **44** ainsi obtenu est traité avec le DSC/Et_3N mais là encore le couplage n'a pas été obtenu (Schéma 33).

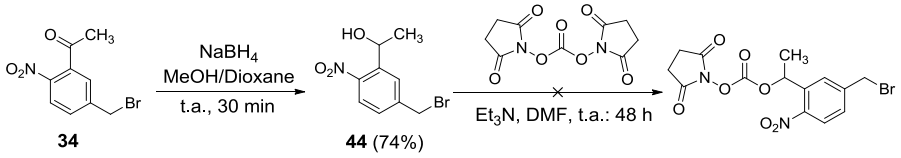


Schéma 33. Tentative d'activation du groupement alcool résultant du dérivé bromé 34

Cette absence de réactivité sur ces nouveaux alcools (**36**, **38**, **42** et **44**) nous a permis d'infirmer l'hypothèse liée à des contraintes engendrées par la présence de la biotine. En

revanche, elle nous a conduit à incriminer l'éventuelle présence d'une liaison hydrogène entre le groupement hydroxyle et le groupement *o*-nitro de cet alcool benzylique. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons décidé d'agiter l'alcool **38** en présence de Et_3N avant que le DSC ne soit ajouté. Dans ces conditions, le produit de départ **38** est presque totalement consommé. La chaîne PEG monoprotégée **17** est alors incorporée conduisant à l'aminolyse rapide de l'intermédiaire activé. Le carbamate résultant **39** est enfin obtenu après traitement et purification sur silice avec un rendement modéré de 47% sur les deux étapes en raison de difficultés de purification (Schéma 34).

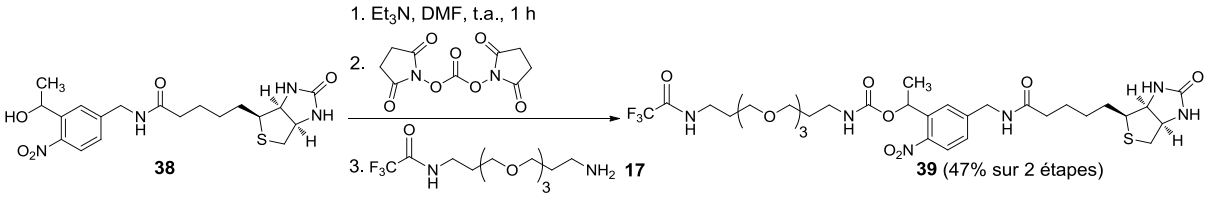


Schéma 34. Nouveau protocole permettant l'obtention du carbamate

La sonde C1 **45a** est par la suite rapidement obtenue après déprotection du groupement trifluoroacétate du composé **39** au carbonate de potassium[275] et couplage de l'amine résultante à la lactone catéchine **6a** dans du DMF. Cette nouvelle sonde **45a** est obtenue avec un rendement de 37% sur deux étapes après purification sur silice (Schéma 35).

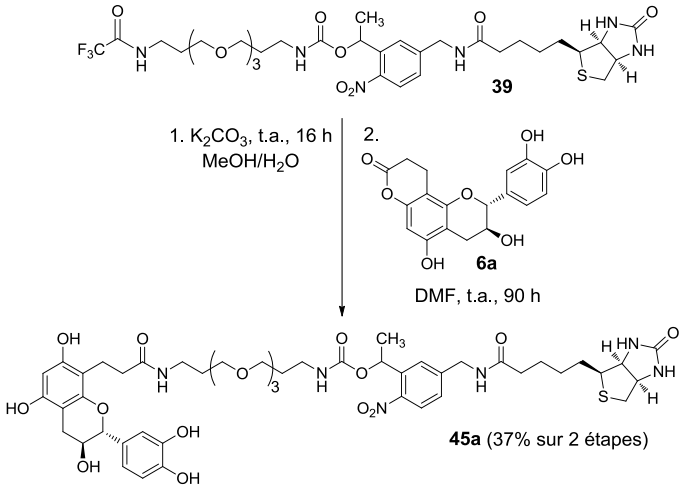


Schéma 35. Dernières étapes de la synthèse de la sonde photoclivable C1

5.1.3. Evaluation du clivage de la sonde C1

La sonde C1 synthétisée, une analyse UV de cette molécule ainsi que sa photolyse ont été réalisées pour déterminer les conditions expérimentales les plus adaptées lors des expériences de protéomique chimique.

Spectre d'absorption de la sonde C1 et suivi d'irradiation

La photolyse d'un groupe alcool *o*-nitrobenzyle est réalisée à des longueurs d'onde comprises entre 300 et 365 nm avec un temps d'irradiation variant de quelques minutes à plusieurs heures en fonction de la puissance de la lampe utilisée.[174,217] Par exemple, Rothschild et *al*. ont montré que ce clivage photochimique réalisé à 365 nm sur des sondes similaires aux nôtres pouvait être rapide (< 5 minutes) et efficace (> 99%).[210] Sur la base de cette étude, nous avons privilégié cette longueur d'onde et l'avons comparée à une irradiation à 312 nm utilisée comme témoin. La photolyse de la sonde C1 en solution aqueuse a été conduite dans une cuve en quartz de 1 mL à l'aide d'une lampe pour CCM (VL-6.LC, Vilbert Lourmat, comportant un tube de 6-Watt et une puissance de 0.61 mW/cm^2 à une distance de 15 cm). Cette cuve a été placée dans une boîte noire et sur de la glace fondante à 2 cm de la source d'irradiation. Le spectre d'absorption de la sonde C1 (t = 0 min) ainsi que son suivi d'absorbance UV sous irradiation à 365 nm sont enregistrés sur un spectrophotomètre UV-Vis (CARY 300 Scan, Varian) en prenant l'eau comme référence. Les mesures ont été faites toutes les 2 minutes durant 10 minutes, puis 2 mesures supplémentaires ont été réalisées à t = 15 minutes et t = 30 minutes. Nous pouvons remarquer que cette sonde C1 possède un maximum d'absorption à 273 nm (courbe rouge) et qu'après 2 minutes d'irradiation ce maximum est rapidement décalé vers 280 nm et 360 nm lors de la photolyse et n'évolue plus au-delà de 15 minutes (Figure 51).

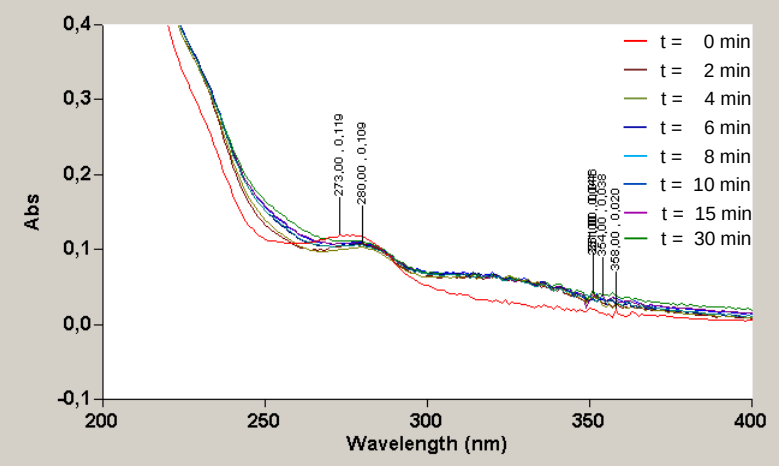


Figure 51. Spectre d'absorption et suivi de l'évolution de la sonde C1 sous irradiation à 365 nm

Dans ces conditions, la sonde est donc totalement photoclivée en quelques minutes pour donner naissance à deux composés susceptibles d'absorber à des longueurs d'ondes voisines de 280 et 360 nm. Pour déterminer la structure des deux produits anticipés de cette photolyse (Schéma 36), des prélèvements réalisés lors des différentes mesures d'absorbance ont été analysés par ESI-MS.

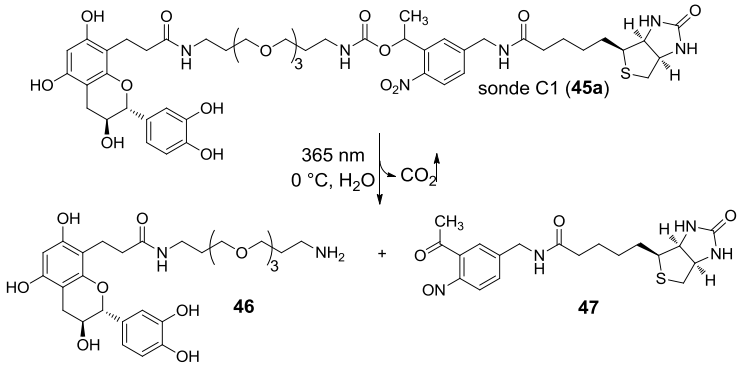
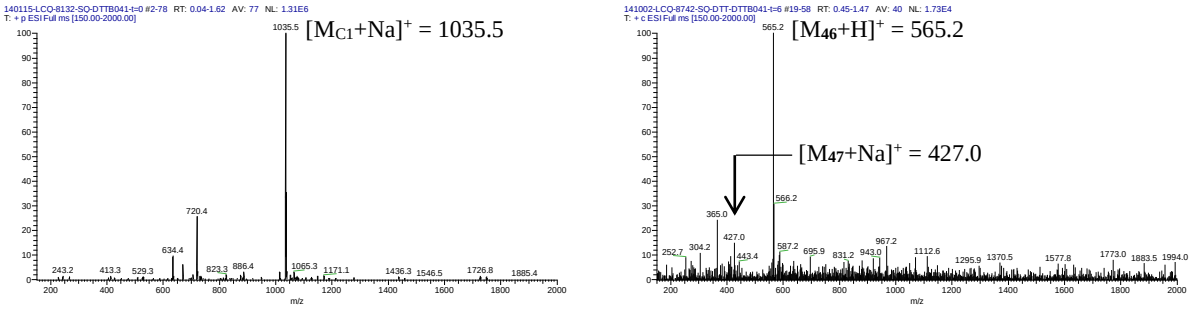


Schéma 36. Photoclivage de la sonde C1

Les analyses en ESI-MS semblent indiquer que la photolyse est terminée en moins de 6 minutes. Les deux molécules résultant de cette photolyse sont identifiées par les ions à *m/z* = 565,2 $[M_{\mathbf{46}}+H]^+$ et 427,0 $[M_{\mathbf{47}}+Na]^+$ (Figure 52). Une irradiation au-delà de 10 minutes ne permet plus de retrouver le composé **47**. Celui-ci possédant un groupement nitroso sensible, continue à évoluer au cours de l'irradiation pour générer d'autres composés non-identifiés.



Sonde C1 avant irradiation — Sonde C1 après 6 minues d'irradiation

Figure 52. Analyse par ESI-MS de la sonde C1 avant et après 6 minutes d'irradiation à 365 nm

Une photolyse similaire de la sonde C1 réalisée dans le tampon phosphate utilisé lors de l'étape de capture conduit à des résultats similaires à ceux obtenus dans l'eau.[210] Par contre, une irradiation à 312 nm est moins efficace, les analyses en spectrométrie de masse indiquant encore la présence de la sonde au-delà de 30 minutes d'irradiation.

Une irradiation sous 365 nm durant un quart d'heure semble donc suffisante pour cliver la totalité de notre sonde.

Application à la capture et à la photoélution de la LDOX par la sonde C1

Les conditions de photolyse étant établies, des essais de capture et de photoélution de la LDOX avec la sonde **45a** ont alors été réalisés. L'irradiation sous UV peut provoquer la dégradation des protéines, notamment dans le cas de la LDOX, une enzyme sensible aux conditions expérimentales. Dans un premier temps, un suivi de la stabilité de la LDOX irradiée à 365 nm a donc été réalisé par SDS-PAGE. Pour ce suivi, une solution de LDOX est soumise à une irradiation sous 365 nm à 0 °C durant 60 minutes avec des prélèvements (0,75 µg) de solution irradiée toutes les 5 minutes jusqu'à 30 minutes, puis 2 supplémentaires au bout de 45 et 60 minutes. Ces prélèvements sont ensuite déposés sur gel d'électrophorèse. Un témoin négatif de LDOX non irradiée maintenue à 0 °C durant 60 minutes est également déposé sur le gel (Figure 53). Après migration, l'analyse de ce gel nous permet de constater une certaine stabilité de la protéine lorsque l'irradiation est inférieure à 60 minutes.

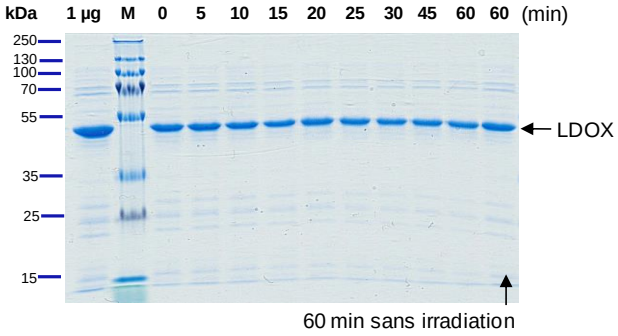
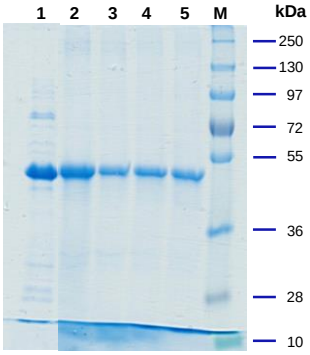


Figure 53. Gel SDS-PAGE du suivi d'irradiation de la LDOX sous 365 nm à 0 °C (coloré au Bleu de Coomassie®)

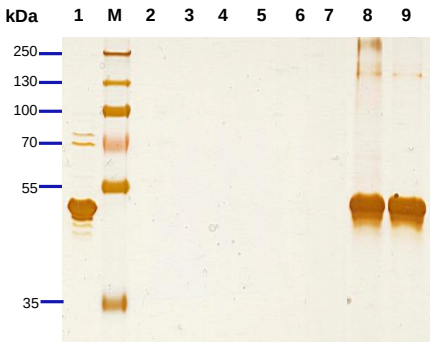
Par la suite, l'efficacité de capture de la LDOX par la sonde C1 a été comparée à celle de la sonde B1 (sans fonction photoclivable) en appliquant exactement le protocole de capture optimal établi (voir partie 4.4.6, chapitre 4) et en considérant deux tampons de capture (phosphate pH = 7,0 et PBS pH = 7,4). L'analyse du gel SDS-PAGE résultant de ces essais de capture de la LDOX, permet tout d'abord de valider l'efficacité et la reproductibilité de capture de la LDOX par la sonde B1 (~ 14%). La LDOX est également capturée par la sonde C1 mais avec un peu plus faible rendement (~5,7%) quel que soit le tampon utilisé (Figure 54). Ce plus faible rendement pourrait s'expliquer par la présence de lien photoclivable hydrophobe.



Piste 1 : 1 µg de LDOX (partiellement purifiée)
Piste 2 : LDOX + $NaIO_4$ + sonde B1/tampon phosphate pH = 7,0
Piste 3 : LDOX + $NaIO_4$ + sonde C1/tampon PBS pH = 7,4
Piste 4 : LDOX + $NaIO_4$ + sonde C1/tampon phosphate pH = 7,0
Piste 5 : LDOX + $NaIO_4$ + sonde C1/tampon phosphate pH = 7,0
Piste M : Marqueurs de taille

Figure 54. Evaluation de l'efficacité de capture de la LDOX par la sonde C1

L'efficacité de capture de la LDOX par la sonde C1 démontrée, le photoclivage du complexe sonde C1-LDOX retenu par les billes de streptavidine a été testé. Pour cela, après la phase d'enrichissement réalisée à l'aide de billes recouvertes de streptavidine suivi de plusieurs lavages, une partie des billes a été éluée en conditions dénaturantes (tampon Laemmli) (Figure 55, piste 9), tandis qu'une autre a été irradiée à 365 nm à 2 cm de la source d'UV et en agitant (650 rpm) à 4 °C. Des prélèvements de la solution de photolyse ont été régulièrement effectués toutes les 30 minutes d'irradiation (pistes 3-6). Les billes restantes après photoélution ont également été traitées en conditions dénaturantes (piste 8). Toutes les fractions collectées ont alors été analysées par gel SDS-PAGE révélé par une coloration au nitrate d'argent (Figure 55).



Piste 1 : 250 ng de LDOX (partiellement purifiée)
Piste M : Marqueurs de taille
Piste 2 : Dernier lavage au tampon phosphate avant irradiation
Piste 3 : 30 min d'irradiation
Piste 4 : 60 min d'irradiation
Piste 5 : 90 min d'irradiation
Piste 6 : 120 min d'irradiation
Piste 7 : Lavage à l'eau après 120 min d'irradiation
Piste 8 : La LDOX décrochée des billes après 120 min d'irradiation
Piste 9 : La LDOX décrochée des billes avant irradiation

Figure 55. Evaluation du photoclivage de la sonde C1 à 365 nm après capture de la LDOX

Sur ce gel, aucune LDOX n'est visualisée au cours de la photoélution sur le support d'affinité quel que soit le temps d'irradiation (pistes 3-6). En revanche, après irradiation, la quantité de cette protéine restée sur les billes semble identique à celle observée avant photolyse (pistes 8 et 9). Cette observation démontre une absence de photoclivage de la sonde C1 dans les conditions utilisées. On peut dès lors supposer que le support d'affinité ou/et la LDOX

perturbe le photoclivage (effet parasol de la surface streptavidine ou de la LDOX). Deux études réalisées respectivement par Deiters et *al*.[229] et par Takamori et *al*.[291] semblent confirmer cette hypothèse. Dans notre cas, la proximité de streptavidine par rapport au lien photoclivable pourrait expliquer cette absence de réactivité. Il apparaît donc nécessaire d'éloigner la fonction biotine et donc le support solide (streptavidine) de la fonction photoclivable. Un certain nombre d'études rapportées dans la littérature privilégient en effet pour ce type de sonde l'utilisation d'un dérivé de la biotine possédant un espaceur de 6 carbones, le 6-(biotinamido)hexanoate de succinimidyle**.**[194,196,210–213,215,295] Il a donc été envisagé la synthèse d'une seconde génération de sonde photoclivable composant un espaceur entre la biotine et le lien photosensible.

5.2. Conception et synthèse de sondes photoclivables (sonde C2)

5.2.1. Synthèse de la sonde photoclivable C2

Sur la base du protocole mis au point lors de la synthèse de la sonde C1, la synthèse de la sonde C2 incluant l'acide 6-aminohexanoïque comme espaceur a été réalisée comme schématisé ci-après (Schéma 37).

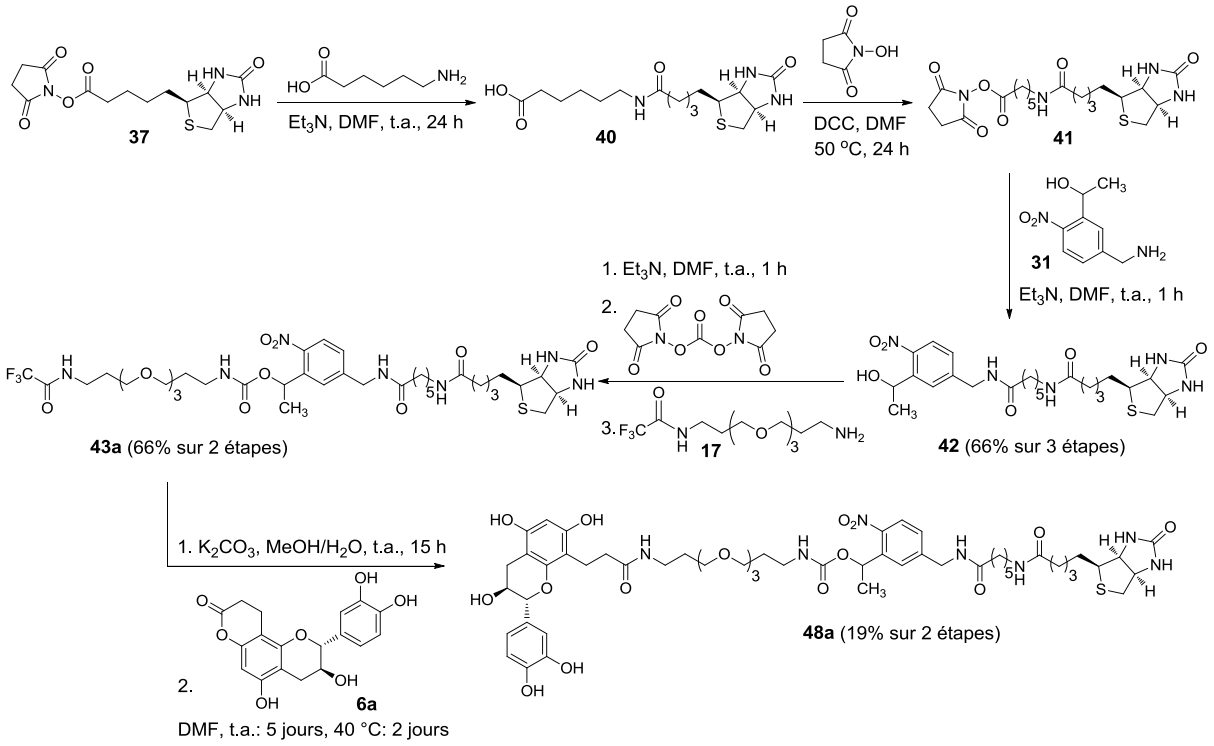


Schéma 37. Voie de synthèse de la deuxième sonde photoclivable

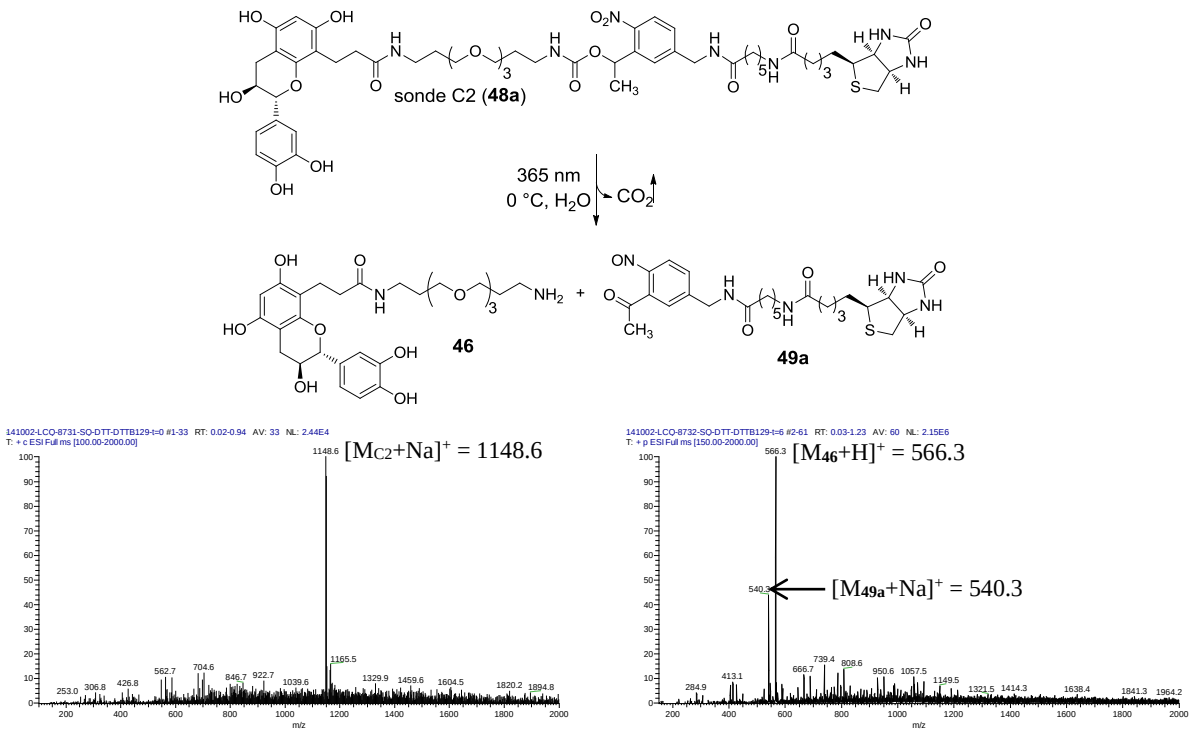
Tout d'abord, l'acide 6-aminohexanoïque est installé sur la biotine dont l'acide carboxylique a été préalablement activé sous la forme d'un ester NHS **37**. La fonction acide du

composé **40** formé est de nouveau activé par NHS et l'ester résultant **41** est couplé *in situ* avec la fonction photoclivable **31** pour conduire au composé **42** avec un rendement de 66% sur trois étapes. L'étape suivante consiste à générer une fonction carbamate sur la l'alcool du produit **42**. Un ajout successif de Et_3N, puis de DSC et l'introduction de la chaîne PEG **17** permet d'accéder au produit **43a** avec un rendement de 66% sur ces deux étapes. La synthèse de la sonde est finalisée par la déprotection de l'amine du composé **43a** en condition basique[275] suivi du couplage avec la lactone catéchine **6a**. Cette sonde C2 **48a** est obtenue avec un faible rendement de 19% sur ces deux dernières étapes en partie dû à la réactivité de l'amine obtenue et à des difficultés de purification sur silice.

5.2.2. Evaluation du photoclivage de la sonde C2

Spectre d'absorption de la sonde C2 et suivi d'irradiation

Similairement à C1, la sonde C2 possède un maximum d'absorption à 273 nm. Les analyses ESI-MS montrent que cette sonde est totalement clivée au bout de 6 minutes sous irradiation à 365 nm, dans des conditions similaires à celles utilisées pour la sonde C1. Les structures des deux composés générés sont confirmées par l'observation des ions à *m/z* = 566.3 $[M_{\mathbf{46}}+H]^+$ (l'isotope le plus abondant) et 540.3 $[M_{\mathbf{49a}}+Na]^+$ (Figure 56).



La sonde C2 avant irradiation — Les composés résultants de la photolyse

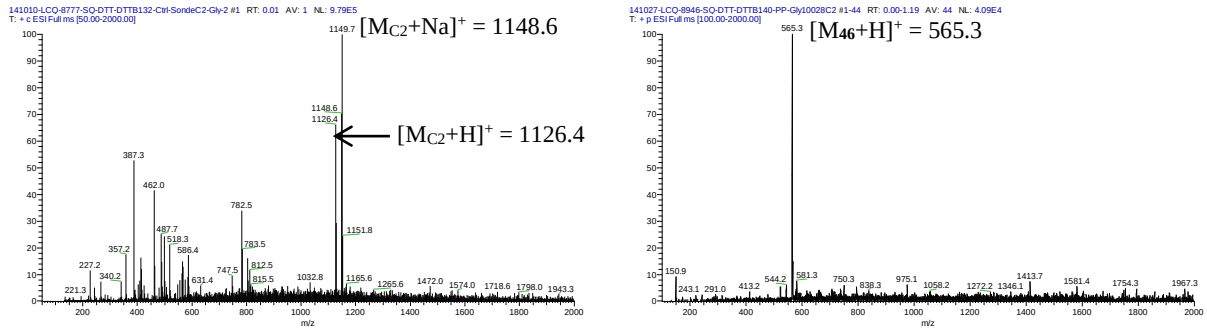
Figure 56. Photoclivage de la sonde C2 sous 365 nm et analyse par ESI-MS avant et après 6 minutes d'irradiation

Evaluation de la photoélution de la sonde C2 fixée sur les billes

Pour évaluer l'influence sur l'étape de photoélution de ce nouvel espaceur introduit entre la biotine et la fonction photoclivable, la sonde C2 sans LDOX est immobilisée sur les billes magnétiques recouvertes de streptavidine. Après plusieurs lavages, les billes sont suspendues dans de l'eau ou dans un tampon phosphate et irradiées sous 365 nm durant 30 minutes à 4 °C sous agitation (650 rpm). A l'issue de l'irradiation, le surnageant est dilué dans du MeOH et analysé en masse. Similairement à la sonde C1, le composé **46** résultant de la photolyse n'est pas observé dans le surnageant suggérant deux possibilités : soit la photolyse n'a pas été efficace, soit la photolyse est efficace mais le composé **46** reste adsorbé sur les billes. Cette dernière hypothèse peut être rapidement vérifiée en incubant le composé **46** préalablement photogénéré avec des billes de streptavidine. Cette expérience réalisée, l'analyse du surnageant par spectrométrie de masse indique clairement l'absence du composé **46** et donc son adsorption privilégiée sur le support d'affinité. A ce stade, l'utilisation d'un tampon de lavage post photolyse plus efficace est donc nécessaire. Cependant, l'utilisation de détergents ou de tampons alcalins est exclue en raison de l'incompatibilité avec les analyses en masse ou de l'instabilité de la catéchine dans ces conditions. Le tampon glycine-HCl 0,1 M, pH = 2,8, préconisé comme tampon d'élution et de régénération dans les méthodes d'enrichissement d'affinité a donc été privilégié.[190] Une étape d'élution de 30 minutes à l'aide ce tampon glycine-HCl réalisée sur les billes permet un relargage efficace du composé **46** (présence de l'ion à *m/z* = 565.3 $[M_{\mathbf{46}}+H]^+$ dans l'éluat).

Basée sur ces résultats, la sonde C2 a été incubée avec les billes puis irradiée à 365 nm dans des conditions préalablement décrites et par la suite lavée à l'aide du tampon glycine-HCl. La présence de la catéchine modifiée **46** par analyse ESI-MS dans l'éluat permet de valider l'efficacité du lavage et par conséquence l'efficacité de l'étape de photolyse sur le support d'affinité.

En complément, la stabilité de la sonde C2 dans ce nouveau tampon a été vérifiée pour réaliser éventuellement la photolyse de cette sonde dans ce tampon. Pour cela, une solution de sonde C2 dans le tampon glycine-HCl a été incubée pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Passé ce temps, cette solution a été divisée en deux lots, l'un étant irradié sous 365 nm pendant 30 minutes, l'autre non. L'analyse en ESI-MS de ces deux lots indique la présence abondante des ions à *m/z* = 1126,4 $[M_{C2}+H]^+$ et 1148,6 $[M_{C2}+Na]^+$ ainsi que l'absence de l'ion *m/z* = 565,3 $[M_{\mathbf{46}}+H]^+$ dans la solution non irradiée confirmant la stabilité de la sonde C2 dans ce nouveau tampon. De plus, la visualisation unique de l'ion *m/z* = 565,3 $[M_{\mathbf{46}}+H]^+$ dans la solution irradiée valide la possibilité de photoclivage de notre sonde dans ce tampon (Figure 57).



Incubation de la sonde C2 avant irradiation — Photoclivage mené dans le tampon glycine-HCl

Figure 57. Stabilité et photoclivage sous 365 nm de la sonde C2 dans le tampon glycine-HCl

Une expérience similaire réalisée sur le photoclivage de la sonde C1 préalablement fixée sur les billes conduit également après irradiation et élution à la libération du produit **46**. A ce stade, il semble donc que le support solide ne perturbe pas le photoclivage quelle que soit la distance moléculaire entre le groupement photosensible et la biotine. Par contre, il est nécessaire de réaliser une étape d'élution dans un tampon acidifié, comme le tampon glycine-HCl par exemple pour relarguer le composé polyphénolique du support d'affinité (Figure 58).

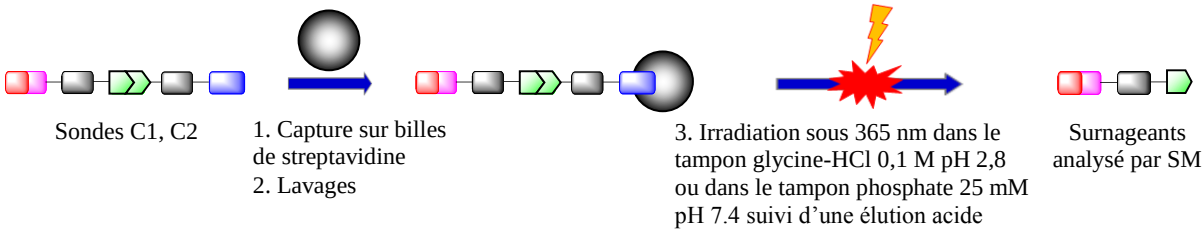
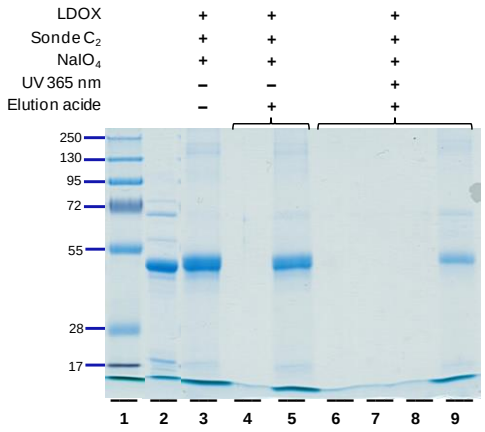


Figure 58. Irradiation de sondes photoclivables immobilisées sur le support d'affinité

Capture et photoélution de la LDOX fixée à la sonde C2

Les conditions d'élution étant mises au point, l'étape suivante a consisté à évaluer la photoélution du complexe sonde C2-LDOX immobilisée sur les billes magnétiques recouvertes de streptavidine par une analyse sur gel SDS-PAGE. Trois captures de la LDOX (1 éq.) par la sonde C2 (1,8 éq.) ont été effectuées en milieu oxydant en suivant le protocole opératoire optimisé pour la sonde C1. Après l'enrichissement sur billes de streptavidine suivi de plusieurs lavages. Pour le premier lot de capture, les billes ont été directement éluées en conditions dénaturantes avec un tampon Laemmli et l'éluat a été déposé sur le gel. Cette expérience permet de contrôler l'efficacité de la capture (Figure 59, piste 3) ; Pour le second lot de capture, les billes ont été incubées avec un tampon glycine-HCl. Le surnageant a été concentré et déposé sur gel (piste 4) puis les billes restantes ont été dénaturées par un tampon Laemmli et l'éluat déposé sur gel (piste 5) ; Pour le troisième lot, les billes ont été suspendues dans un tampon phosphate suivi d'une irradiation UV à 365 nm durant 30 minutes sous agitation à 4 °C. Le

surnageant résultant a été concentré et déposé sur gel (piste 7) et les billes restantes ont été traitées similairement au deuxième lot (pistes 8 et 9).



Piste 1: marqueur de tailles.

Piste 2 : LDOX partiellement purifiée.

Piste 3 : billes dénaturée au tamponLaemmli.

Piste 4 : billes dénaturée au tampon glycine-HCl.

Piste 5 : billes dénaturées au tampon glycine-HCl puis Laemmli.

Piste 6 : dernier lavage au tampon phosphate.

Piste 7 : surnageant dans le tampon phosphate.

Piste 8 : éluat avec le tampon glycine-HCl après irradiation.

Piste 9 : billes dénaturées par le tampon Laemmli après irradiation et élution acide.

Figure 59. Evaluation du photoclivage de la sonde C2 à 365 nm après capture de la LDOX

L'analyse de ce gel permet de tirer un certain nombre de conclusions. Premièrement, la sonde C2 en conditions oxydantes est également capable de capturer la LDOX (pistes 3, 5 et 9). Deuxièmement, le complexe-sonde C2-LDOX n'est pas décroché des billes par la seule action du tampon glycine-HCl, confirmant la compatibilité de ce tampon avec la présence du complexe sur les billes (pistes 4 et 5). Troisièmement, la LDOX n'est toujours pas libérée sous irradiation (piste 8). La LDOX reste liée à la sonde C2 qui est immobilisée sur le support d'affinité et n'est relarguée uniquement que lorsque l'interaction biotine-streptavidine est dénaturée par l'action du tampon Lammeli (piste 9).

A ce stade, trois hypothèses peuvent être formulées pour expliquer l'absence de LDOX libérée lors de l'irradiation de la sonde C1 et C2 fixées au support d'affinité :

- l'instabilité du groupement photoclivable dans les conditions oxydantes de capture

- une photolyse inefficace (source d'irradiation pas suffisamment puissante)

- un effet "parasol" de LDOX liée à la sonde

Trois études ont donc été menées pour vérifier ces trois hypothèses. La première concerne la stabilité du groupement photoclivable dans les conditions de capture. Une dénaturation de ce groupement pouvant le rendre inopérant durant l'étape ultérieure de photoclivage.

Etude de la stabilité du groupement photoclivable en conditions oxydo/réductrices par RMN et SM

L'intégrité du groupement photosensible dans les conditions de capture (solution $NaIO_4$ puis de DTT) a été contrôlée sur la sonde **43a** à l'aide d'un suivi RMN. Cette sonde a été privilégiée aux sondes C1 ou C2 car la présence de catéchine qui évolue très rapidement lors des traitements oxydants ne permet pas de réaliser un suivi RMN précis. A une solution du composé **43a** (D_2O/ACN-d_3, 1 éq.) est ajoutée une solution de $NaIO_4$ dans D_2O (5 éq.) suivie d'une agitation manuelle. La RMN ^1H est réalisée au bout de 5, 10, 15 et 20 minutes. Passé ce temps, une solution de DTT 1 M dans D_2O est ajoutée au mélange et la RMN ^1H est réalisée au bout de 5 min et 65 min d'agitation manuelle (correspondant au temps de désactivation et d'incubation avec des billes de streptavidine). Parallèlement, une solution du composé **43a** est directement traitée avec DTT (Schéma 38).

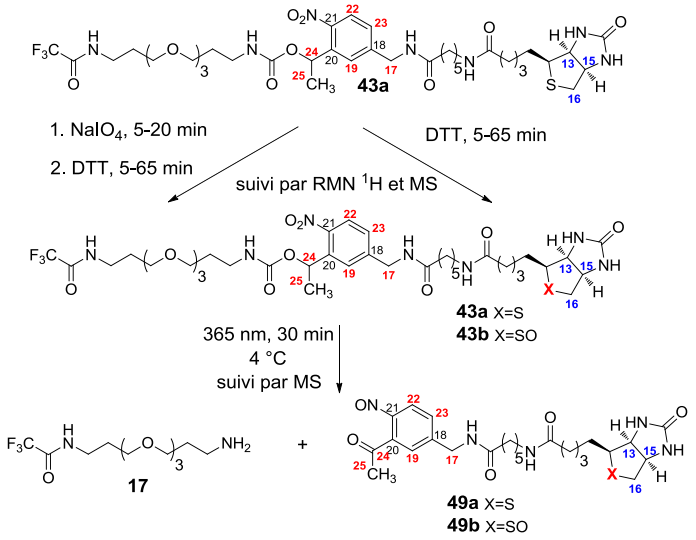


Schéma 38. Stabilité de groupement d'*o*-nitrobenzyle lors des traitements oxydo/réducteurs

Sur les spectres RMN ^1H des différents échantillons, aucune modification n'est observée indiquant une certaine stabilité au cours du temps du composé **43a** malgré l'ajout de $NaIO_4$ ou de DTT. Par contre, l'ajout de $NaIO_4$ oxyde le soufre de la biotine en sulfoxyde confirmé par un déblindage des protons en position 13, 15 et 16 (Figure 60).[296,297] L'analyse en masse confirme cette oxydation de la biotine avec un incrément de masse de 16 Da correspondant à l'addition d'un atome d'oxygène qui n'est pas observé en l'absence de $NaIO_4$ (Schéma 37).

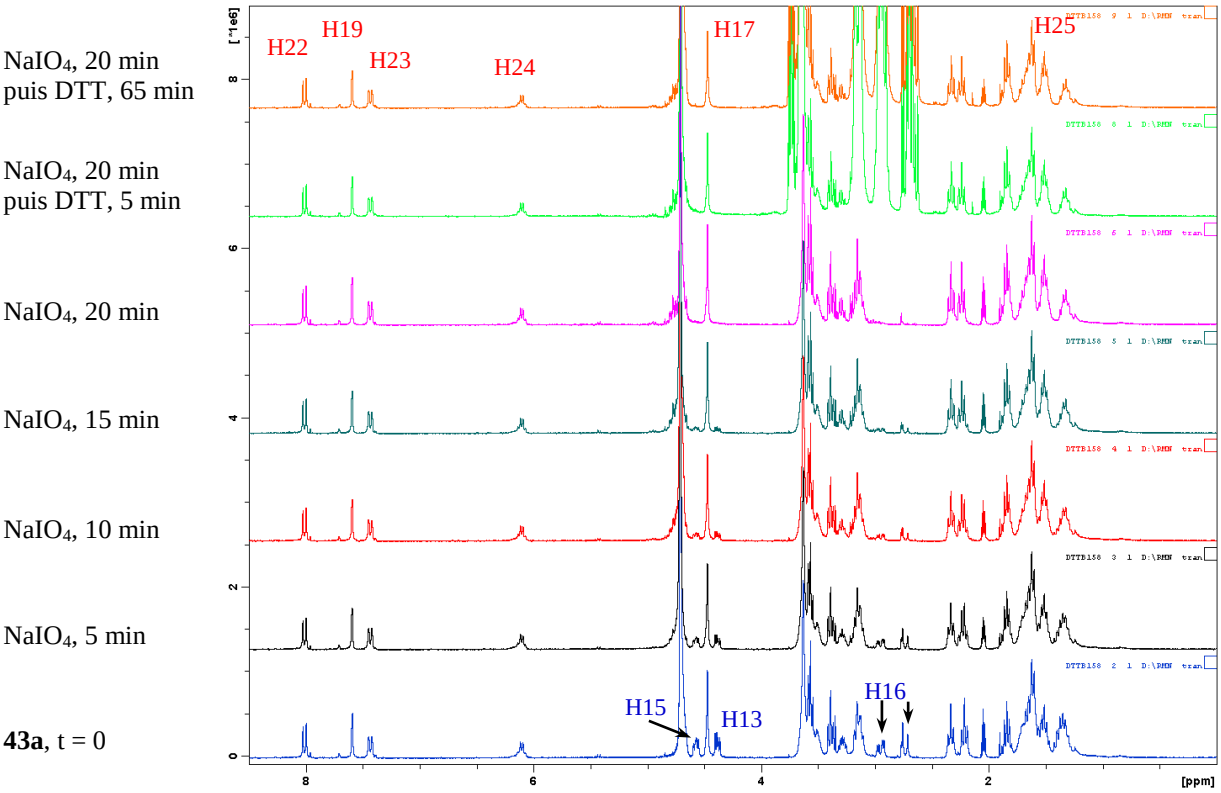
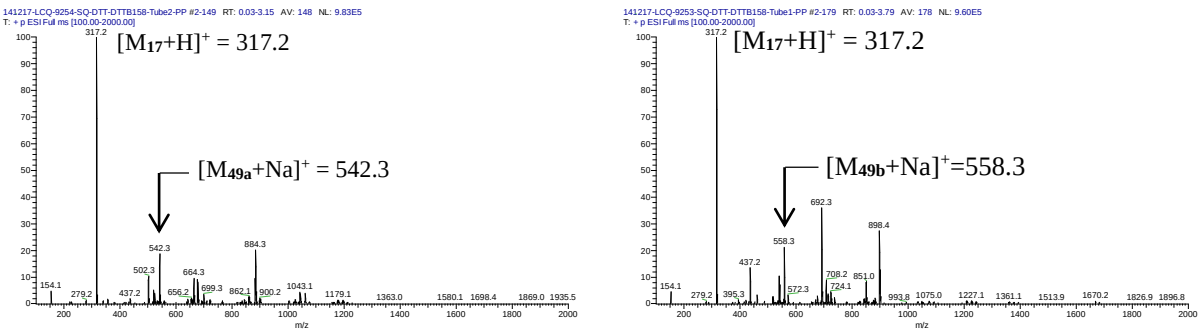


Figure 60. Stabilité du groupement d'*o*-nitrobenzyle en conditions oxydantes

Par ailleurs, le photoclivage du groupement *o*-nitrobenzyle du composé **43a** après des traitements oxydo/réducteurs a également été vérifié. Le composé **43a** irradié à 365 nm durant 30 minutes ayant subi, soit un traitement oxydant puis réducteur ($NaIO_4$ suivi par DTT), soit uniquement un traitement réducteur (DDT), conduit dans les deux cas aux composés de photoclivage attendus (**17**, **49a** et **49b**) confirmant l'efficacité du photoclivage (Figure 61).



Après incubation avec DTT

Après incubation avec $NaIO_4$ suivie par DTT

Figure 61. Photoclivage du composé 43a après incubation en conditions oxydo/réductrices

Photoclivage des sondes en présence d'un sensibilisateur

L'intégrité du groupement photosensible vérifié dans les conditions oxydo/réductrices utilisées, le photoclivage du complexe sondes C2-LDOX fixé sur le support d'affinité a été étudié en présence d'un sensibilisateur à l'aide de différentes sources d'irradiation.

Dans le cas où la source d'irradiation ne permet pas d'exciter efficacement ou directement le groupement photolabile *o*-nitrobenzylique (faible coefficient d'absorption ou effet "parasol" d'une macromolécule liée à la sonde par exemple), un sensibilisateur jouant le rôle de médiateur photochimique peut être utilisée (Schéma 38).[298–301] Des études menées par Wöll et *al.*,[300] mais également par Pirrung et *al.*,[301] sur des dérivés comportant un groupement 2-(2-nitrophényl)propoxycarbonyle (NPPOC) ont montré que la thioxanthone peut être excitée à l'état singulet ou triplet par une source UV ou à 2 photons avant de transférer son énergie intra- ou intermoléculairement au NPPOC (Schéma 38).

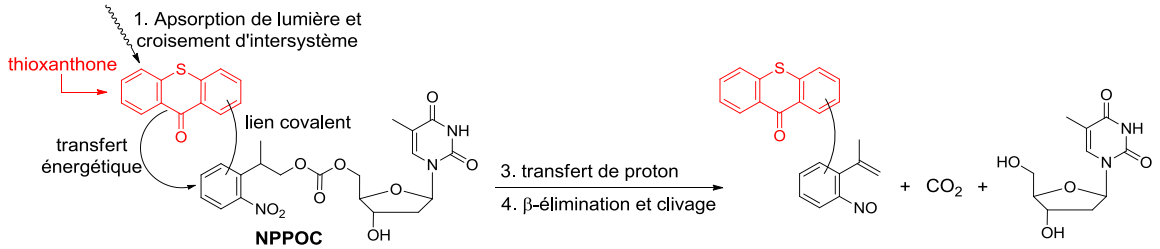


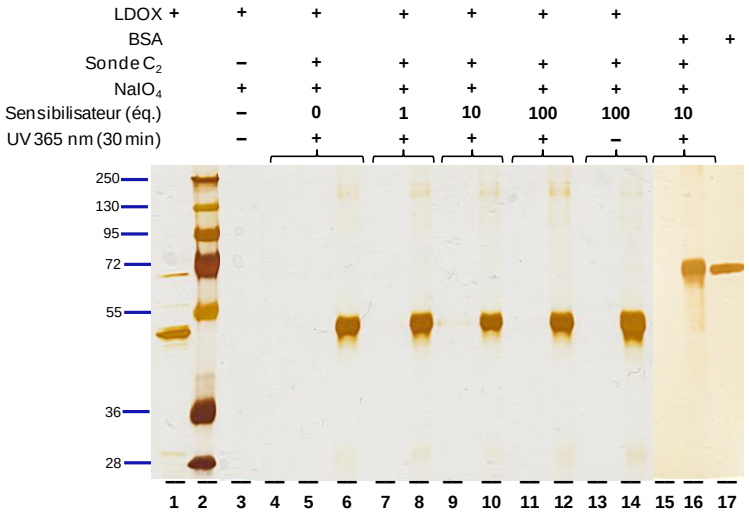
Schéma 38. Sensibilisation intramoléculaire du groupe NPPOC à l'aide du thioxanthone

L'efficacité de cette photodéprotection indirecte dépend de plusieurs facteurs. De façon générale, un transfert intramoléculaire est plus efficace qu'un transfert intermoléculaire. Cependant, Wöll et *al.*[300] ont récemment rapporté que dans le cas de nucléotides fixés sur un support solide (puces ADN), la sensibilisation intermoléculaire du NPPOC par la thioxanthone excitée à deux photons peut être plus efficace que celle intramoléculaire pour des concentrations supérieures à 5 mM de sensibilisateur.[299] Par contre, dans le cas d'une irradiation indirecte sous UV à 365 nm, Pirrung et *al.* ont montré que la meilleure déprotection de NPPOC n'est observée qu'en présence d'une quantité limitée à 10% molaire de thioxanthone libre.[301] La présence importante de la thioxanthone peut donc nuire au photoclivage sous UV à 365 nm et être, en revanche, favorisée sous irradiation à l'aide d'une source laser.[301]

Dans notre cas, le photoclivage de la sonde C2 en présence de thioxanthone (TX) par irradiation à un photon sous UV et à deux photons a donc été testé.

Une première série d'essais a été réalisée sous irradiation UV à 365 nm en présence de TX. Le complexe sonde C2-LDOX immobilisée sur des billes de streptavidine, est irradiées pendant 30 minutes en l'absence ou présence de 1, 10 et 100 équivalents de TX par rapport à la

sonde engagée dans l'étape de fixation. En parallèle, des contrôles ont été réalisés en l'absence de sonde C2, en l'absence d'irradiation et en l'absence de LDOX remplacée par la BSA. L'ensemble des surnageants et des billes photolysées est dénaturé puis déposé sur gel d'électrophorèse (Figure 62).

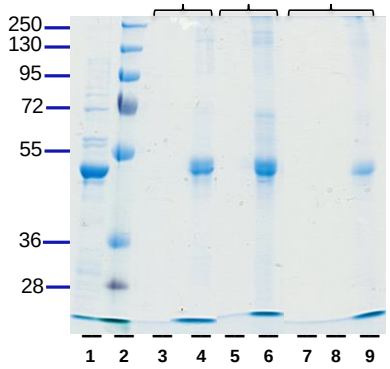


Piste 1: LDOX partiellement purifiée
Piste 2: marqueur de tailles
Piste 3: LDOX + $NaIO_4$ sans sonde C2
Piste 4: dernier lavage au tampon phosphate 25 mM pH = 7,4
Piste 5: surnageant sans TX
Piste 6: billes dénaturées après photolyse sans TX
Piste 7: surnageant avec 1 éq. de TX
Piste 8: billes dénaturées après photolyse avec 1 éq. de TX
Piste 9: surnageant avec 10 éq. de TX
Piste 10: billes dénaturées après photolyse avec 10 éq. de TX
Piste 11: surnageant avec 100 éq. de TX
Piste 12: billes dénaturées après photolyse avec 100 éq. de TX
Piste 13: surnageant avec 100 éq. de TX sans irradiation
Piste 14: billes dénaturées après incubation avec 100 éq. de TX sans irradiation
Piste 15: surnageant avec 10 éq. de TX
Piste 16: billes dénaturées après photolyse avec 10 éq. de TX
Piste 17: BSA commerciale

Figure 62. Evaluation du photoclivage en présence du sensibilisateur (TX)

L'analyse du gel obtenu par coloration au nitrate d'argent montre tout d'abord l'efficacité de capture de la LDOX par la sonde C2 en conditions oxydantes (piste 6), l'efficacité des lavages réalisés (piste 4), et l'absence de capture de la LDOX sans activation au $NaIO_4$ (piste 3). En présence du complexe sonde C2-LDOX, la protéine n'est pas observée dans les surnageants après 30 minutes d'irradiation que ce soit en l'absence ou en présence de TX dans des quantités croissantes (pistes 5, 7, 9 et 11). Elle n'est pas relarguée non plus durant l'incubation sans irradiation avec ce sensibilisateur (piste 13). Dans tous les cas, la LDOX est retenue sur les billes par la sonde et ne peut être décrochée de ce support qu'à l'aide du tampon Laemmli (pistes 6, 8, 10, 12 et 14). Les mêmes résultats sont observés dans le cas de la BSA indiquant un comportement similaire pour des protéines de nature différentes.

Une deuxième série d'essais a été réalisée sous irradiation à deux photons fournie par un laser disponible au sein du Groupe Phoenics de l'ISM et en présence de TX. Les billes obtenues après l'étape d'enrichissement sont suspendues dans un tampon phosphate et introduites dans une cuve en quartz en présence d'une solution de TX solubilisée dans de l'acétonitrile (50 éq. par rapport à la sonde C2). L'irradiation est réalisée grâce à une émission d'IR à 770 nm pendant 4 heures à t.a. (Figure 63).



Piste 1 : LDOX partiellement purifiée
Piste 2 : marqueur de tailles
Piste 3 : dernier lavage au tampon phosphate 25 mM, pH = 7,4
Piste 4 : contrôle de capture
Piste 5 : surnageant après 4 heures d'irradiation avec TX
Piste 6 : billes dénaturées après 4 heures d'irradiation avec TX
Piste 7 : surnageant après 4 heures avec TX sans irradiation
Piste 8 : surnageant avec TX sous irradiation à 365 nm
Piste 9 : billes dénaturées avec TX sous irradiation à 365 nm

Figure 63. Tentative de photoclivage à deux photons

L'analyse du gel d'électrophorèse indique l'absence de LDOX dans le surnageant (piste 5). Celle-ci elle est uniquement relarguée des billes lorsque les billes sont dénaturées à l'aide du tampon Laemmli (piste 6). Cependant dans le cas présent il est difficile de conclure sur l'efficacité de ce type d'irradiation. En effet, l'absence d'agitation liée à des contraintes opératoires ne permet pas une irradiation homogène des échantillons (les billes ont tendance à se déposer au fond de la cuve).

La présence d'un médiateur photochimique quelle que soit la source d'irradiation ne permet donc pas de libérer la LDOX lors de l'irradiation de la sonde C2 fixée au support d'affinité et la puissance insuffisante de la source d'irradiation peut être écartée compte tenu de la photoélution observée dans le cas où seules les sondes C1 ou C2 sont fixées sur les billes. La troisième hypothèse liée à la présence de la LDOX sur ces sondes susceptibles de nuire au photoclivage a donc été étudiée.

<u>Photoclivage de sondes ayant été fixées à la LDOX en solution</u>

Cette étude a été réalisée sur les complexes de sonde C1- ou C2-LDOX en solution en l'absence du support d'affinité. Dans ces expériences, les sondes C1 et C2 (1,8 éq.) sont incubées avec la LDOX (1 éq.) puis activées à l'aide d'une solution de $NaIO_4$ (50 éq. par rapport à la sonde) suivie d'une désactivation au DTT. Pour chaque solution obtenue, une partie est conservée sans irradiation ($t_{irradiation}$ = 0 min) et deux autres sont respectivement irradiées à 365

nm durant 30 et 60 minutes à 4 °C. Parallèlement, des contrôles négatifs sont réalisés dans les mêmes conditions mais en l'absence de $NaIO_4$. Tous les échantillons collectés sont ensuite traités avec un tampon Laemmli à 95 °C durant 10 minutes pour supprimer les interactions non covalentes entre les sondes et la LDOX et déposés sur gel SDS-PAGE. Le gel obtenu est par la suite révélé par Western blot avec un anticorps anti-biotine/anticorps anti-souris-HRP pour visualiser uniquement les protéines biotinylées (Figure 64).

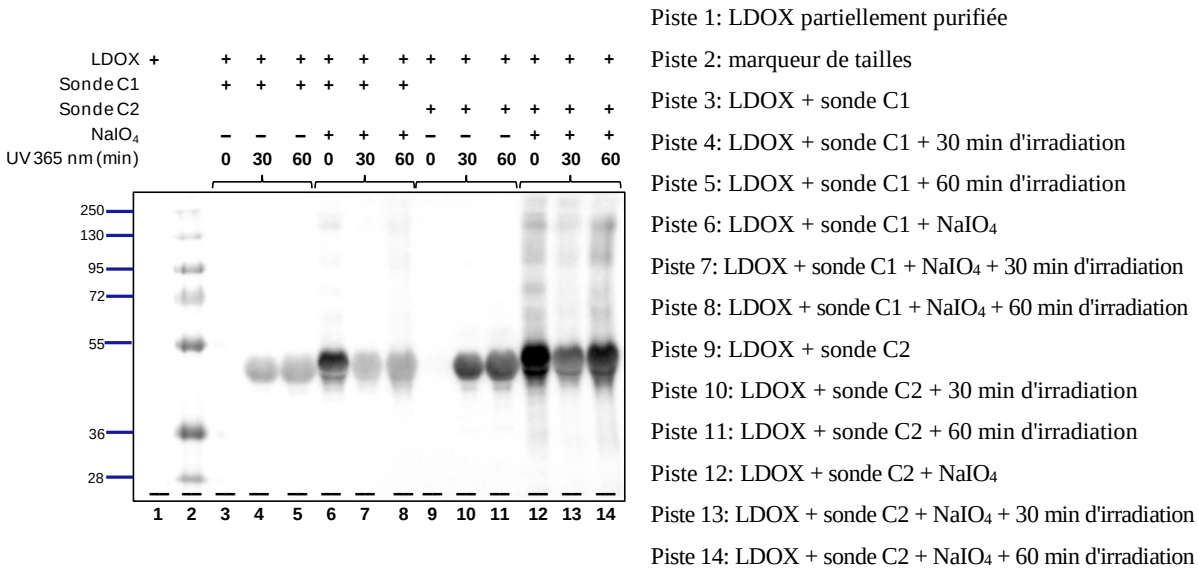


Figure 64. Evaluation du photoclivage en solution des sondes C1 et C2 ayant fixées la LDOX

L'analyse du Western blot sur lequel n'apparaît que des protéines liées de façon covalente à une biotine montre premièrement l'efficacité et la fiabilité du protocole de capture de la LDOX de façon covalente par les sondes C1 et C2 en conditions oxydantes (pistes 6 et 12). En l'absence de $NaIO_4$, aucune protéine biotinylée n'est détectée lorsque les sondes n'ont pas été activées (pistes 3 et 9). Ceci est en accord avec l'absence de réponse de la LDOX partiellement purifiée (piste 1). Deuxièmement, la quantité de LDOX fonctionnalisée par les sondes est diminuée due à la libération du fragment contenant la biotine lors de l'irradiation (pistes 7, 8, 13 et 14). Cette observation confirme que le photoclivage des sondes fixées à la LDOX est opérationnel. La proximité de la LDOX par rapport au groupement photoclivable ne perturbe donc pas l'étape de photolyse. Par contre, l'apparition de LDOX biotinylée en présence de sondes non activées (pistes 4, 5, 10 et 11) suggère un autre type de biotinylation. Pour ces échantillons, on peut supposer que le photoclivage a bien eu lieu relarguant la protéine non-biotinylée et un fragment comportant un groupement nitroso hautement réactif pouvant réagir avec les résidus nucléophiles voisins de la protéine pour reformer un lien covalent (Schéma 40).[302] De plus, l'importance de cette capture parasite serait proportionnelle au temps d'irradiation (comparaison des pistes 7 et 8 ainsi que 13 et 14, Figure 64).

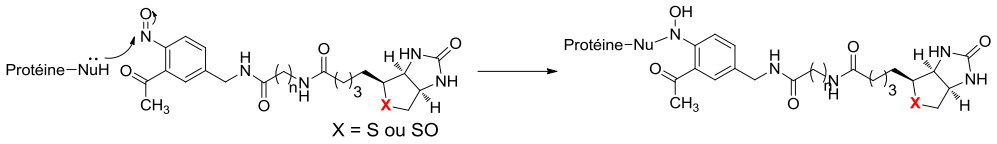


Schéma 40. Recapture de la protéine par le groupement nitroso biotinylé généré photochimiquement

Il semble cependant que ce phénomène ne soit pas observé au cours du photoclivage des sondes seules, non liées à la LDOX, en solution ou des sondes seules immobilisées sur le support d'affinité suggérant une diffusion rapide de la catéchine modifiée **46** empêchant qu'elle ne soit recapturée par les fragments nitroso biotinylés.

Dans le but de limiter la capture supposée de la LDOX par l'intermédiaire du groupement nitroso photogénéré, les billes de streptavidine après immobilisation de la sonde-LDOX ont été soumises à une photolyse en présence d'une concentration importante de nucléophiles comme la cystéamine ou l'hydrazine pour tenter de piéger compétitivement le groupement nitroso. Ces conditions n'ont cependant pas permis de relarguer la LDOX des billes.

A ce stade, la streptavidine ou la LDOX pris indépendamment ne semble pas rendre non opérative la photolyse des sondes. Par contre, le photoclivage des sondes fixées à la LDOX sur le support d'affinité est toujours inopérant. Les deux macromolécules de part et d'autre de la sonde pouvant provoquer un effet "sandwich", un manque d'accessibilité au niveau du site photoactivé par les nucléophiles rajoutés peut être avancé. Une modélisation par docking de la sonde B1 fixée dans le site actif de la LDOX permet de bien appréhender la topologie moléculaire autour de la sonde et d'anticiper sur la topologie du complexe sonde C-LDOX fixé sur le support d'affinité lors de l'irradiation (Figure 65).

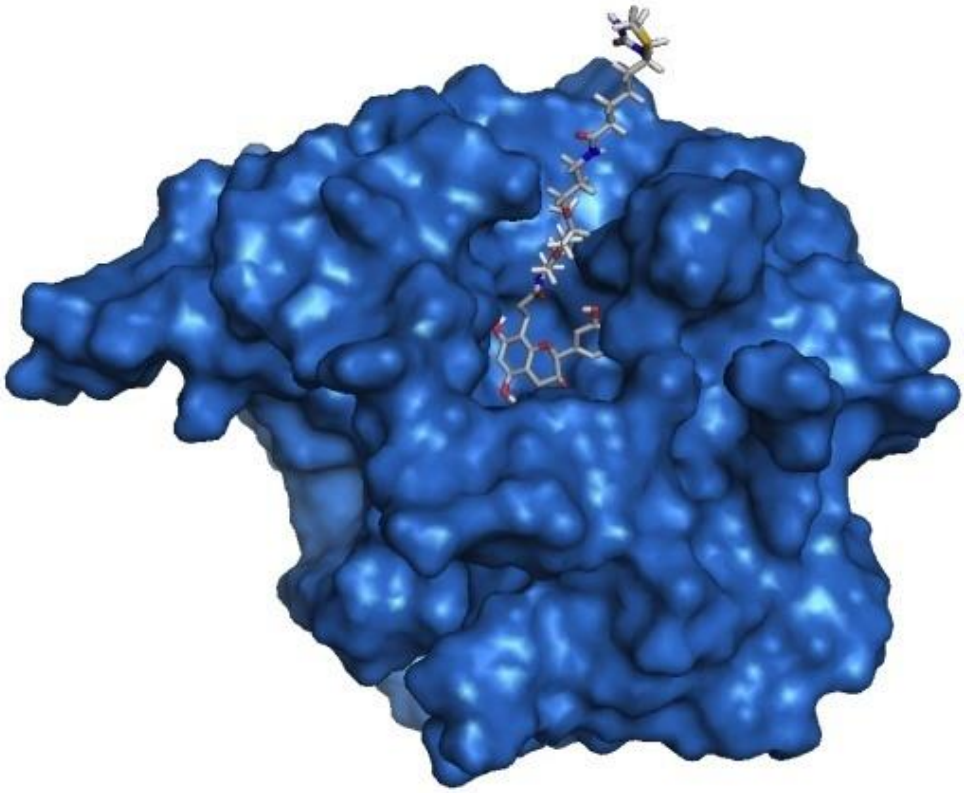


Figure 65. Docking de la sonde B1 liée au site actif de la LDOX

Dans le cas où la sonde est à la fois liée à la LDOX et au support solide, l'attaque des résidus nucléophiles de la protéine au niveau du groupement nitroso photogénéré serait cinétiquement favorisée par rapport à une attaque nucléophile extérieure et par conséquence, la protéine resterait liée au support solide. Une alternative peut consister à brider la réactivité du groupement nitroso photochimiquement formé. Par exemple, Pirrung et *al*. ont conçu une structure dérivée de ces 2-nitrobenzyles permettant de piéger le groupement nitroso résiduel.[303] Ces nouveaux dérivés subissent une cycloaddition Diels-Alder *in situ* du groupement nitroso formé sous irradiation avec un groupement diène préalablement installé en position benzylique du photolyte (Schéma 41). Ces dérivés pentadiénylnitrobenzyliques ont été utilisés comme groupes protecteurs de fonctions acide carboxylique, alcool ou amines.[217,218,219]

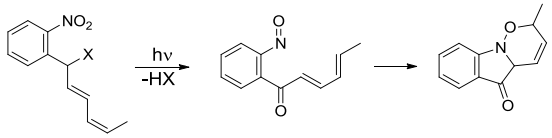


Schéma 41. Piégeage intramoléculaire du groupement nitroso par cycloaddition Diels-Alder[303]

Pour la même raison, un transfert énergétique efficace d'un sensibilisateur excité au groupement photoclivable peut-être remis en cause par manque d'accessibilité.

Afin de s'affranchir de cette recapture de la protéine par le fragment photogénéré fixé au support d'affinité, trois solutions peuvent être proposées :

A : L'utilisation d'un groupement photoclivable ne générant pas de fonction nitroso sous irradiation : un dérivé ester de benzoïne (Tableau 1, Chapitre 1) par exemple.

B : L'utilisation d'un groupement *o*-nitrobenzyle modifié permettant de brider la réactivité de la fonction nitroso photogénérée (par cycloaddition intramoléculaire par exemple).

C : L'utilisation d'un groupement *o*-nitrobenzyle mais uniquement lorsque celui-ci est liée à un peptide ou un composé de faible poids moléculaire, diffusant rapidement sous agitation.

Les trois solutions sont schématisées sur la figure 66 suivante :

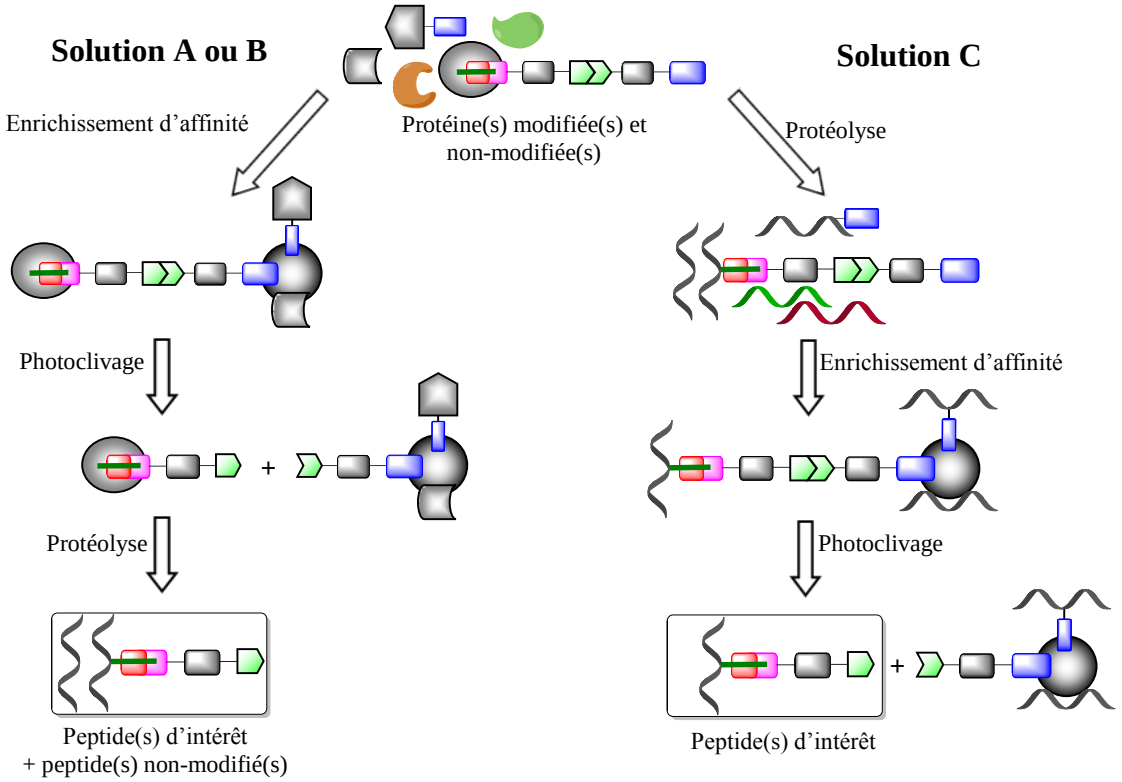


Figure 66. Perspectives pour l'utilisation des sondes photoclivables de type C

6. Conclusion

Dans ce chapitre, les modifications de la (2*R*,3*S*)-catéchine et de la (2*R*,3*R*)-épicatéchine ont été réalisées en six étapes avec des rendements globaux respectifs de 40% et 20% en vue de leur fixation sur des sondes d'affinité. A l'aide de ces flavanols modifiés, la synthèse des sondes photoactivables catéchine A1 et épicatéchine A2 a été réalisée en une dizaine d'étapes avec des rendements respectifs de 2,5% et 1%. Contrairement aux sondes photoactivables de type A, la synthèse de sondes activables par oxydation chimique, plus simples dans leur conception, a été achevée en quatre étapes avec un rendement global de 9% pour la sonde catéchine B1 et de 6% pour celle de l'épicatéchine B2.

La synthèse de ces sondes réalisée, ce travail s'est poursuivi par la validation d'une stratégie de capture par ces sondes à l'aide d'une protéine clé de la voie de biosynthèse des flavonoïdes : la LDOX. Dans un premier temps, des protocoles efficaces de capture de la LDOX à l'aide des sondes B1-2 en conditions oxydantes (par $NaIO_4$ ou $K_3Fe(CN)_6$) ou de la sonde A1 sous activation photochimique ont été mis au point. Puis, des analyses par Western blot et MALDI-TOF ont permis de confirmer la formation d'un lien covalent entre les sondes et la protéine. Lors de ces études, la stratégie de capture par oxydation du flavanol de la sonde s'est avérée plus efficace que celle impliquant la photoactivation du groupement azoture. Le rendement de capture de la LDOX par activation oxydante a été évalué à 13%. A ce stade, l'étude de la sélectivité des sondes a été démontrée sur un mélange de LDOX et BSA. Ces sondes catéchine et épicatéchine sont capables de capturer la LDOX de façon majoritaire dans ces conditions. De plus, la LDOX a été ajouté de façon minoritaire à un mélange complexe de protéines provenant d'un lysat cellulaire de la bactérie *E. coli*. L'analyse protéomique a pu mettre en évidence la capture privilégiée de la LDOX parmi 500 protéines bactériennes.

Enfin, dans le but de localiser le site de fixation des sondes sur la LDOX, une analyse des protéolysats de ces adduits par MALDI-TOF a été réalisée. Cependant, elle n'a pas permis de déterminer la localisation de la sonde sur la LDOX. Des analyses supplémentaires en LC-MS/MS sont donc envisagées. Afin de rendre possible l'identification des zones peptidiques modifiées de la protéine par la sonde ou encore pour détecter des cibles protéiques de polyphénols dans des mélanges complexes, un protocole compatible avec les analyses en masse permettant d'enrichir puis d'éluer uniquement la protéine ciblée par la sonde est nécessaire. Pour ce faire, les sondes photoclivables de type C comportant un lien photoclivable de type *o*-nitrobenzyle ont été conçues et synthétisées avec succès. Le lien photoclivable de type *o*-nitrobenzyle, pouvant être clivé sous irradiation UV proche, a été préparé indépendamment sur 6 étapes à partir de l'acide 5-méthyle-2-nitrobenzoïque commercial avec un rendement global

de 37%. L'introduction d'un carbamate sur ce lien photoclivable pour sa fixation au polyphénol *via* la chaîne PEG a représenté l'un des obstacles de ce travail. La mise au point d'un protocole adapté a cependant permis l'installation d'un carbamate suivie d'une aminolyse *in situ* par la chaîne PEG. La fixation de la catéchine fonctionnalisée sur la chaîne PEG résultante après déprotection a permis l'accès aux sondes photoclivables comportant des espaceurs plus ou moins longs (sondes C1 et C2) avec un rendement global de 14% et 8% respectivement.

Les études préliminaires réalisées à l'aide d'une simple lampe UV pour CCM disponible au laboratoire, ont permis de valider le photoclivage des sondes C, ainsi que leur stabilité en conditions de capture par voie oxydante. Quel que soit leur espaceur incorporé, les analyses en masse ont confirmé le photoclivage de sondes seules ou de sondes immobilisées sur des billes magnétiques recouvertes de streptavidine. Par contre, due à une interaction remarquable entre la streptavidine du support solide et la catéchine, la partie photolysée portant ce flavanol n'a été décrochée des billes que lors d'une élution dans le tampon glycine-HCl. La photolyse des sondes préalablement fixées à la LDOX suivie des analyses par Western blot a pu révéler l'incompatibilité de cette approche avec les groupements nitroso photogénérés hautement réactifs. En effet, ces analyses ont montré que la LDOX, préalablement biotinylée par la sonde, est relarguée sous irradiation mais partiellement recapturée *in situ* par l'addition du groupement nitroso généré lors de la photolyse. Ceci a permis de mettre en évidence le photoclivage des sondes C fixées à la protéine et la compatibilité de la lampe utilisée. Cependant, le photoclivage de ces complexes après l'immobilisation et l'enrichissement sur des billes magnétiques ne permet pas de relarguer la protéine même en présence d'un sensibilisateur. L'encapsulation de la sonde à la fois par le support solide et la LDOX est très vraisemblablement à l'origine de cet échec.

Afin de s'affranchir de cette recapture de la protéine par le fragment photogénéré fixé au support d'affinité, trois solutions peuvent être proposées : l'utilisation d'un groupement photoclivable ne générant pas de fonction nitroso sous irradiation : un dérivé ester de benzoïne (Tableau 1) par exemple, l'utilisation d'un groupement *o*-nitrobenzyle modifié permettant de brider la réactivité de la fonction nitroso photogénérée (par cycloaddition intramoléculaire par exemple), l'utilisation d'un groupement *o*-nitrobenzyle mais uniquement lorsque celui-ci est liée à un peptide ou à un composé de faible poids moléculaire, diffusant rapidement sous agitation.

Chapitre 3

Synthèse de sondes moléculaires pour l'étude des interactions polyphénol-protéine par la technique de Résonance Plasmonique de Surface

Récemment, des études réalisées au sein de l'équipe ont montré que la SPR permettait de discriminer efficacement des interactions spécifiques polyphénol-protéine par rapport à des non-spécifiques en utilisant une statégie d'immobilisation du ligand sur la surface d'une puce de détection (sensor chip) dite "inverse" (Voir Chapitre 1, Figure 28B). Cette stratégie a été validée notamment par l'étude de l'interaction du couple vescaline-topoisomérase IIα (TopIIα),[77] puis étendue à des dérivés de polyphénols de type flavanol (la catéchine et l'épicatéchine) et de type ellagitannin *C*-glucosidique (la vescalagine et la vescaline) modifiés avec un espaceur comportant une biotine terminale (Figure 67). Cette biotine a permis d'immobiliser ces polyphénols modifiés sur des surfaces SPR revêtues de streptavidine pour l'étude d'interactions polyphénol-protéine en temps réel.

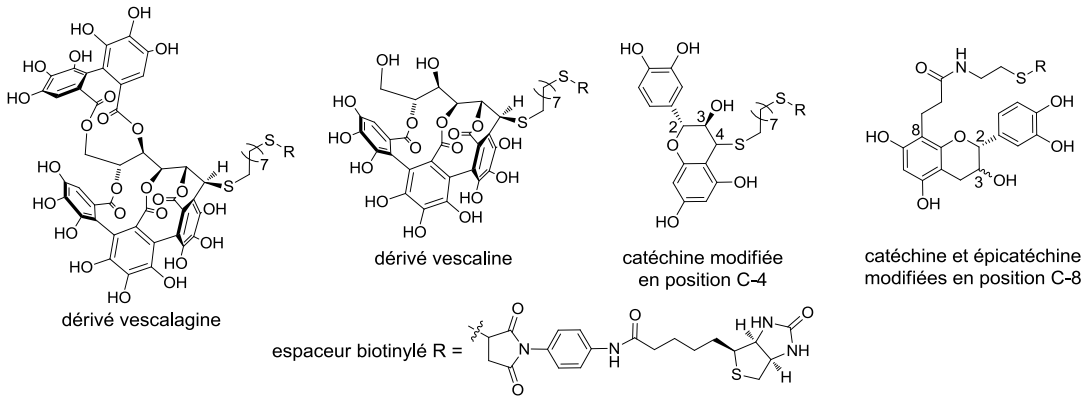


Figure 67. Adduits biotinylés des éllagitannins C-glucosidiques et des flavanols

Dans un premier temps, l'intérêt de cette nouvelle méthodologie d'analyse par SPR a été confirmé à l'aide de trois polyphénols (la vescalagine, la vescaline et la catéchine). Ainsi, la TopIIα et l'actine fibrilaire (F-Actine) ont montré une plus grande affinité pour les polyphénols de type ellagitannin (vescalagine et vescaline) que pour ceux de type flavanol (catéchine

modifiée en position C-4). En particulier, l'association plus importante du système TopIIα-vescalagine que dans le cas des systèmes vescaline et catéchine, a indiqué une préférence d'affinité de la TopIIα pour la vescalagine. Ces résultats sont en accord avec le fait que la vescalagine est un inhibiteur de la TopIIα plus puissant que la vescaline, établi lors d'une étude précédente.[76,304] L'analyse par SPR montre que la protéine TopIIα est capable de discriminer des polyphénols de familles différentes (vescaline, un éllagitannin *C*-glucosidique et catéchine, un flavanol), mais aussi au sein d'une même famille de polyphénols (vescaline et vescalagine, deux ellagitannins *C*-glucosidiques). Ces analyses ont également pu montrer que d'autres protéines (BSA, myoglobine, actine globulaire, streptavidine, collagen type I) n'avaient pas ou peu d'interaction avec les flavanols et les ellagitannins.

Par la suite, l'adduit catéchine modifié en position C-4 et les adduits de catéchine et d'épicatéchine modifiées en position C-8 ont été étudiés pour évaluer l'influence de la nature et de la localisation de l'espaceur sur ces polyphénols vis-à-vis de leurs interactions avec la LDOX dont l'interaction spécifique avec la catéchine est avérée.[99,103,104,150,254] L'analyse des interactions flavanols-LDOX par SPR a montré que la LDOX conserve une affinité sélective pour la catéchine et l'épicatéchine modifiées en position C-8, ce qui est en accord avec les études précédentes.[205] Cette affinité est de plus comparable à celle observée pour la catéchine modifiée en position C-4. Ces différentes expériences ont donc permis de valider l'utilisation de cet outil SPR pour discriminer les interactions entre différents polyphénols et différents types de protéines.

Dans la continuité des travaux précédents, l'objectif de cette étude a été d'étendre cette approche SPR "inversée" par le développement de sondes moléculaires porteuses de nouveaux flavanols d'intérêt : la procyanidine B2, la (–)-épigallocatéchine-3-gallate (EGCG) et des analogues de celle-ci telles que la (+)-gallocatéchine (GC), la (–)-épigallocatéchine (EGC) et la (+)-gallocatéchine-3-gallate (GCG) pour étudier l'interaction de ces polyphénols avec diverses protéines (Figure 68). Ces sondes modifiées avec un espaceur comportant une biotine terminale pourront également être utilisées dans des applications en protéomique chimique.

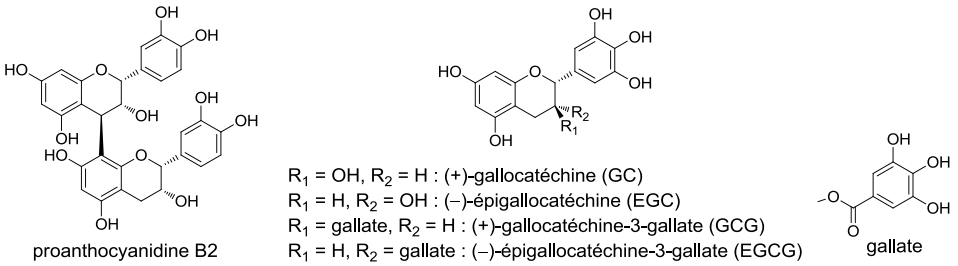


Figure 68. Structure des polyphénols sélectionnés pour développer des sondes d'affinité utilisables en SPR

Les flavanols sélectionnés dans cette étude sont souvent isolés de sources naturelles sous forme de mélanges complexes difficilement purifiables. Par extraction, il est donc délicat d'avoir des molécules pures permettant l'étude de leurs activités biologiques. Pour cette raison, le développement de synthèses ou hémisynthèses efficaces et stéréocontrôlées permettant l'accès à ces flavanols est donc indispensable et constitue le challenge principal de cette étude.

La synthèse de ces sondes a été considérée à partir des lactones de flavanols sélectionnés par réaction d'amidation soit avec la cystéamine suivie d'une addition de Michaël au maléimide biotinylé **50** (voie A), soit directement avec la chaîne PEG biotinylée **29** (voie B). Ces espaceurs biotinylés permettent l'immobilisation de ces sondes sur la surface SPR recouverte de streptavidine en vue de l'étude des interactions polyphénol-protéine en temps réel (Schéma 42).

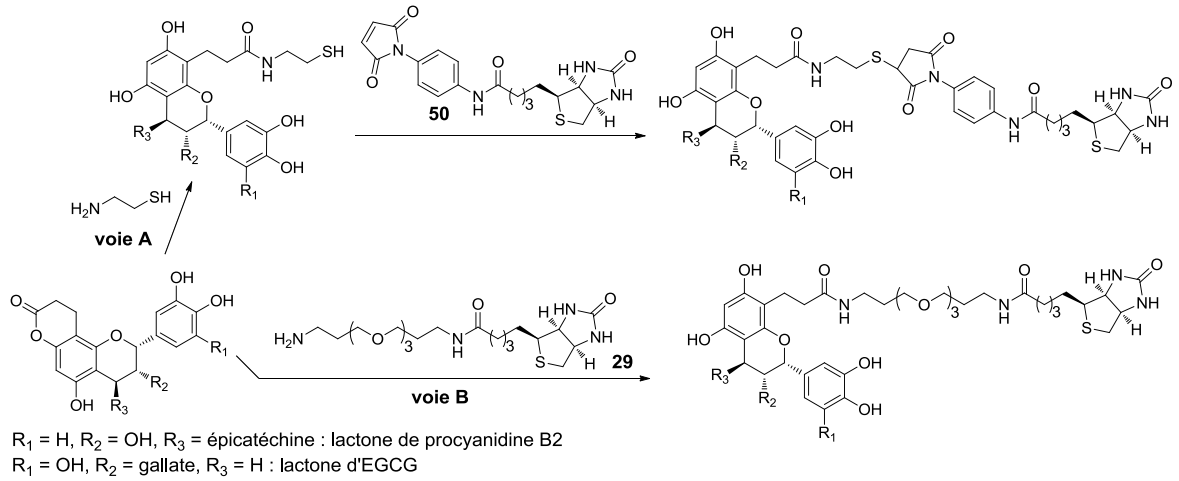


Schéma 42. Voies synthétiques envisagées pour introduire un espaceur portant une biotine terminale

1. Synthèse selon la voie A des sondes porteuses de flavanols

1.1. Préparation de l'espaceur biotine-maléimide

Dans le cas de la voie A, la synthèse du dérivé biotine-maléimide **50** est requise.[241,242] Ce composé, très souvent utilisé dans des applications en biologie, permet d'établir en conditions douces (pH 6.5-7.5 et température ambiante) un lien covalent irréversible et chimiosélective avec un thiol nucléophile d'une cystéine par exemple.[245,305,306] Dans notre cas, ce dérivé permettra, d'une part, de fixer la sonde à la surface modifiée par de la streptavidine d'un sensor chip SPR, et d'autre part, il permettra le couplage de la fonction maléimide avec un thiol terminal d'une petit espaceur préalablement introduit au niveau du flavanol.

La synthèse du dérivé **50**, initialement décrite par Keana et *al.*,[307] a été réalisée précédemment au sein de l'équipe (Schéma 43).[241,242]

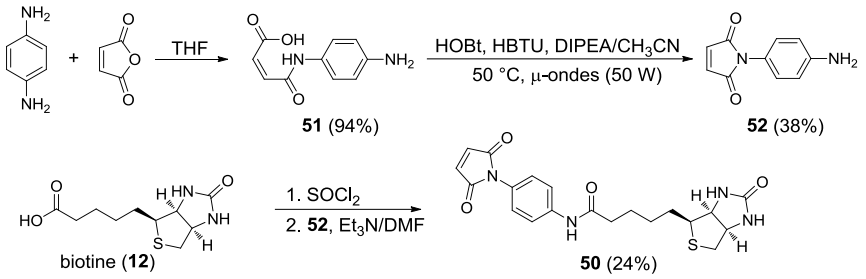


Schéma 43. Préparation du dérivé 50 selon le protocole décrit par Keana et *al.*[307]

Malgré différents essais, les rendements isolés du produit de cyclisation du dérivé de l'acide maléamique **51** et du produit de couplage du *N*-(4-aminophényl)maléimide **52** avec le chlorure d'acide de la biotine commerciale **12** sont restés relativement modestes (38% et 24% respectivement). Ces faibles rendements s'expliquent en partie par un manque de chimiosélectivité de la dernière étape et la nécessité de purifier le dérivé **50** par HPLC semi-préparative.

Afin de s'affranchir de ces inconvénients, un nouveau protocole synthétique a été envisagé en privilégiant la cyclodéshydratation de l'acide maléamique en fin de séquence, la fonction maléimide étant sensible en milieu basique (pH > 8).[245,308] La cyclodéshydratation, lors de cette dernière étape, peut être réalisée par simple chauffage ou en utilisant un agent déshydratant comme le DCC ou l'anhydride acétique en présence d'acétate de sodium.[309] Cette méthode de cyclisation décrite par Schofield *et al.*[167] lors de la préparation d'une fonction d'azoture maléimide privilégiant la formation de la fonction maléimide en fin de séquence semble donc dans notre cas la plus adaptée. En suivant ce nouveau protocole, la synthèse du maléimide biotinylé **50** est réalisée de façon efficace en cinq étapes (Schéma 44).

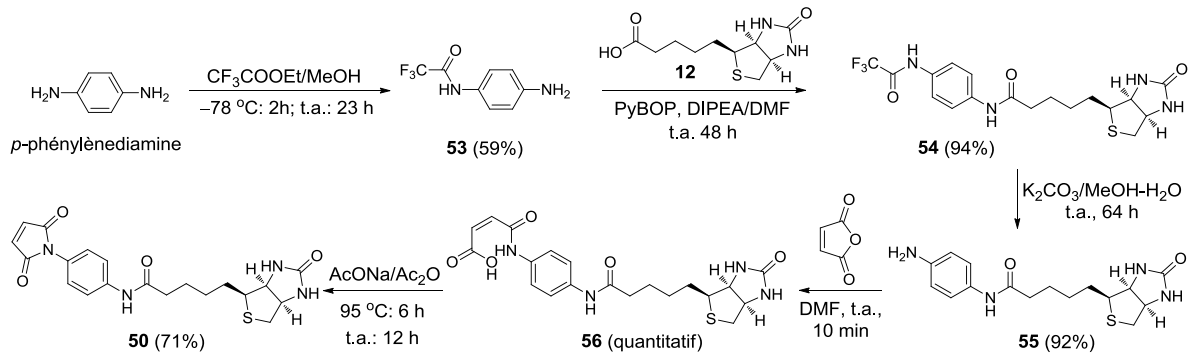


Schéma 44. Préparation de l'espaceur maléimide biotinylé

La première étape consiste en une monoprotection de la *p*-phénylènediamine commerciale par un trifluoroacétate. En appliquant les conditions de monoprotection des diamines décrites par Fixon-Owoo *et al.*,[274] l'amine monoprotégée **53**, est obtenue sous forme d'un solide beige avec un rendement de 59%. Cette étape nécessite cependant une température ambiante de réaction et une durée relativement longue de 23 h. Cette amine est alors engagée dans un couplage avec la biotine commerciale (**12**) activée par le système PyBOP/DIPEA. Le produit **54**, obtenu sous la forme d'un solide blanc, est facilement séparé par une simple filtration suivie de lavages au MeOH/Et_2O, avec un rendement quasi-quantitatif. Par la suite, la déprotection du groupement trifluoroacétamide du produit **54** est réalisée à l'aide de K_2CO_3 dans un mélange de MeOH/H_2O. L'élimination du K_2CO_3 par filtration fournit l'amine biotinylée **55**, jugée par RMN dans un premier temps suffisamment pure pour être directement engagée dans un couplage avec l'anhydride maléique, suivi de la cyclodéshydratation conduisant au maléimide **50** recherché. Cependant, la présence probable de traces résiduelles de K_2CO_3 a conduit à la formation de sous-produits. De plus, la purification sur silice du produit **50** réalisée à l'aide du système CH_2Cl_2/MeOH (9:1) conduit à une dégradation partielle de ce produit lors sa concentration en raison de l'attaque du MeOH sur le maléimide. Une solution a été trouvée d'une part en purifiant l'amine **55** sur silice et d'autre part en préparant l'acide maléamique **56** par l'ajout goutte à goutte d'une solution d'amine **55** dans du DMF à un léger excès d'anhydride maléique solubilisé dans ce même solvant. Après l'évaporation du DMF, l'excès d'anhydride est éliminé par trituration à l'AcOEt permettant d'obtenir quantitativement le produit attendu **56**. Par la suite, la cyclodéshydratation de l'acide **56** est réalisée en chauffant à reflux à 95 °C dans l'anhydride acétique en présence d'acétate de sodium. Le produit **50** étant soluble dans un milieu aqueux acide, ce type de traitement en fin de réaction est à proscrire. Le mélange réactionnel est donc trituré dans l'Et_2O à –20 °C et le solide jaune pâle formé est facilement isolé par filtration, suivie de différents lavages [Et_2O pour éliminer l'anhydride, MeOH/H_2O (1:1) pour solubiliser l'acétate de sodium, MeOH pour enlever les traces d'eau et enfin de nouveau Et_2O pour éliminer les traces de MeOH]. Le maléimide **50** est finalement obtenu avec un rendement de 71% sur les deux dernières étapes.

1.2. Synthèse par la voie A d'une sonde moléculaire porteuse de la procyanidine B2

1.2.1. Bibliographie sur la synthèse des proanthocyanidines de type B

Les synthèses de proanthocyanidines (PAs) de type B à partir d'unités monomériques de flavanols peuvent se faire par addition nucléophile.[310] Cependant les synthèses les plus récentes et les plus souvent décrites dans la littérature sont réalisées par substitution. Ce type de stratégie a permis lors de ces dix dernières années l'accès à différentes PAs de type B avec un bon contrôle du degré d'oligomérisation et une bonne stéréosélecivité.[30,49,311]

La stratégie de substitution consiste à réaliser une réaction de type Friedel-Crafts en présence d'un acide de Lewis permettant de coupler une unité flavanol électrophile, activée en position C-4 (**A***), à une unité flavanol dont les carbones C-8 et C-6 du cycle A possèdent un caractère nucléophile (Schéma 45). Les méthodes développées dans le cadre de cette stratégie ont eu pour objectifs principaux, les contrôles de la régiochimie, de la stéréochimie de la liaison interflavane et du degré d'oligomérisation.[47,49,263,312–315]

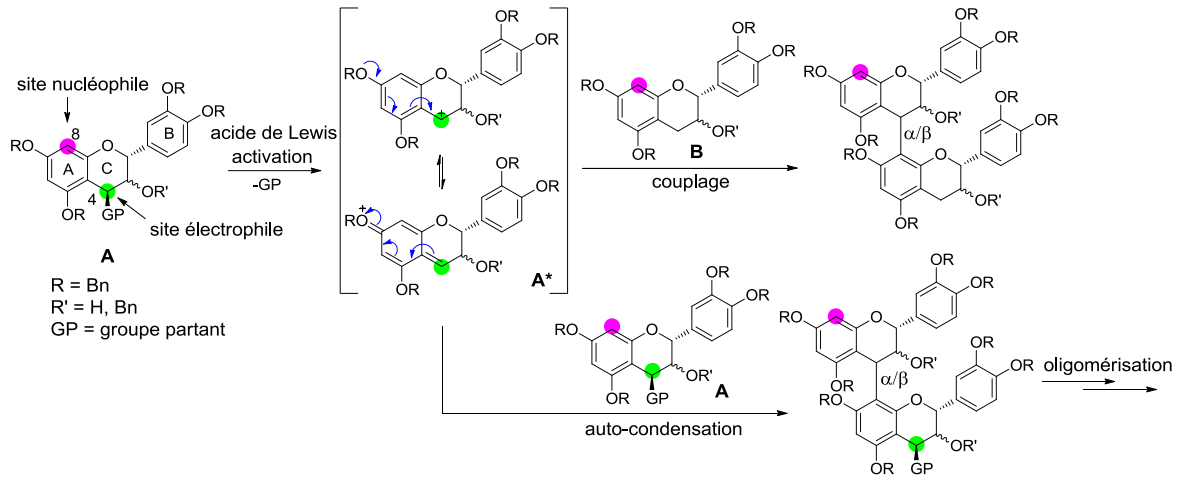


Schéma 45. Stratégie générale de substitution nucléophile pour synthétiser des PAs type B

En ce qui concerne la régiochimie, le couplage préférentiel du carbone C-8 par rapport au carbone C-6 des unités **A** ou **B** avec l'espèce cationique (ou à caractère cationique) **A*** générée en C-4 à l'aide d'un acide de Lewis, est observé lorsque les hydroxyles phénoliques de **A** ou **B** sont protégés par un groupement benzyle.[47,67,263,310,315,316] La régiochimie constatée proviendrait principalement d'un facteur stérique, le carbone C-8 encadré par un seul groupement benzyloxyle libre de rotation étant moins encombré que celui en C-6 encadré par deux benzyloxyles.[49,262,263,311] La stéréosélectivité de la liaison interflavane formée lors de la substitution aromatique électrophile réside dans le choix approprié de l'acide de Lewis et du

groupement partant préalablement introduit en C-4.[49] De nombreux acides de Lewis ont été essayés dans ce contexte dont $TiCl_4$,[263,313,316,317] le trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (TMSOTf),[67,317,318] $AgBF_4$,[47] pour les dimères d'épicatéchine et de catéchine, $SnCl_4$ et BF_3•Et_2O pour l'oligomérisation dela catéchine,[47,315] la montmorillonite K10 pour les dimères et oligomères d'épicatéchine.[312] Parmi ces acides, BF_3•Et_2O est le meilleur candidat en terme de rendement et de stéréosélectivité pour activer la position C-4.[49,315] Le carbone benzylique C-4 pour être efficacement activé doit comporter un bon groupement partant (nucléofuge). Ce groupement est généralement introduit par oxydation sur un flavanol dont les fonctions hydroxyles sont protégées. Dans la littérature, trois principaux réactifs ont été utilisés pour oxyder des flavanols en position C-4, le système $K_2S_2O_8/CuSO_4$ catalytique, le $Pb(OAc)_4$ et la 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ).[67,263,318,319] Actuellement, DDQ est l'oxydant de choix pour réaliser cette réaction d'oxydation. Ce réactif, connu pour former des complexes de transfert de charge avec des substrats aromatiques conduit efficacement et de façon propre aux produits désirés.[47,49,67,263,313,315–318,320] D'un point de vue mécanistique, Steenkamp *et al.*[321] expliquent les régio- et stéréosélectivités observées en C-4 de l'attaque nucléophile du flavanol par une complexation préférentielle du DDQ avec le cycle A, plus nucléophile que le cycle B. De plus, des interactions stériques entre les hydrogènes axiaux en position C-2 et C-4 avec cet oxydant volumineux favoriseraient la complexation prédominante du DDQ avec la face inférieure (α) du cycle A, l'oxydation a donc lieu sélectivement en position 4 plutôt qu'en position 2. L'espèce intermédiaire formée est alors attaquée par un agent nucléophile (le MeOH dans ce cas) par la face β opposée, *via* un processus de substitution nucléophile (Schéma 46).[321] Cependant, la formation minoritaire de produits secondaires d'oxydation résultant d'une complexation différente du DDQ peut être également observée.[263]

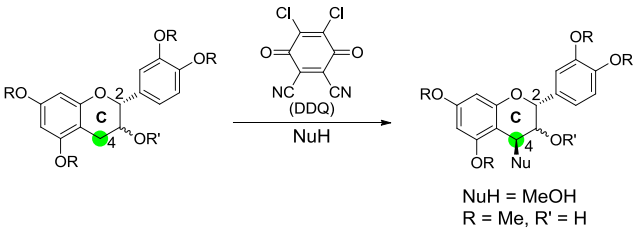


Schéma 46. Oxydation en C4 d'un flavanol proposé par Steenkamp et *al*.[321]

Les rendements de cette réaction d'oxydation/substitution varient significativement suivant la nature de l'agent nucléophile. Dans le tableau suivant sont regroupés quelques exemples d'oxydation/substitution en position benzylique C-4 de la catéchine et de l'épicatéchine par DDQ pour synthétiser des procyanidines (Tableau 4).

Entrée	Flavanol (OR')	Agent nucléophile	Produit d'oxydation C-4 Nu, rendement (%)			Références
1	α-OH	Ethylène glycol	**57b**	OCH_2CH_2OH	52	Tückmantel et *al*.[263]
2	β-OAc	Méthanol	**58a**	OCH_3	97	Saito et *al*.[313]
3	β-OAc	2-Ethoxyéthanol	**59a**	$OCH_2CH_2OC_2H_5$	96	Saito et *al*.[317]
4	β-OBn	Acide acétique	**60a**	$OCOCH_3$	54	Ohmori et *al*.[320]
5	α-OBn	Acide acétique	**60b**	$OCOCH_3$	51	
6	β-OH	Alcool propargylique	**61**	$OCH_2C{\equiv}CH$	98	Hayes et *al*.[49]

Tableau 4. Exemples d'oxydation/substitution en position C4 de la catéchine et de l'épicatéchine tétrabenzylées

Le contrôle de l'auto-condensation conduisant à l'oligomérisation lors de la substitution électrophile aromatique activée par un acide de Lewis peut être réalisé par deux méthodes. La première méthode consiste à utiliser un excès d'unité nucléophile (au moins 3 équivalents). Cette approche permet de raccourcir la synthèse mais peut rendre l'étape de purification difficile.[47,67,263] La deuxième méthode repose sur le blocage temporaire de la position C-8 du cycle A de l'unité électrophile par un atome de brome. Cette stratégie nécessite deux étapes supplémentaires, mais elle permet de travailler en quantités stœchiométriques et de bien contrôler le degré d'oligomérisation. L'étape de purification s'en trouve facilité.[47,315,316]

La première stratégie de synthèse a été développée par Tückmantel et *al*. en 1999 et repose sur une étape de couplage réalisée à température ambiante avec de l'épicatéchine tétrabenzylée activée **57b** (1 éq) et son précurseur **1b** (4 éq) en présence de $TiCl_4$ (2 éq) dans un mélange de CH_2Cl_2/THF (Schéma 47).[263]

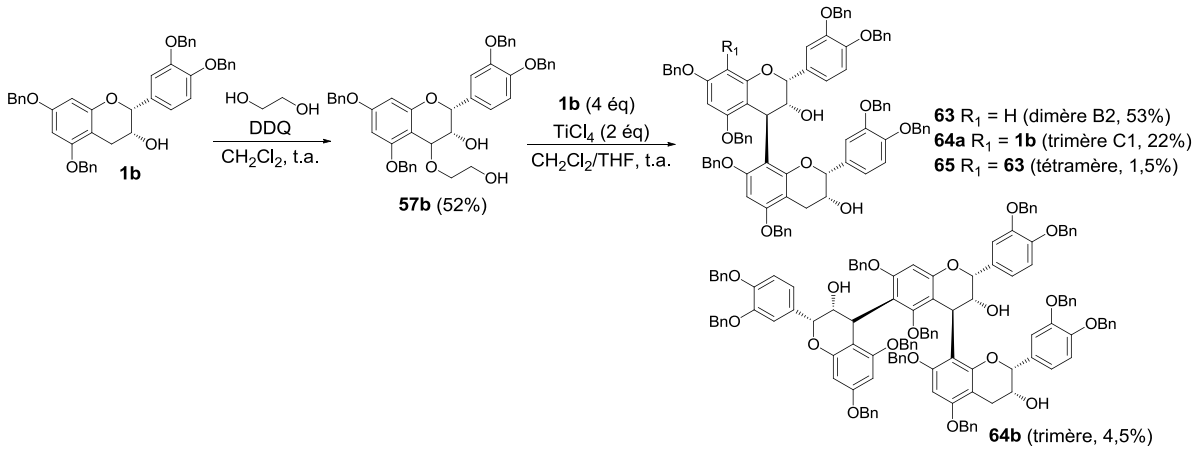


Schéma 47. Synthèse de la procyanidine B2 par Tückmantel et *al*.[263]

Dans ces conditions de couplage, le dimère B2 octabenzylé **63**, deux trimères **64a** et **64b** dont la procyanidine C1, et un tétramère **65** ont été formés et possèdent tous une stéréochimie β pour les liaisons interflavanes.[263,312] En 2003, cette même équipe de recherche a pu améliorer le contrôle de la régiochimie et maîtriser le degré d'oligomérisation de cette réaction en remplaçant le $TiCl_4$ par la montmorillonite K10, une argile acide constituée d'aluminosilicates. Avec ce nouvel acide de Lewis, le dimère B2 **63** est obtenu avec un rendement de 92% après purification chromatographique.[312]

En 2002, Saito et *al.* ont réalisé la condensation de la 3-acétoxy-4-méthoxycatéchine tétrabenzylée (**58a**, 1 éq) avec son précurseur **1a** (ca. 5 éq) dans du CH_2Cl_2 à 0 °C en utilisant un seul équivalent de $TiCl_4$.[313] Dans ces conditions, le couplage permet d'accéder à la procyanidine B3 octabenzylée **66** avec un bon rendement de 83% et une haute stéréosélectivité (4α:4β = 23:1). Saito et *al.* ont par la suite amélioré à la fois le rendement de la procyanidine B3 (97%), mais également la stéréosélectivité du couplage (4α:4β > 48:1) en remplaçant l'acide de Lewis $TiCl_4$ par le TMSOTf et en activant la catéchine protégée en position C-4 par le 2-éthoxyéthanol en présence de DDQ (Schéma 48).[314,317]

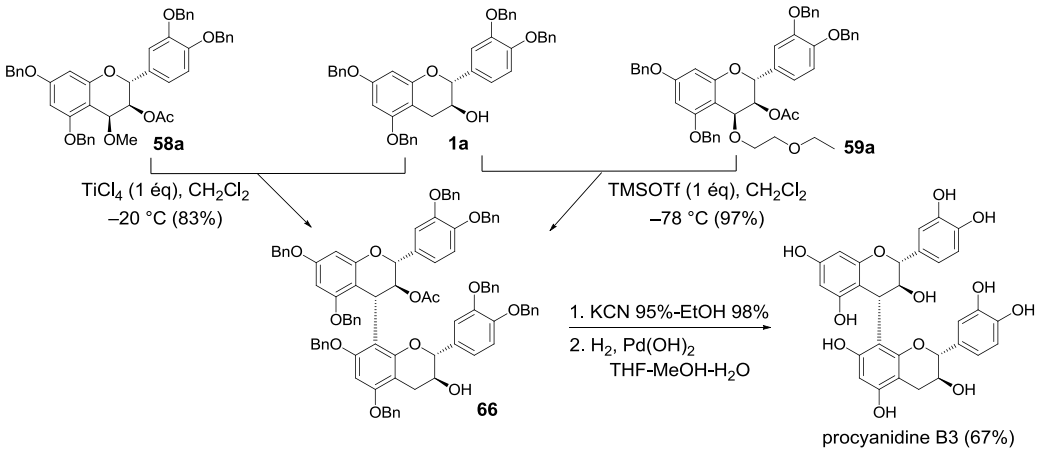


Schéma 48. Synthèse de la procyanidine B3 par de Saito et *al.*[313,314,317]

Une alternative permettant à la fois de réduire l'excès de partenaire nucléophile et de contôler efficacement l'oligomérisation a été proposé par Ohmori et *al.*[47,315] Elle consiste à bloquer temporairement la position C-8 par un atome de brome permettant un couplage équimolaire des partenaires, associé à un mode d'activation orthogonale permettant de bloquer rapidement l'oligomérisation (Schéma 49).

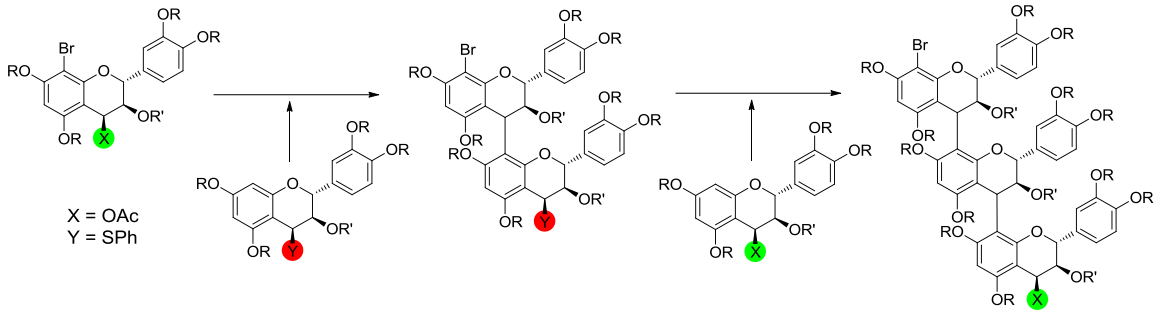
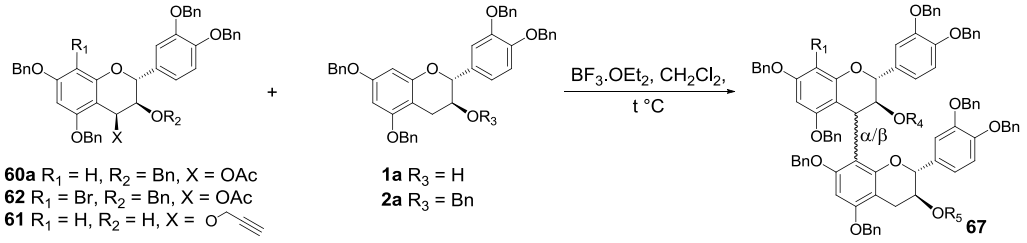


Schéma 49. Activation orthogonale en position C-4 des oligomères de catéchine proposée par Ohmori et *al.*[47,315]

L'étape d'activation orthogonale repose sur le choix d'une combinaison appropriée du groupement partant en position C-4 et de l'acide de Lewis activateur. Deux combinaisons ont ainsi été mises au point, le groupement acétate pour une activation "dure" à l'aide de BF_3•OEt_2 et le groupement thiophényle pour une activation "douce" en présence de *N*-iodosuccinimide (NIS). Dans le cas de la dimérisation de la catéchine, l'utilisation de la première combinaison permet d'obtenir la procyanidine B3 avec un rendement et une stéréosélectivité satisfaisants (Schéma 50, entrées 1-3).[47] Ces résultats sont similaires à ceux de Hayes et *al.*[49] obtenus pour différents dérivés 4-alkoxylés de la catéchine (propanoxyle, crotyloxyle et propargyloxyle) et différents acides de Lewis activateurs incluant TMSOTf, Cp_2HfCl_2•$AgClO_4$, $SnCl_4$, BF_3•OEt_2, ce dernier acide conduisant aux meilleurs résultats, dans le cas de la procyanidine B3 (Schéma 50, entrée 4).[49]



60a R_1 = H, R_2 = Bn, X = OAc
62 R_1 = Br, R_2 = Bn, X = OAc
61 R_1 = H, R_2 = H, X =

1a R_3 = H
2a R_3 = Bn

Entrée	Unité électrophile	Unité nucléophile	$BF_3.OEt_2$	Température	Produits 67		Références
					Rdt (%)	α:β	
1	**60a** (1 éq)	**2a** (3 éq)	1 éq	–30 °C	94	90:10	Ohmori et *al.*[47]
2	**60a** (1 éq)	**2a** (1,2 éq)	1 éq	–30 °C	59	90:10	
3	**62** (1 éq)	**2a** (1,2 éq)	1 éq	–78 → –30 °C	88	86:14	
4	**61** (1 éq)	**1a** (3 éq)	1,5 éq	–78 °C	78	90:10	Hayes et *al.*[49]

Schéma 50. Dimérisation de catéchine selon Ohmori et Hayes

En tirant avantageusement parti du blocage en position C-8 de l'unité électrophile, Tarascou et *al.* ont récemment synthétisé plusieurs procyanidines de type C4-C8 (les dimères

B1, B2, B3 et B4, les trimères C2 et (catéchine)$_2$-épicatéchine ainsi que le tétramère (catéchine)$_4$) en condensant en quantités stœchiométriques des unités nucléophiles (la catéchine ou l'épicatéchine tétrabenzylées **1a-b**) et leurs partenaires électrophiles protégés temporairement en position C-8 par un atome de brome et activés en position C-4 par l'éthylène glycol **68a-b**. Les couplages réalisés à l'aide du $TiCl_4$ dans ces conditions ont permis d'obtenir ces procyanidines avec un bon contrôle du degré d'oligomérisation mais également une bonne régio- et stéréochimie des liaisons interflavanes (Schéma 51).[316,322]

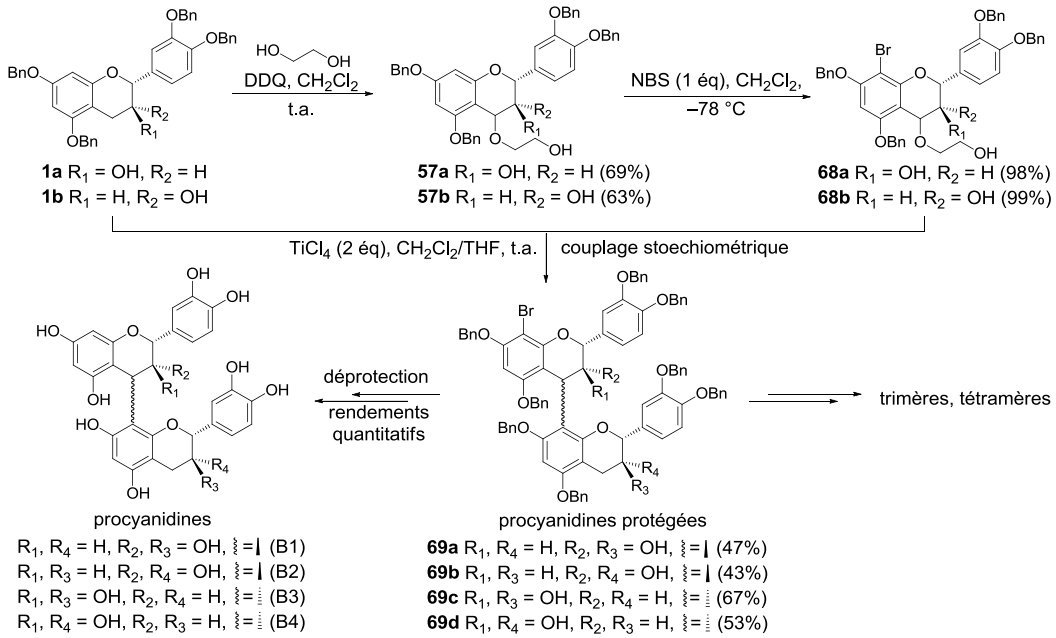


Schéma 51. Condensations intermoléculaires selon le protocole de Tarascou et *al.*[316,322]

Sur la base de ces différentes approches, une synthèse de procyanidines B2 et B3 modifiées en vue de leur greffage sur des sondes a été réalisée par le Dr Mélanie Delannoy au sein de l'équipe.[242] Une première tentative de couplage, envisagé selon le protocole de Tückmantel et *al.*[263] à l'aide de l'acide de Lewis $TiCl_4$ entre unités flavanols protégés par des groupements *tert*-butyldiméthylsilyle, n'a pas fonctionné et l'utilisation de BF_3•OEt_2 en suivant le protocole de Hayes et *al.*[49] n'a permis d'obtenir les produits attendus qu'avec des rendements modestes (35% pour la B3 et 30% pour la B2).

Lors de cette étude bibliographique, nous avons retenu les conditions de Ohmori et *al.*[47,320] pour préparer la procyanidine B2. Le couplage en présence d'un excès d'unité nucléophile a été choisi permettant d'éviter les deux étapes supplémentaires sur l'unité électrophile.

1.2.2. Hémisynthèse et caractérisation de la procyanidine B2

L'hémisynthèse de la procyanidine B2 est réalisée en deux étapes à partir de l'épicatéchine protégée **2b** (Schéma 52).

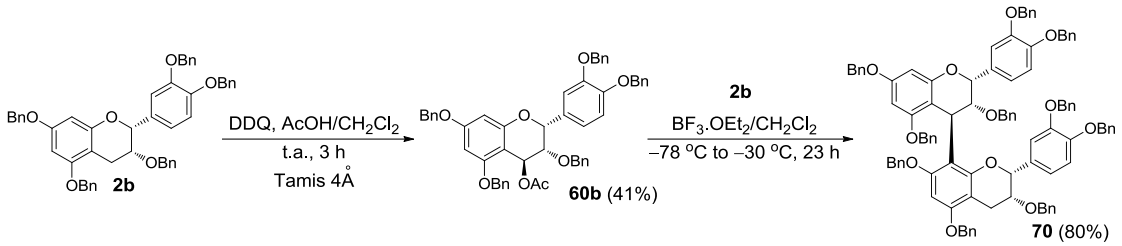


Schéma 52. Dernières étapes de l'hémisynthèse de la procyanidine B2

Lors de la première étape, l'épicatéchine pentabenzylée **2b** (cf. chapitre 2) est engagée dans une oxydation de la position benzylique C-4 à l'aide de DDQ dans un mélange d'acide acétique et de CH_2Cl_2 fraîchement distillés comprenant du tamis moléculaires 4 Å. Le produit substitué par un groupement acétate en position C-4 **60b** est alors obtenu avec un rendement de 41%. Ce rendement modéré, proche de celui obtenu par Ohmori et *al*. (51%), est dû en partie à la dégradation du produit **2b** au cours de l'oxydation et à celle du produit attendu **60b** pendant sa purification. La deuxième étape consiste à condenser, dans du CH_2Cl_2 distillé, l'épicatéchine benzylée activée en C-4 **60b** (1 éq) avec l'épicatéchine benzylée **2b** (3 éq) en présence de BF_3•OEt_2 (1 éq). La réaction est initiée à –78 °C puis maintenue à –30 °C durant 23 h. Après purification sur colonne de silice, le dimère B2 décabenzylée **70** est obtenu avec un rendement de 80%.

La structure du dimère B2 perbenzylé **70** a été caractérisée par des analyses RMN mono- (^{1}H, ^{13}C, DEPT) et bidimensionnelles (COSY, NOESY, HMQC, HMBC) dans l'acétone deutérée permettant de déterminer la régiochimie et la stéréochimie de la liaison interflavane. L'attribution de l'ensemble des protons et des carbones du dimère **70** a permis de mettre en évidence la présence de deux rotamères dans un ratio 85:15 déterminé par intégration des protons. La caractérisation de la liaison interflavane a été réalisée sur le rotamère majoritaire. La régiochimie C4-C8 de cette liaison est confirmée par une corrélation entre le proton H-4 du cycle C et le carbone C-9 du cycle D observée par HMBC. La stéréochimie de cette liaison peut-être déterminée à l'aide des constantes de couplage entre les protons en positions 2, 3 et 4 de l'hétérocycle C. En accord avec les données relevées dans la littérature,[263,316,314] les valeurs de couplages H-2/H-3 et H-3/H-4 sont faibles et mal résolues indiquant pour le premier couplage une orientation *cis* entre les protons H-2 et H-3 quelle que soit la conformation de l'hétérocycle C. Par contre, le deuxième couplage ne permet pas de conclure sur la stéréochimie

du carbone C-4, si ce n'est que l'hétérocycle C adopte préférentiellement une conformation demi-chaise (conformère E, Figure 69 B). Par contre, l'observation des effets NOE entre les protons H-3/H-2 et H-3/H-4 et l'absence de cet effet entre les protons H-2/H-4 du cycle C confirme que le proton H-3 a préférentiellement une orientation équatoriale et que les protons H-2 et H-3 sont du même côté de l'hétérocycle C alors que le proton H-4 est du côté opposé. Il en résulte que la liaison interflavane créée est orientée en β, correspondant à la procyanidine B2 naturelle (Figure 69 A).

De plus, l'observation par NOESY d'un effet NOE entre les protons H-4 du cycle C et H-2 du cycle F permet de déterminer la structure du rotamère majoritaire, en accord avec celle décrite par Haslam et *al*. (Figure 69 C).[39,3]

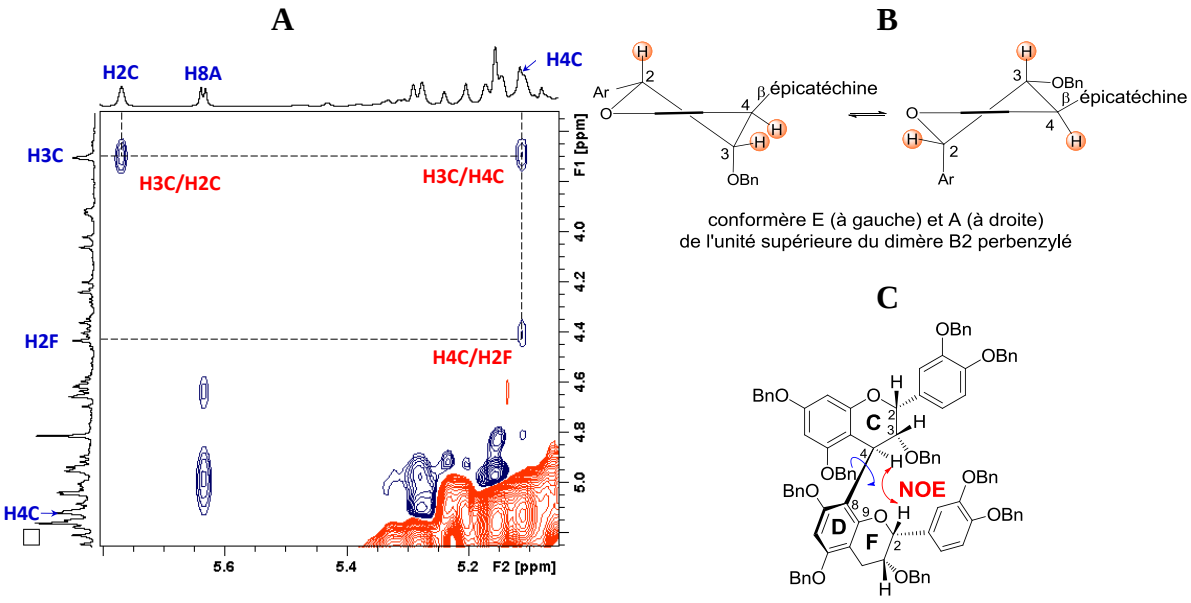


Figure 69. Zoom NOESY et la conformation du rotamère majoritaire du dimère B2 perbenzylé

La condensation entre la 4-acétoxyépicatéchine **60b** et un excès d'épicatéchine **2b** en présence de BF_3•OEt_2 nous a donc permis l'accès au dimère B2 perbenzylé **70** avec un bon rendement et un bon contrôle des régio- et stéréochimies de la liaison interflavane. L'utilisation du groupement acétate et de BF_3•OEt_2 pour activer l'unité électrophile, ainsi que l'encombrement stérique de la face α apporté par le groupement benzyloxyle en position C-3 favorisent l'attaque en β de l'unité nucléophile lors de l'étape de couplage.

1.2.3. Finalisation de la synthèse de la sonde moléculaire porteuse de la procyanidine B2

La procyanidine B2 obtenue, l'étape suivante a consisté à installer un espaceur sur ce flavanol dimérique **70** en exploitant la nucléophilie de la position C-8 libre du cycle A. Cette modification, comme pour les flavanols monomériques **2a** et **2b**, est réalisée par l'introduction d'une fonction aldéhyde puis d'une double liaison C-C sur l'aldéhyde résultant.

La formylation du dimère **70** est réalisée par une réaction de Vilsmeier-Haack,[99,264] en présence de $POCl_3$ dans du DMF et conduit régiosélectivement au produit **71**, formylé en position C-8 du cycle A avec un rendement 58% (Schéma 53). L'analyse par RMN du proton de ce composé fait clairement apparaître la présence des deux rotamères grâce à la séparation des signaux du groupement formyle et permet par intégration de préciser leur ratio de 84:16.

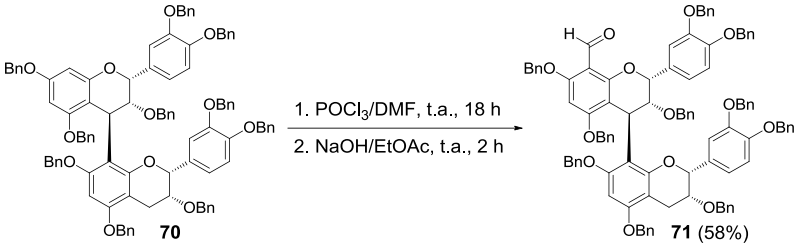


Schéma 53. Formylation régiosélective en position C-8 du dimère B2 perbenzylé

L'étape suivante d'oléfination de l'aldéhyde **71** a été envisagée selon deux protocoles (Schéma 54).

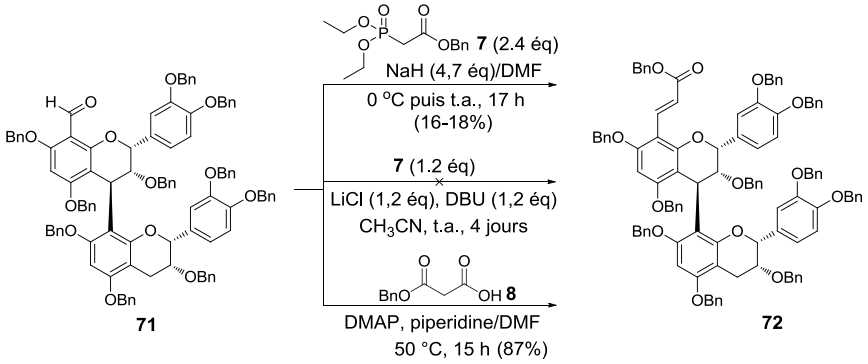


Schéma 54. Différentes approches pour la création d'une double liaison sur l'aldéhyde 71

Le premier protocole repose sur la condensation de Horner-Wadsworth-Emmons entre l'aldéhyde **71** précédemment obtenu et le diéthylphosphonoacétate de benzyle (**7**).[99,266] Cette méthode, efficace dans le cas des flavanols monomériques, s'est avérée dans le cas du composé **71** peu efficace, le produit désiré n'étant obtenu qu'avec un rendement de 20%. Un temps de

réaction plus long ou le rajout de réactif **7** préalablement activé par l'hydrure de sodium n'ont pas permis d'augmenter le rendement, mais au contraire ont contribué à une dégradation partielle du produit de départ **71**.[242] Dans les mêmes conditions, une activation du diéthylphosphonoacétate de benzyle (**7**) par LiCl et le 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) dans du CH_3CN fraîchement distillé, décrite par Blanchette et *al.*[323], s'est avérée inefficace, le produit de départ **71** étant récupéré intégralement après 4 jours de réaction.

Afin d'améliorer la conversion de l'aldéhyde **71**, un deuxième protocole a alors été testé et repose sur une réaction de Doebner-Knoevenagel réalisée en présence de DMAP et de piperidine dans du DMF.[268] Le premier essai réalisé avec 4 équivalents du réactif **8** à température ambiante a conduit au bout de 5 jours au produit attendu **72** avec un rendement encourageant de 46% après séparation sur CCM préparative. Par la suite, cette même réaction réalisée à 50 °C a permis d'améliorer significativement le rendement (87% de rendement en produit isolé). L'ester α,β-insaturé **72** est obtenu sous la forme de deux rotamères dans des proportions 80:20, possédant uniquement une double liaison de stéréochimie *E* déterminée par la constante de couplage des protons vinyliques ($^3J_{trans}$=16.2 Hz) (Schéma 54).

Enfin la déprotection du composé **72** par hydrogénolyse en présence de dihydrogène et de palladium sur charbon, accompagnée de l'hydrogénation simultanée de la double liaison de l'espaceur, fournit quantitativement le composé **73** dont l'analyse par RMN du proton n'a pas permis de discriminer les deux rotamères (Schéma 55).

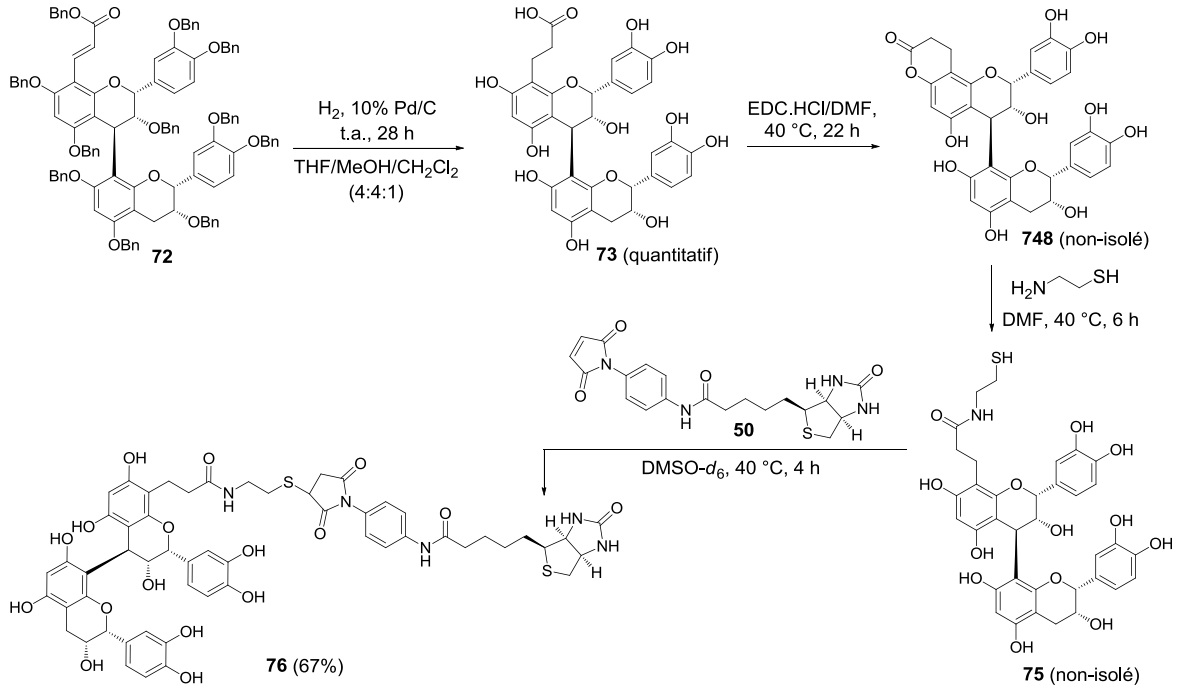


Schéma 55. Finalisation de la synthèse de la sonde porteuse de procyanidine B2

Ce dérivé acide **73** est par la suite lactonisé à l'aide d'EDCI•HCl dans du DMF puis couplé à la cystéamine dont la fonction thiol permet par la suite l'addition au dérivé biotine maléimide **50** (Schéma 55). A l'issue de cette réaction, pour éviter le risque d'oxydation du thiol, le composé **75** n'est pas isolé. Le DMF est évaporé sous pression réduite et le résidu contenant le thiol **75** est repris dans du DMSO deutéré préalablement dégazé par de l'argon. A cette solution est rajoutée goutte à goutte une solution de biotine maléimide **50** également dans du DMSO deutéré et la réaction est suivie par RMN du proton jusqu'à la disparition complète des protons éthyléniques du réactif **50**. Après réaction, le produit attendu **76** est isolé par précipitation dans un mélange $Et_2O/CHCl_3$ (9:1) avec un rendement de 67% sur 3 étapes à partir de l'acide **73**.

Cependant, le spectre RMN du produit obtenu montre la présence minoritaire de sous-produits dont les faibles quantités n'ont pas permis de les caractériser ni de les séparer. Selon l'analyse par SM, on peut cependant avancer la formation probable d'adduits maléimide biotinylé **50**-cystéamine ou encore la présence de cystamine dont une proportion de 5% coexiste avec la cystéamine commerciale utilisée.

Une purification supplémentaire de la sonde **76** réalisée sur colonne en phase inverse par HPLC semi-préparative permet d'obtenir une sonde pure avec un rendement de 30%. L'analyse RMN de cette sonde ne permet pas de déterminer la proportion des deux rotamères de procyanidine B2 liés à la sonde **76,** du fait de l'élargissement des signaux. La stéréochimie de la liaison interflavane du rotamère majoritaire a cependant été déterminée par RMN en particulier à l'aide d'une expérience ROESY révélant des effets NOE similaires à ceux décrits précédemment entre les protons H-3/H-2 et H-3/H-4, mais pas entre les protons H-2/H-4 du cycle C. La sonde synthétisée est donc bien porteuse de la procyanidine B2 naturelle possédant une stéréochimie β au niveau de la liaison inter-épicatéchine. Cette analyse a également permis l'observation, suite à la libération des groupements protecteurs benzyle, de la proximité spatiale entre le proton H-4 du cycle C et les protons H-2' et H-6' du cycle E, mais également entre le proton H-4 et le proton du groupement hydroxyle en position 3. Ceci confirme de nouveau que la procyanidine B2 synthétisée est bien le produit naturel attendu (Figure 70).

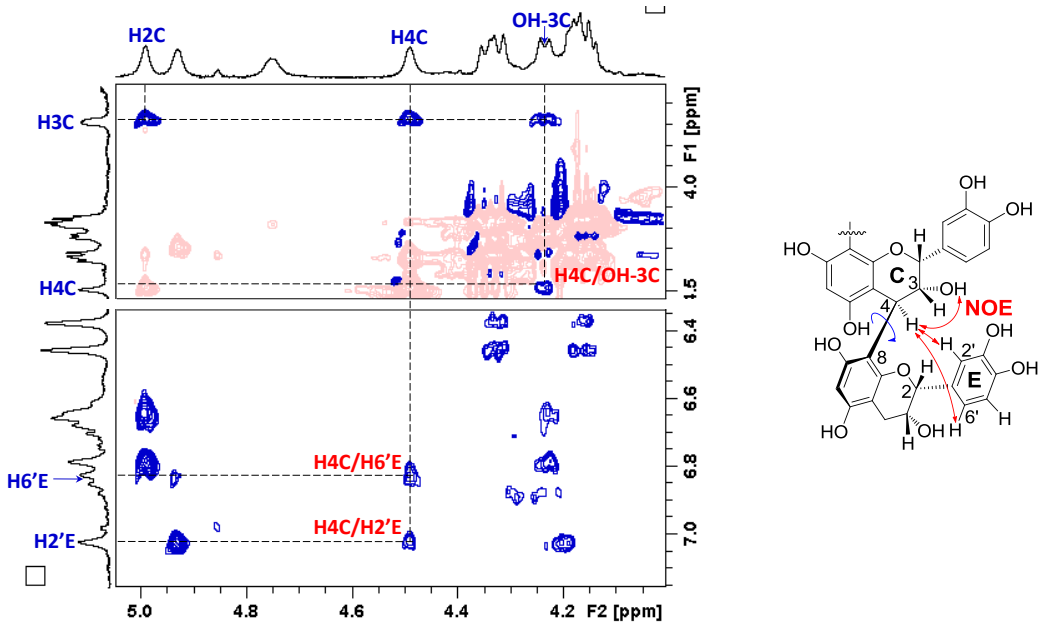


Figure 70. Zoom ROESY de la procyanidine B2 au sein de la sonde 76

2. Synthèse de sondes moléculaires porteuses d'EGCG et de ses analogues

La plupart des bienfaits liés à la consommation du thé vert ont été mis sur le compte de la (–)-épigallocatéchine gallate (EGCG), la molécule la plus abondante dans l'extrait de thé vert (elle constitue 50 à 70% de polyphénols catéchiques totaux).[14] Ses vertus thérapeutiques observées sont en partie liées à sa capacité d'interaction au niveau moléculaire avec certaines protéines présentes dans l'organisme humain.[13,14,16,52,61,68] Le développement d'une sonde porteuse d'EGCG et son utilisation en analyse par SPR et/ou en protéomique chimique permettront la caractérisation et l'identification du réseau de protéines ciblées par ce polyphénol, ainsi que l'élucidation des mécanismes moléculaires et biochimiques responsables de ses activités biologiques. Cependant, la réalisation de cette sonde est limitée par le manque de disponibilité de ce polyphénol. La synthèse totale de l'EGCG est donc nécessaire. De plus, son épimère GCG et ses analogues sans gallate, la GC et l'EGC (Figure 71), intermédiaires dans la synthèse de l'EGCG seront également considérés pour compléter le lot de sondes.

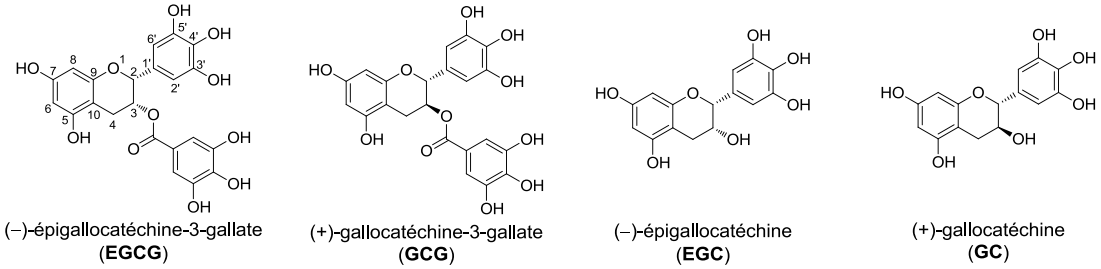


Figure 71. Structure et numérotation de l'EGCG et de ses analogues

2.1. Approches synthétiques de l'EGCG – Etude bibliographique

A ce jour, plusieurs stratégies de synthèse de l'EGCG ont été décrites dans la littérature. La difficulté majeure de ces synthèses réside dans le contrôle de la stéréochimie des centres C-2 et C-3 permettant d'accéder à une conformation 2,3-*cis*. De plus, le centre chiral C-2 créé s'épimérise facilement en conditions acides, basiques ou plus simplement par chauffage pour former le dérivé 2,3-*trans* et donc la méthodologie de synthèse doit être adaptée. La plupart des méthodes synthétiques établies de l'EGCG, ainsi que de son épimère, la GCG, sont basées sur la synthèse indépendante des dérivés 2,3-*cis*- et 2,3-*trans*-flavan-3-ols suivies d'une galloylation du groupement hydroxyle en position C-3.[324] Les synthèses directes des flavan-3-ols, quant à elles, se divisent en deux approches générales (Schéma 56).

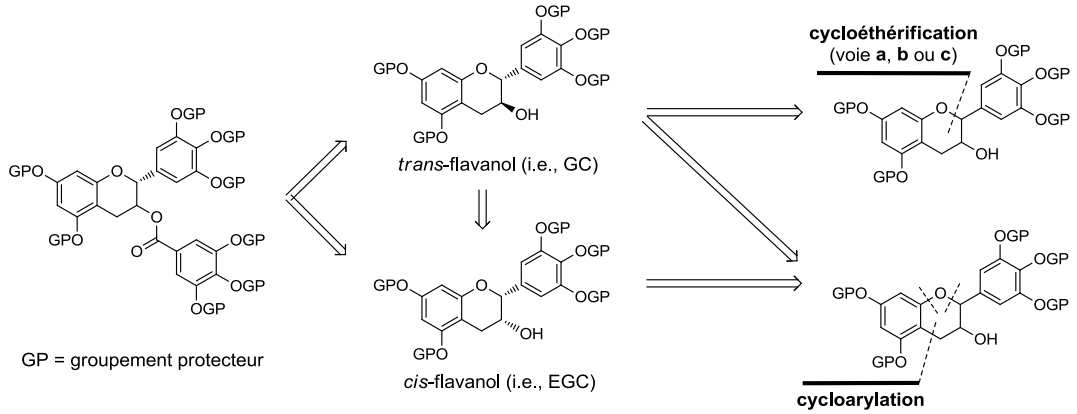


Schéma 56. Deux approches très utilisées pour la synthèse de l'EGCG

La première approche consiste à former la liaison C2-O1 des 1,3-diarylpropanoïdes *via* une cycloéthérification, ce qui conduit principalement aux 2,3-*trans*-flavan-3-ols, plus stables thermodynamiquement. L'accès aux 2,3-*cis*-flavan-3-ols nécessite ensuite des étapes supplémentaires visant à inverser la stéréochimie du centre C-3.[263,325–330] En général, la cycloéthérification et l'établissement simultané de la stéréochimie du centre C-2 peuvent être achevés soit par la formation de l'intermédiaire orthoester (voie **a**)[325–330] soit par la cyclisation directe *via* la réaction de Mitsunobu (voie **b**)[331–334] ou en milieu acide (voie **c**, i.e., HCl méthanolique 3 M).[332,335] Cependant, cette dernière condition est beaucoup moins utilisée due au rendement limité et/ou à la racémisation de flavan-3-ols selon la description de Krohn et *al*.[332] La deuxième approche repose sur la formation de liaison C4-Ar *via* une cycloarylation, ce qui permet l'obtention directe des 2,3-*trans*- ou 2,3-*cis*-flavan-3-ols suivant leurs précurseurs acycliques engagés ainsi que le mode d'établissement préalable de la liaison C2-O1.[324,336–340]

2.1.1. Approche de cycloéthérification pour former la liaison C2-O1

En 2001, Li et Chan[325] ont développé une méthode de synthèse efficace pour accéder à l'EGCG. La réaction entre un dérivé du phloroglucinol **77** et de l'alcool cinnamique **78** *via* une réaction de Friedel-Crafts, a permis de former le (*E*)-1,3-diarylpropène **79**, qui après une protection par un groupement silyle, a été soumis à une dihydroxylation asymétrique de Sharpless pour donner le diol optiquement actif (1*S*,2*S*) **81**. Pour créer la liaison C2-O1, le triol **82** obtenu du précurseur **81** a été traité avec le triéthylorthoformiate permettant la formation de l'intermédiaire orthoester **83** directement converti en pyrane **84**. Après saponification par K_2CO_3/MeOH, ce composé **84** a donné le dérivé gallocatéchine **85a** avec un rendement élevé (Schéma 57).

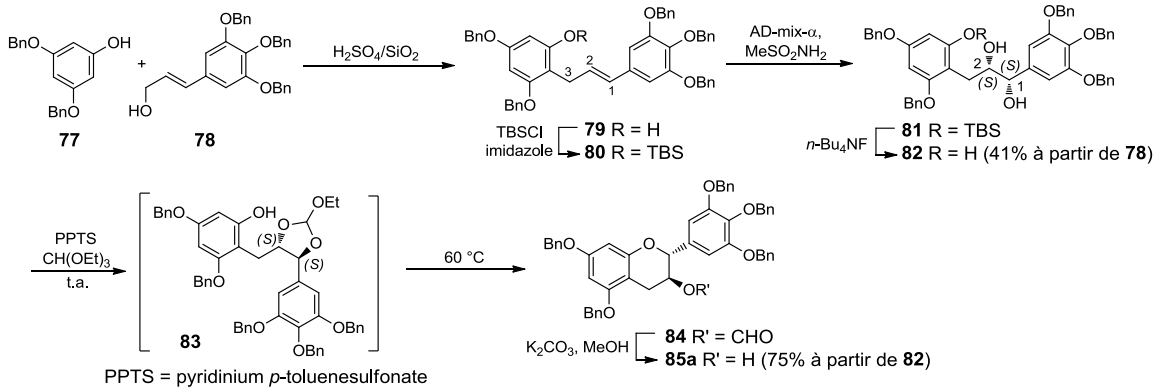


Schéma 57. Synthèse du dérivé gallocatéchine *via* un intermédiaire orthoester proposée par Li et Chan[325]

L'étape suivante consiste à convertir le dérivé gallocatéchine **85a** en épigallocatéchine **85b** selon un protocole simple et efficace précédemment décrit en 1999 par Tückmantel et *al*.[263] qui permet de transformer un 2,3-*trans*-flavane en son 2,3-*cis*-homologue *via* une oxydation/réduction successive du centre C-3 (Schéma 58). Ce protocole a fait ses preuves pour préparer plusieurs dérivés de la série épi(gallo)catéchine.[263,325,327–330,340] Les dernières étapes restantes pour la synthèse de l'EGCG à partir de l'épigallocatéchine **85b** comprennent l'incorporation du motif gallate, puis la déprotection des groupements benzyles (Schéma 58).

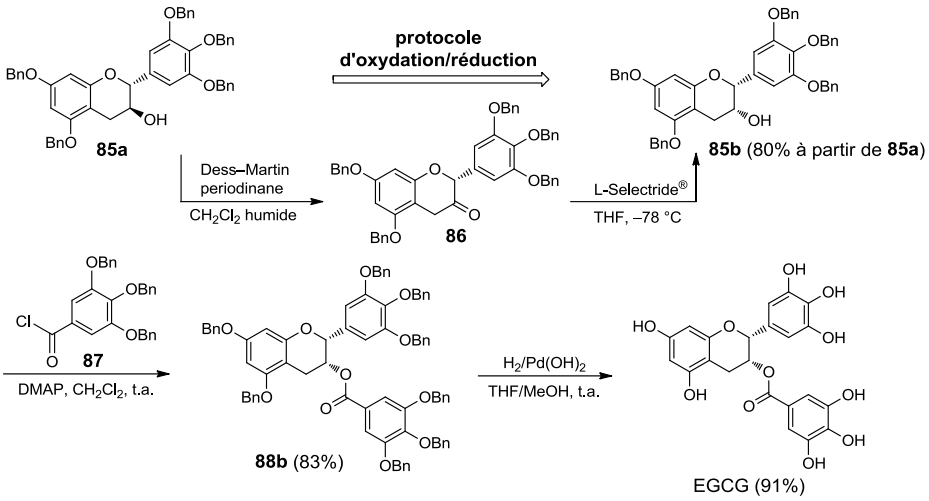


Schéma 58. Synthèse de l'EGCG *via* un protocole d'oxydation/réduction proposé par Tückmantel et *al*.[263]

Bien que le protocole développé par Tückmantel et *al*. ait apporté une contribution remarquable pour la synthèse de diverses épi(gallo)catéchines, elle implique nécessairement des étapes supplémentaires. En vue d'une inversion directe du centre stérogénique C-3, Tückmantelet *al*. ont tenté d'effectuer une réaction de Mitsunobu entre le dérivé 8-bromocatéchine **89** et l'acide *p*-nitrobenzoïque, mais cette réaction a conduit à l'élimination E2 de l'alcool en position C-3 **90** et non à la formation du produit souhaité **91** (Schéma 59).[263]

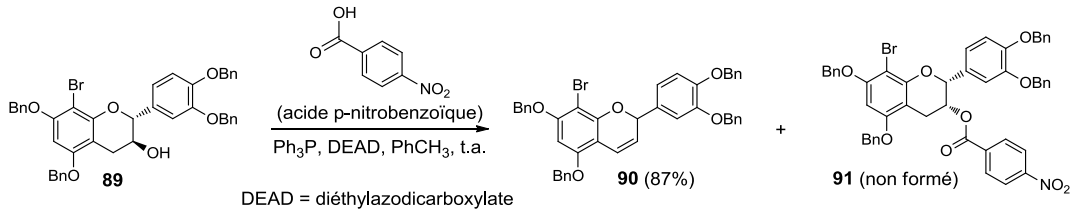


Schéma 59. Réaction de Mitsunobu pour l'inversion directe du centre C-3 proposée par Tückmantel et *al*.[263]

En 2006, Ding et *al*. ont proposé une méthode avantageuse de synthèse de l'EGCG *via* de nouvelles conditions de réactions de Mitsunobu intra- et inter-moléculaire.[331] Cette synthèse utilise un protocole similaire à celui proposé par Li et Chan[325] sur les premières étapes de préparation des précuseurs, mais diffère par la formation du cycle pyrane du produit **85a** *via* une réaction de Mitsunobu intramoléculaire permettant une totale inversion de configuration du centre C-3 sans passage par l'intermédiaire orthoformiate (Schéma 60). Le composé **85a** formé est ensuite soumis à une seconde réaction de Mitsunobu intermoléculaire, avec l'acide gallique tribenzylé (**92**) et conduit à la formation de l'EGCG perbenzylée (**88**) souhaitée avec un

rendement modéré mais une totale inversion du centre C-3 permettant l'accès à l'EGCG après déprotection des groupements benzyles (Schéma 60).

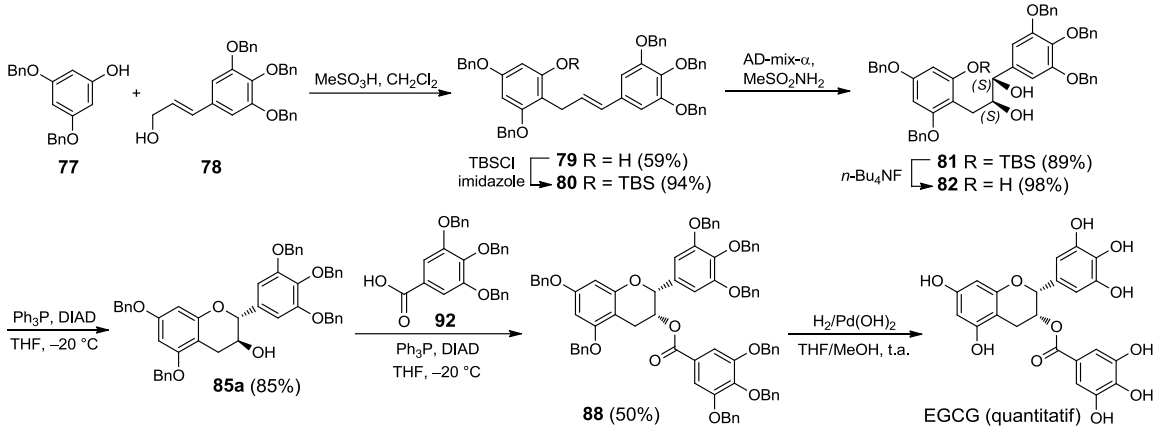


Schéma 60. Synthèse de l'EGCG *via* des réactions de Mitsunobu intra- et inter-moléculaire proposée par Ding et *al*.[331]

Krohn et *al*. ont également tiré avantage de la séquence réactionnelle Sharpless/Mitsunobu pour la synthèse énantiosélective des dérivés 2,3-*trans*-flavan-3-ols.[67,332] Ces synthèses consistent en la dihydroxylation asymétrique de Sharpless des dérivés (*E*)-1,3-diarylpropène à l'aide de l'AD-mix-α, puis les triols formés après la désilylation des produits résultants sont traités avec la Ph_3P et le diéthylazodicarboxylate (DEAD) dans du THF anhydre à température ambiante, induisant la cyclisation intramoléculaire par substitution nucléophile de type S_N2 stéréo- et régiosélective en position benzylique. La GC pentabenzylée **85a** a ainsi été synthétisée avec un rendement de 71% et un excès énantiomérique de 47% pouvant atteindre 85% après recristallisation (Schéma 61).[332]

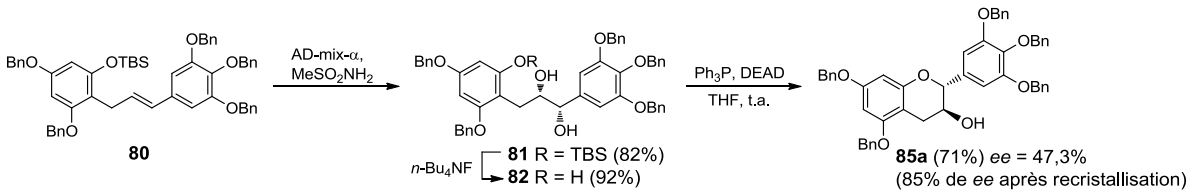


Schéma 61. Synthèse du dérivé gallocatéchine *via* réactions de Sharpless/Mitsunobu par Krohn et *al*.[332]

2.1.2. Approche de cycloarylation pour former la liaison C4-Ar

Cette approche présente diverses méthodologies permettant l'accès aux 2,3-*trans*- ou 2,3-*cis*-flavan-3-ols naturels ou non-naturels dont la stéréochimie du centre C-3 résulte généralement du choix du précurseur arylpropanoïde tandis que celle du centre C-2 dépend à la fois du précurseur arylpropanoïde mais également du mode de formation de la liaison éthérée

C2-O1. Parmi ces méthodes, celles décrites par le groupe du Professeur Suzuki sont particulièrement pertinentes.[336,337] En 2010, ce groupe a rapporté une méthode de synthèse de l'EGCG, basé sur une stratégie d'inversion de polarité pour la connectivité de la liaison C-O, permettant l'accès aux dérivés épicatéchines.[337] Cette nouvelle méthode a été développée à partir d'une autre stratégie décrite précédemment par cette équipe visant à synthétiser la (–)-gallocatéchine, un flavan-3-ol non naturel (Schéma 61).[336] Ces deux stratégies peuvent être schématisées comme suit (Figure 72) :

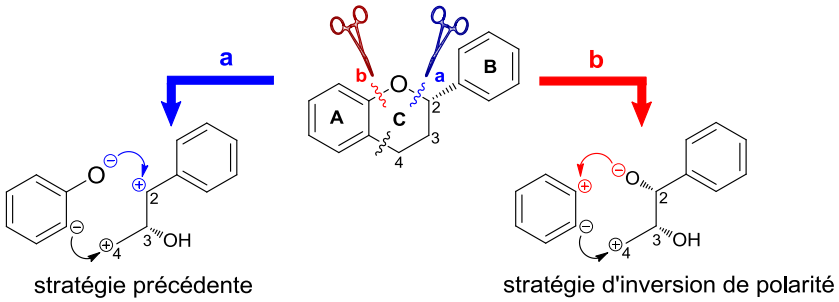


Figure 72. Changement de connectivités pour la stratégie d'inversion de polarité en comparaison avec la stratégie précédente proposé par le groupe Suzuki[336,337]

La stratégie impliquant la voie **a** (Figure 72), également décrite par d'autres auteurs,[324,338–340] implique trois étapes cruciales. La première étape consiste à coupler l'iodophénol **96** et l'époxyalcool **95** pour conduire à l'éther **97** dont la liaison C2-O1 a été établie en inversant totalement le centre stérogénique C-2 (*via* la réaction de Mitsunobu) avant de former la liaison C4-Ar. L'époxyalcool **95** utilisé a préalablement été dérivé de l'alcool cinnamique **78** obtenu par une dihydroxylation asymétrique de Sharpless en présence d'AD-mix-β suivie d'une époxydation du diol **94** résultant de la sulfonylation sélective de l'alcool primaire **93** (Schéma 62). La deuxième étape vise à ouvrir le cycle oxirane de l'intermédiaire **97** pour conduire à la bromohydrine **98**, en vue d'une cyclisation 6-*exo*-tet plus facile que celle 6-*endo*-tet défavorable de l'éther **97** (règles de Baldwin). La liaison C4-Ar dans la troisième étape conduisant au cycle pyranne *trans*-dihydrobenzopyrane **100** repose sur l'attaque chimiosélective de type S_N2 intramoléculaire de l'anion arylique **99** généré *via* un échange halogène-métal (iode-lithium) sur l'électrophile bromé **98**. La déprotection des groupements silyle et benzyle du composé **100** permet finalement l'accès à la (–)-gallocatéchine avec un bon rendement (Schéma 62).[336]

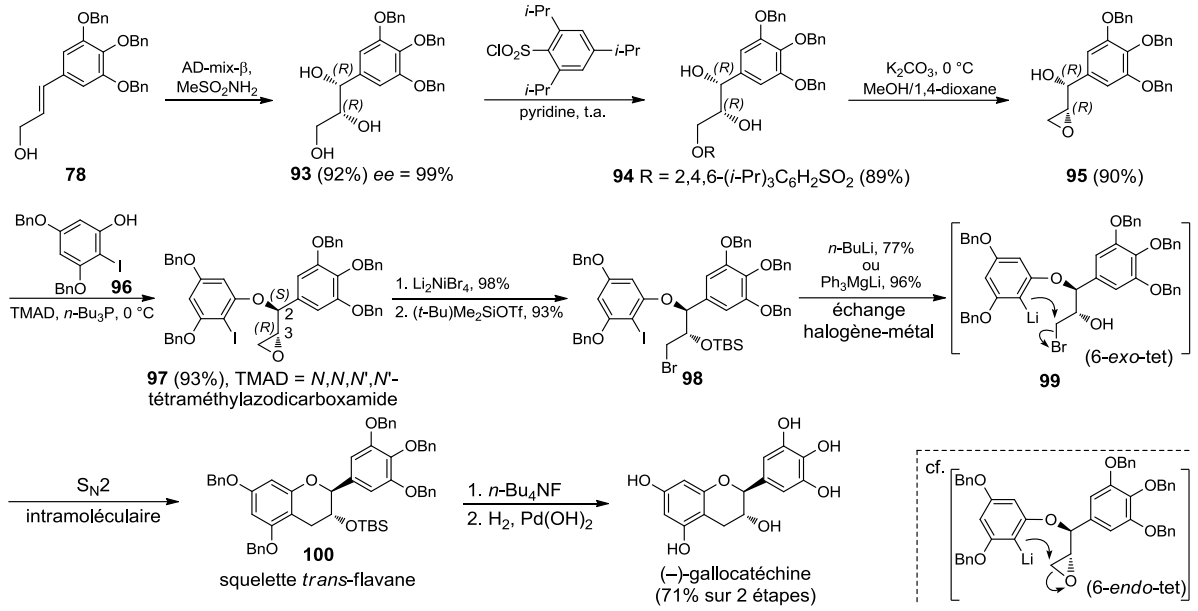


Schéma 62. Synthèse de la (–)-gallocatéchine par cyclisation *via* échange halogène-métal[336]

En ce qui concerne la stratégie d'inversion de polarité (voie **b**, Figure 72), le changement clé réside dans le mode de fragmentation au niveau des cycles A et B. Au lieu de disséquer le cycle C *via* la voie **a**, la déconnexion rétrosynthétique a lieu au niveau des liaisons Ar-O1 et Ar-C4 (la voie **b**) fournissant ainsi une nouvelle paire de fragment, qui peuvent être combinés sans affecter la stéréochimie du centre C-2. Pour réaliser cette stratégie, une substitution nucléophile aromatique (S_NAr) a été envisagée pour former l'intermédiaire **C** en employant une unité aromatique électrophile **A** et un dérivé époxyalcool **B**. Le choix des substituants du composé **A** est important. Le groupe X doit être un groupe fortement électronégatif comme par exemple un atome de fluor, capable d'attirer le nucléophile entrant. D'autre part, le groupe Y doit jouer deux rôles : accepteur d'électrons-π pour faciliter l'attaque conjuguée et précurseur d'anions lors de la fermeture du cycle pyranne. Dans ce but, un groupe sulfinyle a été choisi (Figure 73).[337]

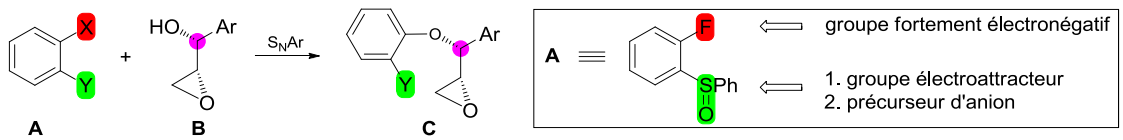


Figure 73. Unité aromatique électrophile envisagé pour l'assemblage[337]

La synthèse de l'EGCG *via* cette stratégie d'inversion de polarité est schématisée ci-après (Schéma 63). La lithiation du 1,3,5-trifluorobenzène **101** à l'aide du *n*-BuLi suivie d'un piègage de l'anion résultant par le $PhSSO_2Ph$ a tout d'abord fourni le sulfide d'aryl correspondant, qui est ensuite traité avec le phénylméthanolate de sodium puis oxydé par le *m*-CPBA conduisant

au sulfoxyde aromatique **102** requis avec un rendement globale de 74% (Schéma 63). La réaction S_NAr entre l'unité électrophile **102** et l'alcoolate de sodium dérivé de l'époxyalcool **95** a ensuite permis d'obtenir le produit souhaité **103** sous forme d'un mélange de diastéréoisomères (ca. 1:1 *dr*) séparé sur gel de silice avec un rendement total de 76%, dont la configuration relative au niveau du groupement sulfoxyde n'a pas été établie. Le clivage de l'oxirane **103** (mélange de diastéréoisomères) avec Li_2NiBr_4 suivi d'une silylation avec du triflate de triéthylsilyle a donné le bromure **104** sous forme de mélange de diastéréoisomères (94%, ca. 1:1 *dr*). L'étape suivante permet de construire le squelette flavane par cyclisation de l'intermédiaire **104** grâce à un échange sulfinyle-lithium à l'aide du PhLi, suivi d'une substitution nucléophile intramoléculaire. Le produit cyclisé **85b** a finalement été converti en (–)-EGCG en deux étapes de galloylation et de déprotection avec un rendement de 68% sur ces deux réactions (Schéma 63).

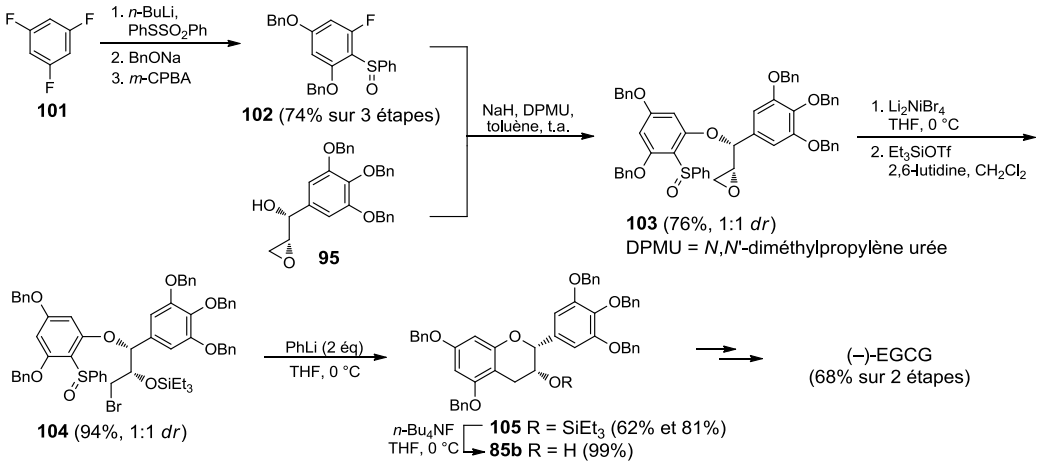


Schéma 63. Synthèse de l'EGCG *via* la stratégie d'inversion de polarité[337]

Le développement de méthodes de cycloarylation par activation d'une liaison C-H aromatique et formation de la liaison C4-Ar catalysées aux métaux de transition a récemment reçu une attention particulière, notamment celles impliquant une unité structurale de type époxyde dans la synthèse des flavan-3-ols.[338–341] En 2008, Yang et *al*. ont présenté une nouvelle méthode de synthèse prometteuse *via* la cycloarylation en présence d'acides de Lewis à l'aide d'un mélange thiourée/$AuCl_3$.[339] La réaction entre le phénol **106** et l'époxyalcool **107** en milieu basique suivie d'une substitution intramoléculaire du monosylate résultant du diol **108** permet d'accéder à l'époxyde **109**. Ensuite, le traitement de ce précurseur **109** en présence de quantités catalytiques d'$AuCl_3$ (5 mol%), AgOTf (15 mol%) et de la thiourée **110** (6 mol%, les rendements sont en général meilleurs avec ce ligands) induit une réaction de Friedel-Crafts intramoléculaire conduisant à divers composés catéchine **112** avec de bons rendements (Schéma 64). Au niveau du mécanisme, l'implication d'une espèce aryl-Au^{III} **111** générée par activation de la liaison

C-H et catalysée à l'or a été suggérée.[342] On notera que la combinaison de l'acide de Lewis et de l'urée est nécessaire pour activer l'oxirane et conduire à l'espèce **111** en vue d'une cyclisation de type 6-*exo*-tet.

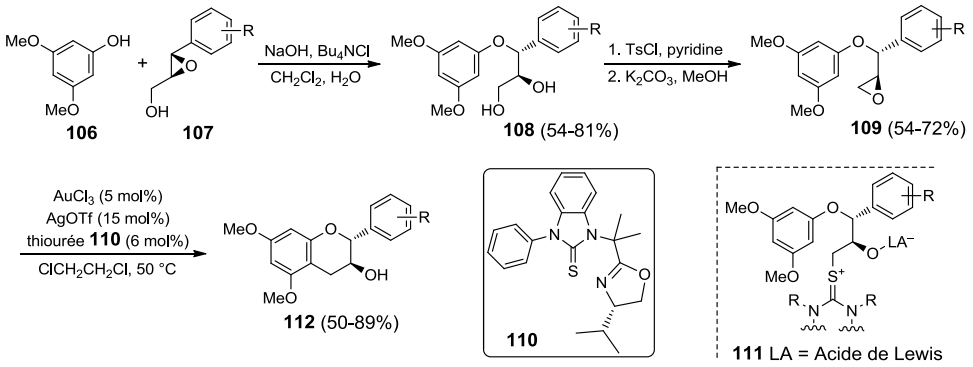


Schéma 64. Synthèse de dérivés catéchines par catalyse thiourée/Au(III)[339]

En 2013, ces mêmes auteurs ont adapté cette méthode pour la synthèse énantiosélective de la (+)-GC et de la (–)-EGC, des composés à partir desquels il est possible d'accéder à l'EGCG.[340] Cette synthèse procède *via* une réaction de Mitsunobu entre un dérivé du phloroglucinol **77** et un alcool benzylique époxydé **113**. Le produit **114** est obtenu sous la forme d'un seul diastéréoisomère avec un rendement de 50% quand la réaction est menée à 20 °C sous sonication. L'intermédiaire formé est ensuite mis en réaction dans les conditions précédemment développées : catalysé par thiourée/Au^{III}. Cependant, même en utilisant différents types d'urée, le produit **115a** n'a été obtenu qu'avec de faibles rendements.[339] Pour améliorer le rendement, d'autres types de ligands ont été testé, tels que des lutidines, Ph_3P, PCy_3, BINAP (2,2'-bis(diphenyl-phosphino)-1,1'-binaphthalene) ou encore la bisoxazoline. Ces différents essais ont démontrés que $AuCl_3$/AgOTf/Ph_3P constituait le meilleur système, permettant d'obtenir de façon *endo*-sélective le composé **115a** avec un rendement de 81%, puis, après une oxydation/réduction successive, son épimère **115b** (57% sur ces deux étapes). La déprotection des composés **115a** et **115b** permet ainsi d'accéder à la (+)-GC et la (–)-EGC avec des rendements acceptables (Schéma 65).

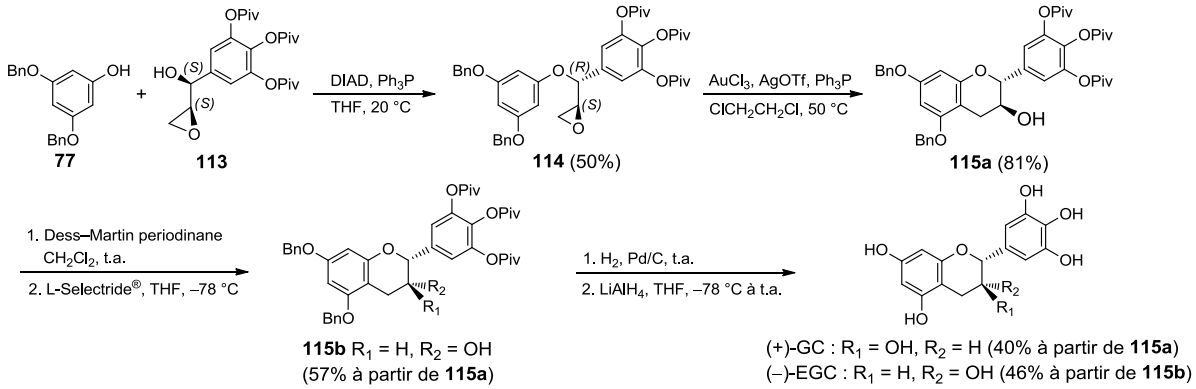


Schéma 65. Synthèse de la (+)-GC et de la (–)-EGC proposée par Yang et *al.*[340]

L'approche utilisant un motif époxyde pour former le cycle pyrane semble donc une bonnes tratégie pour accéder à l'EGCG. Néanmoins, elle implique un nombre d'étapes de synthèses supplémentaires après l'obtention du dérivé d'alcool cinnamique pour former le précurseur époxydé (**95**, **107** ou **113**). Le protocole de synthèse du composé **113**, par exemple, implique au total sept étapes à partir du gallate de méthyle commercial et conduit à un rendement global de 30%.

2.1.3. Synthèse des précurseurs dérivés du phloroglucinol et de l'alcool cinnamique

Lors de cette analyse bibliographique, la synthèse de l'EGCG et de ses analogues, ainsi que leurs fonctionnalisations, ont été envisagées par l'approche de cycloéthérification des 1,3-diarylpropanoïdes selon les protocoles décrits par Li et Chan permettant de former l'intermédiaire orthoester,[325] ou par Ding et *al*. faisant intervenir deux réactions de Mitsunobu.[331] Quel que soit le protocole envisagé, la synthèse plus ou moins directe de deux précurseurs dérivés du phloroglucinol **77** et de l'alcool cinnamique **78** est nécessaire pour par la suite les coupler par réaction de Friedel-Crafts (Schémas 57 et 60).[325–331,340,341]

Le précurseur **77** utilisé pour la synthèse de flavanols catéchiques est en général dérivé du phloroglucinol **116**. Cependant, l'accès direct au phloroglucinol di-**77** ou tri-*O*-benzylé **118** est en pratique délicat, dû au fait que le phloroglucinol **116** est aussi un *C*-nucléophile, ce qui conduit à une compétition entre une *C*- et *O*-benzylation lors de la protection de ce phénol (Schéma 66).[259,343] D'autres protocoles sont décrits dans la littérature permettant de limiter la formation du produit de *C*-benzylation **119** non souhaité.[326,327,343,344] Un protocole simple et très utilisé a été développé par Kawamoto et *al*.,[343] permettant de préparer le phloroglucinol tribenzylé **118** à partir du phloroglucinol triacétylé **117**, ce qui permet de réduire la densité électronique du cycle aromatique et d'empêcher la *C*-benzylation. La dernière étape consiste en une monodébenzylation du produit tribenzylé **118** qui peut être réalisée par hydrogénolyse,[331] ou par une monosubstitution chimiosélective à l'aide d'un thiolate,[326,327,344] conduisant dans les deux cas au phloroglucinol dibenzylé **77** avec de bons rendements (Schéma 66).

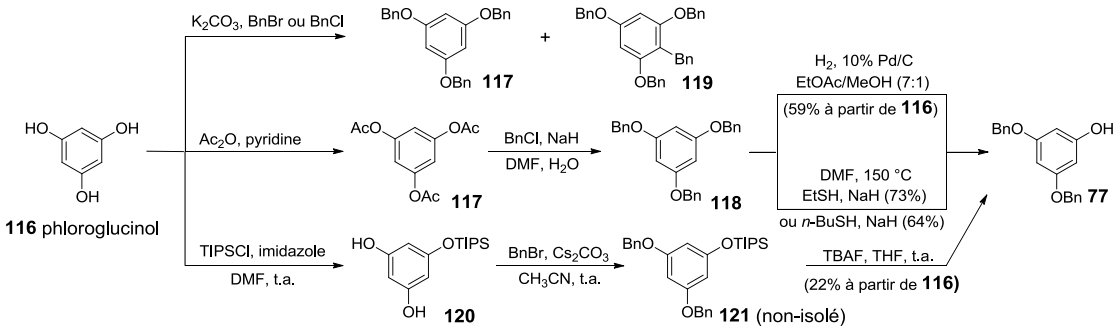


Schéma 66. Différents protocoles pour l'accès au phloroglucinol dibenzylé

Dans la littérature, il existe également une alternative proposée par Tadross et *al.*,[345] permettant d'obtenir le précurseur **77**. Elle implique une monoprotection d'un des trois phénols du phloroglucinol **116** *via* un composé silylé (le chlorotriisopropylsilane, noté TIPS), suivi d'une dibenzylation du résorcinol **120** résultant. La déprotection du produit silylé **121** permet par la suite d'obtenir le composé **77** avec cependant un faible rendementde 22% sur trois étapes (Schéma 66).

Pour le deuxième précurseur **78**, il existe plusieurs voies d'accès en fonction du produit de départ. Seules les dérivatisations à partir de l'acide gallique **122**[331] ou son ester de méthyle **123**,[325,340] ou encore du dérivé de 3,4,5-trihydroxybenzaldéhyde **126**[329,330,337] commercialement disponibles seront présentées dans cette étude bibliographique (Schéma 67).

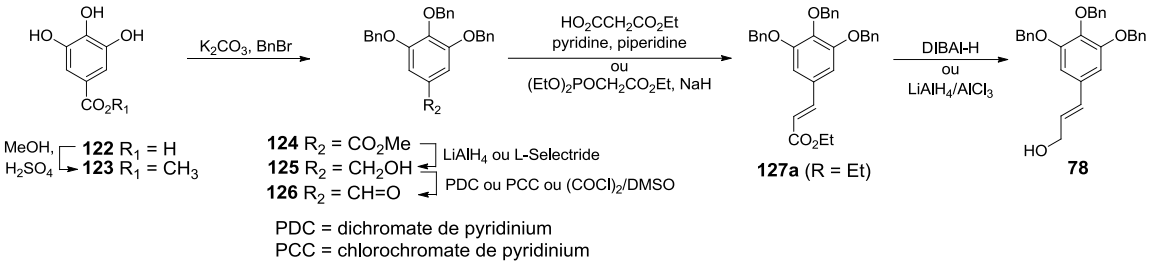


Schéma 67. Préparation du dérivé alcool cinnamique lors de la synthèse des flavanols

La première étape consiste à transformer l'acide gallique **122** en son ester méthylique **123** (aussi commercialement disponible) qui est ensuite tribenzylé dans la plupart des cas pour donner le produit **124**. La réduction de l'ester **124** en utilisant le $LiAlH_4$ ou le L-Selectride génère l'alcool primaire **125** qui est par la suite oxydé en aldéhyde **126** par un réactif au chromate(VI) (PDC ou PCC), ou alternativement en conditions de réaction de Swern. Cet aldéhyde **126** est alors engagé dans une oléfination stéréosélective réalisée *via* une réaction de Horner-Wadsworth-Emmons ou bien de Doebner-Knoevenagel conduisant à l'ester α,β-insaturé **127a**. La fonction ester est finalement réduite à l'aide du DIBAl-H ou du $LiAlH_4$ en présence de chlorure d'aluminium permettant l'obtention du dérivé d'alcool cinnamique désiré **78**.

2.2. Synthèse de sondes moléculaires

2.2.1. Analyse rétrosynthétique

L'introduction d'un espaceur biotinylé sur le carbone en position C-8 du cycle A des flavanols disposant d'un motif gallate en C-3 sera envisagée en fin de synthèse, ce groupement galloyle étant labile dans certaines conditions de la fonctionnalisation, comme celles d'une

réaction de Vilsmeier-Haack par exemple. En s'appuyant sur les protocoles décrits par Li et Chan,[325] également par Ding et *al.*[331] et ceux développés au sein de l'équipe,[99] les sondes porteuses de l'EGCG ou de ses analogues pourront être obtenues par ouverture des lactones **137a-d** par l'amine de l'espaceur connecté à une biotine (**29** ou **50**). L'obtention de ces lactones sera envisagée en deux étapes, à partir de l'acrylate de benzyle **133a-b** suivi d'une hydrogénolyse/réduction et d'une lactonisation. Une séquence réactionnelle en deux étapes (Vilsmeier-Haack et Doebner-Knoevenagel) permettra d'accéder à ces acrylates de benzyle **133a-b** à partir de la GC protégée **85a** ou de l'EGC protégée **85b** dérivée de la GC protégée **85a** *via* une oxydation/réduction successive. Enfin, cette GC protégée **85a** pourra être obtenue par cyclisation de l'intermédiaire orthoester ou directement par réaction de Mitstunobu intramoléculaire sur le triol **82** qui sera quant à lui synthétisé en deux étapes à partir des précurseurs A (**77**) et B (**78**) (Schéma 68).

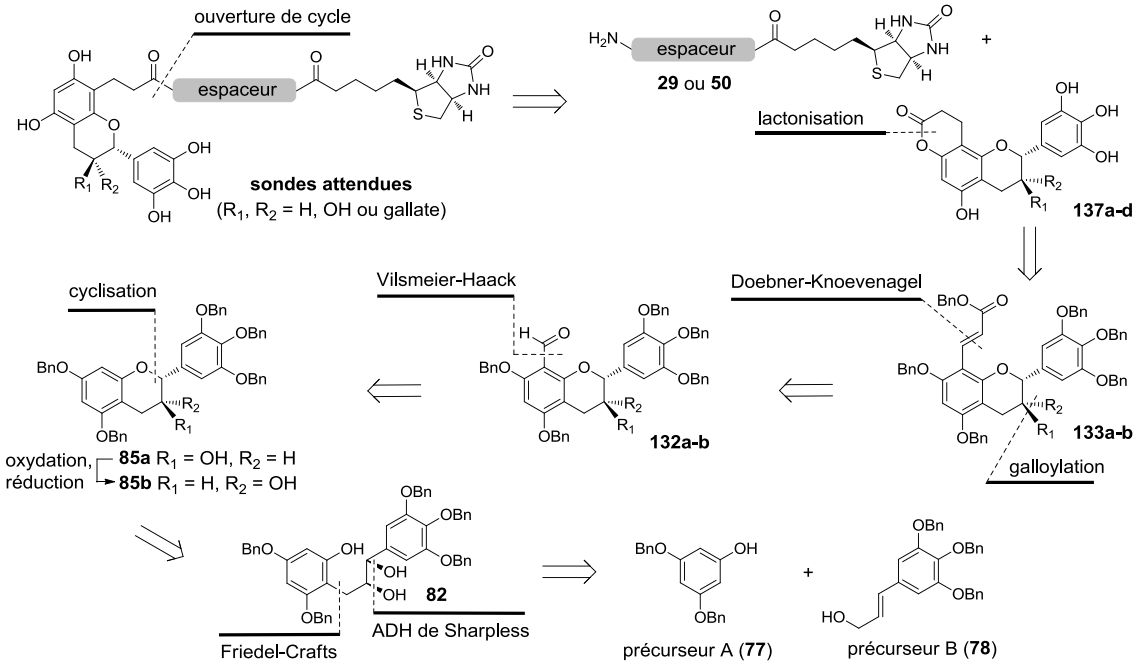


Schéma 68. Analyse rétrosynthétique de sondes moléculaires porteuses de l'EGCG et de ses analogues

2.2.2. Synthèse du précurseur A

Plusieurs protocoles de synthèse ont été testés et améliorés pour obtenir le phloroglucinol dibenzylé **77** à partir du phloroglucinol commercial **116**. Son accès par monodébenzylation du produit tribenzylé **118** grâce à un thiolate ou à une hydrogénolyse a été privilégié. Afin d'éviter la réaction parasite de *C*-benzylation constatée en présence d'halogénure de benzyle et de carbonate de sodium, le produit **118** a été dérivé du phloroglucinol **116** *via* son intermédiaire triacétylé **117** selon le protocole de Kawamoto et *al.*[343] Cette méthode permet dans un premier

temps d'obtenir le triacétate **117** à l'aide de l'anhydride acétique et de la pyridine avec un rendement quantitatif par une simple recristallisation. Le produit **117** formé est ensuite tribenzylé en présence d'hydrure de sodium, de chlorure de benzyle et d'eau distillée pour former *in situ* de la soude conduisant ainsi au composé **118** avec un rendement de 73% (Schéma 69). L'étape suivante consiste en une monodébenzylation du composé **118**. Différents protocoles ont été mis en jeu. L'utilisation de l'éthanethiol et de l'hydrure de sodium, décrite par Chow et *al*.[344] a permis la formation du 3,5-bis(benzyloxy)phenol **77** avec cependant un faible rendement de 25%. Cette même réaction réalisée avec du *tert*-butanethiol proposé par Actis-Goretta et *al*.[327] et également par Wan et *al*.[326] a conduit au composé **77** avec un rendement modéré de 45% (Schéma 69).

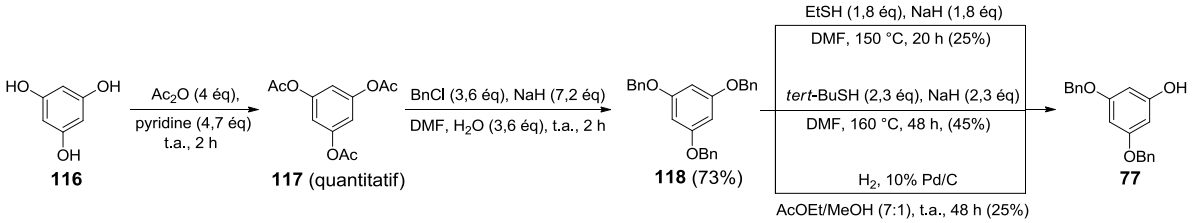


Schéma 69. Tribenzylation du phloroglucinol suivie d'une monodéprotection

Bien que ce mode de déprotection permette d'obtenir le précurseur **77**, le produit formé contient des traces de thiol persistantes, même après purification sur silice, qui peuvent être nuisibles à la poursuite de la synthèse. De plus, les difficultés rencontrées lors de la manipulation des thiols, les temps de réaction longs, ainsi que les rendements modérés nous ont incités à appliquer le protocole de monodébenzylation utilisé par Ding et *al*.[331] *via* une hydrogénolyse partielle catalysée au palladium sur charbon. Bien que cette réaction conduise au composé **77** pur après purification, les rendements restent faibles de l'ordre de 25% en raison de la formation de sous-produits di- et tridébenzylé (Schéma 69).

Afin de résoudre ces inconvénients, nous nous sommes inspirés de la méthode proposée par Tadross et *al*. (Schéma 66),[345] pour mettre au point une nouvelle approche de synthèse exposée ci-dessous impliquant un groupement protecteur acétate à la place d'un groupe silyle (Schéma 70) :

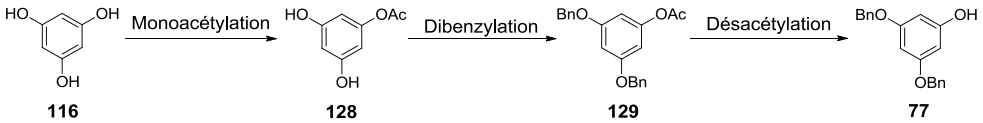


Schéma 70. Nouvelle séquence réactionnelle proposée pour la synthèse du précuseur A (77)

L'étape de monoacétylation est réalisée en utilisant de l'anhydride acétique et de la pyridine puis optimisée en faisant varier la température de réaction, le solvant et le nombre d'équivalents du subtrat **116** (Schéma 71).

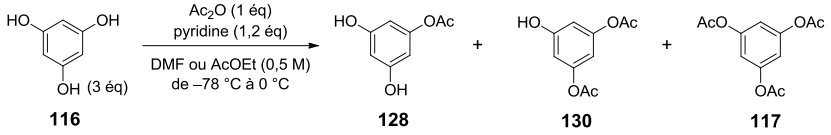


Schéma 71. Monoacétylation du phloroglucinol

Les analyses par CCM et RMN du proton ont permis d'évaluer l'efficacité de la formation du produit attendu **128**. En ce qui concerne la température, l'acétylation ne s'est pas produite à des températures inférieures à –50 °C, mais cette réaction conduite à 0 °C semble suffisamment efficace. Au niveau du solvant, l'utilisation du DMF ou de l'AcOEt ne présente pas de différences significatives en terme de rendement. Cependant, l'AcOEt a été privilégié par rapport au DMF pour des raisons de commodité. Les conditions établies ont ensuite été appliquées pour estimer les proportions approximatives des produits monoacétylé **128**, diacétylé **130** et triacétylé **117** formés en fonction de la quantité de phlorogulcinol **116** engagée. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant (Tableau 5) :

Entrée	**Ac_2O/ pyridine**	**Phloroglucinol**	**Proportion des produits 117 : 130 : 128 : 116**	**Rendement pour 128** (basé sur la quantité d'Ac_2O engagée)
1	1 éq/1,2 éq	1 éq	0,45 : 2,02 : 3,00 : 3,34	**35%**
2	1 éq/1,2 éq	3 éq	0,06 : 0,86 : 3,00 : 4,75	**61%**
3	1 éq/1,2 éq	5 éq	0,07 : 0,84 : 3,00 : 11,06	**61%**

Tableau 5. Evaluation du rendement du composé monoacétylé 128 par analyse RMN du proton

Les meilleurs rendements pour la synthèse du phloroglucinol monoacétylé **128** sont obtenus dans les conditions des entrées 2 et 3, avec un excès de phloroglucinol **116** (3 ou 5 équivalents). Les conditions de l'entrée 2 ont été utilisées pour la monoacétylation du phloroglucinol à plus grande échelle permettant l'obtention du produit **128** attendu avec un rendement isolé de 51% (basé sur la quantité d'Ac_2O engagée), accompagné de phloroglucinol **116** n'ayant pas réagi (Schéma 72).

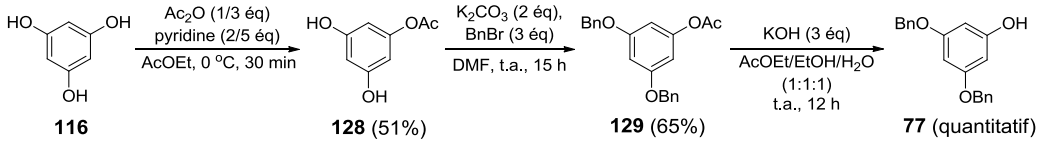


Schéma 72. Synthèse du précurseur A après optimisation

L'étape suivante de dibenzylation a aussi été optimisée en fonction de la nature de la base et de l'halogénure de benzyle nécessaires pour former le produit **129**. De cette étude, le meilleur résultat a été obtenu par l'utilisation d'une combinaison de Cs_2CO_3/BnCl ou de K_2CO_3/BnBr. Toutefois, seule cette dernière combinaison a été retenue pour poursuivre cette synthèse compte tenu que le carbonate de césium est relativement onéreux. Dans ces conditions, le composé **129** est obtenu avec un rendement de 65% (Schéma 72). La dernière étape consiste en une désacétylation du monoacétate **129** à l'aide de l'hydroxyde de potassium. Un premier essai réalisé dans un mélange EtOH/H_2O n'a pas permis de solubiliser de façon efficace le produit de départ **129**, conduisant à une durée de réaction trop importante (36 h). De l'AcOEt a donc été rajouté pour obtenir une phase homogène. Ainsi, en utilisant un mélange d'AcOEt/EtOH/H_2O (1:1:1) à température ambiante, la réaction a permis d'obtenir après 12 h le composé **77** avec un rendement quantitatif (Schéma 72).

Bien que le rendement global de 33% ne soit pas totalement satisfaisant, cette nouvelle voie de synthèse permet l'accès au précurseur A à l'échelle préparative avec des temps de réactions raisonnables et une purification facilitée des produits.

2.2.3. Synthèse du précurseur B

Contrairement au précurseur A, la synthèse du précurseur B (**78**) a été achevée en 5 étapes avec de bons rendements et sur une échelle de plusieurs grammes en se basant, pour les trois premières étapes, sur une séquence décrite dans la littérature.[346] Ces synthèses sont schématisées ci-après (Schéma 73) :

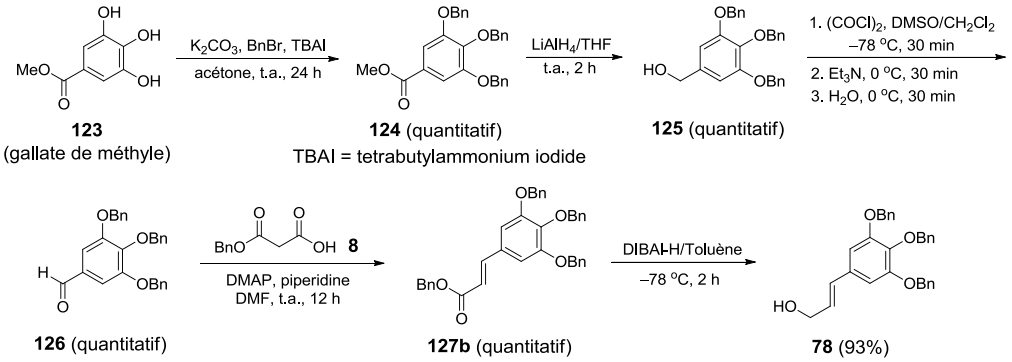


Schéma 73. Synthèse du précurseur B (78)

Le gallate de méthyle commercial **123** est tout d'abord protégé par des groupements benzyle à l'aide du bromure de benzyle, du carbonate de potassium et de l'iodure de tétrabutylammonium (TBAI) en quantité catalytique. Après un traitement aqueux suivi d'une recristallisation dans du *n*-hexane pour éliminer le bromure de benzyle restant, le composé **124** est obtenu avec un rendement quasi-quantitatif.

Cet ester **124** protégé est ensuite réduit en l'alcool correspondant à l'aide de $LiAlH_4$ à température ambiante dans du THF. En fin de réaction, le mélange réactionnel est traité par l'ajout d'eau, suivie d'une solution aqueuse d'hydroxyde de potassium 15% et finalement à nouveau d'eau. Ce traitement simple conduit quasi-quantitativement à l'alcool **125** suffisamment pur pour être directement engagé dans une réaction de Swern permettant une oxydation en conditions douces. Ainsi, sous l'action conjointe du chlorure d'oxalyle, du DMSO et de la triéthylamine, utilisée comme base, dans du CH_2Cl_2, l'alcool **125** est transformé en aldéhyde **126** correspondant avec un rendement quasi-quantitatif sans autre purification nécessaire.

L'étape suivante a consisté en l'oléfination de l'aldéhyde **126** obtenu précédemment. La réaction de Doebner-Knoevenagel appliquée dans ce cas, permet d'obtenir l'ester α,β-insaturé **127b** avec un rendement quantitatif sans nécessité de purification supplémentaire à partir de l'aldéhyde **126** et du réactif de l'acide malonique de monobenzyle **8** en présence de DMAP et de pipéridine utilisées en quantité catalytique.[268]

La dernière étape de la synthèse du précurseur **78** repose sur la réduction de l'ester **127b** en l'alcool correspondant avec de l'hydrure de diisobutylaluminium (DIBAL-H). Cette réaction adaptée de la littérature[347] est réalisée à –78 °C dans du toluène anhydre pendant 2 h. Le précurseur B (**78**) est alors isolé avec un rendement de 93% après purification sur silice (Schéma 73).

2.2.4. Synthèse des dérivés gallocatéchine et épigallocatéchine

En se basant sur le protocole décrit par Actis-Goretta et *al*.,[327] les précurseurs A (**77**) et B (**78**) obtenus préalablement sont soumis à une réaction de Friedel-Craft en présence de Montmorillonite K10 comme substitut du système H_2SO_4/SiO_2 proposé initialement par Li et Chan.[325] Cette argile constituée de SiO_2 (43,77%), Al_2O_3 (18,57%), CaO (1,02%), Na_2O (1,03%) et H_2O (35,61%)[348] agit comme un acide de Lewis et accélère la réaction de substitution électrophile aromatique. Pour cette fusion, le précurseur **71** est ajouté en excès (3 équivalents) afin de limiter la formation du produit secondaire lié à la délocalisation du carbocation formé à partir du précurseur **78**. La purification sur silice permet de récupérer totalement l'unité nucléophile **77** résiduelle par rapport à l'unité électrophile **78** engagée et d'obtenir le produit **79** attendu avec un rendement satisfaisant de 68%. Le composé **79** est en suite protégé avec du chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle (TBSCl), en présence d'imidazole pour donner le composé **80** avec un rendement isolé de 93% (Schéma 74).

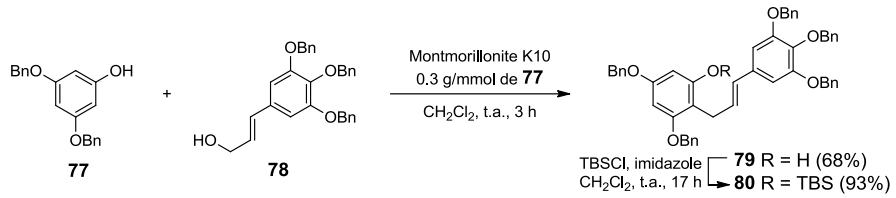


Schéma 74. Synthèse du dérivé (*E*)-1,3-diarylpropène *via* une réaction de Friedel-Craft suivie d'une silylation

Après cette protection, le composé **80** est soumis à une dihydroxylation asymétrique de Sharpless en suivant des conditions décrites dans la littérature[331,340] avec de l'AD-mix-α commercial, un mélange composé d'un ligand chiral dérivé de la dihydroquinine, de carbonate de potassium, du ferricyanure de potassium et d'osmiate de potassium dihydraté. Différents protocoles ont été mis en place pour former le diol souhaité **81**. Un premier essai a été réalisé à 0 °C. Pour cette température de réaction, l'AD-mix-α (1,4 g/mmole de substrat) est introduit à un mélange *tert*-BuOH/H_2O (1:1) à température ambiante avant l'ajout du méthanesulfonamide, $MeSO_2NH_2$ à 0 °C. A ce mélange maintenu à 0 °C est ajouté une solution de composé **80** dissout dans du CH_2Cl_2. La réaction est alors agitée durant 24 h et maintenue à 0 °C, puis un total de quatre lots d'AD-mix-α (0,7 g/mmole de substrat chacun) et de $MeSO_2NH_2$ (0,5 équivalent chacun) sont rajoutés à 24 h d'intervalles. Après quatre jours d'agitation supplémentaire à 0 °C suivie d'un traitement réducteur avec le $Na_2S_2O_3$, le diol **81** est obtenu avec un rendement isolé satisfaisant de 85% (Schéma 75). La pureté énantiomérique de ce type de diol a été mesurée par HPLC analytique à l'aide d'une colonne chirale IA (Daicel *ChiralPak*).[336] L'énantiomère (*S*,*S*) est observé avec un excès énantiomérique de 72%. Par rapport aux excès énantiomériques rapportés, la stéréosélectivité dans notre cas est un peu moins efficace. Le temps de réaction, la consommation des réactifs AD-mix-α et le rendement du produit attendu restent cependant comparables. Un deuxième essai est alors réalisé à température ambiante dans les mêmes conditions permettant d'accéder au produit **81**, au bout de six jours avec quatre lots supplémentaires d'AD-mix-α et de $MeSO_2NH_2$ consommés soit un total de cinq lots, avec un rendement de 76% après purification sur silice. Le rendement et l'excès énantiomérique sont comparables à celui du premier essai (Schéma 75).

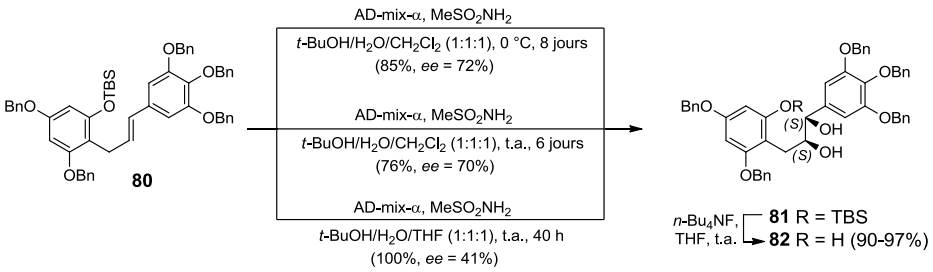


Schéma 75. Différents protocoles à l'accès au produit dihydroxylé suivis d'une déprotection du groupement silyle

Bien que l'utilisation du système de solvant *t*-BuOH/H_2O/CH_2Cl_2 (1:1:1) pour la réaction de dihydroxylation asymétrique de Sharpless ait permis l'obtention du diol **81** avec un bon rendement, les temps de réactions restent longs. Afin d'éviter cet inconvénient, un troisième essai a alors été réalisé en remplaçant le CH_2Cl_2 par du THF. Ce changement conduit ainsi au produit **81** avec un rendement quasi-quantitatif, en seulement 40 h à température ambiante et avec deux seuls lots d'AD-mix-α et de $MeSO_2NH_2$ consommés au total. La pureté du produit **81** ainsi obtenu est suffisament pur pour être engagé dans l'étape suivante sans autre purification supplémentaire (Schéma 75). Par contre l'excès énantiomérique en faveur de l'énantiomère (*S*,*S*) est plus modeste (41%). Cette chute de l'énantiosélectivé de la réaction est probablement liée à ce nouveau système de solvant qui favorise la dihydroxylation de part et d'autre du plan de la double liaison de l'alcène **80** augmentant l'énantiomère (*R*,*R*), et accélère par ailleurs cette réaction transphasée nécessitant moins de réactif d'AD-mix-α consommé. Tous les lots de diol **81** obtenus ont par la suite été soumis à une déprotection du groupement silyle à l'aide du florure de tétrabutylammonium (TBAF) dans du THF. Cette réaction a permis l'accès au triol **82** avec de très bons rendements (90-97%) après purification sur silice (Schéma 75).

L'étape suivante consiste à cycliser le triol **82** avec une inversion de configuration du centre C-2. Cette transformation peut être réalisée *via* une réaction de Mitsunobu intramoléculaire ou par l'intermédiaire d'un orthoester. La première option a tout d'abord été retenue en appliquant le protocole décrit par Ding et *al.*[331] Dans ces conditions, le produit **82** est cyclisé en présence de Ph_3P et de diisopropylazodicarboxylate (DIAD) dans du THF à –20 °C (Schéma 76). Cette réaction, réalisée plusieurs fois, ne conduit au composé **85a** qu'avec un rendement de 30% dans le meilleur des cas après purification (85% dans le cas de Ding et *al.*[331]).

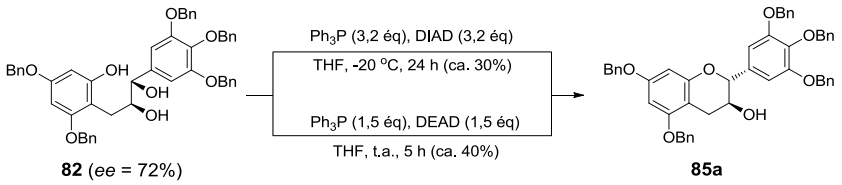


Schéma 76. Accès au dérivé gallocatéchine *via* une réaction de Mitsunobu intramoléculaire

Afin d'améliorer le rendement, cette étape est réalisée de nouveau, mais cette fois-ci en s'appuyant sur un protocle décrit par Krohn et *al*. pour lequel cette même réaction est effectuée à l'aide de Ph_3P et de diéthylazodicarboxylate à température ambiante.[332] Ce protocole appliqué au composé **82** conduit au produit **85a** avec seulement une légère hausse du rendement isolé (ca. 40%) par rapport au protocole précédent, mais qui reste encore insatisfaisant (Schéma 76). De plus, dans les deux cas, la présence persistante d'une impureté inséparable n'a pas permis la caractérisation complète du produit **85a** formé, notamment au niveau de sa stéréochimie.

Pour résoudre ces problèmes, la cyclisation par l'intermédiaire d'un orthoester proposé par Li et Chan[325] a par la suite été envisagée. Le triol **82** du troisième lot (*ee* = 41%) est ainsi traité avec le triéthylorthoformiate en présence de *p*-toluènesulfonate de pyridinium (PPTS) permettant de former l'intermédiaire orthoester **83** qui est directement converti en pyrane **84**. La saponification *in situ* de l'ester formiate **84** résultant par K_2CO_3/MeOH suivie d'une purification sur silice conduit à la gallocatéchine pentabenzylée **85a** avec un bon rendement de 89% (Schéma 77) et les données spectroscopiques sont en accord avec celles décrites dans la littérature.[325,332,336]

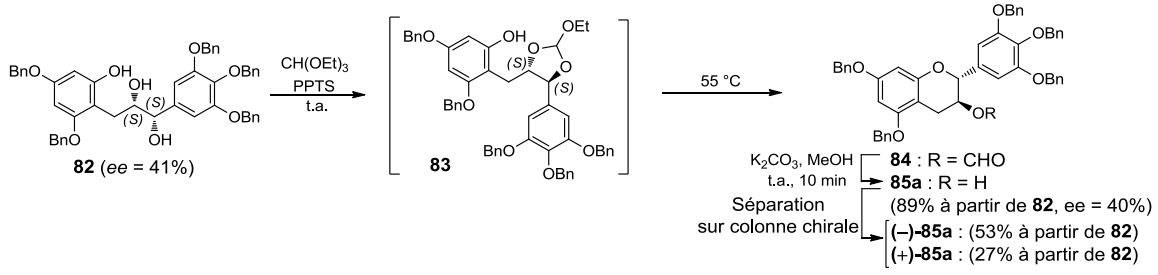


Schéma 77. Accès au dérivé gallocatéchine par l'intermédiaire d'un orthoester

L'attribution de la configuration relative des substituants en position C-2 et C-3 s'est appuyée sur les constantes de couplage en RMN. La valeur élevée des couplages entre ces protons de l'hétérocycle C ($^3J_{2\text{-}3}$ = 8,1 Hz) indique qu'ils sont en *trans*, confirmant la formation de la gallocatéchine. Concernant la stéréochimie du composé **85a** obtenu, la méthode utilisée précédemment pour le produit dihydroxylé **81** n'étant pas adaptable, différentes colonnes chirales (AS-H, OJ-H, OD-H, IA) ainsi que divers éluants (*n*-hexane avec *i*-PrOH, CH_3CN,

CH_2Cl_2, $CHCl_3$, AcOEt) ont été testés. Seuls la colonne IA et le système d'éluant *n*-hexane/*i*-PrOH/$CHCl_3$ semblent adaptés pour ce produit, permettant de déterminer un excès énantiomériquede 40% pour ce dérivé gallocatéchine **85a** correspondant à celui du produit de départ **82**. Un aliquot d'une quarantaine de milligrammes du composé **85a** a ensuite été séparé par HPLC semi-préparative dans les conditions établies, permettant d'isoler l'énantiomère majoritaire (–)-(2*R*,3*S*)-*trans*-gallocatéchine pentabenzylée **(–)-85a** et l'énantiomère minoritaire (+)-(2*S*,3*R*)-*trans*-gallocatéchine pentabenzylée **(+)-85a** avec des rendements respectifs de 53% et 27% à partir du triol **82**.

Une fois la synthèse du dérivé gallocatéchine établie, l'étape suivante a consisté à inverser la stéréochimie du carbone C-3 du composé **85a** pour former son épimère recherché **85b** en utilisant le protocole décrit par Tückmantel et *al*.,[263] (étape d'oxydation/réduction successive du centre C-3). Pour ce faire, à une suspension du produit **85a** dans du CH_2Cl_2 préalablement tamponé par le $NaHCO_3$ pour éviter toute incidence éventuelle de l'acide acétique généré lors de l'oxydation, est ajouté le Dess-Martin périodinane (DMP) suivi d'une quantité catalytique d'eau. En fin de la réaction, un traitement basique/réducteur est suffisamment efficace pour obtenir la cétone intermédiaire **86** suffisament pure pour être directement engagée dans une réduction diastéréosélective à –78 °C à l'aide du L-Selectride. Le dérivé épigallocatéchine **85b** est finalement obtenu après purification sur silice avec un rendement de 57% sur ces deux étapes (Schéma 78).

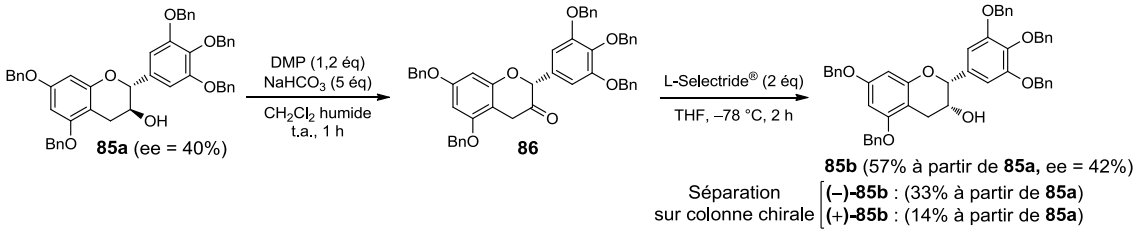


Schéma 78. Synthèse du dérivé épigallocatéchine par oxydation/réduction successive

Les analyses RMN du produit synthétisé **85b** sont en accord avec celles rapportées dans la littérature,[325,329,337] en particulier la valeur faible de la constante de couplage $^3J_{2\text{-}3}$ observée entre les protons en position C-2 et C-3 caractérise une orientation *cis* entre eux et donc confirme la formation de l'épigallocatéchine. La stéréochimie du composé **85b** a ensuite été étudiée en se basant sur la méthode établie pour son épimère **85a**, ainsi l'énantiomère majoritaire a été trouvé avec un excès de 42%. La séparation d'un aliquot du produit **85b** sur colonne chirale a ensuite permis d'isoler cet énantiomère majoritaire (–)-(2*R*,3*R*)-*cis*-épigallocatéchine pentabenzylée **(–)-85b**, mais également l'énantiomère minoritaire (+)-

(2*S*,3*S*)-*cis*-épigallocatéchine pentabenzylée **(+)-85b** avec des rendements respectifs de 33% et 14% à partir de leur précurseur **85a**.

L'objetif principal de cette étude étant l'obtention de sondes finales en quantité raisonnable, la séparation des deux énantiomères **85a**, **85b** à ce stade de la synthèse ne constitue pas une nécessité. Cette séparation conduit en effet inévitablement à une perte de matériel. La synthèse a donc été poursuivie sur les mélanges énantiomériques qui seront séparés uniquement avant l'étape de galloylation.

2.2.5. Fonctionnalisation de la gallocatéchine et épigallocatéchine-finalisation de sondes

En adaptant les protocoles réalisés précédemment dans le cas de la catéchine ou de l'épicatéchine (cf. Chapitre 2), les composés **85a** et **85b** ont été fonctionnalisés en position C-8, tout d'abord, *via* une formylation de Vilsmeier-Haack en présence de $POCl_3$ dans du DMF. Le groupement hydroxyle en position C-3 étant non protégé, la réaction de substitution électrophile aromatique conduit également à une formylation de cet alcool secondaire. La fonction formiate des produits biformylés **131a** et **131b** résultants est ensuite clivée par saponification en utilisant du carbonate de potassium dans un mélange AcOEt/MeOH (voie **a**)[325,329] ou encore de l'hydroxyde de lithium dans THF/H_2O (voie **b**)[349] permettant l'obtention des alcools correspondants **132a** et **132b** avec de bons rendements de 90% et 70%, respectivement, sur deux étapes, et sans variation des excès énantiomériques (Schéma 79).

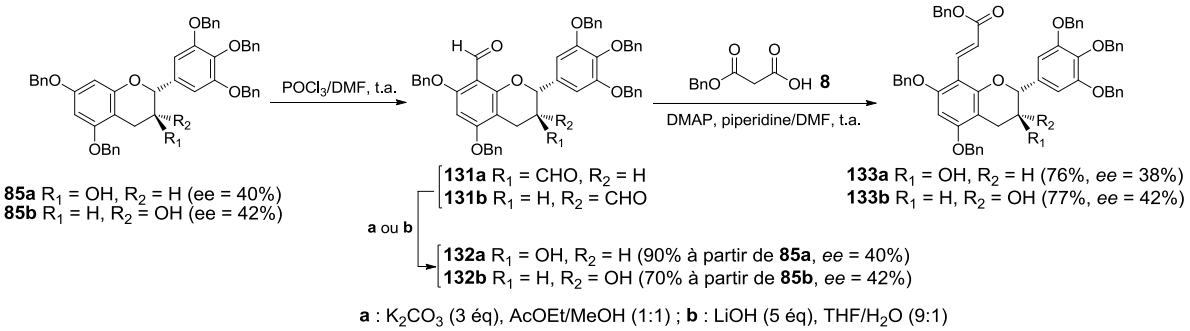


Schéma 79. Fonctionnalisation sur le cycle A de dérivés gallocatéchine et épigallocatéchine

Finalement, l'introduction d'un espaceur sur les aldéhydes **132a** et **132b** obtenus est réalisée *via* une réaction de Doebner-Knoevenagel utilisant le malonate de monobenzyle **8** en présence de DMAP et de piperidine dans du DMF. Les seuls esters (*E*)-α,β-insaturés **133a** et **133b** de stéréochimie *E* ont été obtenus avec des rendements respectifs de 76% et 77% après pufication sur silice (Schéma 79). A cette étape, chacun des deux mélanges énantiomériques **133a** et **133b** formés a été séparé en énantiomères purs par HPLC semi-préparative utilisant la

colonne IA et le système d'éluants *n*-hexane/*i*-PrOH/$CHCl_3$. Les énantiomères majoritaires de chaque version correspondant aux flavanols naturels **(–)-133a** et **(–)-133b** ont ainsi été obtenus avec des rendements respectifs de 39% et 50% à partir de leurs aldéhydes de départ **132a** et **132b**.

L'étape suivante, à partir des dérivés flavanols énantiomériquement purs **(–)-132a** et **(–)-132b**, consiste en la galloylation de leur groupement hydroxyle en position C-3, permettant l'accès aux esters gallates correspondantes. L'acide tri-*O*-benzylgallique (**134**) nécessaire à la formation de tels dérivés a été préparé en adaptant les protocoles décrits dans la littérature,[346,350] à partir de l'ester **124** précédemment utilisé dans la synthèse du précurseur B (**78**). La saponification de l'ester **124** en présence de 1,6 équivalents d'hydroxyde de sodium dans un mélange EtOH/THF (1:1), assurant une bonne solubilité des composés organiques, a permis de régénérer rapidement l'acide **134** avec un rendement quasi-quantitatif par simple traitement aqueux (Schéma 80).

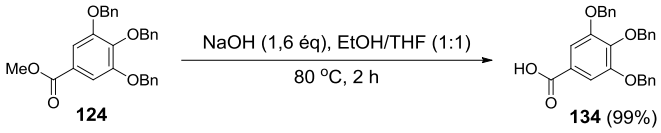


Schéma 80. Préparation de l'acide tri-*O*-benzylgallique (134)

Une fois le réactif **134** obtenu, son incorporation aux alcools **(–)-133a** et **(–)-133b** peut s'effectuer *via* une acylation par le chlorure d'acide **87**,[325] ou utilisant des agents de couplage[329,337] ou *via* une réaction de Mitsunobu intermoléculaire.[331] Cette dernière voie intéressante, d'après le protocole décrit par Ding et *al.*,[331] pourrait permettre l'accès énantiosélective au dérivé EGCG directement à partir du dérivé GC **(–)-133a** en inversant la configuration du centre C-3 de celui-ci sans nécessiter le passage par l'oxydation/réduction successive du centre C-3. Les premiers essais d'acylation de l'alcool GC **(–)-133a** *via* une réaction de Mitsunobu intermoléculaire ont été réalisés en présence de Ph_3P et de réactifs DIAD ou DEAD selon les protocoles décrit par Ding et *al*.[331] ou encore par Krohn et *al.*,[67] celui utilisé pour une cyclisation intramoléculaire (Schéma 81).

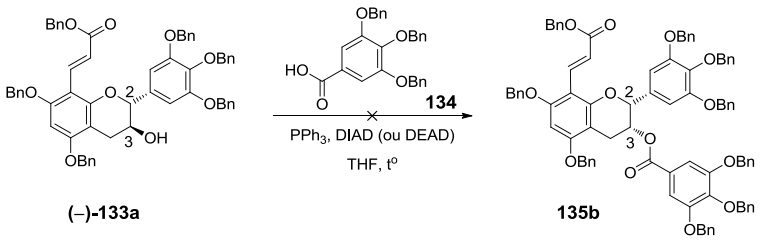


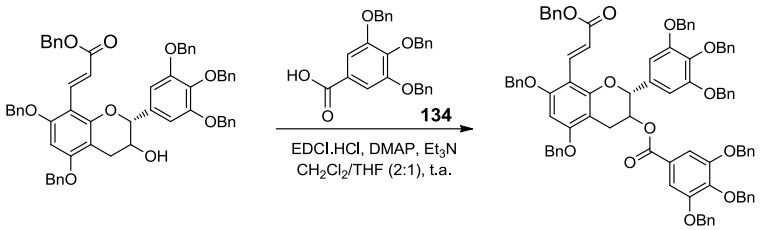
Schéma 81. Accès direct au dérivé EGCG 135b à partir du dérivé GC (–)-133a *via* une réaction de Mitstunobu intermoléculaire

Cependant, malgré plusieurs essais en variant la température et le réactif, il n'a pas été possible d'accéder au produit désiré **135b** (Tableau 6). Dans tous les cas, l'alcool de départ **(–)-133a** a été totalement isolé d'un mélange complexe de l'acide **134** et de réactifs.

Entrée	Composé **(–)-133a** (mg)	Composé **134** (mg)	Conditions
1	50 (1 éq)	120 (5 éq)	DIAD (10 éq), Ph_3P (10 éq), –20 °C : 24 h puis 0 °C : 24 h
2	31 (1 éq)	29 (2 éq)	DIAD (5 éq), Ph_3P (5 éq), t.a. : 24 h
3	30 (1 éq)	72 (5 éq)	DEAD (10 éq), Ph_3P (10 éq), –20 °C : 24 h
4	30 (1 éq)	29 (2 éq)	DEAD (5 éq), Ph_3P (5 éq), t.a. : 18 h

Tableau 6. Conditions de la galloylation via une réaction de Mitstunobu intermoléculaire

Les acylations à l'aide d'un agent de couplage ont donc été effectuées. En traitant les alcools **(–)-133a** et **(–)-133b** avec l'acide **134** en présence d'EDCI•HCl, de DMAP et d'Et_3N dans un mélange CH_2Cl_2/THF anhydre à température ambiante selon le protocole décrit par Ohmori et *al*.,[337] les dérivés gallates de GC **(–)-135a** et d'EGC **(–)-135b** ont ainsi été obtenus avec de bons rendements respectifs de 86% et 88% après purification sur silice (Schéma 82).



(2*R*,3*S*)- **(–)-133a**
(2*R*,3*R*)- **(–)-133b**

(2*R*,3*S*)- **(–)-135a** (86%)
(2*R*,3*R*)- **(–)-135b** (88%)

Schéma 82. Accès aux gallates de dérivés de GC et d'EGC

Les alcools **(–)-133a** et **(–)-133b** et leurs dérivés gallates **(–)-135a** et **(–)-135b** ont ensuite été soumis à une hydrogénolyse et une hydrogénation concomitante de la double liaison de l'espaceur grâce au palladium sur charbon conduisant aux acides correspondants **136a-d** avec des rendements quantitatifs (Schéma 83). En appliquant le protocole mis au point pour la synthèse de la sonde porteuse de procyanidine B2, les acides ainsi obtenus sont lactonisés à l'aide de l'EDCI•HCl dans du DMF anhydre, puis couplés à la cystéamine avant l'introduction au dérivé biotine maléimide **50** (Schéma 83).

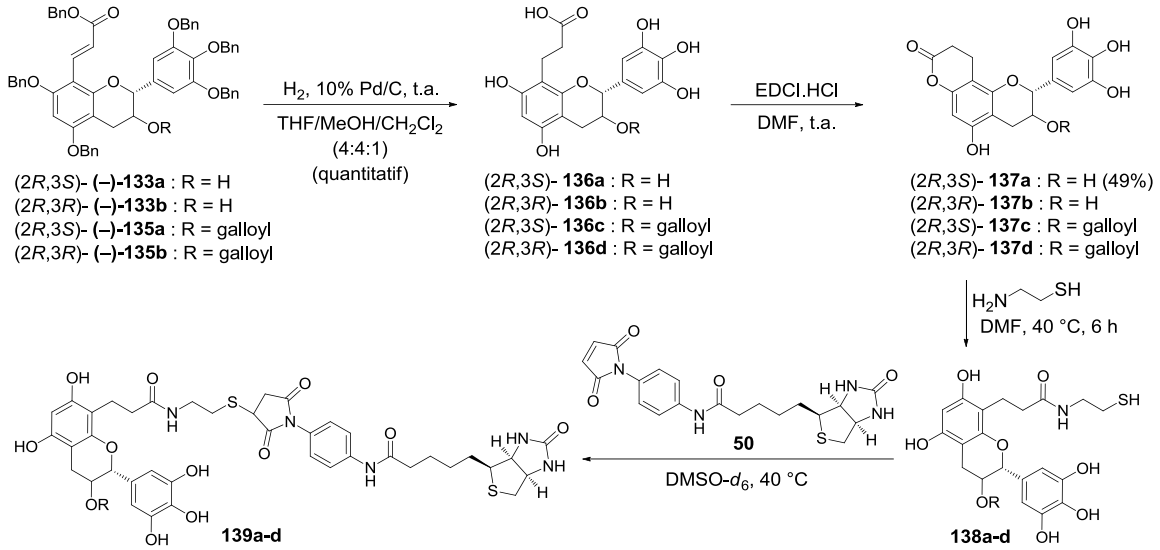


Schéma 83. Dernières étapes de la synthèse de sondes porteuses d'EGCG et de ses analogues

A l'issue de ces réactions, les analyses en RMN et en masse ont confirmé la formation des sondes **139a-d** attendues mais également la présence systématique et notable d'adduits maléimide biotinylé **50**-cystéamine et cystamine résultante d'une oxydation simultanée du groupement thiol au cours du couplage de la cystéamine. La purification par HPLC semi-préparative en phase inverse de tels mélanges réactionnels complexes, notamment à petite échelle, n'a pas pu permettre l'accès aux sondes finales **239a-d** pures pour les caractérisations totales. A ce stade, l'engagement d'un produit plus pur dans un couplage au maléimide biotinylé **50** est donc nécessaire. Néanmoins, l'isolement des intermédiaires **137a-d**, **138a-d** ne semblait pas adéquat en raison de leur caractère hydrophile et de sensibilité à l'oxygène. Le clivage du pont disulfure formé par un traitement réducteur au DTT ou au chlorhydrate de tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP) est aussi exclu en raison de la réactivité de ces derniers vis-à-vis du maléimide biotinylé **50**.[351] Ainsi, ces réactifs devraient être éliminés correctement avant l'addition au biotine-maléimide **50**. Afin d'éviter cette complexité, l'utilisation d'un dérivé cystéamine dont le thiol est protégé par le groupement triphénylméthylé (noté Trt) a donc été considérée. Ce dérivé **140** a été préparé chimiosélectivement à partir de la cystéamine en présence de TFA et de chlorure de triphénylméthyle dans du CH_2Cl_2 d'après le protocole décrit par Liu *et al*.[352] avec un rendement quasi-quantitatif (Schéma 84). Cette nouvelle voie de synthèse basée sur la cystéamine *S*-tritylée **140** à la place du précurseur de celle-ci a ensuite été validée sur la lactone catéchine **6a** permettant d'obtenir le même type de sonde version catéchine après trois étapes : couplage, détritylation[353] et addition de Michaël avec un rendement global de 64% (Schéma 84). Les caractérisations du produit **143a** obtenu sont en accord avec celles rapportées précédemment.[242]

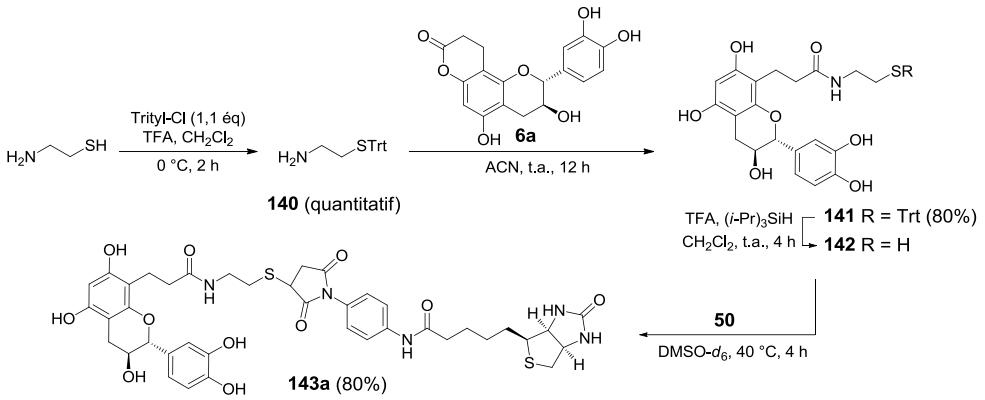


Schéma 84. Accès à la sonde version catéchine *via* le couplage avec la cystéamine *S*-tritylée (140)

Bien que ces protocoles soient efficaces pour la lactone catéchine, ils présentent cependant des inconvénients une fois appliqués aux versions lactones des gallates de GC et d'EGC. Premièrement, le dérivé polyphénol tritylé résultant est difficilement purifiable sur colonne de silice ou sur colonne en phase inverse en raison de son caractère amphiphile. Deuxièment, la détritylation dans les conditions décrites dure plus longtemps à cause de la faible solubilité du produit engagé, qui provoque une dégradation de celui-ci.

Devant les difficultés lors de l'étape de couplage avec la cystéamine, le développement des sondes en version gallate consistant en l'introduction directe de l'espaceur PEG biotinylée a donc été privilégié (voie B, Schéma 42). Ainsi, l'amidation par la chaîne PEG biotinylée **29** des dérivés d'acides galloylés **136c-d** préalablement lactonisés a permis d'obtenir des sondes PEG biotinylées porteuses de GCG **144a** et d'EGCG **144b** avec des rendements globaux de 5% et 13% respectivement à partir des produits perbenzylés **(–)-135a** et **(–)-135b** (Schéma 85). Ces rendements modestes sont dûs en partie à une faible réactivité des substrats polyphénoliques et à des difficultés de purification sur colonne en phase inverse.

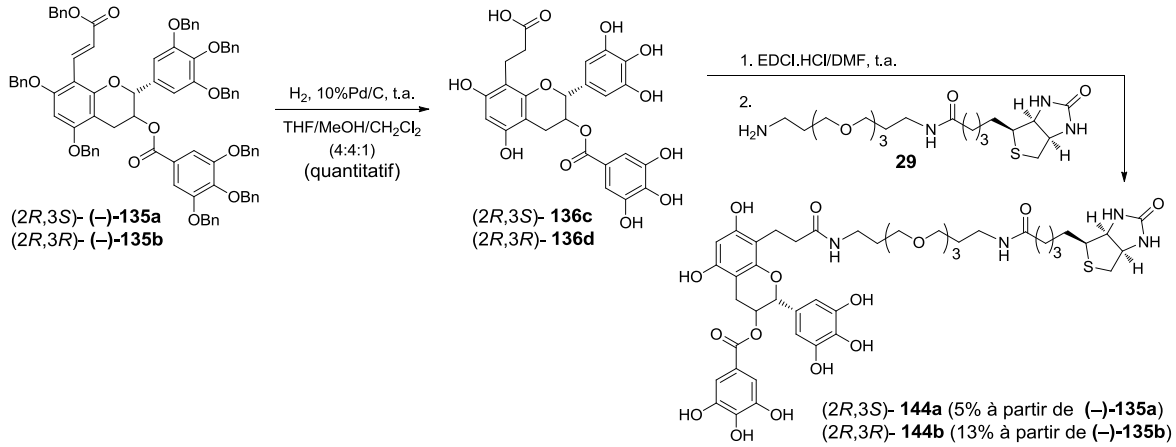


Schéma 85. Synthèse selon la voie B des sondes porteuses de GCG et d'EGCG

Les analyses RMN mono- (^{1}H, ^{13}C, DEPT) et bidimensionnelles (COSY, NOESY, HMQC, HMBC) dans le DMSO deutéré, en particulier l'expérience ROESY, ont permis de confirmer la structure de l'EGCG au sein de la sonde **144b** synthétisée. L'observation des effets NOE entre les protons H-3/H-2 et H-3/H-4α, H-3/H-4β prouve que l'hétérocycle C adopte préférentiellement un conformère E (dont le cycle B en position C-2 se trouve en position équatoriale) et que les protons H-2 et H-3 sont du même côté de l'hétérocycle C donc de configuration *cis*. Il en résulte que le groupement gallate est du côté opposé et orienté en axial (Figure 74).

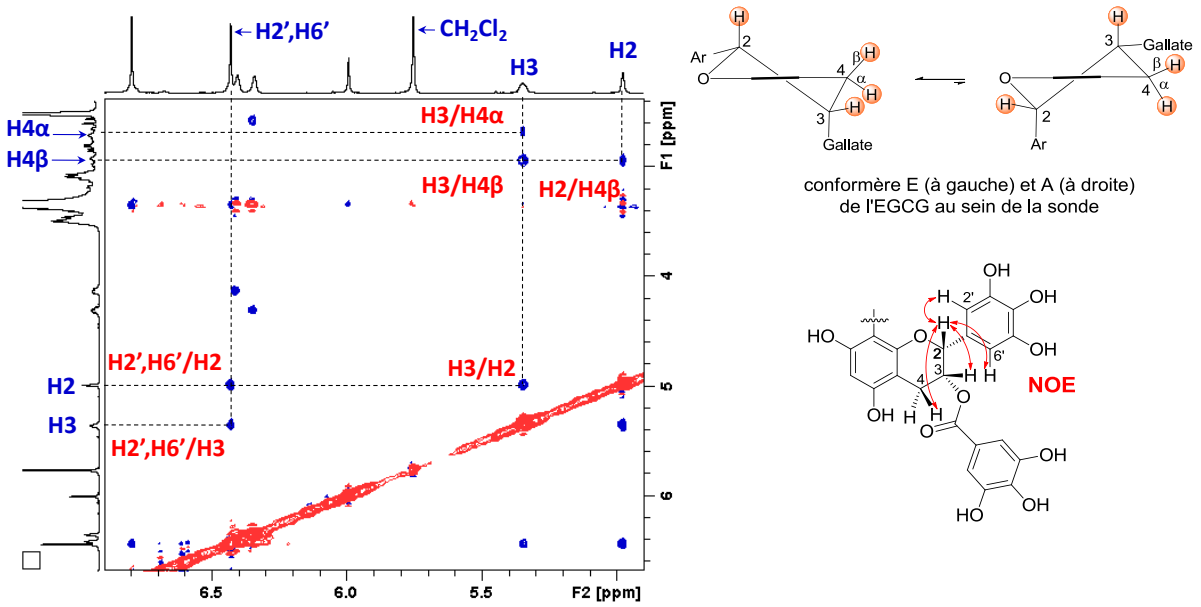


Figure 74. Zoom ROESY de l'EGCG au sein de la sonde 144b

3. Etude d'interactions polyphénol-protéine par SPR

Les expériences d'interactions polyphénol-protéines par SPR ont été réalisées sur un appareil BIAcore^{TM} 3000 à 25 °C en utilisant des sensor chips CM5 (BIAcore).[354–356] Sur ces puces de detection CM5, 4 pistes sont disponibles sur la surface dont une servant de piste témoin. Le tampon de course utilisé pour ces essais, dans la plupart des cas, est le phosphate de sodium 50 mM, pH = 7,0 contenant 150 mM de NaCl, et 0,005 % de surfactant P20.[77,242] En pratique, l'étude d'une interaction par SPR consiste généralement en 4 étapes : l'immobilisation du polyphénol sur l'une des pistes de la puce, l'injection de la protéine à la surface de la puce, la régénération (dissociation des complexes formés) pour réutiliser la puce et l'évaluation des données permettant de déterminer éventuellement des constantes cinétiques et d'affinité.

3.1. Immobilisation de ligands polyphénols biotinylés sur la sensor chip CM5

Les différents adduits polyphénols-biotine ont été immobilisés sur la surface de carboxylméthyldextrane (CM5) en utilisant la méthode d'immobilisation par capture d'affinité (l'immobilisation indirecte) grâce à l'interaction non covalente très forte entre la streptavidine et la biotine (K_D = 4 × 10^{-14} M).[357] Par rapport à la stratégie d'immobilisation directe par couplage thiol-or, celle-ci permet de rendre plus stable la surface modifiée de la puce au fil du temps.[77,242] Le prix moyen d'une puce CM5 étant un tier moins cher que celle recouverte de streptavidine (puce SA), la streptavidine a tout d'abord été immobilisée sur la surface de la puce CM5 préalablement activée par EDCI/NHS selon le protocole d'immobilisation directe par couplage amine (cf. partie expérimentale).[235,239,355,356,358] Une fois la surface bien recouverte de streptavidine (7000-8500 RU), l'immobilisation du polyphénol biotinylé a été réalisée par injection sur la piste sélectionnée d'une solution de ligand à une concentration de 25-100 nM, préalablement diluée avec le tampon de course d'une solution 1 mM dans du DMSO, à un débit de 5 μL/min. En parallèle, la surface de la piste de référence est recouverte de streptavidine, immobilisée selon le même protocole, permettant de comparer par la suite les effets de modifications de surface des 3 autres pistes.[359] Une fois l'immobilisation terminée, les sites actifs résiduels de la streptavidine sont bloqués par l'injection d'une solution de biotine, et la surface est lavée pour éliminer les molécules non immobilisées par la circulation du tampon de course jusqu'à la stabilisation de la ligne de base (Figure 75).

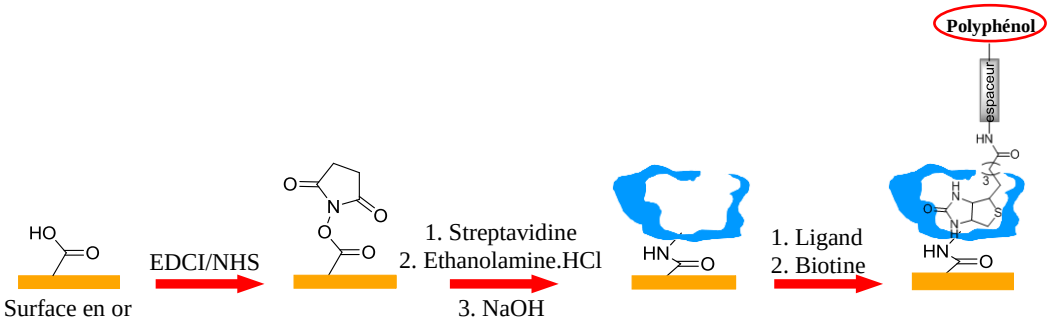


Figure 75. Immobilisation des polyphénols sur la sensor chip CM5 par capture d'affinité et étude d'interactions

3.2. Interaction entre les polyphénols immobilisés avec des protéines

Cette étude complète celle réalisée précédemment au laboratoire par le Dr M. Delanoy.[242] Dans cette étude, les adduits polyphénols-maléimide de biotine sont directement immobilisés sur les sensor chips SA (BIAcore) pour étudier leurs interactions avec les protéines. Cependant, par suite des difficultés de la purification des sondes à base de maléimide de biotine portant l'EGCG et ses analogues, les sondes à chaîne PEG ont été synthétisées. Pour valider ce changement, ainsi que la mise en jeu de la sensor chips CM5, il est donc nécessaire d'évaluer l'influence de la nature de l'espaceur sur un polyphénol vis-à-vis de son interaction avec une protéine donnée.

Pour ces essais préliminaires, trois ligands ont été immobilisés avec succès sur la sensor chip CM5 par la stratégie de capture d'affinité : la catéchine-maléimide de biotine **143a** (143 RU), l'épicatéchine-maléimide de biotine **143b** (147 RU) et la sonde à la chaîne PEG B1 **30a** (134 RU) (Figure 76).[242]

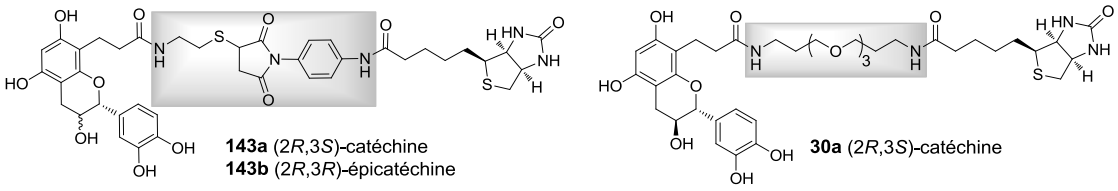


Figure 76. Deux types de sondes immobilisées sur la sensor chip CM5

Des analyses d'interactions de ces polyphénols ont été réalisées avec la BSA et la myoglobine commerciales à des concentrations de 6,25, 25 et 500 nM, et aussi avec la LDOX partiellement purifiée à 200, 400 et 800 nM en les injectant par ordre croissant de concentration. Ces analyses ont été réalisées en triplicat. Les sensorgrammes obtenus lors de ces analyses n'ont cependant pas été exploitables. Par manque de LDOX fraîche, l'enzyme possédant une affinité particulière pour ces polyphénols comme témoin positif, les résultats obtenus n'ont pas permis

de valider ces changements. La production d'un nouveau lot de LDOX fraîche et dialysée dans les meilleures conditions (tampon sodium phosphate 20 mM, pH 6,0, NaCl 100 mM, DMSO 5% et P20 0.005%) pour l'étude d'interactions a donc été planifiée.

4. Conclusions

En raison du manque de disponibilité de la procyanidine B2 et de l'EGCG, ainsi que des analogues de cette dernière, la synthèse de ces polyphénols et leur fonctionnalisation ont été effectuées. Dans un premier temps, la procyanidine B2 **70** est synthétisée en quatre étapes à partir de l'épicatéchine commerciale avec un rendement global de 23%. Les analyses en RMN permettent de confirmer la procyanidine B2 naturelle obtenue, caractérisée par un bon contrôle des régio- et stéréochimies de la liaison interflavane. La fonctionnalisation impliquant le carbone en position C-8 du cycle A de la procyanidine B2 **70** a été accomplie *via* deux réactions de Vilsmeier-Haack et de Doebner-Knoevenagel, permettant d'accéder à la lactone procyanindine B2 après une séquence d'hydrogénolyse/réduction et de lactonisation avec un rendement global de 50%. L'incorporation du dérivé lactone aussi produit à un espaceur biotinylé a été réalisée *via* un couplage avec la cystéamine suivie d'une addition de Michaël au maléimide biotinylé **50**. La synthèse de cet espaceur **50** est quant à elle réalisée de façon efficace en cinq étapes avec un rendement global de 36% à partir de la *p*-phénylènediamine commerciale. En s'appuyant sur ce protocole, l'adduit biotine maléimide-procyanidine B2 **76** est synthétisé avec un rendement de 30% sur trois étapes après une purification sur colonne en phase inverse par HPLC semi-préparative.

Dans un second temps, la réalisation des sondes porteuses d'EGCG et de ses analogues a débuté par la synthèse totale de ces polyphénols et leur fonctionnalisation. Afin d'accéder à ces molécules, l'approche de cycloéthérification a été choisie pour la synthèse du dérivé gallocatéchine à partir de ses précurseurs. L'inversion ultérieure du centre stéréogénique C-3 du produit résultant a été envisagée soit par une séquence oxydo/réductrice successive, soit *via* une réaction de Mitsunobu pour l'obtention du dérivé épigallocatéchine et de sa version gallate. Les difficultés rencontrées lors de la préparation du précurseur **77** ont nécessité une nouvelle approche de synthèse optimisée permettant l'accès au produit **77** attendu à partir du phloroglucinol sur une échelle de plusieurs grammes. Le précurseur **78** a quant à lui été obtenu aisément avec de très bons rendements sur les cinq étapes à partir du gallate de méthyle commercial. Une fois les précurseurs disponibles, leur fusion *via* une réaction de Friedel-Craft conduit au dérivé 1,3-diarylpropène avec un bon rendement de 68%. Un changement de solvant lors de l'étape dihydroxylation asymétrique de Sharpless sur l'alcène préalablement obtenu a conduit au diol avec un excellent rendement mais un peu moins efficace au niveau de

l'énantiosélectivité. Par la suite, l'étape de cyclisation *via* la réaction de Mitsunobu intramoléculaire n'a conduit au dérivé gallocatéchine qu'avec un rendement insatisfaisant. La galloylation *via* la réaction de Mitsunobu intermoléculaire n'a pas non plus permis l'accès au dérivé EGCG. Par contre, le passage par un intermédiaire orthoester a fourni, de façon efficace et stéréosélective le dérivé gallocatéchine qui a ensuite été converti en son épimère via un protocole oxydo/réducteur successif avec un rendement de 57%. La dérivatisation des *trans*- et *cis*-flavanols obtenus en deux étapes formylation et oléfination suivie de la séparation sur colonne chirale a permis d'accéder aux énantiomères naturels majoritaires de chaque version avec un rendement global de 27% pour chacun, à partir des dérivés flavanols correspondants. La galloylation des alcools **(–)-133a** et **(–)-133b** a conduit aux versions gallates avec de bons rendements. Enfin, les dernières étapes pour l'obtention des sondes consistent en la déprotection/hydrogénation puis la lactonisation avant l'introduction d'un espaceur biotinylé. L'accès aux adduits polyphénol-biotine maléimide *via* un couplage avec la cystéamine a posé des difficultés en raison de réaction secondaires, qui n'ont pas permis d'isoler les produits attendus. Le développement de sondes en version gallate en introduisant l'espaceur PEG biotinylée a donc été privilégié. Deux sondes moléculaires porteuses de GCG **144a** et d'EGCG **144b** ont ainsi été synthétisées avec des rendements globaux de 5% et 13%, respectivement, à partir de leurs dérivés totalement benzylés.

Conclusion et perspectives

Conclusion

Les travaux effectués au cours de cette thèse ont consisté à concevoir, à synthétiser et à évaluer des sondes moléculaires polyvalentes porteuses de polyphénols comme substrats d'affinité pour l'analyse des interactions polyphénol-protéine, selon une approche similaire à celle de la technologie de protéomique chimique dite "Affinity-Based Protein Profiling" (ABPP). Le développement et l'utilisation de telles sondes permettront des avancées majeures dans la compréhension des interactions polyphénol-protéine(s) et des activités biologiques qui peuvent en résulter. Dans ce contexte, de nombreuses sondes à polyphénols ont été synthétisées, qui pourront être utilisées soit pour identifier au sein d'un mélange complexe de protéines, une protéine ayant une affinité spécifique pour un polyphénol donné, soit pour étudier de manière qualitative les interactions d'un polyphénol avec une protéine donnée en temps réel par la technique de résonance plasmonique de surface (SPR).

Dans une première étude, nous avons conçu et développé des sondes protéomiques. Ces sondes porteuses d'un flavan-3-ol (la catéchine ou l'épicatéchine) sont capables d'interagir avec une ou plusieurs protéines et de les capturer de façon covalente sous l'activation par voie photochimique (sondes de type A) ou oxydative (sondes de type B). Cette stratégie a été validée à l'aide de la LDOX, une enzyme impliquée dans les dernières étapes de la voie de biosynthèse des flavonoïdes. La capture de la LDOX en conditions oxydantes s'est avérée être plus efficace que celle impliquant une fonction réactive photoactivable. Le type de sondes activables par oxydation a ensuite été appliqué à des mélanges protéiques complexes issus d'*E. coli* ou de *Vitis vinifera*. Les résultats obtenus nous ont permis la mise au point d'un outil expérimental efficace pour l'étude d'interactions particulières entre polyphénols et protéines. Bien qu'efficaces et sélectives lors de l'étape de capture et d'enrichissement sur support solide, ces premières sondes ont révélé une limitation majeure lors de l'étape d'élution en conditions dénaturantes. L'identification du site de fixation de la sonde sur l'enzyme modèle LDOX n'a en effet pas abouti.

Des sondes photoclivables munies de différents espaceurs porteurs de catéchine (sondes de type C) ont aussi donc été conçues et synthétisées sur le même principe que celui des sondes de type B pour s'affranchir des problèmes rencontrés. L'incorporation au coeur de la sonde d'un lien photosensible de type *o*-nitrobenzyle pouvant être clivé sous irradiation à 365 nm permettra

d'éluer uniquement la protéine ciblée par la sonde en conditions non-dénaturantes. Les résultats obtenus à ce jour ont permis de mettre en évidence le photoclivage des sondes C fixées à la LDOX en solution. Par contre, le photoclivage de ces complexes "sonde C-protéine" après immobilisation sur supports solides (billes magnétiques) n'a malheureusement pas permis de relarguer la protéine. Cependant, l'utilisation de ces sondes C avec la protéine en solution, suivie d'une protéolyse devrait permettre de récupérér et d'analyser les peptides produits et fixés au polyphénol.

En s'appuyant sur le principe et l'efficacité des sondes activables par oxydation chimique, notre seconde étude a également consisté en la synthèse de sondes structuralement modulables, équipées de polyphénols de type flavanol et d'une biotine. Cette biotine terminale pourra servir soit à l'immobilisation sur des surfaces SPR, permettant ainsi l'étude d'interactions polyphénol-protéine en temps réel, soit à la détection/purification en protéomique chimique. Des polyphénols d'intérêts biologiques multiples comme la procyanidine B2, l'EGCG et ses analogues, ont été synthétisés puis fonctionnalisés pour leur installation à un espaceur biotinylé à base de maléimide ou de PEG. Ces synthèses ont permis l'obtention de sondes porteuses de tels polyphénols, prêtes à être utilisées.

Perspectives

Les perspectives de ce travail consisteront principalement à utiliser ces sondes polyvalentes et modulables, porteuses de différents polyphénols pour l'étude d'interactions polyphénol-protéine. Tout d'abord, l'utilisation de ces sondes permettra d'étudier en temps réel les interactions par la technique SPR. Ces sondes pourront ensuite approfondir l'étude de telles interactions au niveau moléculaire à l'aide des techniques de la protéomique chimique et permettre d'isoler la ou les protéine(s) ciblée(s), d'identifier les sites de fixation privilégiés du polyphénol sur celle(s)-ci et ainsi de mieux en comprendre leur mode d'action. Cette stratégie offrira également la possibilité de travailler directement sur des extraits complexes de protéines, voire même des protéines dans leurs environnements natifs.

Chapitre 4

Partie expérimentale

1. General information

Commercially available reagents were used as received unless otherwise noted. All reactions utilizing air- and moisture-sensitive reagents were carried out in flame-dried glassware under inert atmosphere (nitrogen or argon) with dry solvents. Solvents were either purified immediately before use from a solvent purification system (MB SPS-800, MBRAUN) by filtration through activated alumina columns under argon [CH_2Cl_2, tetrahydrofuran (THF)] or freshly distilled under reduced pressure over calcium hydride (CaH_2) [*N*,*N*-dimethylformamide (DMF), CH_2Cl_2], or over Drierite® (CH_3COOH) and stored in activated 4 Å molecular sieves, or purified by distillation over sodium (Na)/benzophenone (THF) under N_2 prior to use. Methanol (MeOH), ethyl acetate (EtOAc), diethylic ether (Et_2O), acetone ($(CH_3)_2CO$), acetonitrile (CH_3CN), cyclohexane, trifluoroacetic acid (TFA), piperidine and ammonium hydroxide solution (30-33%) were used as received. HPLC-grade CH_3CN and MilliQ water were used for HPLC analyses and purification. Evaporations were conducted under reduced pressure at temperatures less than 40 °C, except for DMF at 50 °C. Further drying of residues was accomplished under high vacuum, except for volatile compounds. Column chromatography was carried out under positive pressure using 40-63 μm silica gel (Merck). Eluting solvents are listed as volume/volume ratios and were used without further purification. Reactions and purifications were monitored by thin layer chromatography (TLC) carried out on Merck silica gel plates (60 F_{254}) or on Merck C18 reverse phase plates (60 RP-18 F254s). Visualization was accomplished with UV (λ 254, 312, 365 nm) light and staining with a solution of ceric ammonium molybdate or phosphomolybdic acid or ninhydrin followed by heating as the developing agent. Low-temperature reactions were carried out over ice bath (0 °C), acetone/dry ice bath (–78 °C) or on a cryostat.

1.1. Melting point (m.p.)

Melting points of recrystallized solids and amorphous powders were measured with a digital melting point apparatus Büchi B-540. Opened capillary tubes were used and melting point values were not corrected.

1.2. Infrared spectroscopy (IR)

IR spectra were recorded between 4000 and 500 cm^{-1} on a Bruker IFS55 FT-IR spectrometer (OPUS/IR 3.0.2). Oil and solid samples were dissolved in dichloromethane or in acetone and analyzed as films by evaporation of the solvent on a zinc-selenide (ZnSe) pellet, otherwise noted.

1.3. Optical rotation ([α]D)

The specific optical rotation (specific rotation) was recorded on a JASCO P-2000 polarimeter at 25 °C using a 1 mL quartz cell with a path length of 1 dm and the sodium light of wavelength 589 nm. The solvents and concentration *c* (the number of g of substance contained in 100 mL of solution) were given for each compound.

1.4. UV-Vis spectra (UV-Vis)

UV-Vis spectra were recorded on a CARY 300 Scan UV-Visible spectrophotometer (Varian) at the range of 200-500 nm in the indicated solvent or from analytical HPLC analysis detection, in the solvent composition given by elution of each compound.

1.5. Circular Dichroism (CD)

CD measurements were carried out on a JASCO J-815 CD spectrometer. The CD spectra were collected between 400 and 220 nm at 25 °C at a concentration of 0.25 mg/mL of sample in HPLC grade acetonitrile using a quartz cell with a path length of 2 mm. Data were acquired in continuous scan mode with a data pitch of 0.1 nm, a scanning speed of 100 nm/min, 2 nm bandwith and 3 accumulations per sample. Molar circular dichroism or molar differential (Δε) was calculated using the following equation:

$$\Delta\varepsilon = \frac{[\theta]}{a} = \frac{100.\theta}{C.l.a} \text{ (with a = 3298.2 m}^2\text{.mol}^{-1}\text{)}$$

where θ is the observed value of degrees of ellipticity and often quoted as millidegrees (m°), C is the concentration in molar, and *l* the cell pathlength in cm. The factor of 100 converts to pathlength in meters.

1.6. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)[360]

^{1}H-NMR: Proton NMR spectra were recorded in the indicated solvent on a Bruker Avance II 300 MHz spectrometer or on a Bruker DPX 400 MHz spectrometer. Chemical shifts (δ) are expressed in parts per million relative to the residual solvent used as internal standard ($CDCl_3$: δ 7.26 ppm; acetone-d_6: δ 2.05 ppm; methanol-d_4: δ 3.31 ppm; DMSO-d_6: δ 2.50 ppm; acetonitrile-d_3: δ 1.94 ppm). Coupling constants (*J*) are given in Hertz (Hz). Splitting patterns

are abbreviated as follows: s (singulet), bs (broad singulet), d (doublet), dd (double doublet), t (triplet), q (quartet), p (pentet), m (multiplet).

^{13}C-NMR: Carbon NMR spectra were recorded in the indicated solvent on a Bruker Avance II 300 MHz (at 75 MHz) or a Bruker DPX 400 MHz (at 100 MHz) or a Bruker Avance III 800 MHz (at 200 MHz) spectrometer. Carbon multiplicities were determined by DEPT135 experiments. Chemical shifts (δ) are expressed in parts per million relative to the residual solvent used as internal standard ($CDCl_3$: δ 77.0 ppm; acetone-d_6: δ 29.84 ppm; methanol-d_4: δ 49.00 ppm; DMSO-d_6: δ 39.52 ppm; acetonitrile-d_3: δ 1.32 ppm).

1.7. Mass Spectrometry (MS)

Low resolution mass spectra (LRMS) were recorded on a Thermo Finnigan LCQ Deca XP ion trap mass spectrometer using electrospray (ESIMS, positive mode unless otherwise noted) at the mass spectrometry laboratory of the Institut Européen de Chimie et Biologie (IECB).

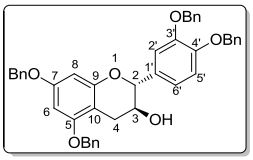
High resolution mass spectrometric analysis (HRMS, positive mode unless otherwise noted) were obtained from the mass spectrometry laboratory of the Institut Européen de Chimie et Biologie (IECB) and from the Centre d'Etude Structurale et d'Analyse des Molécules Organiques (CESAMO, University of Bordeaux).

1.8. HPLC

Preparative HPLC separations were carried out using a Daicel Chiralpak® IA (250 × 10 mm) or a Varian Microsorb C18 (250 × 10 mm, 5 μm) column on a Varian system equipped with ProStar 215 pumps and a ProStar 320 UV-visible detector. Analytical HPLC were performed using the respective analytical columns (250 × 4.6 mm) on a Thermo system equipped with P1500 pumps and a UV 6000LP diode array detector. HPLC grade solvents were used and indicated for each elution.

2. Experimental procedures

1a **(2*R*,3*S*)-3',4',5,7-Tetrakis(benzyloxy)flavan-3-ol**



CAS : 20728-73-8
CF : $C_{43}H_{38}O_6$
EM : 650.2668
MW : 650.76 g.mol^{-1}

According to the procedure described in the litterature,[99,67] to a stirred ice-cold solution of commercial (+)-catechin (2.1 g, 7.24 mmol) in anhydrous DMF (35 mL) under argon atmosphere was added dry K_2CO_3 (6.0 g, 43.4 mmol) and stirred for 20 min. Then benzyl bromide (4.3 mL, 36.2 mmol) was added dropwise and the reaction mixture was allowed to stir at r.t. for 22 h. After which time, the solid was removed by filtration, the filtrate was diluted with EtOAc (300 mL), then washed with slightly HCl-acidified water (6 × 100 mL), brine (150 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4, filtered and concentrated. The resulting brown sticky solid was purified by column chromatography, eluting with CH_2Cl_2, to give the desired product **1a** as a pale yellow solid (3.6 g, 76 %).

R$_f$ = 0.21 [CH_2Cl_2 (100%)].

^{1}H-NMR (300 MHz, acetone-d_6) δ 2.60 (dd, ^2J = 16.4 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 8.4 Hz, 1H, H4a), 2.96 (dd, ^2J = 16.4 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 5.5 Hz, 1H, H4b), 4.02-4.11 (m, 2H, H3, 3-OH), 4.68 (d, $^3J_{2\text{-}3}$ = 7.7 Hz, 1H, H2), 5.08 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.13 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.16 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.18 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 6.16 (d, $^4J_{6\text{-}8}$ = 2.3 Hz, 1H, H8), 6.36 (d, $^4J_{8\text{-}6}$ = 2.3 Hz, 1H, H6), 6.98 (dd, $^3J_{6'\text{-}5'}$ = 8.3 Hz, $^4J_{6'\text{-}2'}$ = 1.9 Hz, 1H, H6'), 7.06 (d, $^3J_{5'\text{-}6'}$ = 8.3 Hz, 1H, H5'), 7.18 (d, $^4J_{2'\text{-}6'}$ = 1.9 Hz, 1H, H2'), 7.29-7.53 (m, 20H, 20 HAr).

^{13}C-NMR (75 MHz, acetone-d_6) δ 159.6 (ArC-7), 158.6 (ArC-5), 156.5 (ArC-9), 149.7 (ArC-3', ArC-4'), 138.7, 138.6, 138.5, 138.4 (ArC), 133.5 (ArC-1'), 129.3 (overlapping), 129.2 (overlapping), 128.5 (overlapping), 128.4 (overlapping), 128.3, 128.1 (ArCH), 121.5 (ArCH-6'), 115.3 (ArCH-5'), 115.1 (ArCH-2'), 103.4 (ArC-10), 95.5 (ArCH-8), 94.2 (ArCH-6), 82.6 (CH-2), 71.7, 71.6, 70.5 (overlapping) (O*CH*$_2$Ph), 67.9 (CH-3), 29.0 (CH_2-4).

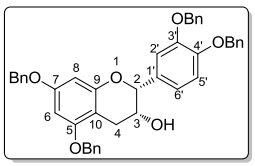
IR (ZnSe) ν_{max} 3428, 3031, 2927, 1618, 1593, 1143, 1117 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 651 (70) [M+H]$^+$, 1339 (100) [2M+K]$^+$.

m.p. 112-113 °C (lit.[99]), 121-122 °C (lit.[67]).

$[\alpha]_D^{21}$ +4.0° (*c* 1.00, CH_2Cl_2) (lit.[99]).

1b **(2*R*,3*R*)-3',4',5,7-Tetrakis(benzyloxy)flavan-3-ol**



CAS : 20728-73-8
CF : $C_{43}H_{38}O_6$
EM : 650.2668
MW : 650.76 g.mol^{-1}

According to the procedure described in the litterature,[99,265] to a stirred ice-cold solution of commercial (–)-epicatechin (2.8 g, 9.65 mmol) in anhydrous DMF (40 ml), under argon atmosphere, was added dry K_2CO_3 (8.0 g, 57.9 mmol) and the mixture was stirred for 20 min. Then benzyl bromide (5.74 mL, 48.23 mmol) was added dropwise and the mixture was allowed to stir for 2 h at 0°C and 44 h at r.t. under argon atmosphere. After which time it was diluted with EtOAc (400 mL) and washed with H_2O (3 × 300 mL), brine (300 mL) and dried over anhydrous Na_2SO_4, filtered and evaporated. The resulting yellow oily residue was purified by silica gel column chromatography, eluting with CH_2Cl_2, to give the expected compound **1b** as a pale yellow foam (4.591 g, 73%).

R$_f$ = 0.30 [CH_2Cl_2 (100%)].

^{1}H-NMR (300 MHz, acetone-*d*$_6$) δ 2.88 (dd, ^2J = 17.1 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 3.0 Hz, 1H, H4a), 2.96 (dd, ^2J = 16.8 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 4.5 Hz, 1H, H4b), 3.76 (d, $^3J_{\text{OH-H3}}$ = 5.4 Hz, 1H, 3-OH), 4.26-4.30 (m, 1H, H3), 4.98 (s, 1H, H2), 5.06 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.09 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.13 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.14 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 6.26 (d, $^4J_{8\text{-}6}$ = 2.3 Hz, 1H, H8), 6.37 (d, $^4J_{6\text{-}8}$ = 2.3 Hz, 1H, H6), 7.04 (d, $^3J_{5'\text{-}6'}$ = 8.4 Hz, 1H, H5'), 7.09 (dd, $^3J_{6'\text{-}5'}$ = 8.3 Hz, $^4J_{6'\text{-}2'}$ = 1.7 Hz, 1H, H6'), 7.37 (d, $^4J_{2'\text{-}6'}$ = 1.7 Hz, 1H, H2'), 7.31-7.52 (m, 20H, 20 HAr).

^{13}C-NMR (75 MHz, acetone-*d*$_6$) δ159.4 (ArC-7), 159.0 (ArC-5), 156.8 (ArC-9), 149.5 (ArC-3'), 149.3 (ArC-4'), 138.7, 138.6, 138.4 (ArC), 133.7 (ArC-1'), 129.2 (overlapping), 129.1 (overlapping), 128.5 (overlapping), 128.4 (overlapping), 128.3 (overlapping), 128.0 (ArCH), 120.9 (ArCH-6'), 115.2 (ArCH-5'), 115.1 (ArCH-2'), 102.6 (ArC-10), 95.7 (ArCH-8), 94.2 (ArCH-6), 79.5 (CH-2), 71.7, 71.6, 70.4 (overlapping) (O*CH*$_2$Ph), 66.5 (CH-3), 29.3 (CH_2-4, hidden in the solvent residual signals).

IR (ZnSe) ν_{max} 3062, 3031, 2095, 1617, 1592, 1511, 1498, 1265, 1143, 1113, 736, 696 cm^{-1}.

UV/Vis λ_{max} 255, 270 nm.

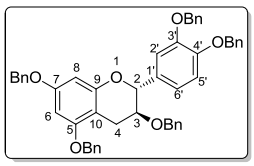
LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 651.2 (100) $[M+H]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{43}H_{39}O_6$ $[M+H]^+$ 651.2741, found 651.2766.

m.p. 130-131 °C (lit.[99]), 129.5-130 °C (lit.[263]).

$[\alpha]_D^{21}$ –17.7° (*c* 1.00, CH_2Cl_2) (lit.[99]), $[\alpha]_D$ –27.7° (*c* 2.16, EtOAc) (lit.[263]).

2a **(2*R*,3*S*)-3,3',4',5,7-Pentakis(benzyloxy)flavan**



CAS : 85443-49-8
CF : $C_{50}H_{44}O_6$
EM : 740.3138
MW : 740.88 g.mol^{-1}

According to the litterature,[99] a 60 % dipersion of sodium hydride in mineral oil (369 mg, 9.22 mmol) was washed with *n*-pentane (3 × 4 mL), dried under vacuum and suspended with anhydrous DMF (4 mL) under argon atmosphere. To the resulting suspension, cooled at 0°C, a ice-cold solution of **1a** (3.0 g, 4.61 mmol) in anhydrous DMF (10 mL) was added dropwise. After stirring 30 min, benzyl bromide (658 µL, 5.53 mmol) was added dropwise. The reaction mixture was maintained at 0°C under argon atmosphere for 2 h. After which time, H_2O (3 mL) was added slowly and the resulting mixture was stirred vigorously at 0°C until no more H_2 gaz was observed. The reaction mixture was then diluted with EtOAc (100 mL), washed with H_2O (3 × 100 mL) and brine (100 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4, filtered and evaporated. The obtained yellowish oil was purified by column chromatography, eluting with cyclohexane/EtOAc = 95:5 to remove impurities, and then 9:1, to give the expected product **2a** as a pale yellow foam (3.21 g, 94%).

R$_f$ = 0.40 [Cyclohexane/EtOAc (9:1)].

^{1}H-NMR (300 MHz, acetone-d_6) δ 2.67 (dd, ^2J = 16.4 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 7.8 Hz, 1H, H4a), 2.95 (dd, ^2J = 16.4 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 5.4 Hz, 1H, H4b), 3.86-3.93 (m, 1H, H3), 4.27 (d, ^2J = 11.9 Hz, 1H, O*CH*Ph), 4.43 (d, ^2J = 11.9 Hz, 1H, O*CH*Ph), 4.88 (d, $^3J_{2\text{-}3}$ = 7.3 Hz, 1H, H2), 5.06 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.11 (bs, 4H, 2O*CH*$_2$Ph), 5.18 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 6.19 (d, $^4J_{6\text{-}8}$ = 2.3 Hz, 1H, H8), 6.35 (d, $^4J_{8\text{-}6}$ = 2.3 Hz, 1H, H6), 6.97 (dd, $^3J_{6'\text{-}5'}$ = 8.3 Hz, $^4J_{6'\text{-}2'}$ = 1.8 Hz, 1H, H6'), 7.06 (d, $^3J_{5'\text{-}6'}$ = 8.3 Hz, 1H, H5'), 7.12 (d, $^4J_{2'\text{-}6'}$ = 1.6 Hz, 1H, H2'), 7.14-7.52 (m, 25H, 25 HAr).

^{13}C-NMR (75 MHz, acetone-d_6) δ 159.7 (ArC-7), 158.6 (ArC-5), 156.3 (ArC-9), 149.7 (overlapping, ArC-3', ArC-4'), 139.6, 138.6, 138.5, 138.4 (overlapping) (ArC), 133.6 (ArC-1'), 129.3, 129.2 (overlapping), 128.9, 128.6, 128.5, 128.4 (overlapping), 128.3, 128.2, 128.1 (ArCH), 121.2 (ArCH-6'), 115.5 (ArCH-5'), 114.8 (ArCH-2'), 102.9 (ArC-10), 95.4 (ArCH-8), 94.3 (ArCH-6), 80.4 (CH-2), 75.4 (CH-3), 71.9, 71.6, 70.5 (overlapping) (O*CH*$_2$Ph), 26.2 (CH_2-4).

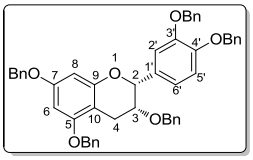
IR (ZnSe) ν_{max} 3646, 2924, 1685, 1592, 1496, 1454, 1376, 1261, 1215, 1120, 1027 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 763.0 (100) $[M+Na]^+$.

m.p. 89-90 °C (lit.[99]).

$[\alpha]_D^{21}$ +39.0° (*c* 0.92, CH_2Cl_2) (lit.[99]).

2b **(2*R*,3*R*)-3,3',4',5,7-Pentakis(benzyloxy)flavan**



CAS : 301539-02-6
CF : $C_{50}H_{44}O_6$
EM : 740.3138
MW : 740.88 g.mol^{-1}

According to the litterature,[99] a 60 % dipersion of sodium hydride in mineral oil (553 mg, 13.83 mmol) was washed with *n*-pentane (3 × 4 mL), dried under vacuum and suspended with anhydrous DMF (4 mL) under argon atmosphere. To the resulting suspension, cooled at 0 °C, a ice-cold solution of **1b** (4.5 g, 6.92 mmol) in anhydrous DMF (15 mL) was added dropwise, followed by a dropwise addition of benzyl bromide (987 µL, 8.30 mmol). The reaction mixture was maintained at 0 °C under argon atmosphere for 4 h. After which time, H_2O (6 mL) was added slowly and the resulting mixture was stirred vigorously at 0 °C until no more H_2 gaz was observed. The reaction mixture was then diluted with EtOAc (150 mL), washed with H_2O (3 × 100 mL) and brine (100 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4, filtered and evaporated, to afford 7 g of beige solid. This solid was purified by silica gel column chromatography, eluting with cyclohexane/EtOAc (95:5), to furnish the compound **2b** as a white foam (4.87 g, 95 %).

R$_f$ = 0.35 [Cyclohexane/EtOAc (9:1)].

^{1}H-NMR (300 MHz, acetone-d_6) δ 2.84 (dd, ^2J = 16.9 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 4.3 Hz, 1H, H4a), 3.03 (dd, ^2J = 17.1 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 3.1 Hz, 1H, H4b), 4.07-4.10 (m, 1H, H3), 4.29 (d, ^2J = 12.0 Hz, 1H, O*CH*Ph), 4.49 (d, ^2J = 12.0 Hz, 1H, O*CH*Ph), 5.04 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.06 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.09 (s, 1H, H2), 5.11 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.18 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 6.22 (d, $^4J_{8\text{-}6}$ = 2.3 Hz, 1H, H8), 6.35 (d, $^4J_{6\text{-}8}$ = 2.3 Hz, 1H, H6), 7.06 (bs, 2H, H5', H6'), 7.33 (s, 1H, H2'), 7.08-7.53 (m, 25H, 25HAr).

^{13}C-NMR (75 MHz, acetone-d_6) δ 159.5 (ArC-7), 158.9 (ArC-5), 156.8 (ArC-9), 149.5 (ArC-3'), 149.4 (ArC-4'), 139.6, 138.7, 138.6, 138.4 (ArC), 133.6 (ArC-1'), 129.3, 129.2 (overlapping), 129.1, 128.8, 128.5 (overlapping), 128.4, 128.3 (overlapping), 128.2, 128.0 (ArCH), 120.9 (ArCH-6'), 115.2 (ArCH-5'), 115.1 (ArCH-2'), 102.4 (ArC-10), 95.7 (ArCH-8), 94.2 (ArCH-6), 78.7 (CH-2), 74.1 (CH-3), 71.9, 71.6, 70.5 (overlapping) (O*CH*$_2$Ph), 25.3 (CH_2-4).

IR (ZnSe) ν_{max} 3062, 3030, 2866, 1617, 1592, 1498, 1266, 1145, 735, 696 cm^{-1}.

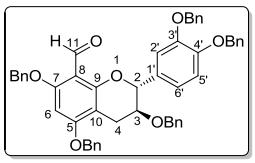
LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 741.1 (100) $[M+H]^+$, 1504.1 (50) $[2M+Na]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{50}H_{45}O_6$ $[M+H]^+$ 741.3211, found 741.3228.

m.p. 125-126 °C (with decomposition) (lit.[99]).

$[\alpha]_D^{21}$ –23.3 (*c* 1.00, CH_2Cl_2) (lit.[99]), $[\alpha]_D$ –30.7 (*c* 0.60, EtOAc) (lit.[310]).

3a **(2*R*,3*S*)-8-Formyl-3,3',4',5,7-penta-*O*-benzylcatechin**



CAS : 89385-18-2
CF : $C_{51}H_{44}O_7$
EM : 768.3087
MW : 768.89 g.mol^{-1}

According to the procedure described in the litterature,[99,264] to a solution of **2a** (2.0 g, 2.7 mmol) in anhydrous DMF (8 mL) at 0 °C under argon atmosphere, a solution of $POCl_3$ (1.11 mL, 11.9 mmol) in DMF (5 mL) which was previously stirred for 1 h at r.t., was added dropwise. The obtained mixture was first warmed at 75 °C for 4 h, then at r.t. for 12 h. After which time the solution was diluted with EtOAc (100 mL), cooled to 0 °C, quenched with water (22 mL) and subsequently adjusted to pH = 8 by the addition of a 2 M aqueous NaOH solution (27 mL). The resulting mixture was stirred vigorously at r.t. for 2 h. After separation, the aqueous layer was extracted with EtOAc (2 × 120 mL) and the combined organic layers were washed with brine (2 × 100 mL), dried over Na_2SO_4, filtered and evaporated. The residue was purified by column chromatography, eluting with cyclohexane/EtOAc = 9:1 (to avoid impurities) then 8:2, to afford the expected aldehyde **3a** (1.68 g, 81%) as a pale yellow foam.

R$_f$ = 0.26 [Cyclohexane/EtOAc (8:2)].

^{1}H-NMR (300 MHz, acetone-d_6) δ 2.71 (dd, ^2J = 16.5 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 6.9 Hz, 1H, H4a), 2.84 (dd, ^2J = 16.6 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 5.2 Hz, 1H, H4b), 3.97 (ddd, $^3J_{3\text{-}4}$ = 6.8 Hz, $^3J_{3\text{-}2}$ = 6.6 Hz, $^3J_{3\text{-}4}$ = 5.3 Hz, 1H, H3), 4.36 (d, ^2J = 11.9 Hz, 1H, O*CH*Ph), 4.48 (d, ^2J = 11.9 Hz, 1H, O*CH*Ph), 5.10 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.12 (bs, 1H, H2), 5.16 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.23 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.24 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 6.60 (s, 1H, H6), 6.99 (dd, $^3J_{6'\text{-}5'}$ = 8.4 Hz, $^4J_{6'\text{-}2'}$ = 1.7 Hz, 1H, H6'), 7.05 (d, $^3J_{5'\text{-}6'}$ = 8.3 Hz, 1H, H5'), 7.20 (s, 1H, H2'), 7.16-7.59 (m, 25H, 25HAr), 10.43 (s, 1H, H11).

^{13}C-NMR (75 MHz, acetone-d_6) δ 186.5 (C_{11}=O), 162.8 (ArC-7), 161.8 (ArC-5), 158.3 (ArC-9), 149.8 (ArC-3'), 149.7 (ArC-4'), 139.5, 138.6, 138.5, 137.9, 137.6 (ArC), 132.9 (ArC-1'), 129.4, 129.3, 129.2 (overlapping), 129.0, 128.9, 128.6, 128.5 (overlapping), 128.5 (overlapping), 128.4 (overlapping), 128.2, 128.0 (ArCH), 120.7 (ArCH-6'), 115.5 (ArCH-5'), 114.5 (ArCH-2'), 109.5 (ArC-8), 103.2 (ArC-10), 91.9 (ArCH-6), 80.1 (CH-2), 74.4 (CH-3), 71.9, 71.6 (overlapping), 71.2, 71.0 (O*CH*$_2$Ph), 25.3 (CH_2-4).

IR (ZnSe) ν_{max} 3031, 2872, 1674, 1599, 1454, 1220, 1126, 1026, 738, 696 cm^{-1}.

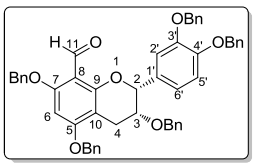
LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 769.1 (100) $[M+H]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{51}H_{45}O_7$ $[M+H]^+$ 769.3160, found 769.3171.

m.p. 66-67 °C (lit.[99]).

$[\alpha]_D^{17}$ –26.0° (*c* 1.50, CH_2Cl_2) (lit.[99]), $[\alpha]_D^{20}$ –35.3° (*c* 3.80, $CHCl_3$) (lit.[264]).

3b **(2*R*,3*R*)-8-Formyl-3,3',4',5,7-penta-*O*-benzylepicatechin**



CAS : 1312298-11-5
CF : $C_{51}H_{44}O_7$
EM : 768.3087
MW : 768.89 g.mol^{-1}

According to the procedure described in the litterature,[99,264] to a solution of **2b** (810 mg, 1.09 mmol) in anhydrous DMF (8 mL) at 0 °C under argon atmosphere, a solution of $POCl_3$ (449 µL, 4.81 mmol) in DMF (4 mL) which was previously stirred for 1 h at r.t., was added dropwise. The obtained mixture was first warmed at 75 °C for 4 h, then at r.t. for 40 h. After which time the solution was diluted with EtOAc (80 mL), cooled to 0 °C, quenched with water (15 mL) and subsequently adjusted to pH = 8 by the addition of a 2 M aqueous NaOH solution (18 mL). The resulting mixture was stirred vigorously at r.t. for 2 h. The phases were separated, the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 × 30 mL) and the combined organic layers were washed with water (3 × 40 mL), brine (2 × 50 mL), dried over Na_2SO_4, filtered and evaporated. The residue was purified by column chromatography, eluting with cyclohexane/EtOAc = 9:1 (to avoid impurities) then 8:2, to afford the expected aldehyde **3b** (450 mg, 54%) as a pale yellow foam.

R$_f$ = 0.32 [Cyclohexane/EtOAc (8:2)].

^{1}H-NMR (300 MHz, acetone-d_6) δ 2.83 (dd, ^2J = 17.2 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 4.3 Hz, 1H, H4a), 3.06 (dd, ^2J = 17.1 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 2.7 Hz, 1H, H4b), 4.20 (bs, 1H, H3), 4.26 (d, ^2J = 12.1 Hz, 1H, O*CH*Ph), 4.43 (d, ^2J = 12.1 Hz, 1H, O*CH*Ph), 5.12 (bs, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.18 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.20 (s, 1H, H2), 5.24 (bs, 4H, 2O*CH*$_2$Ph), 6.59 (s, 1H, H6), 7.06 (s, 1H, H5'), 7.11 (s, 1H, H6'), 7.48 (s, 1H, H2'), 7.01-7.57 (m, 25H, 25HAr), 10.50 (s, 1H, H11).

^{13}C-NMR (75 MHz, acetone-d_6) δ 186.6 (C_{11}=O), 163.2 (ArC-7), 162.1 (ArC-5), 158.6 (ArC-9), 149.7 (ArC-3'), 149.2 (ArC-4'), 139.5, 138.8, 138.6, 137.9, 137.7 (ArC), 133.1 (ArC-1'), 129.4, 129.3, 129.2 (overlapping), 128.9, 128.8, 128.6, 128.5 (overlapping), 128.4 (overlapping), 128.3, 128.1 (overlapping) (ArCH), 120.2 (ArCH-6'), 115.4 (ArCH-5'), 114.6 (ArCH-2'), 109.6 (ArC-8), 102.7 (ArC-10), 91.7 (ArCH-6), 78.9 (CH-2), 72.9 (CH-3), 72.0, 71.7, 71.5, 71.2, 71.0 (O*CH*$_2$Ph), 25.4 (CH_2-4).

IR (ZnSe) ν_{max} 2924, 2359, 1670, 1599, 1455, 1266, 1226, 1129, 738, 696 cm^{-1}.

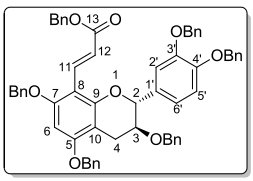
LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 791.3 (100) $[M+Na]^+$, 1559.2 (80) $[2M+Na]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{51}H_{45}O_7$ $[M+H]^+$ 769.3160, found 769.3215.

m.p. 55-56 °C (lit.[99]).

$[\alpha]_D^{21}$ –81.0° (*c* 1.00, CH_2Cl_2) (lit.[99]).

4a **(2*R*,3*S*)-8-((*E*)-Benzyl prop-2-enoate)-3,3',4',5,7-penta-*O*-benzylcatechin



CAS : 1312298-13-7
CF : $C_{60}H_{52}O_8$
EM : 900.3662
MW : 901.05 g.mol^{-1}

According to the procedure described by List *et al.*,[268] DMAP (46 mg, 0.372 mmol), piperidine (37 µL, 0.372 mmol) and phenylmethyl hydrogen propanedioate (**8**, 1.45 g, 7.45 mmol) were dissolved in anhydrous DMF (10 mL) and stirred at r.t. during 1 h. A solution of aldehyde **3a** (1.43 g, 1.861 mmol) in anhydrous DMF (20 mL) was then added dropwise. The reaction mixture was stirred at r.t. under argon atmosphere until the aldehyde was consumed (17 h). After which time it was concentrated *in vacuo* at 50 °C then diluted with EtOAc (200 mL), washed successively with NH_4Cl (50 mL), water (50 mL), $NaHCO_3$ (3 × 50 mL), once again with water (50 mL) and brine (100 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4, filtered and concentrated. The resulting residue was purified by flash column chromatography, eluting with cyclohexane/EtOAc = 9:1 (to remove impurities) then 85:15, to give the expected α,β-unsaturated product **4a** as a yellowish foam (1.34 g, 80%).

R_f = 0.37 [Cyclohexane/EtOAc (85:15)].

^{1}H-NMR (300 MHz, acetone-d_6) δ 2.73 (dd, ^2J = 16.6 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 7.1 Hz, 1H, H4a), 2.87 (dd, ^2J = 16.6 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 5.3 Hz, 1H, H4b), 3.94-4.01 (m, 1H, H3), 4.36 (d, ^2J = 12.0 Hz, 1H, 3-O*CH*Ph), 4.48 (d, ^2J = 12.0 Hz, 1H, 3-O*CH*Ph), 5.09 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.14 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.15 (d, $^3J_{2\text{-}3}$ = 5.9 Hz, 1H, H2), 5.17 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.20 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.27 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 6.63 (s, 1H, H6), 6.88 (d, $^3J_{12\text{-}11}$ = 16.2 Hz, 1H, H12), 6.97 (dd, $^3J_{6'\text{-}5'}$ = 8.3 Hz, $^4J_{6'\text{-}2'}$ = 1.7 Hz, 1H, H6'), 7.07 (d, $^3J_{5'\text{-}6'}$ = 8.3 Hz, 1H, H5'), 7.24 (s, 1H, H2'), 7.16-7.53 (m, 30H, 30HAr), 8.24 (d, $^3J_{11\text{-}12}$ = 16.2 Hz, 1H, H11).

^{13}C-NMR (75 MHz, acetone-d_6) δ 168.6 (C_{13}=O), 159.9 (ArC-7), 159.3 (ArC-5), 155.9 (ArC-9), 149.7 (ArC-3', ArC-4'), 139.3, 138.4, 138.3, 137.8, 137.6 (ArC), 136.6 (CH-11), 132.8 (ArC-1'), 129.3 (overlapping), 129.1 (overlapping), 129.0, 128.8, 128.7, 128.4 (overlapping), 128.3, 128.2 (overlapping), 128.1 (ArCH), 120.6 (ArCH-6'), 118.2 (CH-12), 115.2 (ArCH-5'), 114.2 (ArCH-2'), 106.0 (ArC-8), 103.4 (ArC-10), 91.9 (ArCH-6), 80.3 (CH-2), 74.7 (CH-3), 71.8, 71.6, 71.5, 71.3, 70.7, 65.8 (O*CH*$_2$Ph), 25.9 (CH_2-4).

IR (ZnSe) ν_{max} 3718, 3031, 2867, 2364, 1702, 1599, 1130, 734, 696 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 923.3 (41) $[M+Na]^+$.

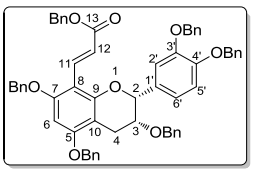
HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{60}H_{52}O_8Na$ $[M+Na]^+$ 923.3554, found 923.3566 (lit.[99]).

m.p. 59-60 °C (lit.[99]).

$[\alpha]_D^{21}$ –21.0° (*c* 1.00, CH_2Cl_2) (lit.[99]).

DC (λ_{max} (nm), $\Delta\varepsilon$) 250, –9.4; 309, –15.8 (0.25 mg/mL, CH_3CN, 25 °C).

4b **(2*R*,3*R*)-8-((*E*)-Benzyl prop-2-enoate)-3,3',4',5,7-penta-*O*-benzylepicatechin**



CAS : 1312298-14-8
CF : $C_{60}H_{52}O_8$
EM : 900.3662
MW : 901.05 g.mol^{-1}

According to the procedure described in the litturature,[99] 60 % dispersion of sodium hydride in mineral oil (180.0 mg, 7.50 mmol) was placed in a 100 mL flask and mineral oil was removed by washing with pentane (3 × 5 mL). Anhydrous DMF (20 mL) was added to the flask containing the sodium hydride under argon atmosphere. To the resulting suspension of NaH, cooled at 0 °C, was added dropwise benzyl phosphonoacetate (**7**, 1.59 g, 5.55 mmol) under argon atmosphere. After stirring at room temperature for 20 min, a solution of **3b** (2.80 g, 3.64 mmol) in dry DMF (35 mL) was added dropwise at 0 °C. The reaction mixture was stirred at room temperature under argon atmosphere for 19 h, after which time it was diluted with EtOAc (200 mL), extracted with H_2O (3 × 200 mL) and brine (100 mL). The organic extract was dried over anhydrous Na_2SO_4, filtered and evaporated. The resulting residue was purified by column chromatography, eluting with cyclohexane/EtOAc (9:1) to remove impurities, and then with cyclohexane/EtOAc (8:2), to give the expected α,β-unsaturated ester **4b** as a white solid (2.64 g, 80%).

R_f = 0.69 [Cyclohexane/EtOAc (7:3)].

^{1}H NMR (300 MHz, acetone-d_6) δ 2.87 (dd, ^2J = 17.0 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 4.0 Hz, 1H, H4a), 3.07 (dd, ^2J = 17.2 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 2.5 Hz, 1H, H4b), 4.13-4.16 (m, 1H, H3), 4.29 (d, ^2J = 12.1 Hz, 1H, O*CH*Ph), 4.46 (d, ^2J = 12.1 Hz, 1H, O*CH*Ph), 5.08 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.14 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.19 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.20 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.26 (bs, 3H, H2, O*CH*$_2$Ph), 6.62 (s, 1H, H6), 6.98 (d, $^3J_{12\text{-}11}$ = 16.2, 1H, H12), 7.06 (bs, 2H, H5', H6'), 7.41 (s, 1H, H2'), 7.04-7.55 (m, 30H, 30HAr), 8.33 (d, $^3J_{11\text{-}12}$ = 16.2, 1H, H11).

^{13}C NMR (75 MHz, acetone-d_6) δ168.7 (C_{13}=O), 160.4 (ArC-7), 159.4 (ArC-5), 156.6 (ArC-9), 149.8 (ArC-3'), 149.4 (ArC-4'), 139.5, 138.7, 138.6, 138.0 (overlapping), 137.9 (ArC), 136.8 (CH-11), 133.2 (ArC-1'), 129.4 (overlapping), 129.2 (overlapping), 129.1, 128.9, 128.8, 128.6, 128.5 (overlapping), 128.4 (overlapping), 128.3 (overlapping)), 128.1 (ArCH), 120.4 (ArCH-6'), 118.2 (CH-12), 115.4 (ArCH-5'), 114.5 (ArCH-2'), 106.2 (ArC-8), 102.9 (ArC-10), 92.1 (ArCH-6), 79.3 (CH-2), 73.4 (CH-3), 72.0, 71.7, 71.6, 71.5, 70.8, 65.9 (O*CH*$_2$Ph), 25.5 (CH_2-4).

IR (ZnSe) ν_{max} 3700, 3029, 2363, 1700, 1599, 1508, 1121, 732, 696 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 923.3 (100) $[M+Na]^+$.

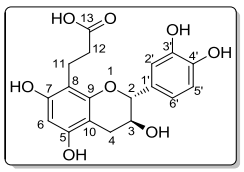
HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{60}H_{52}O_8Na$ $[M+Na]^+$ 923.3554, found 923.3604 (lit.[99]).

m.p. 95-96 °C (lit.[99]).

$[\alpha]_D^{21}$ –27.9° (*c* 0.60, CH_2Cl_2) (lit.[99]).

DC (λ_{max} (nm), $\Delta\varepsilon$) 235, –10.0; 313, –18.2 (0.25 mg/mL, CH_3CN, 25 °C).

5a **(2*R*,3*S*)-8-(Propanoic acid)catechin**



CAS : 89385-46-6
CF : $C_{18}H_{18}O_8$
EM : 362.1002
MW : 362.33 g.mol^{-1}

According to the procedure described in the litterature,[99] to a stirred solution of **4a** (878 mg, 0.974 mmol) in an anhydrous mixture of THF/MeOH/CH_2Cl_2 (4:4:1, v/v/v, 8 mL) under argon atmosphere was added 10 wt % Pd/C (259 mg Pd/C, 0.244 mmol Pd). Vacuum and H_2 were alternated, and then the mixture was stirred at r.t. under H_2 (balloon pressure) for 15 h (monitored by TLC and ^{1}H NMR). After evaporation of the solvents at r.t., the crude residue was dissolved in acetone (10 mL), filtered through cotton/Celite® (*via* a Pasteur pipet) and the solid was washed with acetone (10 mL). The combined filtrates were concentrated under reduced pressure to afford the expected product **5a** as an off-white foam in quantitative yield (370 mg) without further purification.

R_f = 0.19 [CH_2Cl_2/MeOH (8:2)].

^{1}H-NMR (300 MHz, acetone-d_6) δ 2.49-2.54 (m, 2H, H12), 2.57 (dd, ^2J = 16.5 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 8.0 Hz, 1H, H4a), 2.78-2.84 (m, 2H, H11), 2.90 (dd, ^2J = 16.2 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 5.4 Hz, 1H, H4a), 3.95-4.02 (m, 2H, H3, 3-OH), 4.66 (d, $^3J_{2\text{-}3}$ = 7.5 Hz, 1H, H2), 6.09 (s, 1H, H6), 6.72 (dd, $^3J_{6'\text{-}5'}$ = 8.3 Hz, $^4J_{6'\text{-}2'}$ = 1.7 Hz, 1H, H6'), 6.80 (d, $^3J_{5'\text{-}6'}$ = 8.1 Hz, 1H, H5'), 6.92 (d, $^4J_{2'\text{-}6'}$ = 1.6 Hz, 1H, H2'), 8.01 (bs, 4H, 4OH).

^{13}C-NMR (75 MHz, acetone-d_6) δ 176.4 (C_{13}=O), 155.0 (ArC-5, ArC-7), 154.4 (ArC-9), 145.6 (overlapping) (ArC-3', ArC-4'), 132.4 (ArC-1'), 119.7 (ArCH-6'), 115.8 (ArCH-5'), 114.9 (ArCH-2'), 106.7 (ArC-8), 100.9 (ArC-10), 96.6 (ArCH-6), 82.6 (CH-2), 68.3 (CH-3), 34.3 (CH_2-12), 28.7 (CH_2-4), 19.0 (CH_2-C11).

IR (ZnSe) ν_{max} 3362, 1694, 1619, 1523, 1454, 1378, 1283, 1209, 1174, 1060 cm^{-1}.

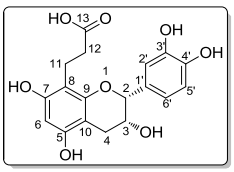
LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 361.0 (100) $[M-H]^-$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{18}H_{18}O_8Na$ $[M+Na]^+$ 385.0893, found 385.0891 (lit.[99]).

m.p. 198-199 °C (with decomposition) (lit.[99]).

$[\alpha]_D^{21}$ +61.0° (*c* 1.00, acetone) (lit.[99]).

5b **(2*R*,3*R*)-8-(Propanoic acid)epicatechin**



CAS : 1312298-17-1
CF : $C_{18}H_{18}O_8$
EM : 362.1002
MW : 362.33 g.mol^{-1}

According to the procedure described in the litterature,[99] to a stirred solution of **4b** (451 mg, 0.50 mmol) in an anhydrous mixture of THF/MeOH/CH_2Cl_2 (4:4:1, v/v/v, 7 mL) under argon atmosphere was added 10 wt % Pd/C (133 mg Pd/C, 0.125 mmol Pd). Vacuum and H_2 were alternated, and then the mixture was stirred at r.t. under H_2 (balloon pressure) for 19 h (monitored by TLC and ^{1}H NMR). After evaporation of the solvents at r.t., the crude residue was dissolved in EtOAc (30 mL), filtered through Celite® and the solid was washed several times with EtOAc (100 mL). The combined filtrates were concentrated under reduced pressure to afford the expected product **5b** as a pale pink foam in quantitative yield (182 mg) without further purification.

R_f = 0.1 [CH_2Cl_2/MeOH (8:2)].

^{1}H-NMR (300 MHz, acetone-d_6) δ 2.56-2.62 (m, 2H, H12), 2.77 (dd, ^2J =16.7 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 2.6 Hz, 1H, H4a), 2.79-2.87 (m, 2H, H11), 2.89-2.93 (m, 1H, H4b), 4.23 (bs, 1H, H3), 4.94 (bs, 1H, H2), 6.08 (s, 1H, H6), 6.80 (d, $^3J_{5'\text{-}6'}$ = 8.1 Hz, 1H, H5'), 6.88 (dd, $^3J_{6'\text{-}5'}$ = 8.2 Hz, $^4J_{6'\text{-}2'}$ = 1.9 Hz, 1H, H6'), 7.09 (d, $^4J_{2'\text{-}6'}$ = 1.9 Hz, 1H, H2').

^{13}C-NMR (75 MHz, acetone-d_6) δ 177.6 (C_{13}=O), 155.4 (ArC-7), 155.0 (ArC-5), 154.6 (ArC-9), 145.5 (ArC-3'), 145.2 (ArC-4'), 132.4 (ArC-1'), 119.0 (ArCH-6'), 115.6 (ArCH-5'), 115.0 (ArCH-2'), 107.3 (ArC-8), 100.0 (ArC-10), 96.8 (ArCH-6), 79.3 (CH-2), 66.7 (CH-3), 34.9 (CH_2-12), 29.2 (CH_2-4), 19.1 (CH_2-11).

IR (ZnSe) ν_{max} 3356, 1697, 1620, 1455, 1283, 1105 cm^{-1}.

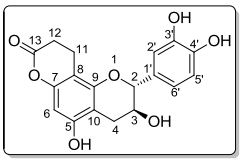
LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 361.1 (100) $[M-H]^-$.

HRMS (ESI-TOF) calculated for $C_{18}H_{17}O_8$ $[M-H]^-$ 361.0918, found 361.0924.

m.p. 66-67 °C (lit.[99]).

$[\alpha]_D^{21}$ –28.6° (*c* 0.38, acetone) (lit.[99]).

6a **(2*R*,3*S*)-Catechin-7,8-caprolactone**



CAS : 1312298-20-6
CF : $C_{18}H_{16}O_7$
EM : 344.0896
MW : 344.32 g.mol^{-1}

To a stirred solution of **5a** (79 mg, 0.22 mmol) in anhydrous DMF (3 mL) was added EDCI.HCl (46 mg, 0.24 mmol). The reaction mixture was stirred for 19 h at r.t. under argon atmosphere. The solution was evaporated until dryness, taken up in EtOAc (80 mL), washed with a saturated aqueous solution of NH_4Cl (2 × 15 mL), brine (15 mL), dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated *in vacuo* to furnish the product **6a** as a white powder (70 mg, 93%) without further purification.

R_f = 0.51 [(CH_2Cl_2/MeOH (9:1)].

^{1}H-NMR (300 MHz, acetone-d_6) δ 2.61 (dd, ^2J = 16.5 Hz, $^3J_{3\text{-}4}$ = 8.0 Hz, 1H, H4a), 2.68 (t, $^3J_{12\text{-}11}$ = 6.5 Hz, 2H, H12), 2.81-2.86 (m, 2H, H11), 2.90-2.97 (m, 1H, H4b), 4.02-4.09 (m, 1H, H3), 4.12 (bs, 1H, 3-OH), 4.71 (d, $^3J_{2\text{-}3}$ = 7.4 Hz, 1H, H2), 6.16 (s, 1H, H6), 6.76 (dd, $^3J_{6'\text{-}5'}$ = 8.2 Hz, $^4J_{6'\text{-}2'}$ = 1.8 Hz, 1H, H6'), 6.81 (d, $^3J_{5'\text{-}6'}$ = 8.1 Hz, 1H, H5'), 6.90 (d, $^4J_{2'\text{-}6'}$ = 1.8 Hz, 1H, H2'), 7.97-8.44 (m, 3H, ArOH).

^{13}C-NMR (75 MHz, aceton-d_6) δ 168.9 (C_{13}=O), 155.7 (ArC-7), 152.8 (ArC-5), 152.1 (ArC-9), 145.8 (ArC-3'), 145.7 (ArC-4'), 131.8 (ArC-1'), 119.8 (ArCH-6'), 115.8 (ArCH-5'), 115.0 (ArCH-2'), 105.3 (ArC-8), 102.3 (ArC-10), 96.2 (ArCH-6), 82.8 (CH-2), 67.8 (CH-3), 29.4 (CH_2-12), 28.6 (CH_2-4), 18.0 (CH_2-11).

IR (ZnSe) ν_{max} 3395, 1739, 1618, 1272, 1168, 1114 cm^{-1}.

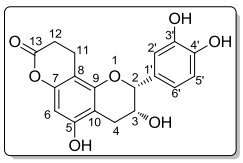
LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 367.1 (100) $[M+Na]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{18}H_{15}O_7$ $[M-H]^-$ 343.0823, found 343.0824 (lit.[99]).

m.p. 222-223 °C (lit.[99]).

$[\alpha]_D^{21}$ –34.0° (*c* 1.00, acetone) (lit.[99]).

6b **(2*R*,3*R*)-Catechin-7,8-caprolactone**



CAS : 1312298-21-7
CF : $C_{18}H_{16}O_7$
EM : 344.0896
MW : 344.32 g.mol^{-1}

To a stirred solution of **6b** (114 mg, 0.32 mmol) in anhydrous DMF (9 mL) was added EDCI.HCl (66 mg, 0.35 mmol). The reaction mixture was then stirred for 18 h at r.t. under argon atmosphere. After partial evaporation of the solvent under reduced pressure, the residue was taken in EtOAc (120 mL), washed with a saturated aqueous solution of NH_4Cl (2 × 20 mL), brine (20 mL), dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated *in vacuo* to furnish the expected lactone **6b** as a beige foam (80 mg, 74%) without further purification.

R_f = 0.75 [CH_2Cl_2/MeOH (8:2)].

^{1}H-NMR (300 MHz, acetone-d_6) δ 2.67-2.72 (m, 2H, H12), 2.87-2.92 (m, 4H, H4, H11), 3.58 (s, 1H, 3-OH), 4.30-4.32 (m, 1H, H3), 4.98 (s, 1H, H2), 6.15 (s, 1H, H6), 6.81 (d, $^3J_{5'\text{-}6'}$ = 8.1 Hz, 1H, H5'), 6.87 (dd, $^3J_{6'\text{-}5'}$ = 8.2 Hz, $^4J_{6'\text{-}2'}$ = 1.6 Hz, 1H, H6'), 7.09 (d, $^4J_{2'\text{-}6'}$ = 1.9 Hz, 1H, H2'), 8.02 (bs, 3H, 3Ar-OH).

^{13}C-NMR (75 MHz, acetone-d_6) δ 169.0 (C_{13}=O), 156.0 (ArC-7), 153.0 (ArC-5), 151.9 (ArC-9), 145.5 (ArC-3'), 145.3 (ArC-4'), 131.9 (ArC-1'), 119.0 (ArCH-6'), 115.6 (ArCH-5'), 114.9 (ArCH-2'), 104.4 (ArC-8), 102.3 (ArC-10), 96.1 (ArCH-6), 79.5 (CH-2), 66.3 (CH-3), 29.4 (CH_2-12), 29.2 (CH_2-4), 17.9 (CH_2-11).

IR (neat) ν_{max} 3367, 2361, 1619, 1112 cm^{-1}.

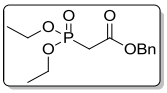
LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 367.1 (100) [M+Na]$^+$.

HRMS (ESI-TOF): calcd for $C_{18}H_{16}O_7Na$ [M+Na]$^+$ 367.0788, found 367.0791 (lit.[99]).

m.p. 216-217 °C (with decomposition) (lit.[99]).

$[\alpha]_D^{21}$ –74.1° (*c* 0.80, acetone) (lit.[99]).

7 Benzyl 2-(diethoxyphosphoryl)acetate



CAS : 7396-44-3
CF : $C_{13}H_{19}O_5P$
EM : 286.0970
MW : 286.26 g.mol^{-1}

According to the procedure described in the litterature,[99,267] a mixture of triethyl phosphite (16.5 mL, 97.5 mmol) and benzyl 2-bromoacetate (13.8 mL, 87.8 mmol) was stirred and gradually heated to distil ethyl bromide (b.p. 39 °C). After completion of the distillation, the reaction mixture was heated to 200 °C for 1 h and then cooled gently to r.t. The fractioned distillation under vacuum provided the expected product **7** as a colorless oil (20 g, 80%).

R_f = 0.10 [Cyclohexane/CH_2Cl_2 (9:1)].

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.29 (t, ^3J = 7.0 Hz, 6H, $2CH_3$), 3.01 (d, $^2J_{H\text{-}P}$ = 21.5, 2H, CH_2), 4.08-4.18 (m, 4H, $2CH_2$), 5.18 (s, 2H, O*C*H_2Ph), 7.32-7.39 (m, 5H, 5HAr).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 165.6 (d, $J_{C\text{-}P}$ = 6.3 Hz, C=O), 135.3 (ArC), 128.5 (ArCH), 128.4 (ArCH), 128.3 (ArCH), 67.3 (O*C*H_2Ph), 62.7 (OCH_2), 62.6 (OCH_2), 34.4 (d, $J_{C\text{-}P}$ = 134.2 Hz, CH_2), 16.3 (CH_3), 16.2 (CH_3).

^{31}P-NMR (112.5 MHz, $CDCl_3$) δ 19.42 (bs).

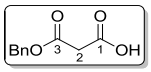
IR (ZnSe**)** ν_{max} 3477, 2985, 1737, 1270, 1024, 973, 838, 782, 752, 700 cm^{-1}.

LRMS (MALDI-TOF) *m/z* (rel. intensity) 287.0 (100) $[M+H]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{13}H_{19}O_5NaP$ $[M+Na]^+$ 309.0862, found 309.0869 (lit.[99]).

b.p. lit.[99] 165 °C (0.9 mm Hg), lit.[361] 130 °C (0.1 mm Hg).

8 Phenylmethyl hydrogen propanedioate

	CAS : 40204-26-0 CF : $C_{10}H_{10}O_4$ EM : 194.0579 MW : 194.18 g.mol^{-1}

According to the procedure described by Felder *et al.*,[269] a mixture of benzyl alcohol (3.6 mL, 34.7 mmol) and 2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-dione (Meldrum's acid, 5.0 g, 34.7 mmol) was heated at 120 °C for 3 h. After cooling, the residue was purified by chromatography over silica gel, eluted with CH_2Cl_2 to remove side product, and then with EtOAc to furnish the expected product **8** as an opalescent crystals (5.76 g, 85%).

R_f = 0.17 [CH_2Cl_2/MeOH (95:5)].

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3.49 (s, 2H, CH_2-2), 5.21 (s, 2H, O*C*H_2Ph), 7.37 (s, 5H, 5HAr), 9.58 (bs, 1H, OH).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 171.4 (C_3=O), 166.5 (C_1=O), 134.9 (ArCH), 128.6 (ArCH), 128.5 (ArCH), 128.3 (ArCH), 67.6 (CH_2), 40.8 (CH_2-2).

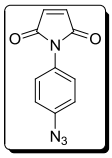
IR (ZnSe) ν_{max} 3476, 3035, 2954, 1744, 1411, 1324, 1214, 1156, 1000, 750, 698 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 217.1 (100) $[M+Na]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{10}H_9O_4$ $[M–H]^–$ 193.0495, found 193.0496.

m.p. 47.3-48.9 °C.

9 1-(4-Azidophenyl)-1*H*-pyrrole-2,5-dione



CAS : 50684-67-8
MM : 214.2 g.mol^{-1}
EM : 214.0491
FM : $C_{10}H_6N_4O_2$

To a suspension of *tert*-butyl 4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)phenylcarbamate **15** (760 mg, 2.64 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (7 mL) was added dropwise trifluoroacetic acid (3.5 mL) at 0 °C. The resulting solution was warmed to r.t. and stirred for 2 h. Then the solvents were evaporated and the remainder taken up in a mixture of concentrated acetic acid (7 mL) and water (7mL). The solution obtained was cooled to 0 °C and sodium nitrite (264 g, 3.82 mmol) was added in one portion. After stirring for 1 h 50 at 0 °C, sodium azide (257 g, 3.95 mmol) was added slowly. When the evolution of nitrogen gas had ceased, the reaction mixture was extracted with CH_2Cl_2 (3 × 20 mL). The organic phases were combined and carefully washed with solution satured of $NaHCO_3$ (3 × 15 mL), dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and evaporated. The residue was purified by column chromatography, eluted with cyclohexane/EtOAc (8:2) to give the product **9** as yellow needles (163 mg, 29%).

R_f = 0.40 [Cyclohexane/EtOAc (8:2)].

^{1}H-NMR (300 MHz, acetone-d_6) δ 7.03 (s, 2H, 2CH), 7.21 (d, ^3J = 8.9 Hz, 2H, 2CHAr), 7.43 (d, ^3J = 8.9 Hz, 2H, 2CHAr).

^{13}C-NMR (75 MHz, acetone-d_6) δ 170.4 (CO), 140.1 (ArA), 135.3 (CH), 129.8 (ArC), 128.9 (ArCH), 120.2 (ArCH).

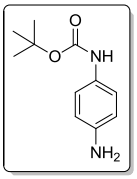
IR (ZnSe) ν_{max} 3106, 2130-2097, 1713, 1508, 1394, 1294 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 237.2 (100) $[M+Na]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{10}H_{10}N_5O_2$ $[M+NH_4]^+$ 232.0835, found 232.0844 [lit.[167]].

m.p. 116-118 °C [lit.[167] 116-118 °C].

13 ***N*-Boc-1,4-phenylenediamine**



CAS : 71026-66-9
CF : $C_{11}H_{16}N_2O_2$
EM : 208.1212
MW : 208.26 g.mol^{-1}

According to the procedure reported by Bonger et *al.*,[270] to a ice-cold solution of *p*-phenylenediamine (8.33 g, 77 mmol) in anhydrous dioxane (60 mL) was added dropwise a solution of di-*tert*-butyl dicarbonate (2.183 g, 10 mmol) in anhydrous dioxane (40 mL). After stirring at r.t. under argon atmosphere for 20 h, the solvent was removed *in vacuo* and the resulting mixture was suspended in water (90 mL). The resulting precipitate was filtrated on a Büchner funnel, followed by washing with cold water (3 × 10 mL) and then dissolved in CH_2Cl_2 (150 mL). The organic extract was washed with water (11 × 100 mL), dried over anhydrous $MgSO_4$, filtrated and evaporated to give the product **13** as a brownish powder (708 mg, 34 %).

R_f = 0.82 [EtOAc/cyclohexane/NH_4OH (6:3:0.1)].

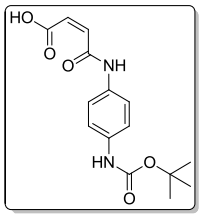
^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.50 (s, 9H, $3CH_3$), 3.52 (bs, 2H, NH_2), 6.24 (bs, 1H, NH-Boc), 6.63 (d, ^3J = 8.7 Hz, 2H, 2HAr), 7.13 (d, ^3J = 8.4 Hz, 2H, CHAr).

^{13}C-NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 117.0 (4ArCH), 28.8 ($3CH_3$). (lit.[270])

IR (ZnSe) ν_{max} 3347, 2977, 1700, 1521, 1239, 1162 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 209.0 $[M+H]^+$ [lit.[270]].

14 **(*Z*)-4-(4-(*tert*-Butoxycarbonylamino)phenylamino-4-oxobut-2-enoic acid**



CAS : 120642-86-6
CF : $C_{15}H_{18}N_2O_5$
EM : 306.1216
MW : 306.31 g.mol^{-1}

According to the procedure reported by Rotili et *al.*,[167] to a stirred solution of maleic anhydride (396 mg, 4.03 mmol) in EtOAc (2 mL) was added a solution of *N*-Boc-1,4-phenylenediamine **13** (700 mg, 3.36 mmol) in EtOAc (6 mL). The resulting suspension was stirred for 20 min at r.t. The resulting solids were filtered on a Büchner funnel, rinsed with cold EtOAc (3 × 10 mL) and resuspended in acetone (50 mL) and dried *in vacuo* to give the maleamic acid derivative **14** as a yellow powder (870 mg, 85%).

R$_f$ = 0.23 [EtOAc/cyclohexane (1:2)].

^{1}H-NMR (300 MHz, acetone-*d*$_6$) δ 1.48 (s, 9H, 3CH$_3$), 6.36 (d, ^3J = 12.8 Hz, 1H, CH), 6.70 (d, ^3J = 12.8 Hz, 1H, CH), 7.59 (d, ^3J = 9.3 Hz, 2H, 2CHAr), 7.64 (d, ^3J = 9.3 Hz, 2H, 2CHAr), 9.51 (s, 1H, NH), 10.38 (s, 1H, NH).

^{13}C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ166.7 (COOH), 162.9 (CO), 152.8 (CO-O), 135.8 (ArC), 132.8 (ArC), 131.5 (CH), 131.0 (CH), 120.2 (ArCH), 118.5 (ArCH), 79.0 (C*q*), 28.2 (CH$_3$).

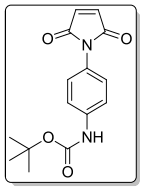
IR (ZnSe) ν_{max} 3286 (ν_{OH}), 1712 (ν_{CH3}), 1519 ($\nu_{C=CAr}$), 1238 (ν_{C-Oac}), 1160 ($\nu_{C-O-CBoc}$) cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 229.2 (100) [M+Na]$^+$.

HRMS (ESI-TOF) calced for $C_{15}H_{17}N_2O_5$ [M–H]$^-$ 305.1143, found 305.1142 [lit.[167]].

m.p. 177-179 °C [lit.[167] 173-175 °C].

15 ***tert*-Butyl 4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)phenylcarbamate**



CAS : 120642-87-7
CF : $C_{15}H_{16}N_2O_4$
EM : 288.1110
MW : 288.30 g.mol^{-1}

A stirred suspension of maleamic acid derivative **14** (862 mg, 2.81 mmol) in acetic anhydride (10 mL) was heated to 95°C. Then anhydrous sodium acetate (254 mg, 3.09 mmol) was added and the resulting solution was stirred for 2 h 30. The solution was allowed to stand overnight to give yellow, crystalline precipitate. Water (60 mL) was added and the mixture was stirred for 10 min. The precipitate was filtrered on a Büchner funnel and washed with solution satured of $NaHCO_3$ (4 × 15 mL) and then with water (4 × 15 mL). The resultant solid was redissolved in acetone (50 mL), dried over anhydrous $MgSO_4$, filtrated and concentrated *in vacuo* to give the product **15** as a pale yellow powder (770 mg, 95%).

R$_f$ = 0.72 [EtOAc/cyclohexane (1:2)].

^{1}H-NMR (300 MHz, acetone-d_6) δ 1.49 (s, 9H, 3CH_3), 7.00 (s, 2H, 2CH), 7.26 (d, ^3J = 8.9 Hz, 2H, 2CHAr), 7.65 (d, ^3J = 8.9 Hz, 2H, 2CHAr), 8.55 (s, 1H, NH).

^{13}C-NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ 170.1 (CO), 152.7 (CO-O), 139.1 (ArC), 134.6 (CH), 127.3 (ArC), 125.3 (ArCH), 118.2 (ArCH), 79.3 (C*q*), 28.1 (CH_3).

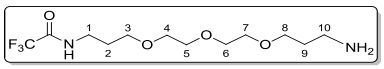
IR (ZnSe) ν_{max} 3368 (ν_{NH}), 1707 (ν_{CO}), 1600 ($\nu_{C=C}$), 1530 ($\nu_{C=CAr}$), 1234 (ν_{C-O-C}), 1155 (ν_{N-C}) cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 311.1 (100) $[M+Na]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{15}H_{15}N_2O_4$ $[M–H]^–$ 287.1037, found 287.1042 [lit.[167]].

m.p. 181-184 °C [lit.[167] 182-184 °C].

17 ***N*-(3-(2-(2-(3-aminopropoxy)ethoxy)ethoxy)propyl)-2,2,2-trifluoroacetamide**



CAS : 452309-60-3
CF : $C_{12}H_{23}F_3N_2O_4$
EM : 316.1610
MW : 316.32 g.mol^{-1}

Adapted from the procedure described by Fixon-Owoo *et al.*,[274] commercially available 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine (**11**, 3.0 g, 13.6 mmol) was dissolved in anhydrous THF (9 mL) under argon atmosphere and cooled to –65 °C. To this solution, ethyl trifluoroacetate (1.9 g, 13.6 mmol) was added dropwise and the resulting solution was stirred for 1 h at –65 °C under argon atmosphere. The solution was then slowly warmed to r.t. Solvent and volatiles were removed *in vacuo* and the remainder taken up in water (10 mL). The resulting aqueous solution was then extracted with CH_2Cl_2 (6 × 15 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated *in vacuo* to give a yellow oil, which was purified by column chromatography, eluted with CH_2Cl_2/MeOH/NH_4OH (9.8:0.8:0.2) to remove by-products and then CH_2Cl_2/MeOH/NH_4OH (9:1:0.2) to furnish the product **17** as pale yellowish oil (1.88 g, 44%).

R$_f$ = 0.26 [CH_2Cl_2/MeOH/NH_4OH (9:1:0.2)].

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.56 (bs, 2H, NH_2), 1.70 (p, $^3J_{9\text{-}8} = {}^3J_{9\text{-}10}$ = 6.2 Hz, 2H, H9), 1.80-1.88 (m, 2H, H2), 2.79 (t, $^3J_{10\text{-}9}$ = 6.5 Hz, 2H, H10), 3.45 (t, $^3J_{1\text{-}2}$ = 6.0 Hz, 2H, H1), 3.54-3.64 (m, 12H, 6OCH_2), 8.79 (bs, 1H, NH).

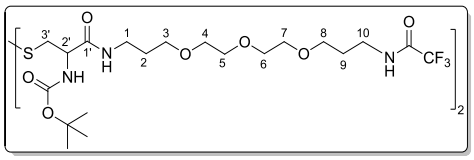
^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 157.2 (q, *J* = 36.6 Hz, $COCF_3$), 116.1 (q, *J* = 287.8 Hz, CF_3), 70.5 (CH_2-4), 70.4 (CH_2-5, CH_2-6), 70.0 (CH_2-7), 69.7 (CH_2-3), 69.7 (CH_2-8), 39.8 (CH_2-10), 38.2 (CH_2-1), 32.9 (CH_2-2), 28.0 (CH_2-9).

IR (ZnSe) ν_{max} 3363, 3066, 2876, 1714, 1564, 1483, 1350, 1208, 1188, 1155 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 317.1 (100) $[M+H]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{12}H_{24}F_3N_2O_4$ $[M+H]^+$ 317.1683, found 317.1697.

18



CAS : New product
CF : $C_{40}H_{70}F_6N_6O_{14}S_2$
EM : 1036.4296
MW : 1037.14 g.mol^{-1}

To a solution of *N*,*N*′-di-Boc-L-cystine (**10d**, 3.44 g, 7.81 mmol) in anhydrous THF (80 mL) was added *O*-Benzotriazole-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphate (HBTU, 6.22 g, 16.4 mmol) and hydroxybenzotriazole (HOBt, 2.22 g, 16.4 mmol). To the resulting suspension was added a solution of **17** (5.19 g, 16.4 mmol) and DIPEA (4.63 mL, 26.56 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (80 mL). The resulting mixture was stirred at r.t. in the dark for 48 h under argon atmosphere. After this time, CH_2Cl_2 (200 mL) was added and the organic layer was successively washed with an aqueous solution of HCl 0.5 M (3 × 30 mL), $NaHCO_3$ (3 × 30 mL) and brine (50 mL), dried over anhydrous $MgSO_4$, filtreted and then evaporated. The residue was purified by column chromatography, eluted with CH_2Cl_2/EtOAc/MeOH (48:50:2 then 46:50:4) to give the product **18** as a white translucent waxe (4.16 g, 53%).

R_f = 0.57 [CH_2Cl_2/EtOAc/MeOH (4:5:1)].

^{1}H-NMR (300 MHz, acetone-*d*$_6$) δ 1.44 (s, 18 H, 6CH_3), 1.72-1.88 (m, 8H, 4CH_2), 2.97-3.04 (m, 2H, 2CH-3'a), 3.17-3.22 (m, 2H, 2CH-3'b), 3.28-3.35 (m, 4 H, 2CH_2-1), 3.43 (q, ^3J = 6.4 Hz, 4H, 2CH_2-10), 3.50-3.62 (m, 24H, 12CH_2-O), 4.46-4.48 (m, 2H, 2CH-2'), 6.28 (d, ^3J = 8.2 Hz, 2H, 2NH), 7.58 (bs, 2H, 2NH), 8.41 (bs, 2H, 2NH).

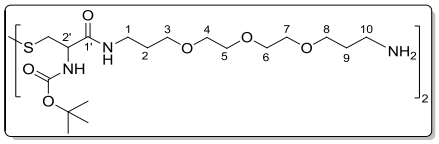
^{13}C-NMR (100 MHz, acetone-*d*$_6$) δ171.0 (CO), 157.4 (q, *J* = 36.1 Hz, $COCF_3$), 156.4 (CO), 117.1 (q, *J* = 287.6 Hz, CF_3), 79.8 (C*q*), 71.1 (CH_2), 71.0 (CH_2), 70.9 (CH_2), 70.8 (CH_2), 69.5 (CH_2), 69.3 (CH_2), 55.1 (CH), 43.4 (CH_2), 38.3 (CH_2), 37.7 (CH_2), 30.2 (CH_2), 29.5 (CH_2), 28.6 (CH_3).

IR (ZnSe) ν_{max} 3338, 2930, 2872, 1660, 1715, 1686, 1659, 1523, 1162 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) m/z (rel. intensity) 1037.0 (100) $[M+H]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{40}H_{70}N_6O_{14}F_6S_2Na$ $[M+Na]^+$ 1059.4170, found 1059.4187.

23



CAS : New product
CF : $C_{36}H_{72}N_6O_{12}S_2$
EM : 844.4650
MW : 845.12 g.mol^{-1}

Dried K_2CO_3 (511 mg, 3.7 mmol) was dissolved in distillated water (5 mL). This solution was diluted with HPLC-grade MeOH (15 mL) and then added to the solution of **18** (1.27 g, 1.13 mmol) in HPLC-grade MeOH (10 mL). The resulting solution was stirred for 36 h at r.t. in the dark under argon atmosphere. After this time, the solvent was removed *in vacuo* and the resulting solid was redissolved into MeOH (30 mL). The resulting suspension was filtered and the solid was washed with dried MeOH (3 × 5 mL). The filtrate was concentrated again and the resulting residue was purified by column chromatography, eluted with CH_2Cl_2/MeOH/NH_4OH = 92:8:2 (to avoid impurities) and then 90:10:2 to give the expected product **23** as a white translucent waxe (916 mg, 80%).

R_f = 0.1 [CH_2Cl_2/MeOH/NH_4OH (88:10:2)].

^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 1.46 (s, 18H, 6CH_3), 1.71-1.82 (m, 8H, 4CH_2), 2.77 (t, ^3J = 6.8 Hz, 4H, 2CH_2-10), 2.86-2.93 (m, 2H, 2CH-3'a), 3.13-3.19 (m, 2H, 2CH-3'b), 3.27-3.33 (m, 4 H, 2CH_2-1), 3.51-3.65 (m, 24H, 12O*C*H_2), 4.33-4.38 (m, 2H, 2CH-2').

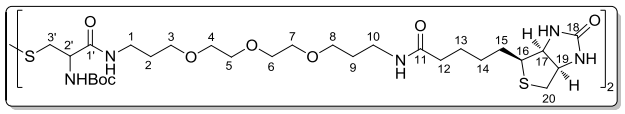
^{13}C-NMR (75 MHz, acetone-d_6) δ 170.8 (CO), 156.4 (CO), 79.7 (C*q*), 71.1 (CH_2), 70.9 (CH_2), 69.6 (CH_2), 69.6 (CH_2), 55.0 (CH), 48.4 (CH_2), 43.4 (CH_2), 37.6 (CH_2), 31.8 (CH_2), 30.3 (CH_2), 28.6 (CH_3).

IR (ZnSe) ν_{max} 3344, 2935-2867, 1660, 1520, 1045, 845 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 845.3 (100) $[M+H]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{36}H_{73}N_6O_{12}S_2$ $[M+H]^+$ 845.4722, found 845.4725.

19



CAS : New product
CF : $C_{56}H_{100}N_{10}O_{16}S_4$
EM : 1296.6202
MW : 1297.71 g.mol^{-1}

To a stirred solution of biotin (**12**, 345 mg, 1.41 mmol) in anhydrous DMF (10 mL), was added DIPEA (296 µL, 1.70 mmol) and stirred at r.t. for 10 min then PyBOP (735 mg, 1.41 mmol) was added and the resulting solution was continuously stirred at r.t. for 30 min. Then to this mixture was added dropwise a solution in which **23** (500 mg, 0.565 mmol) was previously dissolved in anhydrous DMF (13 mL). After stirring at r.t. under argon atmosphere in the dark for 24 h, the solution was concentrated in the vacuum, taken up in a mixture of CH_2Cl_2/EtOAc (3:1, 120 mL) and resulting solution was successively washed with an aqueous saturated solution of $NaHCO_3$ (3 × 10 mL), 0.5M HCl (10 mL), then with brine (10 mL), dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and evaporated. The residue was purified by column chromatography, eluted with CH_2Cl_2/MeOH/NH_4OH (95:5:1 then 92:8:1) to give the product **19** as a white foam (468 mg, 64%).

R$_f$ = 0.38 [CH_2Cl_2/MeOH/NH_4OH (9:1:0.2)].

^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 1.39-1.49 (m, 4H, 2CH_2), 1.46 (bs, 18H, 6CH_3), 1.54-1.83 (m, 16H, 8CH_2), 2.20 (t, ^3J = 7.3 Hz, 4H, 2CH_2-12), 2.71 (d, ^2J = 12.7 Hz, 2H, 2CH-20a), 2.86-2.94 (m, 2H, 2CH-3'a), 2.93 (dd, ^2J = 12.8 Hz, ^3J = 4.9 Hz, 2H, 2CH-20b), 3.13-3.29 (m, 12H, 2CH_2-1, 2CH_2-10, 2CH-16, 2CH-3'b), 3.51-3.67 (m, 24H, 12O*C*H_2), 4.31 (dd, ^3J = 7.9 Hz, ^3J = 4.5 Hz, 2H, 2CH-17), 4.35-4.38 (m, 2H, 2CH-2'), 4.48-4.52 (m, 2H, 2CH-19).

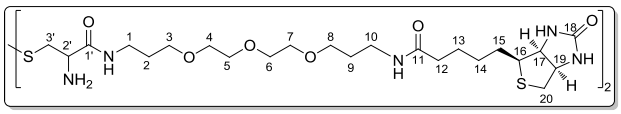
^{13}C-NMR (75 MHz, CD_3OD) δ 175.9 (CO), 173.0 (CO), 166.1 (CO), 157.6 (CO), 80.9 (C*q*), 71.5 (CH_2), 71.2 (CH_2), 69.9 (CH_2), 63.4 (CH-17), 61.6 (CH-19), 57.0 (CH-16), 55.5 (CH-2'), 42.0 (CH_2), 41.1 (CH_2), 38.1 (CH_2), 37.8 (CH_2), 36.9 (CH_2), 30.4 (CH_2), 30.3 (CH_2), 29.8 (CH_2), 29.5 (CH_2), 28.8 (CH_3), 26.9 (CH_2).

IR (ZnSe) ν_{max} 3304, 2926, 2869, 2416, 1696, 1650, 1105, 846 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 649.5 (95) $[M+2H]^{2+}$, 1298.3 (100) $[M+H]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{56}H_{100}N_{10}O_{16}S_4Na$ $[M+Na]^+$ 1319.6093, found 1319.6089.

24



CAS : New product
CF : $C_{46}H_{84}N_{10}O_{12}S_4$
EM : 1096.5153
MW : 1097.48 g.mol^{-1}

To a solution of **19** (453 mg, 0.35 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (15 mL) was added trifluoroacetic acid (TFA, 1.5 mL). The resulting mixture was stirred at r.t. in the dark for 5 h under argon atmosphere. Excess TFA was evaporated and the residue was dried overnight under high vacuum, then dissolved in degassed MeOH (15 mL), stirred with powdered $NaHCO_3$ (176 mg, 2.09 mmol) at r.t. under Ar for 3 h (monitored by NMR). The mixture was concentrated in the vacuum, taken up in deuterated methanol (2 mL), stirred with powdered K_2CO_3 (145 mg, 1.05 mmol) at r.t. for 30 min under Ar. After this time, the suspension was removed by filtration, the solid was washed with deuterated methanol (3 × 1 mL), and the fitrate was evaporated to give the expected product **24** as a pale yellowish foam in quantitative yield (400 mg) without further purification.

R$_f$ = 0.05 [CH_2Cl_2/MeOH (85:15)].

^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 1.41-1.49 (m, 4H, 2CH_2), 1.58-1.84 (m, 16H, 8CH_2), 2.21 (t, ^3J = 7.3 Hz, 4H, 2CH_2-12), 2.71 (d, ^2J = 12.7 Hz, 2H, 2CH-20a), 2.86 (dd, ^2J = 13.6 Hz, ^3J = 7.6 Hz, 2H, 2CH-3'a), 2.93 (dd, ^2J = 12.8 Hz, ^3J = 4.9 Hz, 2H, 2CH-20b), 3.11 (dd, ^2J = 13.5 Hz, $^3J_{cis}$ = 5.5 Hz, 2H, 2CH-3'b), 3.18-3.35 (m, 10H, 2CH_2-1, 2CH_2-10, 2CH-16), 3.50-3.66 (m, 26H, 12OCH_2, 2CH-2'), 4.31 (dd, ^3J = 7.9, ^3J = 4.4 Hz, 2H, 2CH-17), 4.48-4.52 (m, 2H, 2CH-19).

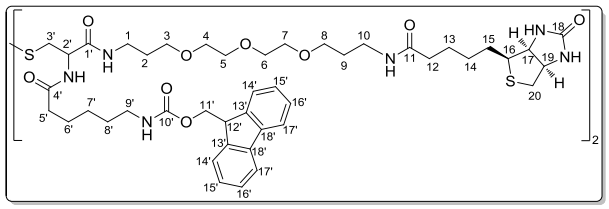
^{13}C-NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 175.9 (C_{11}=O), 175.3 ($C_{1'}$=O), 166.1 (C_{18}=O), 71.5 (CH_2), 71.3 (CH_2), 70.1 (CH_2), 70.0 (CH_2), 63.4 (CH-17), 61.6 (CH-19), 57.0 (CH-16), 55.3 (CH-2'), 44.4 (CH_2-3'), 41.1 (CH_2-10), 38.1 (CH_2-1), 37.8 (CH_2-20), 36.9 (CH_2-12), 30.4 (CH_2-9), 30.3 (CH_2-2), 29.8 (CH_2-14), 29.5 (CH_2-15), 26.9 (CH_2-13).

IR (ZnSe) ν_{max} 3351, 2930, 1684, 1561, 1433, 1338, 1206, 1183, 1133, 838, 802, 723 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 550.0 (60) $[M+2H]^{2+}$, 1098.3 (100) $[M+H]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{46}H_{84}N_{10}O_{12}S_4Na$ $[M+Na]^+$ 1119.5045, found 1119.5099.

20



CAS : New product
CF : $C_{88}H_{126}N_{12}O_{18}S_4$
EM : 1766.8196
MW : 1768.27 g.mol^{-1}

To a stirred solution of 6-(Fmoc-amino)hexanoic acid (**16**, 240 mg, 0.68 mmol) in anhydrous DMF (10 mL), was added DIPEA (120 µL, 0.68 mmol) and stirred at r.t. for 10 min then HBTU (296 mg, 0.781 mmol) was added and the resulting solution was continuously stirred at r.t. for 1 h. Then to this mixture was added dropwise a solution in which **24** (373 mg, 0.34 mmol) and DIPEA (117 µL, 0.68 mmol) were previously stirred in anhydrous DMF (12 mL). After stirring at r.t. under argon atmosphere in the dark for 14 h, the solution was concentrated under reduced pressure at 50 °C. The residue was purified by column chromatography, eluted with CH_2Cl_2/NH_4OH (100:1) then CH_2Cl_2/MeOH/NH_4OH (98:2:1) to give the expected product **20** as a white foam (400 mg, 67%).

R$_f$ = 0.38 [CH_2Cl_2/MeOH/NH_4OH (90:10:2)].

^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 1.29-1.78 (m, 32H, 16CH_2), 2.18 (t, ^3J = 7.3 Hz, 4H, 2CH_2-5'), 2.27 (t, ^3J = 7.3 Hz, 4H, 2CH_2-12), 2.69 (d, ^2J = 12.7 Hz, 2H, 2CH-20a), 2.90 (dd, ^2J = 12.7 Hz, $^3J_{cis}$ = 4.9 Hz, 2H, 2CH-20b), 2.89-2.96 (m, 2H, 2CH-3'a), 3.07-3.28 (m, 16H, 2CH_2-1, 2CH_2-10, 2CH_2-9', 2CH-16, 2CH-3'b), 3.49 (t, ^3J = 6.2 Hz, 8H, 2CH_2-3, 2CH_2-8), 3.54-3.62 (m, 16H, 8OCH_2), 4.18 (t, ^3J = 6.8 Hz, 2H, 2CH-12'), 4.27 (dd, ^3J = 7.9 Hz, ^3J = 4.5 Hz, 2H, 2CH-17), 4.33 (d, ^3J = 6.9 Hz, 4H, 2CH_2-11'), 4.44-4.48 (m, 2H, 2CH-19), 4.69-4.73 (m, 2H, 2CH-2'), 7.28-7.41 (m, 8H, 4HAr-15', 4HAr-16'), 7.64 (d, ^3J = 7.3 Hz, 4H, 4HAr), 7.79 (d, ^3J = 7.5 Hz, 4H, 4HAr).

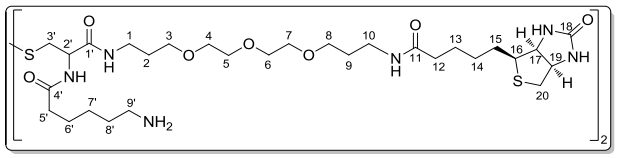
^{13}C-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ174.0 (CO), 173.2 (CO), 170.9 (CO), 164.4 (CO), 156.6 (CO), 144.0 (ArC), 141.3 (ArC), 127.6 (ArCH), 127.0 (ArCH), 125.1 (ArCH), 119.9 (ArCH), 70.4 (CH_2), 70.0 (CH_2), 69.9 (CH_2), 68.8 (CH_2), 66.4 (CH_2-11'), 61.9 (CH-17), 60.1 (CH-19), 55.6 (CH-16), 53.0 (CH-2'), 47.3 (CH-12'), 44.3 (CH_2), 40.8 (CH_2), 40.6 (CH_2), 37.7 (CH_2), 37.0 (CH_2), 35.9 (CH_2), 35.8 (CH_2), 29.3 (CH_2), 29.1 (CH_2), 28.7 (CH_2), 28.2 (CH_2), 28.0 (CH_2), 26.1 (CH_2), 25.5 (CH_2), 25.2 (CH_2).

IR (ZnSe) ν_{max} 3305, 2932, 2865, 2413, 2361, 1643, 1540, 1451, 1104, 913, 760, 741 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 907.6 (100) $[M+2Na]^{2+}$, 1791.5 (65) $[M+Na]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{88}H_{126}N_{12}O_{18}S_4Na_2$ $[M+2Na]^{2+}$ 906.3990, found 906.4060.

25



CAS : New product
CF : $C_{58}H_{106}N_{12}O_{14}S_4$
EM : 1322.6834
MW : 1323.79 g.mol^{-1}

To a solution of **20** (365 mg, 0.206 mmol) in anhyrous DMF (7.5 mL) was added piperidine (123 µL, 1.24 mmol) at r.t. under argon atmosphere. After 1 h stirring at r.t., the starting material was consumed and the dibenzofulvene had been scavenged but the mixture was allowed to stir for an additional 1 h until complete conversion of starting material was observed by TLC. Then, degassed MeOH (7.5 mL) was added and the resulting solution was washed with *n*-hexane (10 × 15 mL) to remove the dibenzofulvene. After evaporation of the residual organic solvent under reduced pressure at 50 °C and under high vacuum, the expected product **25** was obtained as a yellow plastic (254 mg, 93%) without further purification.

R_f = 0 [CH_2Cl_2/MeOH/NH_4OH (90:10:2)].

^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 1.35-1.80 (m, 32 H, 16CH_2), 2.20 (t, ^3J = 7.3 Hz, 4H, 2CH_2-5'), 2.29 (t, ^3J = 7.3 Hz, 4H, 2CH_2-12), 2.66-2.73 (m, 6H, 2CH-20a, 2CH_2-9'), 2.86-3.00 (m, 4H, 2CH-20b, 2CH-3'a), 3.13-3.30 (m, 12H, 2CH_2-1, 2CH_2-10, 2CH-16, 2CH-3'b), 3.53 (t, ^3J = 6.2 Hz, 8H, 2CH_2-3, 2CH_2-8), 3.59-3.66 (m, 16H, 8OCH_2), 4.31 (dd, ^3J = 7.8 Hz, 2 H, ^3J = 4.5 Hz, 2H, 2CH-17), 4.48-4.52 (m, 2H, 2CH-19), 4.70 (dd, ^3J = 8.9 Hz, ^3J = 5.4 Hz, 2H, 2CH-2').

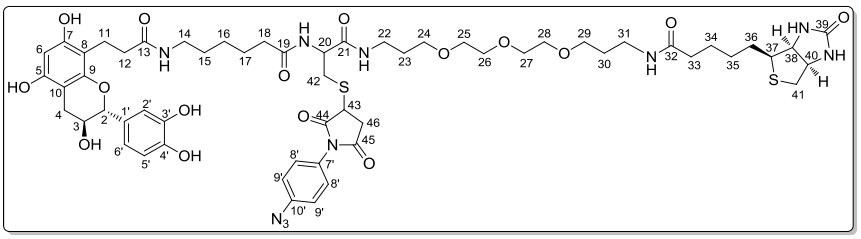
^{13}C-NMR (75 MHz, CD_3OD) δ176.0 ($C_{4'}$=O), 175.9 (C_{11}=O), 172.4 ($C_{1'}$=O), 166.1 (C_{18}=O), 71.5 (CH_2), 71.2 (CH_2), 70.0 (CH_2), 69.8 (CH_2), 63.4 (CH-17), 61.6 (CH-19), 57.0 (CH-16), 54.0 (CH-2'), 42.1 (CH_2-9'), 41.7 (CH_2-3'), 41.1 (CH_2-10), 38.0 (CH_2-1), 37.8 (CH_2-20), 36.9 (CH_2-12), 36.7 (CH_2-5'), 32.5 (CH_2-8'), 30.4 (CH_2-9), 30.3 (CH_2-2), 29.8 (CH_2-14), 29.5 (CH_2-15), 27.4 (CH_2-6'), 26.9 (CH_2-13), 26.6 (CH_2-7').

IR (ZnSe) ν_{max} 3286, 3081, 2930, 2865, 1650, 1549, 1460, 1332, 1264, 1102, 845 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 662.6 (100) $[M+2H]^{2+}$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{58}H_{108}N_{12}O_{14}S_4$ $[M+2H]^{2+}$ 662.3489, found 662.3562.

22a **Probe A1-catechin version**



CAS : New product
MM : 1221.4 g.mol^{-1}
ME : 1220.4882
FM : $C_{57}H_{76}N_{10}O_{16}S_2$

To a stirred solution of **25** (95 mg, 0.072 mmol) in an anhydrous mixture of THF/MeOH (3:1, 4 mL), was added DTT (22 mg, 0.144 mmol) and Et_3N (20 µL, 0.144 mmol). The resulting solution was stirred at r.t. for 3 h under argon atmosphere. Solvents and volatiles were then removed *in vacuo* and the crude product **21** was taken up in dry DMF (4 mL). To this resulting solution was added (2*R*,3*S*)-8-lactone catechin **6a** (38 mg, 0.110 mmol) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at 40 °C for 30 h under argon atmosphere. After complete consumption of the lactone monitored by TLC, the mixture was allowed to reach r.t. and 1-(4-azidophenyl)-1*H*-pyrrole-2,5-dione **9** (36 mg, 0.167 mmol) was added in one portion. The reaction mixture was then stirred at r.t. for an additional 3 h under argon atmosphere and in the dark. After evaporation of the solvents under reduced pressure at 50 °C, the residue was subjected to column chromatography, eluting with CH_2Cl_2/MeOH/HCl 0.1M (95:5:2) to remove impurities, and then CH_2Cl_2/MeOH/HCl 0.1M (90:10:2) to furnish the expected probe **22a** as an inseparable mixture of diastereoismers, and as a yellowish foam (44 mg, 34% over 3 steps).

R_f = 0.50 [CH_2Cl_2/MeOH/HCl 0.1M (80:20:2)].

^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 1.25-1.79 (m, 16H, H15, H16, H17, H23, H30, H34, H35, H36), 2.16-2.26 (m, 4H, H18, H33), 2.40-2.44 (m, 2H, H12), 2.54 (dd, ^2J = 16.2 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 8.0 Hz, 1H, H4a), 2.61-2.72 (m, 1H, H42), 2.69 (d, ^2J = 12.2 Hz, 1H, H41a), 2.78-2.83 (m, 2H, H11), 2.90 (dd, ^2J = 12.9 Hz, $^3J_{41\text{-}40}$ = 5.0 Hz, 1H, H41b), 2.86-3.01 (m, 2H, H4b, H46a), 3.07-3.28 (m, 8H, H14, H22, H31, H37, H42), 3.37-3.41 (m, 1H, H46b), 3.48-3.63 (m, 12H, H24 → H29), 3.92-3.99 (m, 1H, H3), 4.11 (dd, $^3J_{43\text{-}46a}$ = 9.1 Hz, $^3J_{43\text{-}46b}$ = 4.0 Hz, 1H, H43), 4.27 (dd, $^3J_{38\text{-}37}$ = 7.8 Hz, $^3J_{38\text{-}40}$ = 4.4 Hz, 1H, H38), 4.44-4.48 (m, 1H, H40), 4.58-4.68 (m, 1H, H20), 4.64 (d, $^3J_{2\text{-}3}$ = 7.3 Hz, 1H, H2), 6.00 (s, 1H, H6), 6.73 (dd, $^3J_{6'\text{-}5'}$ = 8.2 Hz, $^4J_{6'\text{-}2'}$ = 1.5 Hz, 1H, H6'), 6.78 (d, $^3J_{5'\text{-}6'}$ = 8.1 Hz, 1H, H5'), 6.86 (d, $^4J_{2'\text{-}6'}$ = 1.2 Hz, 1H, H2'), 7.14-7.20 (m, 2H, H9'), 7.31-7.36 (m, 2H, H8').

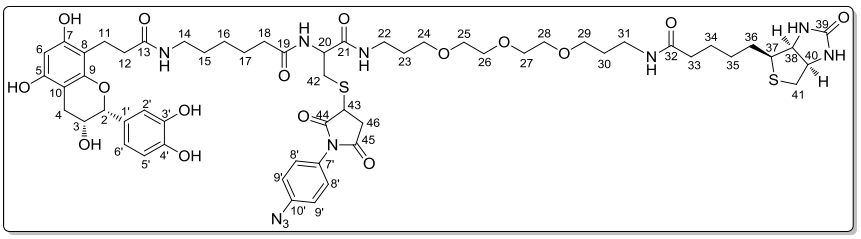
^{13}C-NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 178.0, 177.9 (C_{45}=O), 176.6 (C_{19}=O), 176.3, 176.2 (C_{44}=O), 176.0 (C_{13}=O), 175.8 (C_{32}=O), 172.3 (C_{21}=O), 166.1 (C_{39}=O), 155.3 (ArC-7), 155.2 (ArC-5), 154.6 (ArC-9), 146.2 (ArC-3'), 146.2 (ArC-4'), 141.8 (ArC-10'), 132.5 (ArC-1'), 130.2 (ArC-7'), 129.6 (ArCH-8'), 122.6 (ArCH), 120.6 (ArCH-9'), 120.4 (ArCH), 119.9 (ArCH-6'), 116.2 (ArCH-5'), 115.1 (ArCH-2'), 107.1 (ArC-8), 101.0 (ArC-10), 96.6 (ArCH-6), 82.7 (CH-2), 71.5 (CH_2-26, CH_2-27), 71.2 (CH_2-25, CH_2-28), 69.9 (CH_2-24), 69.7 (CH_2-29), 68.8 (CH-3), 63.4 (CH-38), 61.6 (CH-40), 57.0 (CH-37), 54.3 (CH-43), 53.9 (CH-20), 41.1 (CH_2-41), 40.3 (CH_2-14), 38.0 (CH_2-22), 37.9 (CH_2-31), 37.0 (CH_2-33), 36.9 (CH_2-18), 36.7 (CH_2-12), 35.0 (CH_2-46), 34.6 (CH_2-42), 30.4 (CH_2-23), 30.2 (CH_2-30), 30.0 (CH_2-15), 29.8 (CH_2-35), 29.5 (CH_2-36), 28.7 (CH_2-4), 27.4 (CH_2-17), 26.9 (CH_2-34), 26.5 (CH_2-16), 20.0 (CH_2-11).

IR (ZnSe) ν_{max} 3366, 3328, 3285, 3091- 2511, 2126, 1707, 1659, 1642, 1283, 1175, 669 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 1243.3 (100) $[M+Na]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{57}H_{76}N_{10}O_{16}S_2Na$ $[M+Na]^+$ 1243.4774, found 1243.4807.

22b **Probe A2-epicatechin version**



CAS : New product
CF : $C_{57}H_{76}N_{10}O_{16}S_2$
EM : 1220.4882
MW : 1221.40 g.mol^{-1}

To a stirred solution of **25** (108 mg, 0.082 mmol) in an anhydrous mixture of THF/MeOH (3:1, 4 mL), was added DTT (25 mg, 0.163 mmol) followed by Et_3N (23 µL, 0.163 mmol). After stirring at r.t. for 3 h in the dark under argon atmosphere, the solvents were removed *in vacuo*, and the crude product **21** was taken up in dry DMF (4 mL). To this solution was added (2*R*,3*R*)-8-lactone epicatechin **6b** (56 mg, 0.163 mmol). The reaction mixture was then stirred under argon atmosphere at 40 °C for 60 h, after which time TLC analysis indicated complete consumption of the lactone. Unfortunately, the synthetic thiol was totally oxidized to disulfide **27** during this time, which prevented the coupling with the maleimide **9**. A stoichiometric amount of DTT and Et_3N (0.082 mmol) was then added at r.t. to reduce the disulfide followed by addition of maleimide **9** (53 mg, 0.246 mmol) and the stirring continued at r.t. for an additional of 3 h in the dark. After evaporation of the solvents *in vacuo*, the residue was subjected to column chromatography, eluting with CH_2Cl_2/MeOH (95:5 to remove impurities then 90:10) to furnish an inseparable mixture of diastereoismers **22b** as a yellowish foam (23 mg, 12%). But additional peaks in the NMR spectrum indicated a small amount of unknown impurities, a further purification at this step was required.

R_f = 0.15 [CH_2Cl_2/MeOH (9:1)].

^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 1.24-1.78 (m, 16H, H15, H16, H17, H23, H30, H34, H35, H36), 2.16-2.26 (m, 4H, H18, H33), 2.47-2.52 (m, 2H, H12), 2.68 (d, ^2J = 13.0 Hz, 1H, H41a), 2.77 (dd, ^2J = 16.9 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 2.4 Hz, 1H, H4a), 2.84-3.00 (m, 5H, H4b, H11, H41b, H42), 3.05-3.28 (m, 9H, H14, H22, H31, H37, H42, H46), 3.36-3.41 (m, 1H, H46), 3.48-3.62 (m, 12H, H24, H25, H26, H27, H28, H29), 4.08-4.12 (m, 1H, H43), 4.23 (bs, 1H, H3), 4.24-4.29 (m, 1H, H38), 4.44-4.48 (m, 1H, H40), 4.55-4.68 (m, 1H, H20), 4.84 (s, 1H, H2, under water's signal), 6.01 (s, 1H, H6), 6.79 (d, $^3J_{5'\text{-}6'}$ = 8.1 Hz, 1H, H5'), 6.84 (d, $^3J_{6'\text{-}5'}$ = 8.3 Hz, 1H, H6'), 7.03 (bs, 1H, H2'), 7.15-7.19 (m, 2H, H9'), 7.31-7.36 (m, 2H, H8').

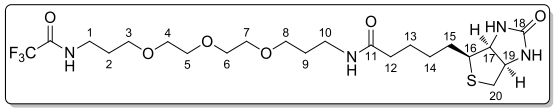
^{13}C-NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 178.0, 177.9 (C_{45}=O), 176.7 (C_{19}=O), 176.3, 176.2 (C_{44}=O), 176.0 (C_{13}=O), 175.8 (C_{32}=O), 172.3 (C_{21}=O), 166.1 (C_{39}=O), 155.8 (ArC-7), 155.2 (ArC-5), 154.9 (ArC-9), 146.0 (ArC-3'), 145.7 (ArC-4'), 141.8 (ArC-10'), 136.9 (ArCH, additional peak), 132.5 (ArC-1'), 130.9 (ArCH, additional peak), 130.2 (ArC-7'), 129.6 (ArCH-8'), 122.6 (ArCH), 120.5 (ArCH-9'), 120.4 (ArCH), 119.1 (ArCH-6'), 116.1 (ArCH-5'), 115.1 (ArCH-2'), 107.4 (ArC-8), 100.2 (ArC-10), 96.7 (ArCH-6), 79.7 (CH-2), 71.5 (CH_2-26, CH_2-27), 71.2 (CH_2-25), 69.9 (CH_2-28), 69.8 (CH_2-24), 69.7 (CH_2-29), 67.1 (CH-3), 63.4 (CH-38), 61.6 (CH-40), 57.0 (CH-37), 54.3 (CH-43), 53.9 (CH-20), 41.1 (CH_2-41), 40.3 (CH_2-14), 38.0 (CH_2-22), 37.8 (CH_2-31), 37.0 (CH_2-33), 36.9 (CH_2-18), 36.7 (CH_2-12), 35.0 (CH_2-46), 34.6 (CH_2-42), 30.4 (CH_2-23), 30.2 (CH_2-30), 29.9 (CH_2-15), 29.8 (CH_2-35), 29.6 (CH_2-4), 29.5 (CH_2-36), 27.4 (CH_2-17), 26.9 (CH_2-34), 26.5 (CH_2-16), 20.1 (CH_2-11).

IR (ZnSe) ν_{max} 3314, 2927, 2124, 1637, 1507, 1456, 1285, 1105 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 1243.5 (100) $[M+Na]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{57}H_{76}N_{10}O_{16}NaS_2$ $[M+Na]^+$ 1243.4774, found 1243.4827.

28



CAS : New product
CF : $C_{22}H_{37}F_3N_4O_6S$
EM : 542.2386
MW : 542.61 $g.mol^{-1}$

To a stirred solution of biotin (**12**, 0.77 g, 3.16 mmol) in anhydrous DMF (25 mL), was added DIPEA (551 µL, 3.16 mmol). Ten minutes later, PyBOP (2.14 g, 4.11 mmol) was added and resulting solution was stirred at r.t. for 30 min till it became clear. A solution of **17** (1.30 g, 4.11 mmol) in DMF (12 mL) was added to the reaction mixure followed by DIPEA (715 µL, 4.11 mmol). The resulting mixture was stirred at r.t. for 24 h under argon atmosphere and then diluted with water (15 mL) and extracted with EtOAc (3 × 100 mL). The combined organics layers were washed with an aqueous saturated solution of NH_4Cl (50 mL), brine (2 × 50 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo* to give a yellowish sticky solid, which was purified by column chromatography, eluted with CH_2Cl_2/MeOH/NH_4OH (9.5:0.5:0.2 to remove impurities, then 9:1:0.2) to furnish the product **28** as a white translucent wax (1.10 g, 64%).

R_f = 0.39 [CH_2Cl_2/MeOH/NH_4OH (9:1:0.2)].

^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 1.41-1.49 (m, 2H, H14), 1.54-1.85 (m, 8H, H2, H9, H13, H15), 2.20 (t, $^3J_{12\text{-}13}$ = 7.3 Hz, 2H, H12), 2.71 (d, ^2J = 12.7 Hz, 1H, H20a), 2.93 (dd, ^2J = 12.7 Hz, $^3J_{20\text{-}19}$ = 5.0 Hz, 1H, H20b), 3.18-3.24 (m, 1H, H16), 3.26 (t, $^3J_{10\text{-}9}$ = 6.8 Hz, 2H, H10), 3.38 (t, $^3J_{1\text{-}2}$ = 6.9 Hz, 2H, H1), 3.50-3.55 (m, 4H, H3, H8), 3.57-3.66 (m, 8H, H4, H5, H6, H7), 4.30 (dd, $^3J_{17\text{-}19}$ = 7.9 Hz, $^3J_{17\text{-}16}$ = 4.5 Hz, 1H, H17), 4.47-4.51 (m, 1H, H19).

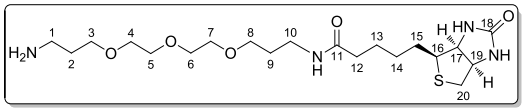
^{13}C-NMR (75 MHz, CD_3OD) δ 175.9 (C_{11}=O), 166.0 (C_{18}=O), 158.8 (q, J = 36.6 Hz, $COCF_3$), 117.5 (q, J = 286.8 Hz, CF_3), 71.5 (CH_2-5, CH_2-6), 71.2 (CH_2-4, CH_2-7), 69.9 (CH_2-3), 69.6 (CH_2-8), 63.3 (CH-17), 61.6 (CH-19), 57.0 (CH-16), 41.0 (CH_2-20), 38.3 (CH_2-1), 37.8 (CH_2-10), 36.8 (CH_2-12), 30.4 (CH_2-2), 29.8 (CH_2-9), 29.7 (CH_2-14), 29.5 (CH_2-15), 26.9 (CH_2-13).

IR (ZnSe) ν_{max} 3285, 2928, 2871, 1697, 1649, 1555, 1460, 1209, 1188, 1156 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 543.1 (45) $[M+H]^+$, 565.2 (100) $[M+Na]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{22}H_{37}F_3N_4O_6SNa$ $[M+Na]^+$ 565.2278, found 565.2272.

29



CAS : New product
CF : $C_{20}H_{38}N_4O_5S$
EM : 446.2563
MW : 446.60 g.mol^{-1}

To a stirred solution of **28** (0.974 g, 1.80 mmol) in methanol (6 mL) was added dropwise a solution of K_2CO_3 (0.74 g, 5.38 mmol) in a mixture of methanol (12 mL) and water (5 mL). The resulting mixture was stirred at r.t. for 16 h under argon atmosphere. The solvents were then removed *in vacuo* and the crude was taken up in MeOH (10 mL), filtered to remove K_2CO_3 and concentrated *in vacuo* to give a yellow gel, which was purified by column chromatography, eluted with CH_2Cl_2/MeOH/NH_4OH (9:1:0.2 to remove impurities, and then 8:2:0.2) to furnish the product **29** as a yellow sticky solid (0.76 g, 95%).

R_f = 0.18 [CH_2Cl_2/MeOH/NH_4OH (7:3:0.2)].

^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 1.41-1.49 (m, 2H, H14), 1.54-1.80 (m, 6H, H2, H13, H15), 1.88 (p, ^3J = 6.3 Hz, 2H, H9), 2.21 (t, $^3J_{12\text{-}13}$ = 7.3 Hz, 2H, H12), 2.71 (d, ^2J = 12.7 Hz, 1H, H20a), 2.93 (dd, ^2J = 12.8 Hz, $^3J_{20\text{-}19}$ = 4.9 Hz, 1H, H20b), 3.01 (t, $^3J_{1\text{-}2}$ = 6.5 Hz, 2H, H1), 3.18- 3.24 (m, 1H, H16), 3.26 (t, $^3J_{10\text{-}9}$ = 6.9 Hz, 2H, H10), 3.52 (t, $^3J_{3\text{-}2}$ = 6.1 Hz, 2H, H3), 3.57-3.66 (m, 10H, H4, H5, H5, H7, H8), 4.30 (dd, $^3J_{17\text{-}19}$ = 7.9 Hz, $^3J_{17\text{-}16}$ = 4.5 Hz, 1H, H17), 4.48-4.52 (m, 1H, H19).

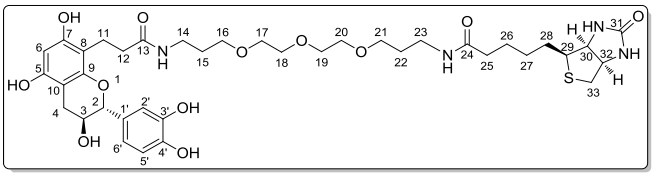
^{13}C-NMR (75 MHz, CD_3OD) δ 176.0 (C_{11}=O), 166.1 (C_{18}=O), 71.4 (CH_2-6), 71.2 (CH_2-5), 71.1 (CH_2-7, CH_2-4), 70.4 (CH_2-8), 69.8 (CH_2-3), 63.4 (CH-17), 61.6 (CH-19), 57.0 (CH-16), 41.0 (CH_2-20), 40.1 (CH_2-1), 37.7 (CH_2-10), 36.8 (CH_2-12), 30.5 (CH_2-9), 29.8 (CH_2-2), 29.5 (CH_2-14), 29.4 (CH_2-15), 26.9 (CH_2-13).

IR (ZnSe) ν_{max} 3313, 2933, 2876, 1682, 1556, 1466, 1202, 1180, 1132 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 447.2 (100) $[M+H]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{20}H_{39}N_4O_5S$ $[M+H]^+$ 447.2636, found 447.2632.

30a **Probe B1-catechin version**



CAS : New product
CF : $C_{38}H_{54}N_4O_{12}S$
EM : 790.3459
MW : 790.92 g.mol^{-1}

To a solution of **29** (259 mg, 0.58 mmol) in anhydrous DMF (6.6 mL) was added (*2R,3S*)-8-lactone-catechin **6a** (100 mg, 0.29 mmol) at one time. The resulting solution was stirred under argon atmosphere for 24 h at 40 °C then for 24 h at 50 °C. After evaporation under reduced pressure, the residue was purified by column chromatography, eluted with CH_2Cl_2/MeOH (9:1 to remove impurities and then 85:15) to furnish the probe **30a** as a yellowish sticky oil (80 mg, 35%).

R$_f$ = 0.29 [CH_2Cl_2/MeOH (8:2)].

^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 1.39-1.46 (m, 2H, H27), 1.54-1.78 (m, 8H, H15, H22, H26, H28), 2.21 (t, $^3J_{25\text{-}26}$ = 7.3 Hz, 2H, H25), 2.41-2.46 (m, 2H, H12), 2.54 (dd, ^2J = 16.2 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 7.9 Hz, 1H, H4a), 2.72 (d, ^2J = 12.8 Hz, 1H, H33a), 2.78-2.87 (m, 3H, H11, H4b), 2.92 (dd, ^2J = 12.9 Hz, $^3J_{33\text{-}32}$ = 5.0 Hz, 1H, H33b), 3.15-3.26 (m, 5H, H14, H23, H29), 3.41 (t, $^3J_{21\text{-}22}$ = 6.1 Hz, 2H, H21), 3.49 (t, $^3J_{16\text{-}15}$ = 6.1 Hz, 2H, H16), 3.52-3.61 (m, 8H, H17, H18, H19, H20), 3.93-4.00 (m, 1H, H3), 4.31 (dd, $^3J_{30\text{-}32}$ = 7.8 Hz, $^3J_{30\text{-}29}$ = 4.3 Hz, 1H, H30), 4.51 (dd, $^3J_{32\text{-}30}$ = 7.6 Hz, $J_{32\text{-}33}$ = 4.8 Hz, 1H, H32), 4.65 (d, $^3J_{2\text{-}3}$ = 7.3 Hz, 1H, H2), 6.03 (s, 1H, H6), 6.73 (dd, $^3J_{6'\text{-}5'}$ = 8.2 Hz, $^4J_{6'\text{-}2'}$ = 1.7 Hz, 1H, H6'), 6.78 (d, $^3J_{5'\text{-}6'}$ = 8.1 Hz, 1H, H5'), 6.87 (d, $^4J_{2'\text{-}6'}$ = 1.7 Hz, 1H, H2').

^{13}C-NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 176.6 (C_{13}=O), 176.0 (C_{24}=O), 165.5 (C_{31}=O), 155.3 (ArC-7), 155.1 (ArC-5), 154.5 (ArC-9), 146.2 (ArC-3'), 146.1 (ArC-4'), 132.5 (ArC-1'), 119.8 (ArCH-6'), 116.2 (ArCH-5'), 115.2 (ArCH-2'), 107.1 (ArC-8), 101.0 (ArC-10), 96.7 (ArCH-6), 82.7 (CH-2), 71.4 (CH_2-18, CH_2-19), 71.1 (CH_2-17, CH_2-20), 69.9 (CH_2-21), 69.8 (CH_2-16), 68.7 (CH-3), 63.4 (CH-30), 61.7 (CH-32), 56.8 (CH-29), 40.9 (CH_2-33), 37.9 (CH_2-14), 37.8 (CH_2-23), 36.9 (CH_2-12), 36.8 (CH_2-25), 30.3 (CH_2-22), 30.1 (CH_2-15), 29.6 (CH_2-27), 29.4 (CH_2-28), 28.5 (CH_2-4), 26.8 (CH_2-26), 20.0 (CH_2-11).

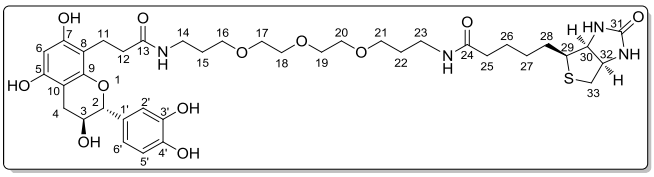
IR (ZnSe) ν_{max} 3386, 2923, 1618, 1449, 1102, 685 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 813.4 (100) $[M+Na]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{38}H_{54}N_4O_{12}NaS$ $[M+Na]^+$ 813.3351, found 813.3376.

UV/Vis λ_{max} 277 nm.

NMR signal assignments of probe **30a**

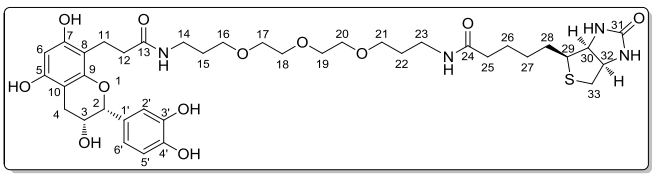


Position	δ_H (mult., *J* in Hz)	δ_C (mult.)	COSY	HSQC[a]	HMBC[b]
Catechin moiety					
2	4.65 (d, 7.3)	82.7	H3	C-2	H6', H3, H5', H4b, H4a, H2', C1', C6', C3, C4, C2', C9
3	3.93-4.00 (m)	68.7	H2, H4b, H4a	C-3	H2, H4b, H4a, C1', C2, C10
4	a: 2.54 (dd, 16.2, 7.9)	28.5	H3, H4b	C-4	H2, C2, C3, C9, C10
	b: 2.78-2.87 (m)		H3, H4a		H2, C2, C3, C5, C9, C10
5	-	155.1	-	-	H4b, H6
6	6.03 (s)	96.7	-	C-6	C5, C7, C8, C10
7	-	155.3	-	-	H6
8	-	107.1	-	-	H6, H11, H12
9	-	154.5	-	-	H2, H4b, H4a
10	-	101.0	-	-	H3, H4b, H4a, H6
1'	-	132.5	-	-	H2, H6', H3, H5', H2'
2'	6.87 (d, 1.7)	115.2	H6'	C-2'	H2, H6', C1', C2, C6', C4', C3'
3'	-	146.2	-	-	H5', H2'
4'	-	146.1	-	-	H2', H6'
5'	6.78 (d, 8.1)	116.2	-	C-5'	C1', C3'
6'	6.73 (dd, 8.2, 1.7)	119.8	H2'	C-6'	H2, H2', C1', C2, C4', C2'
Biotin-linker moiety					
11	2.78-2.87 (m)	20.0	H12	C-11	H12, C8, C12, C13
12	2.41-2.46 (m)	36.9	H11	C-12	H11, C8, C11, C13
14	3.15-3.26 (m)	37.9	-	C-14	H15, H16, C13, C15, C16
15	1.54-1.78 (m)	30.1	-	C-15	H14, H16, C13, C14, C16
16	3.49 (t, 6.1)	69.8	-	C-16	H14, H15, C14, C15
17-20	3.52-3.61 (m)	71.4, 71.1	H17-18, H19-20, H21-22	C-17 - 20	H17-18, H19-20, C17-18, C19-20
21	3.41 (t, 6.1)	69.9	-	C-21	H22, H23, C22, C23
22	1.54-1.78 (m)	30.3	-	C-22	H21, H23, C21, C23, C24
23	3.15-3.26 (m)	37.8	-	C-23	H21, H22, C21, C22, C24
25	2.21 (t, 7.3)	36.8	H26	C-25	H27, C24, C26, C28
26	1.54-1.78 (m)	26.8	H25	C-26	H25, H27, H28, C24, C29
27	1.39-1.46 (m)	29.6	H28	C-27	H28, C25, C26, C28, C29
28	1.54-1.78 (m)	29.4	H27	C-28	H25, H27, C26, C27, C29, C30
29	3.15-3.26 (m)	56.8	H30	C-29	H26, H27, H28, H30, H32, H33a
30	4.31 (dd, 7.8, 4.3)	63.4	H29, H32	C-30	H28, H33a, C29, C31, C33
32	4.51 (dd, 7.6, 4.8)	61.7	H30, H33b	C-32	H33a, C29, C31, C33
33	a: 2.72 (d, 12.8)	40.9	H33b	C-33	H30, H32, C29, C30, C32
	b: 2.92 (dd, 12.9, 5.0)		H32, H33a		H30, H32
Carbonyls					
C_{13}=O	-	176.6	-	-	H11, H12, H14, H15
C_{24}=O	-	176.0	-	-	H22, H23, H25, H26
C_{31}=O	-	165.5	-	-	H30, H32
Amides (NH)					

Position	δ_H (mult., *J* in Hz)	δ_C (mult.)	COSY	HSQC[a]	HMBC[b]
C_{13}-NH	-	-	-	-	-
C_{24}-NH	-	-	-	-	-
C_{31}-NH	-	-	-	-	-

[a]Carbons directly bonded to the protons resonating at the ppm value indicated in the δ_H column. [b]Carbons are two, three or even four bonds away from the protons indicated in the left column.

30b **Probe B2-epicatechin version**



CAS : New product
CF : $C_{38}H_{54}N_4O_{12}S$
EM : 790.3459
MW : 790.92 g.mol^{-1}

To a solution of **29** (128 mg, 0.29 mmol) in anhydrous DMF (4 mL) was added (*2R,3R*)-8-lactone-epicatechin **6b** (70 mg, 0.20 mmol) at one time. The resulting solution was stirred under argon atmosphere for 96 h at 50°C. After evaporation under reduced pressure, the residue was purified by column chromatography, eluted with CH_2Cl_2/MeOH (9:1 to remove impurities and then 87:13) to furnish the probe **30b** as a beige foam (40 mg, 25%).

R$_f$ = 0.36 [CH_2Cl_2/MeOH (8:2)].

^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 1.38-1.45 (m, 2H, H27), 1.52-1.77 (m, 8H, H15, H22, H26, H28), 2.18 (t, $^3J_{25\text{-}26}$ = 7.1 Hz, 2H, H25), 2.50 (t, $^3J_{12\text{-}11}$ = 7.2 Hz, 2H, H12), 2.67 (d, ^2J = 12.7 Hz, 1H, H33a), 2.77 (dd, ^2J =16.9 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 2.2 Hz, 1H, H4a), 2.84-2.96 (m, 4H, H4b, H11, H33b), 3.13-3.26 (m, 5H, H14, H23, H29), 3.39 (t, $^3J_{21\text{-}22}$ = 6.2 Hz, 2H, H21), 3.49 (t, $^3J_{16\text{-}15}$ = 6.2 Hz, 2H, H16), 3.52-3.61 (m, 8H, H17, H18, H19, H20), 4.23 (bs, 1H, H3), 4.24-4.28 (m, 1H, H30), 4.44-4.48 (m, 1H, H32), 4.85 (s, 1H, H2), 6.02 (s, 1H, H6), 6.79 (d, $^3J_{5'\text{-}6'}$ = 8.1 Hz, 1H, H5'), 6.84 (dd, $^3J_{6'\text{-}5'}$ = 8.3 Hz, $^4J_{6'\text{-}2'}$ = 1.7 Hz, 1H, H6'), 7.03 (d, $^4J_{2'\text{-}6'}$ = 1.6 Hz, 1H, H2').

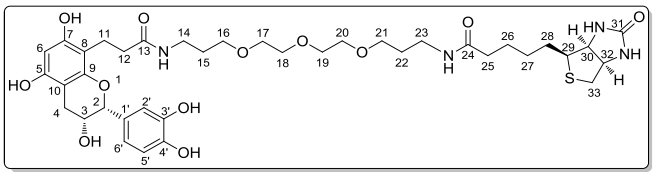
^{13}C-NMR (75 MHz, CD_3OD) δ 176.8 (C_{13}=O), 176.0 (C_{24}=O), 166.1 (C_{31}=O), 155.8 (ArC-7), 155.2 (ArC-5), 154.9 (ArC-9), 146.1 (ArC-3'), 145.7 (ArC-4'), 132.5 (ArC-1'), 119.1 (ArCH-6'), 116.0 (ArCH-5'), 115.1 (ArCH-2'), 107.4 (ArC-8), 100.2 (ArC-10), 96.7 (ArCH-6), 79.7 (CH-2), 71.5 (CH_2-18, -19), 71.2 (CH_2-17), 71.1 (CH_2-20), 69.9 (CH_2-16), 69.8 (CH_2-21), 67.2 (CH-3), 63.4 (CH-30), 61.6 (CH-32), 57.0 (CH-29), 41.0 (CH_2-33), 37.8 (CH_2-14, -23), 37.0 (CH_2-12), 36.9 (CH_2-25), 30.4 (CH_2-22), 30.2 (CH_2-15), 29.8 (CH_2-27), 29.6 (CH_2-4), 29.5 (CH_2-28), 26.9 (CH_2-26), 20.1 (CH_2-11).

IR (ZnSe) ν_{max} 3393, 3369, 1679, 1631, 1204, 1137, 1025, 997, 828, 802, 722, 673 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 813.3 (100) $[M+Na]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{38}H_{54}N_4O_{12}NaS$ $[M+Na]^+$ 813.3351, found 813.3349.

NMR signal assignments of probe **30b**

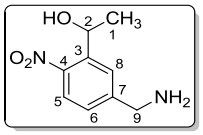


Position	δ_H (mult., *J* in Hz)	δ_C (mult.)	COSY	HMQC[a]	HMBC[b]
Catechin moiety					
2	4.85 (s)	79.7	H3	C-2	H6', H4b, H4a, H2', C1', C6', C3, C4, C2'
3	4.23 (bs)	67.2	H2, H4b, H4a	C-3	H2, H4b, H4a, C10
4	a: 2.77 (dd, 16.9, 2.2)	29.6	H3, H4b	C-4	H2, C2, C3, C5, C6, C9, C10
	b: 2.84-2.96 (m)		H3, H4a		
5	-	155.2	-	-	H4a, H4b, H6
6	6.02 (s)	96.7	-	C-6	H4, C5, C7, C8, C10
7	-	155.8	-	-	H6
8	-	107.4	-	-	H6, H11, H12
9	-	154.9	-	-	H4a, H4b
10	-	100.2	-	-	H3, H4a, H4b, H6
1'	-	132.5	-	-	H2, H6', H5', H2'
2'	7.03 (d, 1.6)	115.1	H6'	C-2'	H2, H6', C1', C2, C6', C4', C3'
3'	-	146.1	-	-	H5', H2'
4'	-	145.7	-	-	H6', H2'
5'	6.79 (d, 8.1)	116.0	H6'	C-5'	C1', C3'
6'	6.84 (dd, 8.3, 1.7)	119.1	H5', H2'	C-6'	H2, H2', C1', C2, C4', C2'
Biotin-linker moiety					
11	2.84-2.96 (m)	20.1	H12	C-11	H12, C8, C12, C13
12	2.50 (t, 7.2)	37.0	H11	C-12	H11, C8, C11, C13
14	3.13-3.26 (m)	37.8	H15	C-14	H15, H16, C13, C15, C16
15	1.52-1.77 (m)	30.2	H14, H16	C-15	H14, H16, C14, C16
16	3.49 (t, 6.2)	69.9	H15	C-16	H14, H15, C14, C15, C17
17	3.52-3.61 (m)	71.2	-	C-17	H16, H18, H19, C18, C19
18-19	3.52-3.61 (m)	71.5	-	C-18 - 19	H17, H20, C17, C20
20	3.52-3.61 (m)	71.1	-	C-20	H21, C18, C19
21	3.39 (t, 6.2)	69.8	H22	C-21	H22, H23, C20, C22, C23
22	1.52-1.77 (m)	30.4	H21, H23	C-22	H21, C21, C23
23	3.13-3.26 (m)	37.8	H22	C-23	H21, H22, C21, C24
25	2.18 (t, 7.1)	36.9	H26	C-25	H27, C24, C26, C28
26	1.52-1.77 (m)	26.9	H25, H27	C-26	H25, H27, C24
27	1.38-1.45 (m)	29.8	H26, H28	C-27	H28, C25, C26, C28, C29
28	1.52-1.77 (m)	29.5	H27, H29	C-28	H25, H27, C27, C29
29	3.13-3.26 (m)	57.0	H28, H30	C-29	H27, H28, H30, H32, H33a
30	4.24-4.28 (m)	63.4	H29, H32	C-30	H32, H33a, C29, C31, C32, C33
32	4.44-4.48 (m)	61.6	H30, H33b	C-32	H30, H33a, C29, C30, C31, C33
33	a: 2.67 (d, 12.7)	41.0	H33b	C-33	H30, H32, C29, C30, C32
	b: 2.84-2.96 (m)		H32, H33a		H30, H32
Carbonyls					
C_{13}=O	-	176.8	-	-	H11, H12, H14
C_{24}=O	-	176.0	-	-	H23, H25, H26

Position	δ_H (mult., *J* in Hz)	δ_C (mult.)	COSY	HMQC[a]	HMBC[b]
C_{31}=O	-	166.1	-	-	H30, H32
Amides (NH)					
C_{13}-NH	-	-	-	-	-
C_{24}-NH	-	-	-	-	-
C_{31}-NH	-	-	-	-	-

[a]Carbons directly bonded to the protons resonating at the ppm value indicated in the δ_H column. [b]Carbons are two, three or even four bonds away from the protons indicated in the left column.

31 1-(5-(Aminomethyl)-2-nitrophenyl)ethanol



CAS : 138957-91-2
CF : $C_9H_{12}N_2O_3$
EM : 196.0848
MW : 196.20 g.mol^{-1}

According to the procedure discussed by Szychowski *et al.*,[194] PPh_3 (901 mg, 3.436 mmol) and H_2O (0.5 mL) were added to a solution of alcohol **36** (694 mg, 3.123 mmol) in THF (20 mL), and the mixture was stirred at r.t. for 5 h. Evaporation of the solvent under reduced pressure gave a residue which was dissolved in CH_2Cl_2 and then purified by silica gel chromatography with a 5% to 10% step gradient of MeOH in CH_2Cl_2 to give the expected amine **31** as a yellowish solid (374 mg, 61%).

R_f = 0.19 [CH_2Cl_2/MeOH (9:1)].

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.58 (d, $^3J_{1\text{-}2}$ = 6.4 Hz, 3H, H1), 1.78 (bs, 3H, OH, NH_2), 3.99 (s, 2H, H9), 5.46 (q, $^3J_{2\text{-}1}$ = 6.3 Hz, 1H, H2), 7.38 (dd, $^3J_{6\text{-}5}$ = 8.4 Hz, $^4J_{6\text{-}8}$ = 1.9 Hz, 1H, H6), 7.79 (d, $^4J_{8\text{-}6}$ = 1.6 Hz, 1H, H8), 7.91 (d, $^3J_{5\text{-}6}$ = 8.4 Hz, 1H, H5).

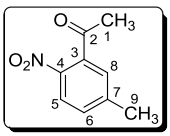
^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 149.0 (ArC-7), 146.2 (ArC-4), 141.7 (ArC-3), 126.4 (ArCH-6), 125.9 (ArCH-8), 124.8 (ArCH-5), 65.4 (CH-2), 45.7 (CH_2-9), 24.4 (CH_3-1).

IR (ZnSe) ν_{max} 3359, 2922, 2851, 1518, 1344, 1109 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 197.1 (100) $[M+H]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_9H_{13}N_2O_3$ $[M+H]^+$ 197.0921, found 197.0920.

33 1-(5-Methyl-2-nitrophenyl)ethanone



CAS : 69976-70-1
CF : $C_9H_9NO_3$
EM : 179.0582
MW : 179.17 g.mol^{-1}

The methyl ketone **33** was synthesized over three steps from commercially available 5-methyl-2-nitrobenzoic acid following the procedure reported by Saran and Burke.[284] Firstly, 5-methyl-2-nitrobenzoic acid (3.5 g, 19.32 mmol) and 10 drops of DMF were added to 35 mL of $SOCl_2$ and refluxed at 80 °C for 3 h under argon atmosphere. The solvents were then evaporated to dryness, and the resulting yellow oil was extracted with Et_2O (3 × 10 mL). Evaporation of ether under reduced pressure gave the expected product, 5-methyl-2-nitrobenzoyl chloride **32**, as yellow needles which was used directly without any characterization. Next, magnesium turnings (564 mg, 23.19 mmol) were mixed with 0.5 mL of absolute ethanol and 50 µL of carbon tetrachloride in a round-bottomed flask equipped with a reflux condenser. This flask was stirred at r.t. under argon atmosphere. The reaction was initiated by heating for a few minutes on a steam bath and allowed to continue for 10 min, and then 10 mL of distilled ether was slowly added while stirring constantly. A solution of diethyl malonate (3.52 mL, 23.19 mmol) in absolute ethanol (2 mL) and distilled ether (3 mL) was added at a rate so that it could maintain the constant boiling mixture. This mixture was stirred overnight at r.t. until most of the magnesium was dissolved (16 h). To this gray mixture, a solution of compound 5-methyl-2-nitrobenzoyl chloride (19.32 mmol) obtained above in 4 mL of distilled ether was very slowly added in a period of 10 min. Reflux on the steam bath was continued throughout the addition until the resulting solution became too viscous to stir. The reaction mixture was then cooled and shaken with dilute sulfuric acid (1.4 mL of concentrated H_2SO_4 in 10 mL of H_2O). The ether layer was separated, and the aqueous layer was extracted with ether (2 × 5 mL). The ether extracts were combined and evaporated. 3.9 mL of glacial acetic acid and 0.73 mL of concentrated sulfuric acid were then added to the crude diethyl-5-methyl-2-nitrobenzoyl malonate, and the mixture was refluxed at 110 °C for 2 h until no more carbon dioxide was evolved. The reaction mixture was cooled on an ice bath and alkalized with NaOH solution (4 g in 10 mL of water), and then this mixture was extracted with ether (3 × 50 mL). The combined ethereal extracts were washed with brine (50 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated to afford the expected product **33** as a brown oil (2.70 g, 78% over three steps from 5-methyl-2-nitrobenzoic acid) without further purification.

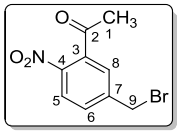
R_f = 0.25 [Cyclohexane/EtOAc (9:1)].

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2.46 (s, 3H, H1), 2.51 (s, 3H, H9), 7.16 (d, $^4J_{8\text{-}6}$ = 1.6 Hz, 1H, H8), 7.33-7.37 (m, 1H, H6), 7.98 (d, $^3J_{5\text{-}6}$ = 8.4 Hz, 1H, H5).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ200.3 (C_2=O), 146.0 (ArC-7), 143.3 (ArC-4), 138.3 (ArC-3), 130.8 (ArCH-6), 127.5 (ArCH-8), 124.4 (ArCH-5), 30.2 (CH_3-1), 21.4 (CH_3-9).

IR (ZnSe) ν_{max} 2924, 1705, 1587, 1520, 1344, 1251, 1193, 830, 759 cm^{-1}.

34 1-(5-(Bromomethyl)-2-nitrophenyl)ethanone



CAS : 99821-59-7
CF : $C_9H_8BrNO_3$
EM : 256.9688
MW : 258.07 g.mol^{-1}

The compound **34** was prepared according to the procedure reported by Kammari *et al.*[285] *N*-bromosuccinimide (NBS, 3.16 g, 17.75 mol) and subsequently azobisisobutyronitrile (AIBN, 292 mg, 1.775 mmol) were added to **33** solution (2.65 g, 14.79 mmol) in degazed acetonitrile (25 mL). The mixture was refluxed for 46 h at 90 °C. The solvent was then removed under reduced pressure. Toluene (40 mL) was added, and the resulting precipitate was filtered off. The filtrate was washed with brine (20 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated. The remaining brown solid was purified by column chromatography, using a 3% to 7% step gradient of EtOAc in petroleum ether for the elution step to recover the non-reacted starting material **33** (704 mg) and to yield the expected product **34** as a yellowish solid (2.29 g, 82%, calculated on the consumed reagent).

R_f = 0.33 [Petroleum ether/EtOAc (9:1)].

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2.54 (s, 3H, H1), 4.49 (s, 2H, H9), 7.41 (d, $^4J_{8\text{-}6}$ = 2.0 Hz, 1H, H8), 7.60 (dd, $^3J_{6\text{-}5}$ = 8.5 Hz, $^4J_{6\text{-}8}$ = 2.0 Hz, 1H, H6), 8.05 (d, $^3J_{5\text{-}6}$ = 8.5 Hz, 1H, H5).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ199.2 (C_2=O), 145.0 (ArC-4), 144.7 (ArC-7), 138.5 (ArC-3), 130.9 (ArCH-6), 127.7 (ArCH-8), 124.9 (ArCH-5), 30.1 (CH_2-9), 30.1 (CH_3-1).

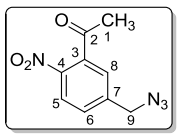
IR (KBr) ν_{max} 1704, 1540, 1347, 1215, 832, 696, 583 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 257.0 $[M+H]^+$ [lit.[194]].

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_9H_9BrNO_3$ $[M+H]^+$ 257.9766, found 257.9773 [lit.[194]].

m.p. 77-78 °C [lit.[231]].

35 1-(5-(Azidomethyl)-2-nitrophenyl)ethanone



CAS : 1312297-30-5
CF : $C_9H_8N_4O_3$
EM : 220.0596
MW : 220.18 g.mol^{-1}

Synthetic protocols for the compound **35** were adapted from Szychowski *et al.*[194] The benzylic bromide **34** (800 mg, 3.1 mmol) was dissolved in acetone/H_2O (5:1, v/v, 15 mL). Sodium azide (302 mg, 4.65 mmol) was added, and the mixture was slowly heated to 75 °C and held under light protection for 2 h in a flask equipped with a reflux condenser. After acetone evaporation, water (30 mL) was added, and the resulting aqueous phase was then extracted with EtOAc (3 × 50 mL). The combined organic extracts were then washed with brine (2 × 50 mL), dried over Na_2SO_4, filtered and evaporated under reduced pressure. The resulting azide compound **35** was obtained as a viscous yellow oil (657 mg, 96%). The spectral data of this compound agreed with previously published values. This product was immediately used for the next step without further purification.

R_f = 0.38 [Cyclohexane/EtOAc (8:2)].

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2.55 (s, 3H, H1), 4.52 (s, 2H, H9), 7.35 (d, $^4J_{8\text{-}6}$ = 1.6 Hz, 1H, H8), 7.53 (dd, $^3J_{6\text{-}5}$ = 8.4 Hz, $^4J_{6\text{-}8}$ = 1.9 Hz, 1H, H6), 8.09 (d, $^3J_{5\text{-}6}$ = 8.4 Hz, 1H, H5).

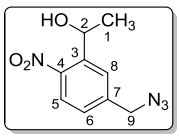
^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ199.4 (C_2=O), 145.0 (ArC-4), 142.8 (ArC-7), 138.5 (ArC-3), 129.4 (ArCH-6), 126.3 (ArCH-8), 124.9 (ArCH-5), 53.3 (CH_2-9), 30.1 (CH_3-1).

IR (KBr) ν_{max} 2914, 2230, 2120, 1703, 1590, 1517, 1337, 837 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 221.3 $[M+H]^+$ [lit.[194]].

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_9H_9N_4O_3$ $[M+H]^+$ 221.0675, found 221.0679 [lit.[194]].

36 1-(5-(Azidomethyl)-2-nitrophenyl)ethanol



CAS : 1241387-87-0
CF : $C_9H_{10}N_4O_3$
EM : 222.0753
MW : 222.20 g.mol^{-1}

According to the procedure discussed by Szychowski *et al.*,[194] the compound **35** (647 mg, 2.94 mmol) was dissolved in MeOH/dioxane (3:2, v/v, 15 mL) and kept at 0 ºC; sodium borohydride (167 mg, 4.41 mmol) was then added slowly. The mixture was stirred for 30 min at r.t. under light protection and then concentrated to dryness and taken up in a cold aqueous solution of 0.5 M HCl (50 mL). The suspension was extracted with EtOAc (3 × 50 mL), washed with brine (3 × 50 mL), dried over Na_2SO_4, and evaporated under reduced pressure to yield the desired alcohol **36** as a yellow oil without further purification (638 mg, 98%).

R_f = 0.37 [Cyclohexane/EtOAc (8:2)].

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.53 (d, $^3J_{1\text{-}2}$ = 6.3 Hz, 3H, H1), 2.51 (bs, 1H, OH), 4.47 (s, 2H, H9), 5.42 (q, $^3J_{2\text{-}1}$ = 6.3 Hz, 1H, H2), 7.35 (dd, $^3J_{6\text{-}5}$ = 8.4 Hz, $^4J_{6\text{-}8}$ = 1.7 Hz, 1H, H6), 7.77 (d, $^4J_{8\text{-}6}$ = 1.2 Hz, 1H, H8), 7.90 (d, $^3J_{5\text{-}6}$ = 8.4 Hz, 1H, H5).

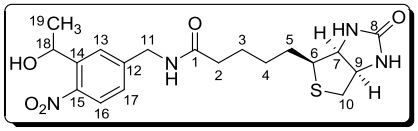
^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 147.0 (ArC-4), 141.8 (ArC-3), 141.6 (ArC-7), 127.2 (ArCH-6), 126.8 (ArCH-8), 124.9 (ArCH-5), 65.4 (CH-2), 53.8 (CH_2-9), 24.3 (CH_3-1).

IR (ZnSe) ν_{max} 3388, 2979, 2105, 1521, 1345, 1281, 1106, 833 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 222.6 (100) $[M+H]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_9H_{11}N_4O_3$ $[M+H]^+$ 223.0831, found 223.0831.

38



CAS : New product
CF : $C_{19}H_{26}N_4O_5S$
EM : 422.1624
MW : 422.50 g.mol^{-1}

Firstly, the *N*-hydroxysuccinimidyl ester of biotin (**37**) was prepared according to the procedure described in the literature,[286,287] to a hot solution of (+)-biotin (**12**, 733 mg, 3 mmol) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS, 345 mg, 3 mmol) in DMF (21 mL) was added *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 805 mg, 3.9 mmol) in one portion. The resulting solution was stirred at r.t., during which time a white precipitate was formed. As the reaction after 24 h was not complete, NHS (52 mg, 0.45 mmol) and DCC (124 mg, 0.6 mmol) were again added, and stirring was maintained at 50 °C for an additional 18 h. The resulting 1,3-dicyclohexyl urea (DCU) was then removed by filtration through cotton/celite® *via* a glass Pasteur-pipette. The filtrate was evaporated, triturated with acetone/Et_2O (1:1, v/v, 6 × 5 mL) to eliminate residual NHS, then dried under vacuum. The desired product **37** was obtained as a white powder (1.09 g, ~100%) giving the ^{1}H-NMR spectral data in agreement with published values; additional peaks indicated a small amount of DCU, but further purification at this step was deemed unnecessary. In a next step, to a solution of aminoalcohol **31** (357 mg, 1.82 mmol) in DMF (10 mL), the *N*-hydroxysuccinimidyl ester of biotin (**37**, 684 mg, 2.00 mmol) was added followed by Et_3N (380 µL, 2.73 mmol). The reaction mixture was stirred for 1 h at r.t. under argon atmosphere. The solvent was then evaporated under reduced pressure at 50 °C. The residue was taken up in CH_2Cl_2 and purified by silica gel chromatography with a 5% to 10% step gradient of MeOH in CH_2Cl_2 to give the desired amide **38** (670 mg, 87% based on the aminoalcohol) as a yellowish foam.

R_f = 0.50 [CH_2Cl_2/MeOH (9:1)].

^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 1.40-1.48 (m, 2H, H4), 1.47 (d, $^3J_{19\text{-}18}$ = 6.3 Hz, 3H, H19), 1.54-1.80 (m, 4H, H3, H5), 2.30 (t, $^3J_{2\text{-}3}$ = 7.3 Hz, 2H, H2), 2.70 (d, ^2J = 12.3 Hz, 1H, H10a), 2.92 (dd, ^2J = 12.7 Hz, $^3J_{10\text{-}9}$ = 4.9 Hz, 1H, H10b), 3.16-3.24 (m, 1H, H6), 4.26-4.31 (m, 1H, H7), 4.46 (s, 2H, H11), 4.46-4.51 (m, 1H, H9), 5.33 (q, $^3J_{18\text{-}19}$ = 6.3 Hz, 1H, H18), 7.36 (dd, $^3J_{17\text{-}16}$ = 8.4 Hz, $^4J_{17\text{-}13}$ = 1.9 Hz, 1H, H17), 7.78 (d, $^4J_{13\text{-}17}$ = 1.4 Hz, 1H, H13), 7.85 (d, $^3J_{16\text{-}17}$ = 8.4 Hz, 1H, H16).

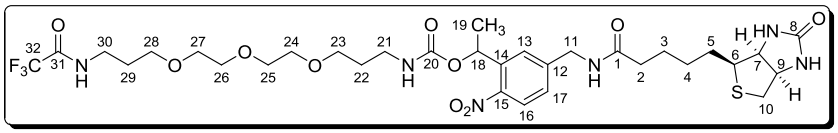
^{13}C-NMR (75 MHz, CD_3OD) δ 176.1 (C_1=O), 166.0 (C_8=O), 147.8 (ArC-15), 146.4 (ArC-12), 143.4 (ArC-14), 127.7 (ArCH-17), 127.2 (ArCH-13), 125.4 (ArCH-16), 66.0 (CH-18), 63.3 (CH-7), 61.6 (CH-9), 56.9 (CH-6), 43.5 (CH_2-11), 41.1 (CH_2-10), 36.7 (CH_2-2), 29.7 (CH_2-4), 29.4 (CH_2-5), 26.8 (CH_2-3), 25.2 (CH_3-19).

IR (ZnSe) ν_{max} 3318, 2930, 1681, 1644, 1519, 1462, 1341, 835 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 423.2 (100) $[M+H]^+$, 867.1 (95) $[2M+Na]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{19}H_{26}N_4O_5NaS$ $[M+Na]^+$ 445.1516, found 445.1532.

39



CAS : New product
CF : $C_{32}H_{47}F_3N_6O_{10}S$
EM : 764.3026
MW : 764.81 g.mol^{-1}1

Compound **39** was synthesized by using a modification of a procedure described by Hamilton and Backes.[294] A solution of alcohol **38** (127 mg, 0.3 mmol) in anhydrous DMF (3 mL) was treated with Et_3N (125 µL, 0.9 mmol) for 1 h before adding *N*,*N*'-dissuccinimidyl carbonate (DSC, 115 mg, 0.45 mmol). The resulting mixture was stirred overnight under argon atmosphere at r.t. As the reaction was not complete after 16 h, Et_3N (63 µL, 0.45 mmol) was added followed by DSC (58 mg, 0.225 mmol) 1 h later. The reaction mixture was stirred overnight. Et_3N (21 µL, 0.15 mmol) followed by DSC (19 mg, 0.075 mmol) were again added and stirring was maintained for an additional 16 h before adding amine **17** (237 mg, 0.75 mmol). The resulting mixture was stirred further for 30 min at r.t. Upon completion of the reaction, the solution was diluted with mixed solvent CH_2Cl_2/EtOAc (3:1, v/v, 100 mL), washed successively with saturated aqueous solution of NH_4Cl (2 × 20 mL), of $NaHCO_3$ (20 mL), brine (30 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated in *vacuo*. The residue was taken up in CH_2Cl_2 and purified by column chromatography (eluting with CH_2Cl_2/MeOH = 95:5 then 9:1) to afford the carbamate **39** (107 mg, 47% over 2 steps) as a yellowish foam.

R$_f$ = 0.51 [CH_2Cl_2/MeOH (9:1)].

^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 1.41-1.48 (m, 2H, H4), 1.58 (d, $^3J_{19\text{-}18}$ = 6.5 Hz, 3H, H19), 1.62-1.75 (m, 6H, H3, H5, H22), 1.81 (p, ^3J = 6.4 Hz, 2H, H29), 2.30 (t, $^3J_{2\text{-}3}$ = 7.3 Hz, 2H, H2), 2.70 (d, ^2J = 12.8 Hz, 1H, H10a), 2.92 (dd, ^2J = 12.8 Hz, $^3J_{10\text{-}9}$ = 4.9 Hz, 1H, H10b), 3.12 (t, $^3J_{21\text{-}22}$ = 6.8 Hz, 2H, H21), 3.14-3.22 (m, 1H, H6), 3.37 (t, $^3J_{30\text{-}29}$ = 7.0 Hz, 2H, H30), 3.46-3.66 (m, 12H, H23, H24, H25, H26, H27, H28), 4.25-4.30 (m, 1H, H7), 4.46 (s, 2H, H11), 4.47-4.51 (m, 1H, H9), 6.14 (q, $^3J_{18\text{-}19}$ = 6.4 Hz, 1H, H18), 7.40 (dd, $^3J_{17\text{-}16}$ = 8.4 Hz, $^4J_{17\text{-}13}$ = 1.5 Hz, 1H, H17), 7.62 (bs, 1H, H13), 7.92 (d, $^3J_{16\text{-}17}$ = 8.4 Hz, 1H, H16).

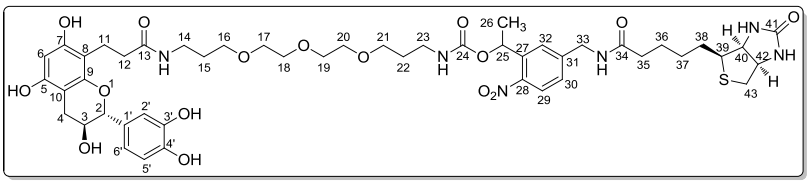
^{13}C-NMR (75 MHz, CD_3OD) δ 176.1 (C_1=O), 166.0 (C_8=O), 158.8 (q, J = 36.6 Hz, $COCF_3$), 157.7 (C_{20}=O), 147.8 (ArC-15), 146.8 (ArC-12), 140.2 (ArC-14), 128.3 (ArCH-17), 127.1 (ArCH-13), 125.8 (ArCH-16), 117.5 (q, J = 286.7 Hz, CF_3), 71.4 (CH_2-25, CH_2-26), 71.2 (CH_2-24), 71.1 (CH_2-27), 69.6 (CH_2-28), 69.6 (CH_2-23), 69.4 (CH-18), 63.3 (CH-7), 61.6 (CH-9), 57.0 (CH-6), 43.5 (CH_2-11), 41.0 (CH_2-10), 39.0 (CH_2-21), 38.3 (CH_2-30), 36.7 (CH_2-2), 30.7 (CH_2-22), 29.8 (CH_2-4), 29.7 (CH_2-29), 29.4 (CH_2-5), 26.8 (CH_2-3), 22.5 (CH_3-19).

IR (ZnSe) ν_{max} 3299, 3074, 2926, 2869, 1702, 1523, 1457, 1348, 1256, 1209, 1156 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 787.3 (100) $[M+Na]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{32}H_{47}F_3N_6O_{10}NaS$ $[M+Na]^+$ 787.2919, found 787.2948.

45a **Photocleavable probe C1**



CAS : New product
CF : $C_{48}H_{64}N_6O_{16}S$
EM : 1012.4100
MW : 1013.12 g.mol^{-1}

To a stirred solution of **39** (90 mg, 0.118 mmol) in MeOH (0.8 mL) at 0 °C was added dropwise a solution of K_2CO_3 (49 mg, 0.353 mmol) in a mixture of MeOH/H_2O (2:1, v/v, 1.5 mL). The reaction mixture was stirred at r.t. under argon atmosphere for 16 h in the dark, then evaporated, diluted with a mixture of CH_2Cl_2/MeOH (7:3, v/v, 10 mL), filtered out K_2CO_3 and finally concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography, eluted with CH_2Cl_2/MeOH/NH_4OH (first 90:10:2 to remove impurities, then 85:15:2) to afford the expected amine (57 mg, 72%) as a yellow plastic, which was positive when reacted with ninhydrin (2,2-dihydroxyindane-1,3-dione) indicating the presence of a free amine. This amine (53 mg, 0.079 mmol) was then taken up in dry DMF (1 mL), and to the resulting solution was added (*2R*,*3S*)-8-lactone-catechin **6a** (18.2 mg, 0.053 mmol). The reaction mixture was stirred under argon atmosphere and protected from light for 90 h at r.t. After concentration *in vacuo*, the resulting crude material was purified by column chromatography, eluted with CH_2Cl_2/MeOH (95:5 to remove impurities and then 90:10) to furnish the expected photocleavable probe **45a** as a yellowish foam (28 mg, 37% over two steps)

R$_f$ = 0.36 [CH_2Cl_2/MeOH (85:15)].

^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 1.40-1.47 (m, 2H, H37), 1.58 (d, $^3J_{26\text{-}25}$ = 6.5 Hz, 3H, H26), 1.64-1.69 (m, 8H, H15, H22, H36, H38), 2.20-2.31 (m, 2H, H35), 2.39-2.44 (m, 2H, H12), 2.53 (dd, ^2J = 16.1 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 8.0 Hz, 1H, H4a), 2.68 (d, ^2J = 12.7 Hz, 1H, H43a), 2.78-2.83 (m, 2H, H11), 2.80-2.88 (m, 1H, H4b), 2.90 (dd, ^2J = 13.2 Hz, $^3J_{43\text{-}42}$ = 5.3 Hz, 1H, H43b), 3.10 (t, $^3J_{23\text{-}22}$ = 6.6 Hz, 2H, H23), 3.18 (t, $^3J_{14\text{-}15}$ = 6.5 Hz, 2H, H14), 3.14-3.22 (m, 1H, H39), 3.37-3.41 (m, 2H, H21), 3.42-3.46 (m, 2H, H16), 3.50-3.60 (m, 8H, H17, H18, H19, H20), 3.92-3.99 (m, 1H, H3), 4.23-4.32 (m, 1H, H40), 4.44 (s, 2H, H33), 4.44-4.50 (m, 1H, H42), 4.63 (d, $^3J_{2\text{-}3}$ = 7.3 Hz, 1H, H2), 5.99 (s, 1H, H6), 6.13 (q, $^3J_{25\text{-}26}$ = 6.4 Hz, 1H, H25), 6.73 (dd, $^3J_{6'\text{-}5'}$ = 8.2 Hz, $^4J_{6'\text{-}2'}$ = 1.6 Hz, 1H, H6'), 6.77 (d, $^3J_{5'\text{-}6'}$ = 8.1 Hz, 1H, H5'), 6.86 (d, $^4J_{2'\text{-}6'}$ = 1.4 Hz, 1H, H2'), 7.38 (d, $^3J_{30\text{-}29}$ = 8.3 Hz, 1H, H30), 7.61 (s, 1H, H32), 7.91 (d, $^3J_{29\text{-}30}$ = 8.4 Hz, 1H, H29).

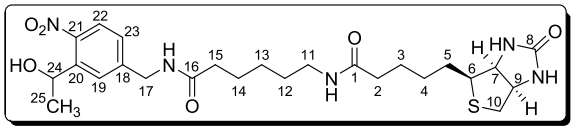
^{13}C-NMR (75 MHz, CD_3OD) δ 176.6 (C_{13}=O), 176.1 (C_{34}=O), 166.0 (C_{41}=O), 157.8 (C_{24}=O), 155.3 (ArC-7), 155.2 (ArC-5), 154.6 (ArC-9), 147.9 (ArC-28), 146.9 (ArC-31), 146.2 (ArC-3'), 146.1 (ArC-4'), 140.2 (ArC-27), 132.5 (ArC-1'), 128.3 (ArCH-30), 127.2 (ArCH-32), 125.8 (ArCH-29), 119.8 (ArCH-6'), 116.1 (ArCH-5'), 115.1 (ArCH-2'), 107.1 (ArC-8), 101.0 (ArC-10), 96.6 (ArCH-6), 82.7 (CH-2), 71.4 (CH_2-18, CH_2-19), 71.1 (CH_2-17, CH_2-20), 69.8 (CH_2-21), 69.6 (CH_2-16), 69.4 (CH-25), 68.8 (CH-3), 63.3 (CH-40), 61.6 (CH-42), 57.0 (CH-39), 43.5 (CH_2-33), 41.0 (CH_2-43), 39.0 (CH_2-23), 37.8 (CH_2-14), 36.9 (CH_2-12), 36.7 (CH_2-35), 30.8 (CH_2-22), 30.2 (CH_2-15), 29.8 (CH_2-37), 29.5 (CH_2-38), 28.6 (CH_2-4), 26.8 (CH_2-36), 22.5 (CH_3-26), 20.0 (CH_2-11).

IR (ZnSe) ν_{max} 3308, 2927, 2870, 1686, 1614, 1522, 1453, 1348, 1265, 1205, 1106 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 1035.5 (100) $[M+Na]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{48}H_{64}N_6O_{16}NaS$ $[M+Na]^+$ 1035.3992, found 1035.4007.

42



CAS : 250610-51-6
CF : $C_{25}H_{37}N_5O_6S$
EM : 535.2465
MW : 535.66 g.mol^{-1}

A solution of 6-aminohexanoic acid (227 mg, 1.73 mmol), *N*-hydroxysuccinimidyl ester of biotin **37** (589 mg, 1.73 mmol) and Et_3N (360 µL, 2.59 mmol) in anhydrous DMF (20 mL) was stirred at r.t. under argon atmosphere. After 24 h, upon completion of the reaction, NHS (59 mg, 0.52 mmol) and DCC (535 mg, 2.59 mmol) were added, and the resulting suspension was heated at 50 °C under stirring for 24 h. After which time TLC analysis indicated completion of the reaction to give the corresponding biotinamidohexanoic acid *N*-hydroxysuccinimide ester **41** (R_f = 0.51, CH_2Cl_2/MeOH = 9:1). The mixture was allowed to reach r.t., and to an aliquot of this mixture (14.2 mL), aminoalcohol **31** (230 mg, 1.17 mmol) was added. The reaction mixture was then stirred for 1 h at r.t. under argon atmosphere. The solvent and volatiles were evaporated at 50 °C under reduced pressure, and the residue was purified by column chromatography (eluting with CH_2Cl_2/MeOH = 95:5 to remove impurities, then 9:1) to give the expected product **42** (412 mg, 66% over 3 steps) as a yellowish solid.

R_f = 0.21 [CH_2Cl_2/MeOH (9:1)].

^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 1.32-1.79 (m, 12H, H3, H4, H5, H9, H10, H11), 1.47 (d, $^3J_{25\text{-}24}$ = 6.3 Hz, 3H, H25), 2.19 (t, $^3J_{8\text{-}9}$ = 7.3 Hz, 2H, H8), 2.29 (t, $^3J_{2\text{-}3}$ = 7.4 Hz, 2H, H2), 2.70 (d, ^2J = 12.7 Hz, 1H, H16a), 2.92 (dd, ^2J = 12.7 Hz, $^3J_{16\text{-}15}$ = 4.9 Hz, 1H, H16b), 3.17 (t, $^3J_{6\text{-}5}$ = 6.9 Hz, 2H, H6), 3.17-3.23 (m, 1H, H12), 4.30 (dd, $^3J_{13\text{-}15}$ = 7.9 Hz, $^3J_{13\text{-}12}$ = 4.4 Hz, 1H, H13), 4.46 (s, 2H, H17), 4.46-4.51 (m, 1H, H15), 5.34 (q, $^3J_{24\text{-}25}$ = 6.3 Hz, 1H, H24), 7.35 (dd, $^3J_{23\text{-}22}$ = 8.4 Hz, $^4J_{23\text{-}19}$ = 1.9 Hz, 1H, H23), 7.79 (d, $^4J_{19\text{-}23}$ = 1.8 Hz, 1H, H19), 7.86 (d, $^3J_{22\text{-}23}$ = 8.4 Hz, 1H, H22).

^{13}C-NMR (75 MHz, CD_3OD) δ 176.1 (C_1=O), 175.9 (C_7=O), 166.0 (C_{14}=O), 147.8 (ArC-21), 146.4 (ArC-18), 143.4 (ArC-20), 127.6 (ArCH-23), 127.2 (ArCH-19), 125.4 (ArCH-22), 66.0 (CH-24), 63.3 (CH-13), 61.6 (CH-15), 57.0 (CH-12), 43.5 (CH_2-17), 41.0 (CH_2-16), 40.2 (CH_2-6), 36.9, 36.8 (CH_2-2, CH_2-8), 30.1 (CH_2-5), 29.7 (CH_2-10), 29.5 (CH_2-11), 27.6 (CH_2-4), 26.9 (CH_2-3), 26.6 (CH_2-9), 25.2 (CH_3-25).

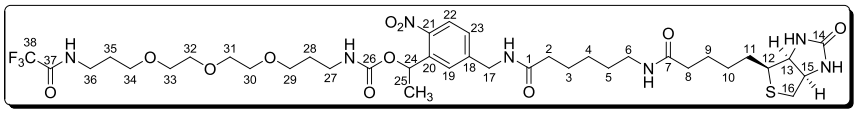
IR (ZnSe) ν_{max} 3309, 2932, 2860, 1638, 1519, 1466, 1342 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 558.3 (100) $[M+Na]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{25}H_{37}N_5O_6NaS$ $[M+Na]^+$ 558.2357, found 558.2374.

m.p. 128-130 °C.

43a



CAS : New product
CF : $C_{38}H_{58}F_3N_7O_{11}S$
EM : 877.3867
MW : 877.97 g.mol^{-1}

Compound **43a** was synthesized by using a modification of a procedure described by Hamilton and Backes.[294] A solution of alcohol **42** (200 mg, 0.373 mmol) in anhydrous DMF (5 mL) was treated with Et_3N (156 µL, 1.12 mmol) for 1 h before adding DSC (143 mg, 0.56 mmol). The reaction mixture was then stirred under an argon atmosphere at r.t. After a period of 6 h, Et_3N followed by DSC (48 mg, 0.187 mmol) were again added and the resulting solution was stirred overnight. After completion of the reaction was observed by TLC, the amine **17** (236 mg, 0.746 mmol) was added, and the resulting mixture was stirred further for 1 h at r.t under argon atmosphere. Upon completion of the reaction, the solvent and volatiles were removed *in vacuo*, and the residue was purified by column chromatography (eluting with CH_2Cl_2/MeOH = 95:5 to remove impurities, then 9:1) to afford the carbamate **43a** (217 mg, 66% over 2 steps) as a yellowish foam.

R_f = 0.37 [CH_2Cl_2/MeOH (9:1)].

^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 1.34-1.85 (m, 16H, H3, H4, H5, H9, H10, H11, H28, H35), 1.58 (d, $^3J_{25\text{-}24}$ = 6.5 Hz, 3H, H25), 2.19 (t, $^3J_{8\text{-}9}$ = 7.3 Hz, 2H, H8), 2.29 (t, $^3J_{2\text{-}3}$ = 7.5 Hz, 2H, H2), 2.69 (d, ^2J = 12.7 Hz, 1H, H16a), 2.92 (dd, ^2J = 12.7 Hz, $^3J_{16\text{-}15}$ = 4.9 Hz, 1H, H16b), 3.10-3.23 (m, 5H, H6, H12, H27), 3.37 (t, $^3J_{36\text{-}35}$ = 6.9 Hz, 2H, H36), 3.45-3.63 (m, 12H, H29, H30, H31, H32, H33, H34), 4.30 (dd, $^3J_{13\text{-}15}$ = 7.9 Hz, $^3J_{13\text{-}12}$ = 4.4 Hz, 1H, H13), 4.46 (s, 2H, H17), 4.46-4.50 (m, 1H, H15), 6.14 (q, $^3J_{24\text{-}25}$ = 6.4 Hz, 1H, H24), 7.39 (dd, $^3J_{23\text{-}22}$ = 8.4 Hz, $^4J_{23\text{-}19}$ = 1.7 Hz, 1H, H23), 7.62 (d, $^4J_{19\text{-}23}$ = 1.6 Hz, 1H, H19), 7.93 (d, $^3J_{22\text{-}23}$ = 8.4 Hz, 1H, H22).

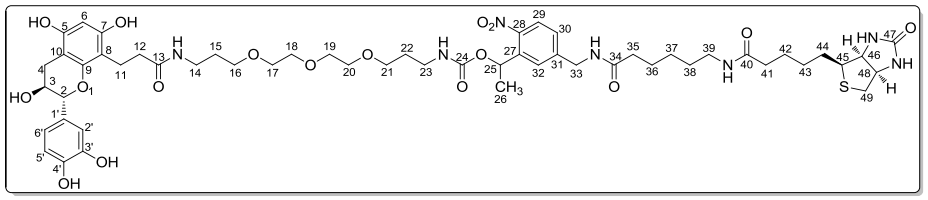
^{13}C-NMR (75 MHz, CD_3OD) δ 176.0 (C_1=O), 175.8 (C_7=O), 166.0 (C_{14}=O), 158.8 (q, J = 36.6 Hz, $COCF_3$), 157.7 (C_{26}=O), 147.8 (ArC-21), 146.9 (ArC-18), 140.2 (ArC-20), 128.2 (ArCH-23), 127.0 (ArCH-19), 125.7 (ArCH-22), 117.5 (q, J = 286.8 Hz, CF_3-38), 71.4 (CH_2-31, CH_2-32), 71.2 (CH_2-30), 71.1 (CH_2-33), 69.6 (CH_2-34), 69.5 (CH_2-29), 69.3 (CH-24), 63.3 (CH-13), 61.5 (CH-15), 57.0 (CH-12), 43.5 (CH_2-17), 41.0 (CH_2-16), 40.1 (CH_2-6), 39.0 (CH_2-27), 38.3 (CH_2-36), 36.8 (CH_2-2, CH_2-8), 30.8 (CH_2-28), 30.1 (CH_2-5), 29.8 (CH_2-10), 29.7 (CH_2-35), 29.4 (CH_2-11), 27.6 (CH_2-4), 26.9 (CH_2-3), 26.6 (CH_2-9), 22.5 (CH_3-25).

IR (ZnSe) ν_{max} 3291, 3078, 2932, 2866, 1703, 1650, 1523, 1455, 1347, 1209, 1156 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 900.4 (100) $[M+Na]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{38}H_{58}F_3N_7O_{11}SNa$ $[M+Na]^+$ 900.3759, found 900.3772.

48a Photocleavable probe C2



CAS : New product
CF : $C_{54}H_{75}N_7O_{17}S$
EM : 1125.4940
MW : 1126.28 g.mol^{-1}

To a stirred solution of **43a** (112 mg, 0.128 mmol) in MeOH (0.5 mL) at 0 °C was added dropwise a solution of K_2CO_3 (53 mg, 0.383 mmol) in a mixture of MeOH/H_2O (3:1, v/v, 2 mL). The reaction mixture was stirred at r.t under argon for 15 h in the dark, then evaporated, diluted with a mixture of CH_2Cl_2/MeOH (7:3, v/v, 10 mL), filtered out K_2CO_3 and finally concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography, eluted with CH_2Cl_2/MeOH (85:15) to remove impurities, and then with CH_2Cl_2/MeOH/NH_4OH (85:15:2) to afford the expected amine (89 mg, 89%) as a yellow plastic, which was positive when reacted with ninhydrin (2,2-dihydroxyindane-1,3-dione) indicating the presence of a free amine (confirmed by the new peak at δ 3.04 ppm (t, 2H, CH_2NH_2) on ^{1}H-NMR spectrum (300 MHz, CD_3OD)). This amine (87 mg, 0.111 mmol) was then taken up in dry DMF (1.5 mL), and to the resulting solution was added (2*R*,3*S*)-8-lactone-catechin **6a** (29 mg, 0.084 mmol). After the reaction mixture was stirred for 5 days at r.t under argon atmosphere and protected from light, (2*R*,3*S*)-8-lactone-catechin (10 mg, 0.029 mmol) was again added. The stirring continued for an additional of 2 days at 40 °C. After concentration *in vacuo*, the resulting crude material was purified by column chromatography, eluted with CH_2Cl_2/MeOH (90:10 to remove impurities and then 85:15) to furnish the expected photocleavable probe **48a** as a yellowish foam (26 mg, 19% over two steps).

R$_f$ = 0.51 [CH_2Cl_2/MeOH (8:2)].

^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 1.31-1.74 (m, 16H, H15, H22, H36-38, H42-44), 1.58 (d, $^3J_{26\text{-}25}$ = 6.5 Hz, 3H, H26), 2.18 (t, $^3J_{41\text{-}42}$ = 7.3 Hz, 2H, H41), 2.28 (t, $^3J_{35\text{-}36}$ = 7.4 Hz, 2H, H35), 2.39-2.44 (m, 2H, H12), 2.53 (dd, ^2J = 16.1 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 8.0 Hz, 1H, H4a), 2.68 (d, ^2J = 12.7 Hz, 1H, H49a), 2.78-2.83 (m, 2H, H11), 2.81-2.94 (m, 2H, H4b, H49b), 3.08-3.21 (m, 7H, H14, H23, H39, H45), 3.39 (t, $^3J_{21\text{-}22}$ = 6.2 Hz, 2H, H21), 3.44 (t, $^3J_{16\text{-}15}$ = 6.2 Hz, 2H, H16), 3.50-3.60 (m, 8H, H17-20), 3.92-3.99 (m, 1H, H3), 4.28 (dd, $^3J_{46\text{-}48}$ = 7.8 Hz, $^3J_{46\text{-}45}$ = 4.5 Hz, 1H, H46), 4.44 (s, 2H, H33), 4.47 (dd, $^3J_{48\text{-}46}$ = 7.8 Hz, $^3J_{48\text{-}49}$ = 5.0 Hz, 1H, H48), 4.63 (d, $^3J_{2\text{-}3}$ = 7.3 Hz, 1H, H2), 5.99 (s, 1H, H6), 6.13 (q, $^3J_{25\text{-}26}$ = 6.5 Hz, 1H, H25), 6.73 (dd, $^3J_{6'\text{-}5'}$ = 8.2 Hz, $^4J_{6'\text{-}2'}$ = 1.8 Hz, 1H, H6'), 6.77 (d, $^3J_{5'\text{-}6'}$ = 8.0 Hz, 1H, H5'), 6.86 (d, $^4J_{2'\text{-}6'}$ = 1.7 Hz, 1H, H2'), 7.37 (dd, $^3J_{30\text{-}29}$ = 8.4 Hz, $^4J_{30\text{-}32}$ = 1.7 Hz, 1H, H30), 7.61 (d, $^4J_{32\text{-}30}$ = 1.7 Hz, 1H, H32), 7.92 (d, $^3J_{29\text{-}30}$ = 8.4 Hz, 1H, H29).

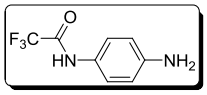
^{13}C-NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 176.6 (C_{13}=O), 176.2 (C_{34}=O), 176.0 (C_{40}=O), 166.1 (C_{47}=O), 157.8 (C_{24}=O), 155.4, 155.3, 155.3, 155.2, 154.6, 154.5 (ArC-5, ArC-7, ArC-9; a double splitting for each carbon), 147.9 (ArC-28), 146.9 (ArC-31), 146.2 (ArC-3', ArC-4'), 140.3 (ArC-27), 132.5 (ArC-1'), 128.2 (ArCH-30), 127.0 (ArCH-32), 125.8 (ArCH-29), 119.9 (ArCH-6'), 116.1 (ArCH-5'), 115.1 (ArCH-2'), 107.1 (ArC-8), 101.0 (ArC-10), 96.6 (ArCH-6), 82.8 (CH-2), 71.4 (CH_2-18, CH_2-19), 71.2 (CH_2-17, CH_2-20), 69.8 (CH_2-21), 69.6 (CH_2-16), 69.5 (CH-25), 68.8 (CH-3), 63.4 (CH-46), 61.6 (CH-48), 57.0 (CH-45), 43.5 (CH_2-33), 41.0 (CH_2-49), 40.2 (CH_2-39), 39.0 (CH_2-23), 37.8 (CH_2-14), 36.9, 36.9, 36.8 (CH_2-12, CH_2-35, CH_2-41), 30.8 (CH_2-22), 30.2 (CH_2-15), 30.1 (CH_2-38), 29.8 (CH_2-43), 29.5 (CH_2-44), 28.7 (CH_2-4), 27.6 (CH_2-37), 26.9 (CH_2-36), 26.6 (CH_2-42), 22.5 (CH_3-26), 20.0 (CH_2-11).

IR (ZnSe) ν_{max} 3261, 2924, 1636, 1522, 1457, 1340, 1264, 1205, 1105 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 1148.6 (100) $[M+Na]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{54}H_{75}N_7O_{17}SNa$ $[M+Na]^+$ 1148.4832, found 1148.4838.

53 ***N*-(4-Aminophenyl)-2,2,2-trifluoroacetamide**



CAS : 53446-90-5
CF : $C_8H_7F_3N_2O$
EM : 204.0510
MW : 204.15 $g.mol^{-1}$

Following the general method reported by Fixon-Owoo *et al.*,[274] to a cooled solution at –78 °C of *p*-phenylenediamine (6.49 g, 60 mmol) in degassed MeOH (50 ml) was added dropwise ethyl trifluoroacetate (7.14 mL, 60 mmol) with a gas tight syringe. The reaction mixture was maintained at this temperature for 2 h under argon atmosphere. After warming slowly to 0 °C over 1h, the solution was allowed to reach to r.t. and maintained for 23 h. After removing the suspension by filtration, the filtrate was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by column chromatography, eluted with CH_2Cl_2/MeOH/NH_4OH (99:0.5:1) to afford 7.29 g of product **53** (59%) as a yellowish crystal.

R_f = 0.53 [CH_2Cl_2/MeOH (95:5)].

^{1}H-NMR (300 MHz $CDCl_3$) δ 3.72 (bs, 2H, NH_2), 6.68 (d, ^3J = 8.7 Hz, 2H, 2HAr), 7.32 (d, ^3J = 8.7 Hz, 2H, 2HAr), 7.74 (bs, 2H, CO-NH).

^{13}C-NMR (75 MHz, CD_3OD) δ 156.5 (q, J = 36.9 Hz, $COCF_3$), 147.2 (ArC-NH_2), 127.8 (ArC-NH), 123.8 (ArCH), 117.6 (q, J = 287.2 Hz, CF_3), 116.4 (ArCH).

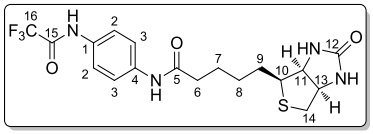
IR (ZnSe) ν_{max} 3405, 3334, 3187, 3032, 1714, 1514, 1151 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 205.1 (100) $[M+H]^+$, 408.7 (100) $[2M+H]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_8H_8F_3N_2O$ $[M+H]^+$ 205.0583, found 205.0591.

m.p. 119.5-122.5 °C [lit.[362,363] 118 °C].

54 ***N*-[4-(2,2,2-Trifluoroacetamido)phenyl]biotinamide**



CAS : New product
CF : $C_{18}H_{21}F_3N_4O_3S$
EM : 430.1286
MW : 430.44 g.mol^{-1}

This compound was prepared by an adaption of the procedure reported by Bonnet *et al.*[276] To a solution of biotin (**12**, 245 mg, 1.00 mmol) in anhydrous DMF (10 mL), was added DIPEA (435 µL, 2.50 mmol) and stirred at r.t. for 10 min. PyBOP (677 mg, 1.30 mmol) was then added and resulting solution was stirred at r.t. till it became clear (about 10 min). Finally, *N*-(4-aminophenyl)-2,2,2-trifluoroacetamide **53** (306 mg, 1.50 mmol) was added and the reaction mixure was stirred under argon atmosphere at r.t. for 48 h. After evaporation of DMF under reduced pressure, the cold Et_2O (20 mL) was added, the resulting white precipitate was separated by filtration and washed successively with cold solvents: Et_2O (5 × 2 mL), MeOH/H_2O mixture (1:1, 10 × 2 mL), and Et_2O (5 × 2 mL), and then dried under vacuum to afford 405 mg (94%) of the desired product **54** as a white powder.

R_f = 0.47 [CH_2Cl_2/MeOH (9:1)].

^{1}H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 1.31-1.44 (m, 2H, H8), 1.47-1.71 (m, 4H, H7, H9), 2.30 (t, $^3J_{6\text{-}7}$ = 7.3 Hz, 2H, H6), 2.58 (d, ^2J = 12.4 Hz, 1H, H14a), 2.82 (dd, ^2J = 12.4 Hz, $^3J_{14b\text{-}13}$ = 5.1 Hz,1H, H14b), 3.09-3.15 (m, 1H, H10), 4.14 (ddd, $^3J_{11\text{-}13}$ = 7.6 Hz, $^3J_{11\text{-}10}$ = 4.4 Hz, $^4J_{11\text{-}14}$ = 1.7 Hz, 1H, H11), 4.31 (dd, $^3J_{13\text{-}11}$ = 7.6 Hz, $^3J_{13\text{-}14}$ = 5.2 Hz, 1H, H13), 6.36 (s, 1H, NH-C_{13}), 6.43 (s, 1H, NH-C_{11}), 7.56 (d, $^3J_{3\text{-}2}$ = 9.3 Hz, 2H, H3), 7.61 (d, $^3J_{2\text{-}3}$ = 9.3 Hz, 2H, H2), 9.94 (s, 1H, NH-C_5), 11.16 (s, 1H, NH-C_{15}).

^{13}C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 171.1 (C_5=O), 162.7 (C_{12}=O), 154.2 (q, *J* = 36.8 Hz, $COCF_3$), 136.9 (C1), 131.1 (C4), 121.6 (C2), 119.3 (C3), 115.8 (q, *J* = 288.0 Hz, CF_3), 61.0 (C11), 59.2 (C13), 55.4 (C10), 39.8 (C14, hidden in the solvent residual signals), 36.2 (C6), 28.2 (C8), 28.1 (C9), 25.1 (C7).

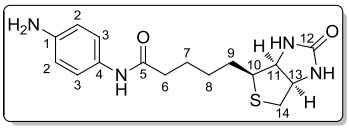
IR (KBr) ν_{max} 3410, 3302, 2939, 1698, 1559, 1519, 1463, 1409, 1158, 840 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 453.1 (100) $[M+Na]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{18}H_{22}F_3N_4O_3S$ $[M+H]^+$ 431.1359, found 431.1345.

m.p. 287.1-289.7 °C.

55 ***N*-(4-Aminophenyl)biotinamide**



CAS : 525583-78-2
CF : $C_{16}H_{22}N_4O_2S$
EM : 334.1463
MW : 334.44 g.mol^{-1}

The trifluoroacetamide cleavage was carried out by using a procedure described in the literature.[364,365] To a suspension of **54** (350 mg, 0.813 mmol) in MeOH (6 mL) was added dropwise a solution of K_2CO_3 (562 mg, 4.07 mmol) in a mixture of H_2O (2.5 mL) and MeOH (4 mL). The reaction mixture was stirred at r.t. under argon atmosphere in the dark for 64 h. After evaporation of solvent, taking up in MeOH (20 mL) and removing K_2CO_3 by filtration, the residue was purified by column chromatography (eluting with CH_2Cl_2/MeOH/NH_4OH = 90:10:2 then 85:15:2) to yield 250 mg (92%) of product **55** as a beige powder.

R_f = 0.47 [CH_2Cl_2/MeOH/NH_4OH (85:15:2)].

^{1}H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 1.29-1.40 (m, 2H, H8),1.43-1.70 (m, 4H, H7, H9), 2.21 (t, $^3J_{6\text{-}7}$ = 7.3 Hz, 2H, H6), 2.58 (d, ^2J = 12.4 Hz, 1H, H14a), 2.82 (dd, ^2J = 12.4 Hz, $^3J_{14b\text{-}13}$ = 5.1 Hz, 1H, H14b), 3.08-3.15 (m, 1H, H10), 4.13 (ddd, $^3J_{11\text{-}13}$ = 7.7 Hz, $^3J_{11\text{-}10}$ = 4.4 Hz, $^4J_{11\text{-}14}$ = 1.7 Hz, 1H, H11), 4.30 (dd, $^3J_{13\text{-}11}$ = 7.6 Hz, $^3J_{13\text{-}14}$ = 5.2 Hz, 1H, H13), 4.80 (s, 2H, NH_2), 6.36 (s, 1H, NH-C_{13}), 6.43 (s, 1H, NH-C_{11}), 6.48 (d, $^3J_{2\text{-}3}$ = 8.8 Hz, 2H, H2), 7.20 (d, $^3J_{3\text{-}2}$ = 8.7 Hz, 2H, H3), 9.41 (s, 1H, NH-C_5).

^{13}C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 170.1 (C_5=O), 162.7 (C_{12}=O), 144.6 (C1), 128.6 (C4), 120.9 (C3), 113.8 (C2), 61.1 (C11), 59.2 (C13), 55.4 (C10), 39.9 (C14), 36.0 (C6), 28.3 (C8), 28.1 (C9), 25.3 (C7).

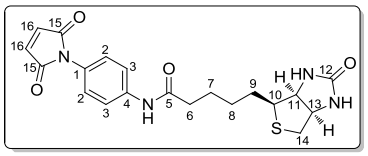
IR (KBr) ν_{max} 3283, 2928, 1692, 1650, 1515, 1461, 1428, 1262, 830 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 373.1 (100) $[M+K]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{16}H_{22}N_4O_2SNa$ $[M+Na]^+$ 357.1356, found 357.1362.

m.p. 202.9-204.8 °C.

50 *N*-[4-(*N*-Maleimido)phenyl]biotinamide



CAS : 1312312-14-3
CF : $C_{20}H_{22}N_4O_4S$
EM : 414.1362
MW : 414.48 g.mol^{-1}

According to the procedure described in the litterature,[167,309] to a stirred solution of maleic anhydride (80 mg, 0.818 mmol) in anhydrous DMF (1 mL) was added a solution of **55** (228 mg, 0.682 mmol) in anhydrous DMF (3 mL). The resulting solution was stirred for 10 minutes at r.t. After evaporation of solvent at 50 °C, the resulting solids were washed with EtOAc (5 × 3 mL) and dried *in vacuo*, giving the intermediate *N*-phenylmaleamic acid **56** as a yellow solid. This was then dissolved in acetic anhydride (5 mL) and heated to 95 °C. Then anhydrous sodium acetate (67 mg, 0.818 mmol) was added and the resulting solution was stirred for 6 h at 95 °C and for an additional of 12 h at r.t. After which time, Et_2O (20 mL) was added and the mixture was allowed to *cool* to – 20 °C. The resulting yellow precipitate was filtrered on a small Büchner funnel and washed successively with cold solvents: Et_2O (5 × 1 mL), MeOH/H_2O mixture (1:1, 5 × 1 mL), MeOH (5 × 1 mL) and Et_2O (5 × 1 mL), and then dried under vacuum to give 200 mg (71%) of the product **50** as a yellow powder.

HPLC analysis, t_R = 18.4 min (Varian Microsorb C18 column, 25 cm × 10 mm diameter, 5µm; method: 0-25 min: 0 to 30% MeCN/0.1% HCOOH, 25-35 min: 30 to 100% MeCN/0.1% HCOOH, 1.0 mL/min).

R$_f$ = 0.51 [CH_2Cl_2/MeOH (9:1)].

^{1}H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 1.31-1.43 (m, 2H, H8), 1.45-1.72 (m, 4H, H7, H9), 2.33 (t, $^3J_{6\text{-}7}$ = 7.4 Hz, 2H, H6), 2.58 (d, ^2J = 12.4 Hz, 1H, H14a), 2.83 (dd, ^2J = 12.4 Hz, $^3J_{14b\text{-}13}$ = 5.1 Hz, 1H, H14b), 3.10-3.16 (m, 1H, H10), 4.14 (ddd, $^3J_{11\text{-}13}$ = 7.7 Hz, $^3J_{11\text{-}10}$ = 4.5 Hz, $^4J_{11\text{-}14}$ = 1.8 Hz, 1H, H11), 4.31 (dd, $^3J_{13\text{-}11}$ = 7.7 Hz, $^3J_{13\text{-}14}$ = 5.2 Hz, 1H, H13), 6.35 (s, 1H, NH-C_{13}), 6.43 (s, 1H, NH-C_{11}), 7.15 (s, 2H, H16), 7.23 (d, $^3J_{2\text{-}3}$ = 8.9 Hz, 2H, H2), 7.67 (d, $^3J_{3\text{-}2}$ = 8.9 Hz, 2H, H3), 10.03 (s, 1H, NH-C_5).

^{13}C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 171.4 (C_5=O), 170.1 (C_{15}=O), 162.7 (C_{12}=O), 138.8 (C4), 134.6 (C16), 127.3 (C2), 126.1 (C1), 119.2 (C3), 61.1 (C11), 59.2 (C13), 55.4 (C10), 39.9 (C14, hidden in the solvent residual signals, observed on the DEPT135 spectrum), 36.2 (C6), 28.2 (C8), 28.1 (C9), 25.1 (C7).

IR (KBr) ν_{max} 3416, 3298, 3093, 2935, 1709, 1531, 1402, 1155, 828, 688 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 415.1 (100) $[M+H]^+$.

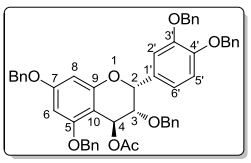
HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{20}H_{22}N_4O_4NaS$ $[M+Na]^+$ 437.1254, found 437.1266.

m.p. 262.3-264.0 °C [lit.[242] 250-252 °C, lit.[307] 247-250 °C].

UV/Vis λ_{max} 227, 247 nm.

$[\alpha]_D^{25}$ –160.4° (*c* 0.09, DMSO) [lit.[242]].

60b **(2*R*,3*S*,4*S*)-4-Acetoxy-3,3',4',5,7-pentakis(benzyloxy)flavan**



CAS : 478241-15-5
CF : $C_{52}H_{46}O_8$
EM : 798.3193
MW : 798.92 g.mol^{-1}

According to the procedure described in the litterature,[320] to a solution of penta-*O*-benzylated epicatechin **2b** (1.85 g, 2.5 mmol) in both freshly distiled acetic acid (658 µL, 11.5 mmol) and CH_2Cl_2 (40 mL) in the presence of molecular sieves 4 Å powder (1 g) was added DDQ (795 mg, 3.5 mmol) at 0 °C. After stirring for 3 h at r.t. under argon atmosphere, excess DMAP (2.26 mg, 18.5 mmol) was added at 0 °C and the mixture was stirred for another 30 min. After removing the resulting solid by filtration, the filtrate was concentrated under reduced pressure and the residue was subjected to silica gel column chromatography, eluting with cyclohexane/EtOAc (9:1), to give the expected product **60b** as a white foam (819 mg, 41%).

R$_f$ = 0.53 [Cyclohexane/CH_2Cl_2/Et_2O (70:15:15)].

^{1}H-NMR (300 MHz, acetone-d_6) δ 2.03 (s, 3H, CH_3), 3.79 (dd, $^3J_{3\text{-}4}$ = 2.3 Hz, $^3J_{3\text{-}2}$ = 1.5 Hz, 1H, H3), 4.31 (d, ^2J = 12.0 Hz, 1H, O*CH*Ph), 4.59 (d, ^2J = 11.9 Hz, 1H, O*CH*Ph), 5.03 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.04 (d, $^3J_{2\text{-}3}$ = 1.0 Hz, 1H, H2), 5.11-5.20 (m, 6H, 3O*CH*$_2$Ph), 6.20 (d, $^3J_{4\text{-}3}$ = 2.3 Hz, 1H, H4), 6.27 (d, $^4J_{8\text{-}6}$ = 2.3 Hz, 1H, H8), 6.41 (d, $^4J_{6\text{-}8}$ = 2.3 Hz, 1H, H6), 7.06 (s, 2H, H5', H6'), 7.27 (s, 1H, H2'), 6.99-7.55 (m, 25H, 25HAr).

^{13}C-NMR (75 MHz, acetone-d_6) δ 170.3 (C=O), 161.8 (ArC-7), 160.3 (ArC-5), 158.1 (ArC-9), 149.7 (ArC-3'), 149.6 (ArC-4'), 138.8, 138.7, 138.6, 138.1 (ArC), 132.2 (ArC-1'), 129.3 (overlapping), 129.2 (overlapping), 128.8, 128.7, 128.5 (overlapping), 128.4, 128.3, 128.2, 127.9 (ArCH), 121.1 (ArCH-6'), 115.2 (overlapping) (ArCH-2', ArCH-5'), 101.0 (ArC-10), 95.3 (ArCH-8), 94.6 (ArCH-6), 76.3 (CH-3), 76.0 (CH-2), 72.7, 71.7, 71.6, 70.6, 70.5 (O*CH*$_2$Ph), 63.0 (CH-4), 21.2 (CH_3).

IR (ZnSe) ν_{max} 3031, 1730, 1618, 1593, 1372, 1228, 1154, 1126, 1017, 736, 696 cm^{-1}.

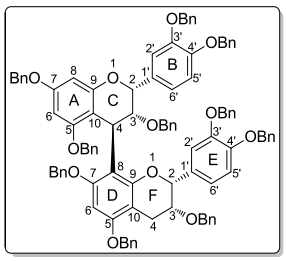
LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 821.1 (100) $[M+Na]^+$, 1619.4 (50) $[2M+Na]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{52}H_{46}O_8Na$ $[M+Na]^+$ 821.3090, found 821.3096.

UV/Vis λ_{max} 270 nm.

$[\alpha]_D^{25}$ +17.2 (*c* 1.00, $CHCl_3$).

70 Perbenzyloxy-(–)-epicatechin-(4β-8)-(–)-epicatechin



CAS : New product
CF : $C_{100}H_{86}O_{12}$
EM : 1478.6119
MW : 1479.75 g.mol^{-1}

According to the litterature,[47] to a solution of nucleophile **2b** (2.25 g, 3.04 mmol) and electrophile **60b** (0.81 g, 1.014 mmol) in freshly distiled CH_2Cl_2 (15 mL) previously stired at –78 °C for 30 min, was added dropwise $BF_3.OEt_2$ (125 µL, 1.014 mmol). After the resulting mixture had been stirred at –30 °C for 23 h, the reaction was quenched with $NaHCO_3$ saturated aqueous solution (5.5 mL) at –30 °C for 40 min then at r.t. for 30 min. The resulting mixture was diluted with CH_2Cl_2 (100 mL) and the organic phase was successively washed with water (2 × 100 mL) and brine (100 mL), dried over Na_2SO_4, filtered, and concentrated. The crude product was purified by column chromatography, eluted with cyclohexane/EtOAc = 95:5 to recover **2b** (1.43 g, 95%) then 90:10 to furnish the protected B2 dimer **70** as a white solid (1.20 g, 80%), containing a mixture of two rotamers in 85:15 ratio (based on the integration values of the ^{1}H NMR spectrum).

R$_f$ = 0.19 [Cyclohexane/EtOAc (9:1)].

HPLC analysis, t_R = 7.7 min (Daicel Chiralpak® IA column, 25 cm × 4.6 mm diameter, 0-80 min : *n*-hexane/*i*-PrOH/EtOAc = 79:1:20, 1.0 mL/min).

^{1}H-NMR (300 MHz, acetone-d_6) δ (85:15 rotamers, major rotamer, mr=minor rotamer) 2.89 (dd, ^2J = 17.6 Hz, $^3J_{4F\text{-}3F}$ = 4.5 Hz, 1H, H4Fβ), 3.22 (d, ^2J = 17.4 Hz, 1H, H4Fα), 3.68 (bs, 1H, H3C + H3C, mr), 3.88-3.89 (m, 1H, H3F), 4.01 (d, ^2J = 12.2 Hz, 1H, O*CH*Ph), 4.13 (bs, H3F, mr), 4.19 (d, ^2J = 11.8 Hz, 1H, O*CH*Ph), 3.92-5.45 (m, 18H, 9O*CH*$_2$Ph), 4.40 (s, 1H, H2F), 5.09 (s, 1H, H4C), 5.29 (s, H4C mr), 5.30 (s, H2F, mr), 5.41 (s, H2C, mr), 5.61 (d, $^4J_{8A\text{-}6A}$ = 2.3 Hz, 1H, H8A), 5.75 (s, 1H, H2C), 5.95 (d, $^4J_{8A\text{-}6A}$ = 2.3 Hz, H8A, mr), 6.07 (d, $^4J_{6A\text{-}8A}$ = 2.3 Hz, 1H, H6A), 6.22 (d, $^4J_{6A\text{-}8A}$ = 2.3 Hz, H6A, mr), 6.30 (s, H6D, mr), 6.61 (dd, $^3J_{6'E\text{-}5'E}$ = 8.2 Hz, $^4J_{6'E\text{-}2'E}$ = 1.7 Hz,1H, H6'E), 6.74 (s, 1H, H6D), 6.77 (dd, $^3J_{6'B\text{-}5'B}$ = 8.1 Hz, $^4J_{6'B\text{-}2'B}$ = 1.8 Hz, 1H, H6'B), 6.85 (d, $^3J_{5'B\text{-}6'B}$ = 8.3 Hz, 1H, H5'B), 6.90 (d, $^3J_{5'E\text{-}6'E}$ = 8.2 Hz, 1H, H5'E), 7.33 (d, $^4J_{2'B\text{-}6'B}$ = 1.8 Hz, 1H, H2'B), 7.37 (d, $^4J_{2'E\text{-}6'E}$ = 1.7 Hz, 1H, H2'E), 6.42-7.61 (m, 50H, 50 HAr).

^{13}C-NMR (75 MHz, acetone-d_6) δ (major rotamer) 158.8, 157.9, 157.5, 156.9, 156.8, 156.0 (C7A, C5A, C7D, C5D, C9A, C9D), 149.9, 149.6, 149.4, 149.0 (C3'B, C3'E, C4'B, C4'E), 139.9, 139.8 (overlapping), 138.7 (overlapping), 138.5, 138.2 (ArC), 134.4 (C1'B), 133.3 (C1'E), 129.4 (overlapping), 129.3, 129.2, 129.1 (overlapping), 129.0 (overlapping), 128.9, 128.8, 128.7, 128.5, 128.4 (overlapping), 128.3 (overlapping), 128.2, 128.1, 128.0, 127.9 (overlapping), 127.8, 127.5, 127.3 (ArCH), 121.5 (C6'B), 120.3 (C6'E), 115.4 (C2'B), 115.1 (C5'B), 114.8 (C2'E), 114.3 (C5'E), 111.6 (C8D), 106.3 (C10A), 103.2 (C10D), 95.1 (C8A), 93.5 (C6A), 91.9 (C6D), 80.9 (C3C), 79.8 (C2F), 76.7 (C2C), 74.6 (C3F), 71.9, 71.8, 71.7 (overlapping), 71.6, 70.7, 70.5, 70.4, 69.9 (O*CH*$_2$Ph), 32.8 (C4C), 26.6 (C4F).

IR (ZnSe) ν_{max} 3030, 2925, 2868, 1595, 1510, 1498, 1453, 1267, 1119, 735, 696 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 1501.5 (100) $[M+Na]^+$.

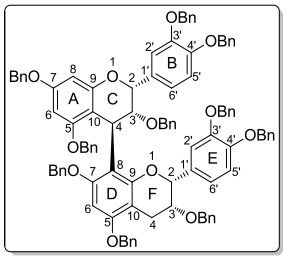
HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{100}H_{87}O_{12}$ $[M+H]^+$ 1479.6192, found 1479.6231.

m.p. 72.5-74.0 °C.

UV/Vis λ_{max} 248, 278 nm.

$[\alpha]_D^{25}$ +41.3° (*c* 1.00, $CHCl_3$).

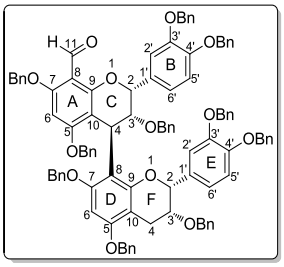
NMR signal assignments of perbenzyloxyprocyanidin B2 **70**



Position	δ_H (mult., *J* in Hz)	δ_C (mult.)	COSY	HSQC[a]	HMBC[b]
Upper unit					
2C	5.75 (s)	76.7	H3C, H4C, H2'B, H6'B	C-2C	C3C, C1'B, C2'B, C6'B, H4C, H6'B, H5'B, H2'B
3C	3.68 (bs)	80.9	H2C, H4C	C-3C	C4C, C10A, C8D, H4C, H2C
4C	5.09 (s)	32.8	H2C, H3C	C-4C	C2C, C3C, C10A, C8D, C9D, C9A, H3C
5A	-	157.9	-	-	H8A
6A	6.07 (d, 2.3)	93.5	H8A	C-6A	C7A, C8A, C10A, H8A
7A	-	158.8	-	-	H6A
8A	5.61 (d, 2.3)	95.1	H6A	C-8A	C5A, C6A, C9A, C10A, H6A
9A	-	156.8	-	-	H4C, H8A
10A	-	106.3	-	-	H3C, H4C, H8A, H6A
1'B	-	134.4	-	-	H2C, H6'B, H5'B, H2'B
2'B	7.33 (d, 1.8)	115.4	H6'B	C-2'B	C2C, C1'B, C4'B, C6'B, H2C, H6'B, H5'B
3'B	-	149.9	-	-	H5'B
4'B	-	149.4	-	-	H6'B, H2'B
5'B	6.85 (d, 8.3)	115.1	H6'B	C-5'B	H2C, C1'B, C2'B, C3'B, C6'B
6'B	6.77 (dd, 8.1, 1.8)	121.5	H2'B, H5'B	C-6'B	C2C, C1'B, C2'B, C4'B, H2C, H5'B, H2'B
Lower unit					
2F	4.40 (s)	79.8	H3F, H4Fα, H2'E, H6'E	C-2F	C3F, C4F, C1'E, C2'E, C6'E, H4Fα, H6'E, H5'E, H2'E
3F	3.88-3.89 (m)	74.6	H2F, H4Fα, H4Fβ	C-3F	C10D, H4Fα, H2F
4F	α: 3.22 (d, 17.4)	26.6	H2F, H3F, H4Fβ	C-4F	C2F, C3F, C9D, C10D, H2F
	β: 2.89 (dd, 17.6, 4.5)		H3F, H4Fα		C9D, C10D
5D	-	156.9	-	-	H6D
6D	6.74 (s)	91.9	-	C-6D	C5D, C7D, C8D, C10D,
7D	-	157.5	-	-	H6D
8D	-	111.6	-	-	H3C, H4C, H6D
9D	-	156.0	-	-	H4Fα, H4Fβ, H4C
10D	-	103.2	-	-	H3F, H4Fα, H4Fβ, H6D
1'E	-	133.3	-	-	H2F, H5'E, H2'E
2'E	7.37 (d, 1.7)	114.8	H6'E	C-2'E	C2F, C1'E, C4'E, C6'E, H2F, H6'E, H5'E
3'E	-	149.6	-	-	H5'E
4'E	-	149.0	-	-	H6'E, H2'E
5'E	6.90 (d, 8.2)	114.3	H6'E	C-5'E	C2F, C1'E, C2'E, C3'E, C6'E
6'E	6.61 (dd, 8.2, 1.7)	120.3	H2'E, H5'E	C-6'E	C2F, C2'E, C4'E, H2F, H5'E, H2'E

[a]Carbons directly bonded to the protons resonating at the ppm value indicated in the δ_H column. [b]Carbons are two, three or even four bonds away from the protons indicated in the left column.

71 **Perbenzyloxy-8-carbaldehyde procyanidin B2**



CAS : New product
CF : $C_{101}H_{86}O_{13}$
EM : 1506.6068
MW : 1509.76 g.mol^{-1}

According to the procedure described in the litterature,[99,264] to a solution of perbenzyloxy procyanidin B2 **70** (190 mg, 0.128 mmol) in anhydrous DMF (2 mL) at 0 °C was added a solution of $POCl_3$ (49 µL, 0.53 mmol) in DMF (1 mL) which was previously stirred for 1 h at r.t. The obtained mixture was stirred under argon atmosphere at r.t. for 18 h. The reaction mixture was diluted with EtOAc (10 mL), then quenched with water (2 mL), and subsequently adjusted to pH = 8 by the addition of a 2 M aqueous NaOH solution (3 mL). After stiring vigorously at r.t. for 2 h, the resulting aqueous layer was extracted by EtOAc (3 × 20 mL), the combined organic layers were washed with brine (2 × 25 mL), dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography, eluting with cyclohexane/EtOAc = 9:1 (to avoid impurities) then 8:2 to afford the expected product **71** as a yellowish foam (113 mg, 58%), a mixture of two rotamers in 84:16 ratio (calculated by ^{1}H NMR).

R$_f$ = 0.28 [Cyclohexane/EtOAc (8:2)].

^{1}H-NMR (300 MHz, acetone-d_6) δ (84:16 rotamers, major rotamer, mr=minor rotamer) 2.86 (dd, ^2J = 17.6 Hz, $^3J_{4F\text{-}3F}$ = 4.5 Hz, 1H, H4Fβ), 2.99 (dd, ^2J = 17.2 Hz, $^3J_{4F\text{-}3F}$ = 4.0 Hz, H4Fβ, mr), 3.23 (d, ^2J = 17.6 Hz, 1H, H4Fα), 3.75-3.78 (m, 1H, H3C + H3C, mr), 3.86-3.87 (m, 1H, H3F), 4.00 (d, ^2J = 12.4 Hz, 1H, O*CH*Ph), 4.20 (d, ^2J = 11.9 Hz, 1H, O*CH*Ph), 4.26 (s, 1H, H2F), 4.01-5.33 (m, 18H, 9O*CH*$_2$Ph), 5.00 (s, 1H, H4C), 5.23 (s, H4C, mr), 5.37 (s, H2F, mr), 5.45 (s, H2C, mr), 5.78 (s, 1H, H2C), 6.36 (s, 1H, H6A), 6.39 (s, H6A, mr), 6.48 (dd, $^3J_{6'E\text{-}5'E}$ = 8.2 Hz, $^4J_{6'E\text{-}2'E}$ = 1.8 Hz, 1H, H6'E), 6.53 (s, H6D, mr), 6.52-6.62 (m, 2H, 2HAr), 6.73 (d, $^3J_{5'E\text{-}6'E}$ = 8.1 Hz, 1H, H5'E), 6.76 (s, 1H, H6D), 6.88 (bs, 2H, H5'B, H6'B), 7.26 (bs, 1H, H2'E), 7.45 (bs, 1H, H2'B), 6.85-7.60 (m, 48H, 48HAr), 10.06 (s, 1H, H11), 10.17 (s, H11, mr).

^{13}C-NMR (75 MHz, acetone-d_6) δ (major rotamer) 186.3 (C_{11}=O), 161.9, 161.5, 158.6, 157.7, 156.9, 155.9 (C7D, C7A, C5A, C5D, C9A, C9D), 150.0 (C3'E), 149.8 (C3'B), 149.4 (C4'E), 149.3 (C4'B), 139.9, 139.6, 139.1, 139.0, 138.8, 138.7 (overlapping), 138.4, 138.2, 137.9 (ArC), 134.1 (C1'B), 132.9 (C1'E), 129.4 (overlapping), 129.2 (overlapping), 129.1, 129.0 (overlapping), 128.9, 128.7 (overlapping), 128.5, 128.4 (overlapping), 128.3, 128.2 (overlapping), 128.0 (overlapping), 127.9, 127.7, 127.5 (ArCH), 120.4 (C6'E), 120.3 (C6'B), 115.5 (C5'B), 114.9 (C5'E), 114.8 (C2'B), 114.0 (C2'E), 110.9 (C8D), 109.7 (C8A), 107.0 (C10A), 103.2 (C10D), 92.0 (C6D), 91.1 (C6A), 79.9 (C3C), 79.7 (C2F), 76.8 (C2C), 74.3 (C3F), 71.9 (overlapping), 71.8, 71.7, 71.5 (overlapping), 70.8, 70.4, 70.2 (O*CH*$_2$Ph), 32.9 (C4C), 26.5 (C4F).

IR (ZnSe) ν_{max} 3030, 2868, 1673, 1594, 1511, 1453, 1266, 1214, 1118, 734, 696 cm^{-1}.

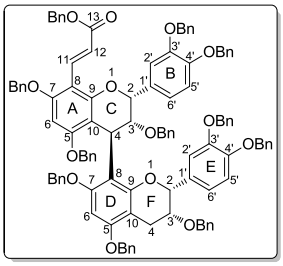
LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 1507.5 (30) $[M+H]^+$, 1529.5 (100) $[M+Na]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{101}H_{87}O_{13}$ $[M+H]^+$ 1507.6141, found 1507.6146.

UV/Vis λ_{max} 254, 280, 320 nm.

$[\alpha]_D^{25}$ +48.9° (*c* 1.00, $CHCl_3$).

72 Perbenzyloxy-8-benzyloxy acrylate procyanidin B2



CAS : New product
CF : $C_{110}H_{94}O_{14}$
EM : 1638.6644
MW : 1639.92 g.mol^{-1}

According to the procedure described in the litterature by List *et al.*,[268] to a solution of aldehyde **71** (450 mg, 0.298 mmol) in dry DMF (4 mL) was added dropwise a mixture of DMAP (7.3 mg, 60 µmol), piperidine (6.0 µL, 60 µmol) and phenylmethyl hydrogen propanedioate **8** (232 mg, 1.19 mmol) in dry DMF (2 mL) previously stirred at r.t. under argon atmosphere for 1 h earlier. The reaction mixture was stirred at 50 °C under argon atmosphere until the aldehyde was consumed (15 h). After which time it was diluted with EtOAc (120 mL), washed successively with 0.5 M HCl aqueous solution (4 × 10 mL), water (10 mL), $NaHCO_3$ (4 × 10 mL), water (40 mL), and brine (2 × 25 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4, filtered and concentrated. The resulting residue was purified by column chromatography, eluting with cyclohexane/acetone = 9:1 (to remove impurities) then 87:13, to furnish the expected product **72** as a white foam (427 mg, 87%), a mixture of two rotamers in 80:20 ratio (based on ^{1}H NMR spectrum).

R_f = 0.71 [Cyclohexane/EtOAc (7:3)].

^{1}H-NMR (300 MHz, acetone-d_6) δ (80:20 rotamers, major rotamer, mr=minor rotamer) 2.85 (dd, ^2J = 17.5 Hz, $^3J_{4F\text{-}3F}$ = 4.5 Hz, 1H, H4Fβ), 2.97 (dd, ^2J = 17.2 Hz, $^3J_{4F\text{-}3F}$ = 4.1 Hz, H4Fβ, mr), 3.22 (d, ^2J = 17.7 Hz, 1H, H4Fα), 3.73 (s, H3C, mr), 3.77 (s, 1H, H3C), 3.82-3.83 (m, 1H, H3F), 4.03-5.32 (m, 22H, 11O*CH*$_2$Ph), 4.29 (s, 1H, H2F), 5.03 (s, 1H, H4C), 5.29 (s, H4C, mr), 5.33 (s, H2F, mr), 5.54 (s, H2C, mr), 5.83 (s, 1H, H2C), 6.38 (s, 1H, H6A), 6.43 (s, H6A, mr), 6.53 (s, H6D, mr), 6.56 (dd, $^3J_{6'E\text{-}5'E}$ = 8.1 Hz, $^4J_{6'E\text{-}2'E}$ = 1.5 Hz, 1H, H6'E), 6.64-6.67 (m, 2H, 2HAr), 6.74 (s, 1H, H6D), 6.77 (d, $^3J_{5'E\text{-}6'E}$ = 8.2 Hz, 1H, H5'E), 6.81 (dd, $^3J_{6'B\text{-}5'B}$ = 10.0 Hz, $^4J_{6'B\text{-}2'B}$ = 1.7 Hz, 1H, H6'B), 6.84 (d, $^3J_{12\text{-}11}$ = 16.1 Hz, 1H, H12), 6.89 (d, $^3J_{5'B\text{-}6'B}$ = 8.3 Hz, 1H, H5'B), 7.15 (d, $^4J_{2'E\text{-}6'E}$ = 1.9 Hz, 1H, H2'E), 7.44 (d, $^4J_{2'B\text{-}6'B}$ = 1.9 Hz, 1H, H2'B), 6.85-7.59 (m, 53H, 53HAr), 7.62 (d, $^4J_{2'B\text{-}6'B}$ = 1.6 Hz, H2'B, mr), 8.11 (d, $^3J_{11\text{-}12}$ = 16.2 Hz, 1H, H11), 8.18 (d, $^3J_{11\text{-}12}$ = 16.2 Hz, H11, mr).

^{13}C-NMR (75 MHz, acetone-d_6) δ (major rotamer) 168.8 (C_{13}=O), 159.4 (C5A), 158.8 (C7A), 157.5 (C5D), 156.9 (C7D, C9D), 155.8 (C9A), 150.1 (C3'E), 149.6 (C3'B), 149.5 (C4'E), 149.4 (C4'B), 139.9, 139.6, 139.2, 138.9, 138.7, 138.6 (overlapping), 138.3, 138.2, 138.1 (ovarlapping) (ArC), 137.4 (C11), 134.1 (C1'B), 132.7 (C1'E), 129.4 (overlapping), 129.3 (overlapping), 129.2, 129.1, 129.0, 128.9 (overlapping), 128.8, 128.7, 128.6, 128.5 (overlapping), 128.4 (overlapping), 128.3 (overlapping), 128.2 (overlapping), 128.1 (overlapping), 128.0, 127.9 (overlapping), 127.8 (overlapping), 127.6 (ArCH), 120.7 (C6'E), 120.6 (C6'B), 117.2 (C12), 115.3 (C5'B), 114.8 (C2'B), 114.7 (C5'E), 114.1 (C2'E), 111.2 (C8D), 107.2 (C10A), 106.5 (C8A), 103.2 (C10D), 92.1 (C6D), 91.5 (C6A), 80.1 (C3C), 79.8 (C2F), 77.4 (C2C), 74.1 (C3F), 72.0, 71.8, 71.7 (overlapping), 70.8, 70.7, 70.1, 65.4 (OCH_2Ph), 33.3 (C4C), 26.4 (C4F).

IR (ZnSe) ν_{max} 3030, 2867, 1702, 1596, 1510, 1266, 1215, 1121, 1025, 735, 696 cm^{-1}.

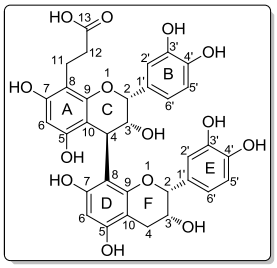
LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 1639.3 (30) $[M+H]^+$, 1661.7 (100) $[M+Na]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{110}H_{95}O_{14}$ $[M+H]^+$ 1639.6716, found 1639.6703.

UV/Vis λ_{max} 248, 284, 324 nm.

$[\alpha]_D^{25}$ +18.9° (*c* 1.00, $CHCl_3$).

73 3-(8-procyanidin B2)propanoic acid



CAS : New product
CF : $C_{33}H_{30}O_{14}$
EM : 650.1636
MW : 650.58 g.mol^{-1}

Debenzylation and reduction of compound perbenzyloxy-8-benzyloxy acrylate procyanidin B2 **72** (200 mg, 0.122 mmol) in a degased mixture of THF/MeOH/CH_2Cl_2 (4:4:1, 4 mL) was carried out under H_2 atmosphere at r.t. for 28 h in the presence of 10 wt % Pd/C (39 mg Pd/C, 0.037 mmol Pd). After evaporation of the solvents at r.t., the crude residue was dissolved in acetone (3 mL), filtered through cotton/Celite® (*via* a Pasteur pipet) and the solid was washed with acetone (5 × 2 mL). The combined filtrates were concentrated under reduced pressure to afford the expected product **73** as an off-white foam in quantitative yield (81 mg) without further purification.

R_f = 0.1 [CH_2Cl_2/MeOH/HCOOH (70:30:0.1)].

HPLC analysis, t_R = 27.1 min (Nucleodur Pyramid C18 column, 25 cm × 4.6 mm diameter, 5µm; method: 0-30 min: 0 to 100% MeOH/0.1% HCOOH, 1.0 mL/min).

^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 2.61 (bs, 2H, H12), 2.79-2.96 (m, 4H, H4F, H11), 3.95 (s, 1H, H3C), 4.31 (s, 1H, H3F), 4.68 (s, 1H, H4C), 4.94 (s, 1H, H2F), 5.08 (s, 1H, H2C), 5.89 (s, 1H, H6D), 6.06 (s, 1H, H6A), 6.73 (bs, 3H, H6'B, H5'B, H5'E), 6.92 (bs, 2H, H2'B, H6'E), 7.13 (s, 1H, H2'E).

^{13}C-NMR (75 MHz, CD_3OD) δ 179.8 (C_{13}=O), 156.5, 156.1, 155.2, 154.4 (C5A, C7A, C9A, C5D, C7D, C9D), 145.8, 145.5, 145.4 (C4'B, C3'B, C4'E, C3'E), 132.7 (C1'B), 132.0 (C1'E), 119.0, 118.9 (C6'B, C6'E), 116.0, 115.2, 114.9 (C5'B, C2'B, C5'E, C2'E), 108.0 (C8D), 107.3 (C8A), 101.0 (C10A), 100.5 (C10D), 97.4 (C6D), 96.7 (C6A), 79.6 (C2F), 76.8 (C2C), 73.2 (C3C), 66.9 (C3F), 37.1 (C4C), 35.6 (C12), 29.7 (C4F), 19.8 (C11).

IR (KBr) ν_{max} 3385, 2926, 1702, 1612, 1521, 1447, 1283, 1199, 1107 cm^{-1}.

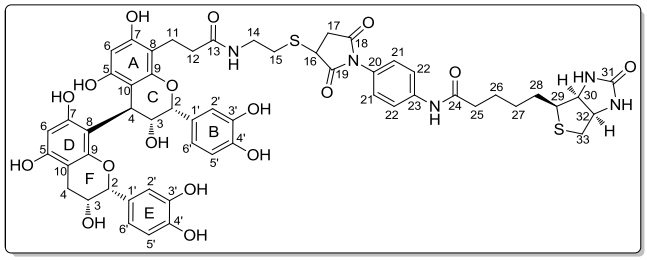
LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 673.3 (100) $[M+Na]^+$, 1323.9 (50) $[2M+Na]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{33}H_{30}O_{14}Na$ $[M+Na]^+$ 673.1528, found 673.1556.

UV/Vis λ_{max} 234, 276 nm.

$[\alpha]_D^{25}$ +21.1° (*c* 1.00, acetone/H_2O (9:1)).

76 Procyanidin B2-bearing probe



CAS : New product
CF : $C_{55}H_{57}N_5O_{17}S_2$
EM : 1123.3191
MM : 1124.19 g.mol^{-1}

To a solution of acid **73** (32.5 mg, 0.05 mmol) in anhydrous DMF (1 mL), under argon atmosphere, was added EDCI•HCl (10.5 mg, 0.055 mmol). The mixture was stirred at 40 °C for 22 h, after which time TLC analysis showed complete consumption of **73** to give the corresponding lactone **74** (R_f of lactone = 0.85, CH_2Cl_2/MeOH = 3:1). The mixture was allowed to reach r.t. and cysteamine (4.3 mg, 0.055 mmol) was added. The mixture was Ar-degased for 5 min at r.t. before heating to 40 °C for 6 h under argon atmosphere, after which time TLC analysis indicated completion of the reaction, giving the thiol **75**. The mixture was then evaporated to dryness and redissolved in DMSO-d_6 (0.6 mL) prior to the addition a solution of biotin maleimide **50** (15.5 mg, 0.0375 mmol) under argon atmosphere. The mixture was shaken at 40 °C for 4 h after which time ^{1}H-NMR analysis indicated completion of the reaction. After removing of DMSO-d_6 by extracting with Et_2O/$CHCl_3$ (9:1, v/v, 5 × 2 mL), the resulting precipitate was washed carefully with water (5 × 1 mL), lyophilized and further dried under high vacuum to furnish the product **76** (28.4 mg, 67%) as a beige fluffy solid. However, spectroscopic analysis indicated a small amount of cysteamine biotin-maleimide adduct. A haft of this material was then purified by semi-preparative HPLC (0-25 min: 10 to 30% CH_3CN/0.1% HCOOH, Varian Microsorb C18 (25 × 250 mm, 5µm), flow rate 16 mL/min) to furnish, after drying, the probe **76** as a white powder (4.2 mg, 30% isolated yield).

R_f = 0.60 [CH_2Cl_2/MeOH (75:25)].

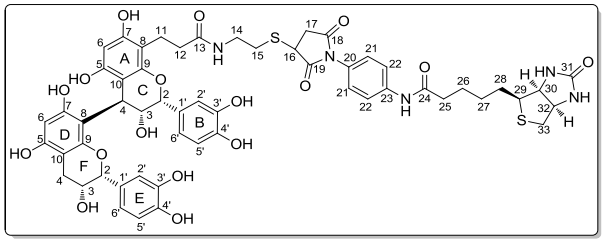
HPLC analysis, t_R = 19 min (Varian Microsorb C18 column, 25 cm × 10 mm diameter, 5µm; method: 0-25 min: 10 to 30% CH_3CN/0.1% HCOOH, 25-35 min: 30 to 100% CH_3CN/0.1% HCOOH, 1.0 mL/min).

^{1}H-NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 1.32-1.43 (m, 2H, H27), 1.45-1.72 (m, 4H, H26, H28), 2.26-2.41 (m, 3H, H4Fα, H12), 2.33 (t, $^3J_{25\text{-}26}$ = 7.2 Hz, 2H, H25), 2.58 (d, ^2J = 12.4 Hz, 1H, H33a), 2.60-2.94 (m, 6H, H4Fβ, H11, H15, H17a), 2.83 (dd, ^2J = 12.5 Hz, $^3J_{33\text{-}32}$ = 5.1 Hz, 1H, H33b), 3.10-3.16 (m, 1H, H29), 3.28-3.34 (m, 3H, H14, H17b, hidden in the water's signals; observed on the COSY and HSQC spectrums), 3.65 (d, ^3J = 3.6 Hz, 1H, H3C), 4.11-4.16 (m, 3H, H3F, H16, H30), 4.21 (d, ^3J = 5.0, 1H, 3C-OH), 4.29-4.33 (m, 1H, H32), 4.47 (s, 1H, H4C), 4.73 (s, 1H, 3F-OH), 4.91 (s, 1H, H2F), 4.97 (s, 1H, H2C), 5.77 (s, 1H, H6D), 5.90 (s, 1H, H6A), 6.36 (s, 1H, C_{32}-NH), 6.43 (s, 1H, C_{30}-NH), 6.60 (d, ^3J = 8.6 Hz, 1H, H6'B), 6.63-6.96 (m, 2H, H5'B, H5'E), 6.76 (s, 1H, H2'B), 6.81 (d, ^3J = 8.1 Hz, 1H, H6'E), 7.00 (s, 1H, H2'E), 7.19 (d, $^3J_{21\text{-}22}$ = 8.9 Hz, 2H, H21), 7.68 (d, $^3J_{22\text{-}21}$ = 8.8 Hz, 2H, H22), 7.88 (s, 1H, 7D-OH), 7.94 (bs, 1H, C_{13}-NH), 8.48 (s, 5A-OH), 8.66 (bs, 2H, 3'E-OH, 4'E-OH), 8.73-8.83 (m, 2H, 3'B-OH, 4'B-OH), 8.80 (s, 7A-OH), 8.90 (s, 1H, 5D-OH), 10.05 (s, 1H, C_{24}-NH).

^{13}C-NMR (200 MHz, DMSO-d_6) δ 176.1 (C_{18}=O), 174.4 (C_{19}=O), 173.2 (C_{13}=O), 171.4 (C_{24}=O), 162.7 (C_{31}=O), 154.4, 154.3, 154.0, 153.9, 153.4, 152.9 (A and D rings C5, C7, C9), 144.6, 144.3, 144.1, 144.0 (B and E rings C3', C4'), 139.3 (C23), 131.4 (C1'B), 130.3 (C1'E), 127.4 (C21), 126.8 (C20), 119.2 (C22), 117.7 (C6'E), 117.4 (C6'B), 115.0, 114.9 (C5'B, C5'E), 114.4 (C2'E), 114.2 (C2'B), 107.1 (C8D), 104.7 (C8A), 101.7 (C10A), 98.7 (C10D), 95.8 (C6D), 94.7 (C6A), 77.5 (C2F), 75.3 (C2C), 71.2 (C3C), 64.6 (C3F), 61.1 (C30), 59.2 (C32), 55.4 (C29), 39.8 (C33) and 39.3 (C16) hidden in the solvent residual signals, observed on the DEPT135 and HSQC spectrums, 38.2 (C14), 36.2

(C25), 36.2 (C17), 35.8 (C4C), 35.4 (C12), 30.6 (C15), 28.2 (C27), 28.1 (C28), 27.6 (C4F), 25.1 (C26), 18.5 (C11).
IR (KBr) ν_{max} 3388, 2934, 1704, 1611, 1515, 1447, 1387, 1284, 1197, 1110 cm^{-1}.
LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 1146.5 (100) $[M+Na]^+$, 1122.2 (100) $[M–H]^–$.
HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{55}H_{57}N_5O_{17}S_2Na$ $[M+Na]^+$ 1146.3083, found 1146.3136.
UV/Vis λ_{max} 234, 277 nm.

NMR signal assignments of procyanidin B2-biotin conjugate **76**

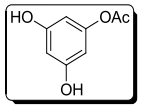


Position	δ_H (mult., *J* in Hz)	δ_C (mult.)	COSY	HSQC[a]	HMBC[b]
Upper unit's B2 moiety					
2C	4.97 (s)	75.3	H3C, H2'B, H6'B	C-2C	
3C	3.65 (d, 3.6)	71.2	H2C, H4C, 3C-OH	C-3C	
4C	4.47 (s)	35.8	H3C	C-4C	
5A	-	[c]group 1	-	-	
6A	5.90 (s)	94.7	-	C-6A	
7A	-	[c]group 1	-	-	
8A	-	104.7	-	-	
9A	-	[c]group 1	-	-	
10A	-	101.7	-	-	
1'B	-	131.4	-	-	
2'B	6.76 (s)	114.2	2C	C-2'B	
3'B	-	[d]group 2	-	-	
4'B	-	[d]group 2	-	-	
5'B	6.63-6.96 (m)	115.0/ 114.9	H6'B	C-5'B	
6'B	6.60 (d, 8.6)	117.4	2C, H5'B	C-6'B	
Lower unit's B2 moiety					
2F	4.91 (s)	77.5	H3F, H2'E, H6'E	C-2F	
3F	4.11-4.16 (m)	64.6	H2F, 3F-OH, H4Fα, H4Fβ	C-3F	
4F	α: 2.26-2.41 (m)	27.6	H3F, H4Fβ	C-4F	
	β: 2.60-2.94 (m)		H3F, H4Fα		
5D	-	[c]group 1	-	-	
6D	5.77 (s)	95.8	-	C-6D	
7D	-	[c]group 1	-	-	
8D	-	107.1	-	-	
9D	-	[c]group 1	-	-	
10D	-	98.7	-	-	
1'E	-	130.3	-	-	
2'E	7.00 (s)	114.4	2F	C-2'E	
3'E	-	[d]group 2	-	-	
4'E	-	[d]group 2	-	-	
5'E	6.63-6.96 (m)	114.9/ 115.0	H6'E	C-5'E	
6'E	6.81 (d, 8.1)	117.7	2F, H5'E	C-6'E	
Hydroxyls (OH)					

Position	δ_H (mult., *J* in Hz)	δ_C (mult.)	COSY	HSQC[a]	HMBC[b]
3C	4.21 (d, 5.0)	-	H3C	-	
5A	8.48 (s)	-	-	-	
7A	8.80 (s)	-	-	-	
3'B, 4'B	8.73-8.83 (m)	-	-	-	
3F	4.73 (s)	-	H3F	-	
5D	8.90 (s	-	-	-	
7D	7.88 (s)	-	-	-	
3'E, 4'E	8.66 (bs)	-	-	-	
Biotin-linker moiety					
11	2.60-2.94 (m)	18.5	H12	C-11	
12	2.26-2.41 (m)	35.4	H11	C-12	
14	3.28-3.34 (m)	38.2	C_{13}-NH, H15	C-14	
15	2.60-2.94 (m)	30.6	H14	C-15	
16	4.11-4.16 (m)	39.3	H17a, H17b	C-16	
17	a: 2.60-2.94 (m)	36.2	H16, H17b	C-17	
	b: 3.28-3.34 (m)		H16, H17a		
20	-	126.8	-	-	
21	7.19 (d, 8.9)	127.4	H22	C-21	
22	7.68 (d, 8.8)	119.2	H21, C_{24}-NH	C-22	
23	-	139.3	-	-	
25	2.33 (t, 7.2)	36.2	H26	C-25	
26	1.45-1.72 (m)	25.1	H25, H27	C-26	
27	1.32-1.43 (m)	28.2	H26, H28	C-27	
28	1.45-1.72 (m)	28.1	H27, H29	C-28	
29	3.10-3.16 (m)	55.4	H28, H30	C-29	
30	4.11-4.16 (m)	61.1	H29, C_{30}-NH, H32	C-30	
32	4.29-4.33 (m)	59.2	H30, C_{32}-NH, H33b	C-32	
33	a: 2.58 (d, 12.4)	39.8	H33b	C-33	
	b: 2.83 (dd, 12.5, 5.1)		H32, H33a		
Carbonyls					
C_{13}=O	-	173.2	-	-	
C_{18}=O	-	176.1	-	-	
C_{19}=O	-	174.4	-	-	
C_{24}=O	-	171.4	-	-	
C_{31}=O	-	162.7	-	-	
Amides (NH)					
C_{13}-NH	7.94 (bs)	-	H14	-	C_{13}=O
C_{24}-NH	10.05 (s)	-	H22	-	C-22, C-23, C_{24}=O
C_{30}-NH	6.43 (s)	-	H30	-	C-30, C_{31}=O, C-32
C_{32}-NH	6.36 (s)	-	H32	-	C-30, C_{31}=O, C-32

[a]Carbons directly bonded to the protons resonating at the ppm value indicated in the δ_H column. [b]Carbons are two, three or even four bonds away from the protons indicated in the left column. [c]Group 1: 154.4, 154.3, 154.0, 153.9, 153.4, 152.9 (A and D rings C5, C7, C9); [d]group 2: 144.6, 144.3, 144.1, 144.0 (B and E rings C3', C4').

128 3,5-Dihydroxyphenyl acetate



CAS : 16534-21-7
CF : $C_8H_8O_4$
EM : 168.0423
MW : 168.15 g.mol^{-1}

To a solution of phloroglucinol (**116**, 11.35 g, 90 mmol) and acetic anhydride (2.84 mL, 30 mmol) in EtOAc (180 mL) at 0 °C was added dropwise pyridine (2.91 mL, 36 mmol) over 15 min. The resulting mixture was stirred at 0 °C for an additional 15 min under an argon atmosphere. The reaction mixture was then washed successively with 1 M aqueous solution of HCl (2 × 50 mL), water (50 mL), brine (100 mL), dried over Na_2SO_4, concentrated under vacuum and purified by column chromatography, eluted with cyclohexane/EtOAc (8:2), to afford the desired product **128** as an off-white wax (2.58 g, 51%, calculated on acetic anhydride).

R_f = 0.42 [CH_2Cl_2/MeOH (95:5)].

^{1}H-NMR (300 MHz, acetone-d_6) δ 2.19 (s, 3H, CH_3), 6.11 (d, $^4J_{meta}$ = 2.1 Hz, 2H, 2HAr), 6.24 (t, $^4J_{meta}$ = 2.1 Hz, 1H, 1HAr), 8.41 (s, 2H, 2ArOH).

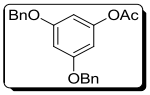
^{13}C-NMR (75 MHz, acetone-d_6) δ 169.4 (C=O), 159.5 (ArC-OH), 153.5 (ArC), 101.6 (ArCH), 100.8 (ArCH), 20.9 (CH_3).

IR (ZnSe) ν_{max} 3387, 1758, 1731, 1613, 1504, 1374, 1241, 1207, 1164, 1128, 1001 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 166.9 (100) $[M–H]^–$.

m.p. 119-121 °C.

129 **3,5-Bis(benzyloxy)phenyl acetate**



CAS : New product
CF : $C_{22}H_{20}O_4$
EM : 348.1362
MW : 348.39 g.mol^{-1}

To a stirred ice-cold solution of **128** (6.63 g, 39.43 mmol) in anhydrous DMF (100 mL) under argon atmosphere was added slowly dry K_2CO_3 (16.35 g, 118.3 mmol). The resulting suspension was stirred for 10 min at 0 °C before dropwise addition of (9.4 mL, 78.86 mmol) over 15 min. The reaction mixture was then allowed to stir for 15 h at r.t. Upon completion, the reaction was diluted with EtOAc (400 mL). The organic layer was washed with water (4 × 100 mL), brine (2 × 100 mL), dried with Na_2SO_4, filtered, concentrated under vacuum and purified by column chromatography, eluting with cyclohexane/EtOAc (97:3) to furnish the desired 3,5-bis(benzyloxy)phenyl acetate **129** (8.94 g, 65%) as a yellowish sticky solid.

R_f = 0.47 [Cyclohexane/EtOAc (8:2)].

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2.32 (s, 3H, CH_3), 5.06 (s, 4H, 2O*CH_2*Ph), 6.48 (d, $^4J_{meta}$ = 2.2 Hz, 2H, 2HAr), 6.60 (t, $^4J_{meta}$ = 2.2 Hz, 1H, 1HAr), 7.37-7.49 (m, 10H, 10HAr).

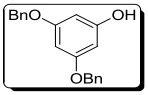
^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 169.0 (C=O), 160.1 (ArC), 152.0 (ArC), 136.4 (ArC), 128.4 (ArCH), 127.9 (ArCH), 127.4 (ArCH), 101.2 (ArCH), 99.6 (ArCH), 70.0 (CH_2), 20.9 (CH_3).

IR (ZnSe) ν_{max} 3032, 1766, 1611, 1453, 1371, 1207, 1157, 1128, 1046, 737, 697 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 371.0 (100) $[M+Na]^+$.

HRMS (CI-DEP) calcd for $C_{22}H_{21}O_4$ $[M+H]^+$ 349.1440, found 349.1451.

77 **3,5-Bis(benzyloxy)phenol**



CAS : 63604-98-8
CF : $C_{20}H_{18}O_3$
EM : 306.1256
MW : 306.36 g.mol^{-1}

To a solution of **129** (4.2 g, 12.06 mmol) in a mixture of EtOH/EtOAc (1:1, 50 mL) at 0 °C was added slowly a pre-cooled solution of KOH (2.03 g, 36.17 mmol) in water (25 mL). After stirring for 12 h under an argon atmosphere at r.t., the reaction was cooled to 0 °C and subsequently quenched by an 1 M aqueous solution of HCl (43 mL). The phases were separated, the aqueous phase was extracted with EtOAc (4 × 70 mL). The combined organic layers were washed with water (100 mL), brine (100 mL), dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated under vacuum to afford the desired product **77** (3.69 g, quasi-quantitative yield) as a pale yellow solid, without further purification.

R_f = 0.38 [Cyclohexane/EtOAc (8:2)].

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.99 (s, 4H, 2CH_2), 5.10 (s, 1H, OH), 6.12 (d, $^4J_{meta}$ = 2.1 Hz, 2H, 2HAr), 6.26 (t, $^4J_{meta}$ = 2.1 Hz, 1H, 1HAr), 7.31-7.43 (m, 10H, 10HAr).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 160.8 (ArC), 157.2 (ArC-OH), 136.7 (ArC), 128.6 (ArCH), 128.0 (ArCH), 127.5 (ArCH), 95.4 (ArCH), 94.9 (ArCH), 70.1 (CH_2).

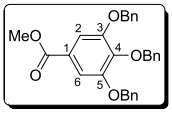
IR (ZnSe) ν_{max} 3392, 3032, 1600, 1498, 1454, 1376, 1154, 1052, 822, 737, 698 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 305.1 (100) $[M-H]^-$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{20}H_{19}O_3$ $[M+H]^+$ 307.1329, found 307.1342.

m.p. 91-93 °C [lit.[331] 89-90 °C].

124 Methyl 3,4,5-tris(benzyloxy)benzoate



CAS : 70424-94-1
CF : $C_{29}H_{26}O_5$
EM : 454.1780
MW : 454.51 g.mol^{-1}

According to the procedure described in the literature,[350,346] to a stirred ice-cold suspension of anhydrous K_2CO_3 (69.1 g, 500 mmol) in distilled acetone (300 mL), under argon atmosphere, was added a pre-cooled solution of commercially available methyl gallate (**123**, 18.42 g, 100 mmol) in distilled acetone (150 mL) and the mixture was stirred for 30 min at 0 °C. Then benzyl bromide (47.6 mL, 400 mmol) was added dropwise followed by TBAI (740 mg, 2 mmol). The suspension was allowed to stir for 24 h at r.t. under argon atmosphere at which time TLC showed full conversion of the starting material. The mixture was filtered through Celite® and the filtrate was then evaporated in vacuum. The residue was recrystallised from *n*-hexane, the resulting solids were filtrered on a Büchner funnel, rinsed with *n*-hexane and dried *in vacuo* to afford the compound **124** (44.8 g, quasi-quantitative yield) as a white solid providing analytical data in agreement with previously published values.

R_f = 0.53 [Cyclohexane/EtOAc (8:2)].

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3.90 (s, 3H, CH_3), 5.14 (s, 2H, CH_2), 5.15 (s, 4H, $2CH_2$), 7.41 (s, 2H, H2, H6), 7.25-7.47 (m, 15H, 15HAr).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 166.6 (C=O), 152.5 (ArC-3, ArC-5), 142.4 (ArC-4), 137.4 (ArC), 136.6 (ArC), 128.5 (ArCH), 128.5 (ArCH), 128.1 (ArCH), 128.0 (ArCH), 127.9 (ArCH), 127.5 (ArCH), 125.2 (ArC-1), 109.0 (ArCH-2, ArCH-6), 75.1 (CH_2), 71.2 (CH_2), 52.2 (CH_3).

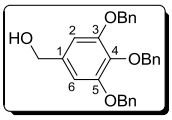
IR (ZnSe) ν_{max} 3033, 2950, 2891, 1714, 1593, 1122, 739, 698 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 477.2 (100) $[M+Na]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{29}H_{26}O_5Na$ $[M+Na]^+$ 477.1672, found 477.1679.

m.p. 99-101 °C [lit.[350] 97 °C (acetone), lit.[331,346] 99-100 °C].

125 **3,4,5-Tris(benzyloxy)phenyl)methanol**



CAS : 79831-88-2
CF : $C_{28}H_{26}O_4$
EM : 426.1831
MW : 426.50 g.mol^{-1}

According to the procedure described by Su *et al.*,[346] to a pre-cooled solution of methyl 3,4,5-tris(benzyloxy)benzoate (**124**, 9.16 g, 20 mmol) in anhydrous THF (100 mL) was added lithium aluminium hydride (918 mg, 24.2 mmol) in several small portions over 10 minutes at 0 °C under argon atmosphere. The reaction mixture was then stirred at room temperature for 1 hours and subsequently cooled to 0 °C before adding dropwise water (918 µL) followed by 15% aqueous potassium hydroxide solution (918 µL) and, finally, water (2.76 mL). The resulting mixture was stirred vigorously for 30 minutes at room temperature and further for 15 minutes in presence of anhydrous Na_2SO_4. The resulting solid was filtered off through a pad of celite/Na_2SO_4 and rinsed with CH_2Cl_2. The filtrate was then concentrated under reduced pressure to afford the expected alcohol **125** as a white solid (8.57 g, quantitative yield) of sufficient purity for the next step. The spectral data was consistent with literature values.[346]

R_f = 0.16 [Cyclohexane/EtOAc (8:2)].

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.62 (s, 1H, OH), 4.58 (s, 2H, CH_2-OH), 5.05 (s, 2H, CH_2), 5.11 (s, 4H, 2CH_2), 6.68 (s, 2H, H2, H6), 7.26-7.45 (m, 15H, 15HAr).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 152.8 (ArC-3, ArC-5), 137.7 (ArC), 137.5 (ArC-1), 137.0 (ArC), 136.7 (ArC-4), 128.5 (ArCH), 128.4 (ArCH), 128.1 (ArCH), 127.8 (ArCH), 127.7 (ArCH), 127.3 (ArCH), 106.1 (ArCH-2, ArCH-6), 75.2 (CH_2), 71.0 (CH_2), 65.1 (CH_2-OH).

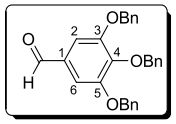
IR (ZnSe) ν_{max} 3320, 2863, 1597, 1439, 1373, 1225, 1122, 733, 696 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 449.1 (100) $[M+Na]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{28}H_{26}O_4Na$ $[M+Na]^+$ 449.1723, found 449.1727.

m.p. 110-112 °C [lit.[346] 109-110 °C (MeOH)].

126 3,4,5-Tris(benzyloxy)benzaldehyde



CAS : 6137-86-6
CF : $C_{28}H_{24}O_4$
EM : 424.1675
MW : 424.49 $g.mol^{-1}$

Compound **126** was synthesized by adaptation of a procedure described by Su *et al*.,[346] to a stirred solution of $(COCl)_2$ (2.54 mL, 30 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (80 mL) at –78 °C was added rapid dropwise a solution of DMSO (4.26 mL, 60 mmol) in CH_2Cl_2 (20 mL). After stirring for 15 min, a solution of 3,4,5-tris(benzyloxy)phenyl)methanol (**125**, 8.53 g, 20 mmol) in CH_2Cl_2 (40 mL) was added slowly. The resulting mixture was stirred at −78 °C for 30 min before addition of triethylamine (12.5 mL, 90 mmol). The reaction mixture was allowed to warm to 0 °C and stirred further for 30 min before quenching with H_2O (60 mL). The layers were separated and the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (2 × 80 mL). The combined organic layers were washed with brine (2 × 100 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure to give the title aldehyde **126** (8.50 g) in quasi-quantitative yield as a yellowish fluffy solid without further purification.

R_f = 0.49 [Cyclohexane/EtOAc (8:2)].

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 5.17 (s, 6H, $3CH_2$), 7.19 (s, 2H, H2, H6), 7.24-7.45 (m, 15H, 15HAr), 9.81 (s, 1H, CH=O).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 190.9 (C=O), 153.2 (ArC-3, ArC-5), 143.8 (ArC-4), 137.2 (ArC), 136.4 (ArC), 131.8 (ArC-1), 128.6 (ArCH), 128.5 (ArCH), 128.2 (ArCH), 128.1 (ArCH), 128.0 (ArCH), 127.4 (ArCH), 108.9 (ArCH-2, ArCH-6), 75.2 (CH_2), 71.2 (CH_2).

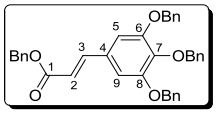
IR (ZnSe) ν_{max} 3029, 1694, 1591, 1437, 1386, 1332, 1237, 1121, 728, 694 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 447.1 (100) $[M+Na]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{28}H_{25}O_4$ $[M+H]^+$ 425.1747, found 425.1750.

m.p. 111-113 °C [lit.[331] 92-93 °C].

127b **(2*E*)-Benzyl 3-(3,4,5-tris(benzyloxy)phenyl)acrylate**



CAS : New product
CF : $C_{37}H_{32}O_5$
EM : 556.2250
MW : 556.65 g.mol^{-1}

Synthetic protocols for the compound **127b** were adapted from List *et al*.,[268] DMAP (288 mg, 2.36 mmol), piperidine (234 µL, 2.36 mmol) and phenylmethyl hydrogen propanedioate **8** (4.58 g, 23.57 mmol) were dissolved in anhydrous DMF (25 mL) and stirred at r.t. during 1 h. To the resulting solution was then added a solution of aldehyde **126** (5 g, 11.78 mmol) in anhydrous DMF (15 mL). The reaction mixture was stirred at r.t. under argon atmosphere until the aldehyde was consumed (29 h). After which time it was concentrated in *vacuo* at 50 °C then diluted with EtOAc (150 mL), washed successively with NH_4Cl (50 mL), water (50 mL), $NaHCO_3$ (3 × 40 mL), once again with water (50 mL) and brine (60 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4, filtered and concentrated under reduced pressure to afford the expected α,β-unsaturated product **127b** as a yellowish solid (6.49 g, quasi-quantitative) without further purification.

R_f = 0.54 [Cyclohexane/EtOAc (8:2)].

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 5.10 (s, 2H, CH_2), 5.11 (s, 4H, $2CH_2$), 5.24 (s, 2H, CH_2), 6.32 (d, $^3J_{2\text{-}3trans}$ = 15.9 Hz, 1H, H2), 6.82 (s, 2H, H5, H9), 7.27-7.43 (m, 20H, 20HAr), 7.58 (d, $^3J_{3\text{-}2trans}$ = 15.9 Hz, 1H, H3).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 166.7 (C_1=O), 153.0 (ArC-6, ArC-8), 145.0 (CH-3), 140.5 (ArC-7), 137.5 (ArC), 136.7 (ArC), 136.0 (ArC), 129.8 (ArC-4), 128.6 (ArCH), 128.5 (ArCH), 128.5 (ArCH), 128.3 (ArCH), 128.2 (ArCH), 128.2 (ArCH), 128.0 (ArCH), 127.9 (ArCH), 127.4 (ArCH), 117.1 (CH-2), 107.8 (ArCH-5, ArCH-9), 75.2 (CH_2), 71.2 (CH_2), 66.3 (CH_2).

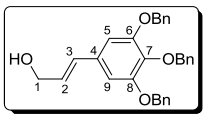
IR (ZnSe) ν_{max} 3031, 1699, 1637, 1584, 1504, 1275, 1154, 1118, 989, 742, 696 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 579.1 (100) $[M+Na]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{37}H_{32}O_5Na$ 579.2141, found 579.2147.

m.p. 116-118 °C.

78 **(2*E*)-3-(3,4,5-Tris(benzyloxy)phenyl)prop-2-en-1-ol**



CAS : 332386-68-2
MW : 452.54 g.mol^{-1}
EM : 452.1988
FM : $C_{30}H_{28}O_4$

According to the procedure described in litterature,[347] to a solution of benzyl (*E*)-3,4,5-tris(benzyloxy)cinnamate (**127b**, 5.17 g, 9.29 mmol) in dry toluene (65 mL) at –78 °C under an argon atmosphere, DIBAl-H (27.9 mL of 1 M solution in toluene, 27.9 mmol) was slowly added. The reaction mixture was stirred at –78 °C for 2 h, then cooled to 0 °C before diluting with EtOAc (50 mL). This mixture was then carefully quenched with 1 M HCl solution (100 mL) under stirring at 0 °C for 10 min. The aqueous layer was extensively extracted with EtOAc (3 × 50 mL). The combined organic layers were washed successively with water (3 × 100 mL) and brine (100 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4, filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography, eluting with cyclohexane/EtOAc 9:1 (to remove benzyl alcohol) then 8:2, to afford the expected (*E*)-3,4,5-tris(benzyloxy)cinnamyl alcohol **78** as a white solide (3.91 g, 93%).

R$_f$ = 0.13 [Cyclohexane/EtOAc (8 :2)].

^{1}H-NMR (300 MHz, CDCl$_3$) δ 1.71 (s, 1H, OH), 4.28 (dd, $^3J_{1\text{-}2}$ = 5.6 Hz, $^4J_{1\text{-}3}$ = 0.9 Hz, 2H, H1), 5.09 (s, 2H, CH_2), 5.12 (s, 4H, 2CH_2), 6.21 (dt, $^3J_{2\text{-}3trans}$ = 15.8 Hz, $^3J_{2\text{-}1}$ = 5.7 Hz, 1H, H2), 6.48 (d, $^3J_{3\text{-}2trans}$ = 15.9 Hz, 1H, H3), 6.70 (s, 2H, H5, H9), 7.28-7.47 (m, 15H, 15HAr).

^{13}C-NMR (75 MHz, CDCl$_3$) δ 152.9 (ArC-6, ArC-8), 138.2 (ArC-7), 137.7 (ArC), 137.0 (ArC), 132.4 (ArC-4), 130.8 (CH-2), 128.5 (ArCH), 128.4 (ArCH), 128.1 (ArCH), 128.0 (ArCH), 127.8 (ArCH), 127.7 (CH-3), 127.3 (ArCH), 106.2 (ArCH-5, ArCH-9), 75.2 (CH_2), 71.2 (CH_2), 63.5 (CH_2-OH).

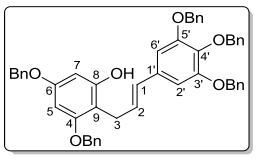
IR (ZnSe) ν_{max} 3307, 3031, 2862, 1583, 1506, 1429, 1337, 1245, 1129, 967, 734, 695 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 475.1 (100) [M+Na]$^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{30}H_{28}O_4Na$ [M+Na]$^+$ 475.1879, found 475.1875.

m.p. 101-102 °C [lit.[331] 87-88 °C].

79 (1*E*)-1-[3,4,5-Tris(benzyloxy)phenyl]-3-[2,4-bis(benzyloxy)-6-hydroxyphenyl]propene



CAS : 332386-61-5
CF : $C_{50}H_{44}O_6$
EM : 740.3138
MW : 740.88 g.mol^{-1}

According to the literature,[327] to a solution of 3,5-bis(benzyloxy)phenol (**77**, 2.71 g, 8.85 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (140 mL) was added Montmorillonite K10 clay (2.66 g, 0.3 g/mmol). The resulting pink suspension was vigorously stirred at r.t. for 15 min under argon atmosphere before a dropwise addition of a solution of (*E*)-3-(3,4,5-tris(benzyloxy)phenyl)prop-2-en-1-ol (**78**, 1.35 g, 2.98 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (45 mL) over a period of 20 min. The resulting purple-pink suspension was stirred for 3 h at r.t. under argon atmosphere. The crude reaction mixture was then filtered through a plug of Celite® washed with CH_2Cl_2 (40 mL). The brown-orange solid residue was purified by column chromatography, eluting with *n*-hexane/EtOAc (9:1) to recover 3,5-bis(benzyloxy)phenol (1.75 g, 97%) then with cyclohexane/EtOAc (9:1) to afford the expected product **79** as a white amorphous solid (1.50 g, 68%). The spectral data was consistent with literature values.[331,332]

R$_f$ = 0.48 [Cyclohexane/EtOAc (8:2)].

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3.60 (d, $^3J_{4\text{-}3}$ = 5.9 Hz, 2H, H3), 5.01 (s, 2H, O*C*H$_2$Ph), 5.06 (s, 2H, O*C*H$_2$Ph), 5.07 (s, 2H, O*C*H$_2$Ph), 5.09 (s, 4H, O*C*H$_2$Ph), 5.18 (s, 1H, 8-OH), 6.17-6.27 (m, 1H, H2), 6.20 (d, $^4J_{8\text{-}6}$ = 2.1 Hz, 1H, H7), 6.32 (d, $^4J_{6\text{-}8}$ = 2.2 Hz, 1H, H5), 6.37 (d, $^3J_{2\text{-}3}$ = 15.8 Hz, 1H, H1), 6.67 (s, 2H, H2', H6'), 7.28-7.47 (m, 25H, 25HAr).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ158.8, 157.9, 155.6 (ArC-4, ArC-6, ArC-8), 152.9 (ArC-3', ArC-5'), 137.8, 137.8, 137.1, 137.1 (ArC), 136.8 (ArC-4'), 133.2 (ArC-1'), 130.2 (CH-1), 128.6, 128.5, 128.4, 128.1, 128.0 (ArCH), 127.9 (CH-2), 127.8, 127.7, 127.5, 127.4, 127.2 (ArCH), 106.9 (ArC-9), 105.9 (ArCH-2', ArCH-6'), 95.1 (ArCH-7), 93.7 (ArCH-5), 75.2, 71.2, 70.3, 70.1 (O*C*H$_2$Ph), 26.3 (CH_2-3).

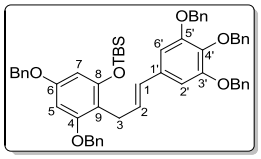
IR (ZnSe) ν_{max} 3391, 3031, 2924 2854, 1584, 1504, 1429, 1149, 1100, 735, 696 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 763.3 (100) [M+Na]$^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{50}H_{44}O_6Na$ [M+Na]$^+$ 763.3030, found 763.3037.

m.p. 140-142 °C [lit.[331] 120-121 °C, lit.[332] 129-131 °C].

80 **(1*E*)-3-[2,4-Bis(benzyloxy)-6-[*tert*-butyl dimethyl siloxyl]phenyl]-1-[3,4,5-tris(benzyloxy)phenyl]-propene**



CAS : 332386-55-7
CF : $C_{56}H_{58}O_6Si$
EM : 854.4003
MW : 855.14 g.mol^{-1}

According to the same procedure described in litterature,[331,332,325] except that DMF was replaced by CH_2Cl_2, imidazole (924 mg, 13.56 mmol) was added to a solution of phenol **79** (3.35 g, 4.52 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (80 mL), followed by introduction of TBSCl (818 mg, 5.43 mmol). The reaction mixture was then stirred for 17 h at r.t. under argon atmosphere, during which time a white precipitate was formed. After removing the white solid by filtration, the filtrate was diluted with CH_2Cl_2 (70 mL) and washed successively with 1 M aqueous solution of HCl (2 × 50 mL), water (50 mL), brine (80 mL), dried over Na_2SO_4, concentrated under reduced pressure. The resulting white solid was purified by silica gel column chromatography with cyclohexane/EtOAc (98:2), to afford the expected product **80** as a white solid (3.58 g, 93%). All spectral characteristics of **80** were identical to those reported in literature.

R$_f$ = 0.57 [Cyclohexane/EtOAc (8:2)].

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 0.20 (s, 6H, 2CH_3), 1.01 (s, 9H, 3CH_3), 3.49 (d, $^3J_{3\text{-}2}$ = 4.6 Hz, 2H, H3), 5.01 (s, 2H, O*C*H_2Ph), 5.03 (s, 4H, 2O*C*H_2Ph), 5.06 (s, 4H, 2O*C*H_2Ph), 6.12 (d, $^4J_{7\text{-}5}$ = 2.3 Hz, 1H, H7), 6.16-6.24 (m, 2H, H1, H2), 6.30 (d, $^4J_{5\text{-}7}$ = 2.3 Hz, 1H, H5), 6.58 (s, 2H, H2', H6'), 7.23-7.44 (m, 25H, 25HAr).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ158.3, 158.1, 154.7 (ArC-4, ArC-6, ArC-8), 152.8 (ArC-3', ArC-5'), 137.9, 137.5, 137.3, 137.2 (ArC), 137.0 (ArC-4'), 134.0 (ArC-1'), 129.3 (CH-1), 128.9 (CH-2), 128.6, 128.5, 128.4 (overlapping), 128.1, 127.9, 127.8, 127.7 (overlapping), 127.4 (overlapping), 127.2 (ArCH), 112.0 (ArC-9), 105.8 (ArCH-2', ArCH-6'), 98.4 (ArCH-7), 93.8 (ArCH-5), 75.2, 71.2, 70.2, 70.1 (O*C*H_2Ph), 26.8 (CH_2-3), 25.8 (CH_3), 18.3 (Cq), –4.1 (CH_3).

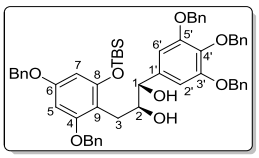
IR (ZnSe) ν_{max} 2928, 2857, 1584, 1429, 1148, 1112, 837, 734, 696 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 877.4 (80) $[M+Na]^+$, 1731.4 (100) $[2M+Na]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{56}H_{58}O_6SiNa$ $[M+Na]^+$ 877.3894, found 877.3898.

m.p. 90-92 °C [lit.[331] 91-92 °C, lit.[332] 88-90 °C].

81 **(–)-(1*S*,2*S*)-3-[2,4-Bis(benzyloxy)-6-[*tert*-butyl dimethylsiloxyl]phenyl]-1-[3,4,5-tris(benzyloxy)phenyl]propane-1,2-diol**



CAS : 942122-64-7
CF : $C_{56}H_{60}O_8Si$
EM : 888.4057
MW : 889.16 g.mol^{-1}

Following the same procedure described in the literature,[331,325] except that CH_2Cl_2 was replaced by THF, AD-mix-α (2.28 g, 1.4 g/mmol of substrate) was added to mixed solvent H_2O/*t*-BuOH (1:1, v/v, 30 mL), and stirred at r.t. for 30 min. This solution was cooled down to 0 °C before the addition of methanesulfonamide (465 mg, 4.89 mmol), followed by compound **80** (1.39 g, 1.63 mmol) in THF (15 mL) over 15 min. After stirring at r.t. for 24 h, AD-mix-α (760 mg) and $MeSO_2NH_2$ (155 mg, 1.63 mmol) were again added to the reaction mixture. The stirring was continued for another 16 h after which TLC indicated the completion of the reaction. The reaction was then quenched by addition of $Na_2S_2O_3$ (10 g/15 mL of water) at r.t. The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (3 × 50 mL). The combined organic layers were washed with water (2 × 50 mL), brine (2 × 50 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4, filtered and concentrated under reduced pressure to afford diol **81** as a yellow foam in quantitative yield (1.45 g, 41% ee) which was used directly for next step without further purification. Enantiomeric purity of diol was assessed by HPLC analysis [Daicel *ChiralPak*® IA (25 cm, 0.46 cm diameter), elution with *n*-hexane/*i*-PrOH 8:2 at flow rate of 1.0 mL/min], t_R = 15.6 min for the (*R*,*R*) isomer and t_R = 18.3 min for the (*S*,*S*)-isomer.

R_f = 0.38 [Cyclohexane/EtOAc (8:2)].

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 0.25 (s, 3H, CH_3), 0.26 (s, 3H, CH_3), 1.05 (s, 9H, $3CH_3$), 2.66 (d, $^3J_{OH\text{-}H2}$ = 5.3 Hz, 1H, 2-OH), 2.93 (d, $^3J_{3\text{-}2}$ = 7.1 Hz, 2H, H3), 3.34 (d, $^3J_{OH\text{-}H1}$ = 2.7 Hz, 1H, 1-OH), 3.94-4.01 (m, 1H, H2), 4.50 (bs, 1H, H1), 5.08 (s, 4H, 2O*CH*$_2$Ph), 5.11 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.12 (s, 4H, 2O*CH*$_2$Ph), 6.22 (d, $^4J_{7\text{-}5}$ = 2.2 Hz, 1H, H7), 6.40 (d, $^4J_{5\text{-}7}$ = 2.1 Hz, 1H, H5), 6.80 (s, 2H, H2', H6'), 7.32-7.52 (m, 25H, 25HAr).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 158.3, 158.2, 155.1 (ArC-4, ArC-6, ArC-8), 152.6 (ArC-3', ArC-5'), 137.9 (ArC), 137.7 (ArC-4'), 137.1 (ArC), 136.7 (ArC), 136.3 (ArC-1'), 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.0 (overlapping), 127.9, 127.6 (overlapping), 127.4, 127.2, 127.0 (ArCH), 109.7 (ArC-9), 106.2 (ArCH-2', ArCH-6'), 98.8 (ArCH-7), 94.1 (ArCH-5), 76.7 (CH-1), 75.4 (CH-2), 75.0, 71.0, 70.4, 70.1 (O*CH*$_2$Ph), 27.6 (CH_2-3), 25.7 (CH_3), 18.1 (Cq), -4.1 (CH_3), -4.3 (CH_3).

IR (ZnSe) ν_{max} 3517, 2928, 2856, 1589, 1433, 1147, 1113, 835, 735, 696 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 911.5 (85) $[M+Na]^+$, 1799.4 (100) $[2M+Na]^+$.

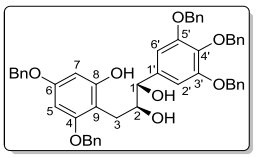
HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{56}H_{60}O_8SiNa$ $[M+Na]^+$ 911.3949, found 911.3967.

m.p. [lit.[331] 147-148 °C].

$[\alpha]_D^{25}$ –7.5° (*c* 1.00, $CHCl_3$) [lit.[331] $[\alpha]_D^{20}$ –9° (c 1.00, CH_2Cl_2), lit.[332] –6.5° (*c* 1.00, $CHCl_3$)].

UV/Vis λ_{max} 233 nm.

82 **(+)-(1*S*,2*S*)-3-[2,4-Bis(benzyloxy)-6-hydroxylphenyl]-1-[3,4,5-tris(benzyloxy)phenyl]propane-1,2-diol**



CAS : 332386-60-4
CF : $C_{50}H_{46}O_8$
EM : 774.3193
MW : 774.90 g.mol^{-1}

According to the literature,[331,332,325] to a solution of compound **81** (1.45 g, 1.63 mmol) in dry THF (21 mL) at r.t. was added TBAF (1.8 mL, 1 M solution in THF, 1.80 mmol). The resulting solution was stirred at r.t. under an argon atmosphere for 30 min before quenching with a saturated aqueous sodium bicarbonate solution (15 mL). The mixture was diluted with water (10 mL) and subsequently extracted with EtOAc (2 × 50 mL). The combined organic extracts were successively washed with water (50 mL), brine (2 × 50 mL), dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel, eluting with CH_2Cl_2 to remove the impureties, then with CH_2Cl_2/MeOH (99:1) to furnish the desired product **82** as yellowish solid (1.23 g, 97%) with spectroscopic data in very good agreement with those reported.

R$_f$ = 0.38 [CH_2Cl_2/MeOH (98:2)].

^{1}H-NMR (300 MHz, CDCl$_3$) δ 2.50 (d, ^3J = 4.3 Hz, 1H, OH), 2.76 (dd, ^2J = 14.6 Hz, $^3J_{3\text{-}2}$ = 8.2 Hz, 1H, H3a), 2.91 (dd, ^2J = 14.6 Hz, $^3J_{3\text{-}2}$ = 3.4 Hz, 1H, H3b), 3.05 (d, ^3J = 1.9 Hz, 1H, OH), 3.90-3.97 (m, 1H, H2), 4.44-4.48 (m, 1H, H1), 4.90 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.00-5.06 (m, 8H, 4O*CH*$_2$Ph), 6.21 (d, $^4J_{5\text{-}7}$ = 2.2 Hz, 1H, H5), 6.27 (d, $^4J_{7\text{-}5}$ = 2.2 Hz, 1H, H7), 6.61 (s, 2H, H2' and H6'), 7.15-7.43 (m, 25H, 25HAr), 7.82 (s, 1H, Ar-OH).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl$_3$) δ 159.0, 157.8 (ArC-4, ArC-6), 157.2 (ArC-8), 152.7 (ArC-3', ArC-5'), 138.0 (ArC-4'), 137.8, 136.8, 136.7 (ArC), 136.1 (ArC-1'), 128.5, 128.4 (overlapping), 128.1, 127.9, 127.8, 127.7, 127.5, 127.4, 126.6 (ArCH), 106.3 (ArCH-2', ArCH-6'), 106.1 (ArC-9), 95.9 (ArCH-7), 93.5 (ArCH-5), 76.8 (CH-1), 76.6 (CH-2, hidden in the solvent signals, observed on the DEPT135 spectrum), 75.1, 71.1, 70.0 (overlapping) (O*CH*$_2$Ph), 26.7 (CH_2-3).

IR (ZnSe) ν_{max} 3367, 1591, 1501, 1437, 1148, 1105, 735, 696 cm^{-1}.

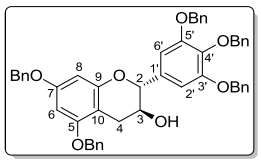
LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 797.3 (100) $[M+Na]^+$, 1571.0 (70) $[2M+Na]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{50}H_{46}O_8Na$ $[M+Na]^+$ 797.3084, found 797.3069.

m.p. 159-161 °C [lit.[331] 158-159 °C, lit.[332] 144-145 °C].

$[\alpha]_D^{20}$ lit.[331] +10.0° (c 1.00, CH_2Cl_2), $[\alpha]_D^{25}$ lit.[332] +11.61° (*c* 1.00, $CHCl_3$).

85a **(–)-(2*R*,3*S*)-*trans*-5,7-bis(benzyloxy)-2-[3,4,5-tris(benzyloxy)phenyl]chroman-3-ol**



CAS : 332386-72-8
CF : $C_{50}H_{44}O_7$
EM : 756.3087
MW : 756.88 g.mol^{-1}

According to the literature,[325] to a solution of compound **82** (800 mg, 1.03 mmol) in dry CH_2Cl_2 (15 mL) was added triethyl orthoformate (540 µL, 3.24 mmol), followed by PPTS (150 mg, 0.60 mmol). The mixture was stirred at r.t. for 10 min. After that, the mixture was heated to 55 °C for 36 h until TLC showed the reaction had been completed. After evaporation of the solvent, the residue was redissolved in CH_2Cl_2 (10 mL), and MeOH (10 mL), K_2CO_3 (450 mg, 3.24) was added, and the mixture was stirred for 10 min. The solvent was evaporated, and the residue was purified by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc = 9:1) to afford the desired product **85a** as white solid (697 mg, 89%, 40% ee) with spectroscopic data in very good agreement with those reported.[325,332,336] 40 mg aliquots were then separated by semi-preparative HPLC (Daicel Chiralpak® IA column, 25 cm × 10 mm diameter, 0-60 min : *n*-hexane/*i*-PrOH/$CHCl_3$ = 64:1:35, 10 mL/min) to afford the (–)-enantiomer **85a** as a white solid (24 mg, 53% yield based on **82**) and the (+)-enantiomer **85a** as a white solid (12 mg, 27% yield based on **82**) with identical NMR spectra as the (–)-enantiomer.[336]

R$_f$ = 0.50 [Cyclohexane/EtOAc (7:3)].

HPLC analysis, t_R major enantiomer = 19.3 min, t_R minor enantiomer = 25.7 min (Daicel Chiralpak® IA column, 25 cm × 4.6 mm diameter, 0-60 min : *n*-hexane/*i*-PrOH/$CHCl_3$ = 64:1:35, 1.0 mL/min).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.62 (d, $^3J_{OH-3}$ = 3.6 Hz, 1H, OH), 2.66 (dd, ^2J = 16.4 Hz, $^3J_{4-3}$ = 9.0 Hz, 1H, H4a), 3.12 (dd, ^2J = 16.4 Hz, $^3J_{4-3}$ = 5.7 Hz, 1H, H4b), 3.93-4.02 (m, 1H, H3), 4.62 (d, $^3J_{2-3}$ = 8.1 Hz, 1H, H2), 5.02 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.05 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.07 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.12 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.13 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 6.24 (d, $^4J_{8-6}$ = 2.1 Hz, 1H, H8), 6.30 (d, $^4J_{6-8}$ = 2.1 Hz, 1H, H6), 6.74 (s, 2H, H2', H6'), 7.27-7.46 (m, 25H, 25HAr).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 158.8, 157.7, 155.1 (ArC-5, ArC-7, ArC-9), 153.0 (ArC-3', ArC-5'), 138.7 (ArC-4'), 137.7, 136.9, 136.8 (ArC), 133.2 (ArC-1'), 128.6, 128.5 (overlapping), 128.1, 128.0, 127.9 (overlapping), 127.8, 127.5 (overlapping), 127.1 (ArCH), 106.8 (ArCH-2', ArCH-6'), 102.2 (ArC-10), 94.4 (ArCH-6), 93.9 (ArCH-8), 81.8 (CH-2), 75.2, 71.2, 70.1, 69.9 (O*CH*$_2$Ph), 68.2 (CH-3), 27.6 (CH_2-4).

IR (ZnSe) ν_{max} 3467, 3031, 2928, 1618, 1592, 1499, 1438, 1147, 1116, 736, 696 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 779.3 (100) $[M+Na]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{50}H_{44}O_7Na$ $[M+Na]^+$ 779.2979, found 779.2972.

m.p. [lit.[332] 116-118 °C].

UV/Vis λ_{max} 264 nm.

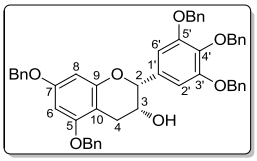
Major enantiomer (CAS: 332386-71-7) $[\alpha]_D^{25}$ –7.5° (*c* 1.00, $CHCl_3$) [lit.[325] –7.21 (*c* 1.00, $CHCl_3$), lit.[332,67] –8.96 (*c* 1.00, $CHCl_3$), lit.[331] $[\alpha]_D^{20}$ –7.0 (*c* 1.00, $CHCl_3$)].

DC (λ_{max} (nm), $\Delta\varepsilon$) 224, –2.4 ; 248, +0.6 ; 277, –0.8 (0.25 mg/mL, CH_3CN, 25 °C).

Minor enantiomer (CAS: 332386-70-6) $[\alpha]_D^{25}$ +5.4° (*c* 1.00, $CHCl_3$) [lit.[336] +9.7 (*c* 0.35, $CHCl_3$)].

DC (λ_{max} (nm), $\Delta\varepsilon$) 226, +4.4 ; 248, –1.1 ; 279, +1.4 (0.25 mg/mL, CH_3CN, 25 °C).

85b **(–)-(2*R*,3*R*)-*cis*-5,7-Bis(benzyloxy)-2-[3,4,5-tris(benzyloxy)phenyl]chroman-3-ol**



CAS : 332386-75-1
CF : $C_{50}H_{44}O_7$
EM : 756.3087
MW : 756.88 g.mol^{-1}

According to the literature,[325] to a suspension of **85a** (743 mg, 0.982 mmol), $NaHCO_3$ (412 mg, 4.91 mmol) in CH_2Cl_2 (9.8 mL) at r.t. un argon atmosphere was added Dess-Martin periodinane (500 mg, 1.18 mmol) in one portion. After stirring at r.t. for 30 min, 18 µL of water were added and the stirring was maintained for an additional 30 min after which TLC showed the completion of the reaction. Subsequently, saturated $NaHCO_3$ solution (15 mL) and 10% aqueous $Na_2S_2O_3$ solution (15 mL) were added to quench the reaction. After extraction with CH_2Cl_2 (3 × 40 mL), the combined organic phases were washed with brine (2 × 50 mL), dried over Na_2SO_4, evaporated and dried overnight under vacuum. The resulting ketone **86** was dissolved in dry THF (20 mL) under argon atmosphere, and the solution was cooled to –78 °C. Then L-Selectride (1.96 mL, 1 M solution in THF, 1.96 mmol) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at –78 °C for 2 h. Upon completion, the reaction was quenched with saturated aqueous $NaHCO_3$ solution (15 mL) at r.t. The aqueous layer was then extracted with EtOAc (3 × 25 mL). The combined organic phases were washed with brine (2 × 30 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated. The residue was purified by chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc = 85:15) to afford the desired product **85b** (422 mg, 57% over 2 steps, 42% ee) as a white foam with spectroscopic data in very good agreement with those reported.[325,329,337]

40 mg aliquots were then separated by semi-preparative HPLC (Daicel Chiralpak® IA column, 25 cm × 10 mm diameter, 0-60 min : *n*-hexane/*i*-PrOH/$CHCl_3$ = 49:1:50, 10 mL/min) to afford the (–)-enantiomer **85b** as a yellowish sticky solid (23 mg, 33% yield based on **85a**) and the (+)-enantiomer **85b** as a yellowish solid (10 mg, 14% yield based on **85a**) with identical NMR spectra as the (–)-enantiomer.

R$_f$ = 0.44 [Cyclohexane/EtOAc (8:2)].

HPLC analysis, t_R major enantiomer = 8.1 min, t_R minor enantiomer = 21.9 min (Daicel Chiralpak® IA column, 25 cm × 4.6 mm diameter, 0-60 min : *n*-hexane/*i*-PrOH/$CHCl_3$ = 49:1:50, 1.0 mL/min).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.65 (d, $^3J_{OH\text{-}3}$ = 5.4 Hz, 1H, OH), 2.93 (dd, ^2J = 17.3 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 4.2 Hz, 1H, H4a), 3.02 (dd, ^2J = 17.3 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 2.0 Hz, 1H, H4b), 4.21-4.22 (m, 1H, H3), 4.90 (s, 1H, H2), 5.03 (s, 4H, 2O*CH*$_2$Ph), 5.06 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.14 (s, 4H, 2O*CH*$_2$Ph), 6.29 (s, 2H, H6, H8), 6.82 (s, 2H, H2', H6'), 7.27-7.45 (m, 25H, 25HAr).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 158.8, 158.3, 155.1 (ArC-5, ArC-7, ArC-9), 153.0 (ArC-3', ArC-5'), 138.4 (ArC-4'), 137.8, 137.0, 136.9 (ArC), 133.7 (ArC-1'), 128.6, 128.5 (overlapping), 128.4, 128.1, 128.0, 127.9 (overlapping), 127.8, 127.5 (overlapping), 127.2 (ArCH), 106.2 (ArCH-2', ArCH-6'), 101.0 (ArC-10), 94.7, 94.1 (ArCH-6, ArCH-8), 78.5 (CH-2), 75.2, 71.3, 70.1, 70.0 (O*CH*$_2$Ph), 66.4 (CH-3), 28.1 (CH_2-4).

IR (ZnSe) ν_{max} 3563, 2924, 1618, 1592, 1498, 1438, 1149, 1114, 735, 696 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 779.3 (100) $[M+Na]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{50}H_{44}O_7Na$ $[M+Na]^+$ 779.2979, found 779.3012.

m.p. [lit.[337] 40-42 °C, lit.[329] 135-137 °C].

UV/Vis λ_{max} 264 nm.

Major enantiomer (CAS: 332386-74-0)
$[\alpha]_D^{25}$ –16.1° (*c* 1.00, $CHCl_3$) [lit.[325] –9.62° (*c* 1.00, $CHCl_3$), lit.[337] $[\alpha]_D^{24}$ –16.7° (*c* 1.20, $CHCl_3$)].

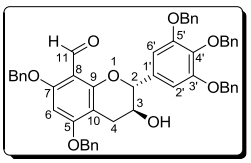
DC (λ_{max} (nm), $\Delta\varepsilon$) 223, –6.9; 248, +0.3; 277, –0.2 (0.25 mg/mL, CH_3CN, 25 °C).

Minor enantiomer (CAS: 332386-73-9)

$[\boldsymbol{\alpha}]_D^{25}$ +15.7° (*c* 1.00, $CHCl_3$) [lit.[325] +9.41 (*c* 1.00, $CHCl_3$)].

DC (λ_{max} (nm), $\Delta\varepsilon$) 224, +6.9; 251, –0.3; 279, +0.3 (0.25 mg/mL, CH_3CN, 25 °C).

132a **(2*R*,3*S*)-8-Formyl-5,7,3',4',5'-pentakis(benzyloxy)flavan-3-ol**



CAS : New product
CF : $C_{51}H_{44}O_8$
EM : 784.3036
MW : 784.89 g.mol^{-1}

To a solution of compound **85a** (200 mg, 0.264 mmol) in anhydrous DMF (2 mL) at 0 °C, a solution of $POCl_3$ (370 µL, 3.96 mmol) in DMF (5 mL) which was previously stirred for 1 h at r.t., was added. The mixture was then stirred at r.t. for 18 h. The reaction was quenched with saturated aqueous Na_2CO_3 solution (40 mL). EtOAc (20 mL) was added. The phases were separated, and the aqueous phase was extracted with EtOAc (3 × 30 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated in *vacuo*. The residue containing resulting ester **131a** was redissolved in EtOAc (3 mL) and MeOH (3 mL), K_2CO_3 (110 mg, 0.796 mmol) were added, and the mixture was stirred for 10 min at r.t. The solvent was evaporated and the residue was purified by chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc = 7:3) to afford the desired product **132a** (186 mg, 90%, 40% ee) as a white foam.

R_f = 0.2 [Cyclohexane/EtOAc (6:4)].

HPLC analysis, t_R minor enantiomer = 12.0 min, t_R major enantiomer = 31.6 min (Daicel Chiralpak® IA column, 25 cm × 4.6 mm diameter, 0-60 min : *n*-hexane/*i*-PrOH/$CHCl_3$ = 44:1:55, 1.0 mL/min).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2.40 (bs, 1H, OH), 2.65 (dd, ^2J = 16.5 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 8.1 Hz, 1H, H4a), 2.94 (dd, ^2J = 16.4 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 5.2 Hz, 1H, H4b), 3.97-3.99 (m, 1H, H3), 4.82 (d, $^3J_{2\text{-}3}$ = 7.2 Hz, 1H, H2), 5.07 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.09 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.10 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.11 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.17 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 6.22 (s, 1H, H6), 6.76 (s, 2H, H2', H6'), 7.29-7.50 (m, 25H, 25HAr), 10.45 (s, 1H, H11).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 187.3 (C_{11}=O), 162.0, 161.0, 157.3 (ArC-5, ArC-7, ArC-9), 152.7 (ArC-3', ArC-5'), 138.2 (ArC-4'), 137.7, 136.8, 136.2, 135.8 (ArC), 133.0 (ArC-1'), 128.6, 128.6, 128.5, 128.3, 128.2, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7, 127.4, 127.0, 126.8 (ArCH), 108.6 (ArC-8), 106.1 (ArCH-2', ArCH-6'), 102.5 (ArC-10), 90.8 (ArCH-6), 81.4 (CH-2), 75.1, 71.0, 70.6, 70.1 (O*CH*$_2$Ph), 66.9 (CH-3), 26.8 (CH_2-4).

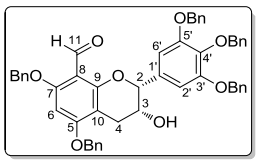
IR (ZnSe) ν_{max} 3436, 3031, 2924, 1671, 1597, 1221, 1120, 735, 697 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 807.3 (100) $[M+Na]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{51}H_{44}O_8Na$ $[M+Na]^+$ 807.2928, found 807.2918.

UV/Vis λ_{max} 254, 280 nm.

132b **(2*R*,3*R*)-8-Formyl-5,7,3',4',5'-pentakis(benzyloxy)flavan-3-ol**



CAS : New product
CF : $C_{51}H_{44}O_8$
EM : 784.3036
MW : 784.89 g.mol^{-1}

To a solution of compound **85b** (412 mg, 0.544 mmol) in anhydrous DMF (5 mL) at 0 °C, a solution of $POCl_3$ (507 µL, 5.44 mmol) in DMF (5 mL) which was previously stirred for 1 h at r.t., was added. The mixture was then stirred at r.t. for 15 h. The reaction mixture was diluted with EtOAc (50 mL) and subsequently quenched with saturated aqueous Na_2CO_3 solution (18 mL) at 0 °C. The phases were separated, and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 × 25 mL). The combined organic layers were washed with water (25 mL), brine (3 × 25 mL), dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated in *vacuo*. The residue containing resulting ester **131b** was redissolved in EtOAc (5 mL) and MeOH (5 mL), K_2CO_3 (226 mg, 1.63 mmol) were added, and the mixture was stirred for 10 min at r.t. After removing of the solids by filtration, the filtrate was concentrated and the resulting residue was purified by chromatography on silica gel, eluting with CH_2Cl_2 to remove the impureties, then with cyclohexane/EtOAc (8:2) to furnish the desired product **132b** (299 mg, 70%, 42% ee) as a yellowish sticky solid.

R$_f$ = 0.16 [Cyclohexane/EtOAc (8:2)].

HPLC analysis, t_R minor enantiomer = 27.4 min, t_R major enantiomer = 45.5 min (Daicel Chiralpak® IA column, 25 cm × 4.6 mm diameter, 0-60 min : *n*-hexane/*i*-PrOH/$CHCl_3$ = 49:1:50, 1.0 mL/min).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.67 (bs, 1H, OH), 2.87 (dd, ^2J = 17.2 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 4.3 Hz, 1H, H4a), 3.03 (dd, ^2J = 17.2 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 1.4 Hz, 1H, H4), 4.31 (bs, 1H, H3), 5.03 (s, 1H, H2), 5.07-5.23 (m, 10H, 5O*CH*$_2$Ph), 6.21 (s, 1H, H6), 6.95 (s, 2H, H2', H6'), 7.27-7.46 (m, 25H, 25HAr), 10.53 (s, 1H, H11).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 187.0 (C_{11}=O), 162.4, 161.4, 156.8 (ArC-5, ArC-7, ArC-9), 152.7 (ArC-3', ArC-5'), 137.7 (ArC-4'), 137.7, 136.8, 136.1, 135.8 (ArC), 132.9 (ArC-1'), 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.0, 127.9, 127.8, 127.6 (overlapping), 127.4, 127.0, 126.7 (ArCH), 108.6 (ArC-8), 105.3 (ArCH-2', ArCH-6'), 101.2 (ArC-10), 90.5 (ArCH-6), 78.2 (CH-2), 74.9, 70.8, 70.5, 70.0 (O*CH*$_2$Ph), 64.8 (CH-3), 27.2 (CH_2-4).

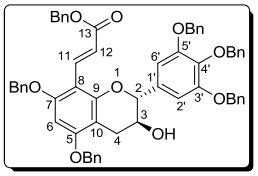
IR (ZnSe) ν_{max} 3452, 3031, 2925, 1669, 1598, 1227, 1121, 734, 697 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 785.1 (100) $[M+H]^+$, 807.3 (45) $[M+Na]^+$.

HRMS (FD-TOF) calcd for $C_{51}H_{44}O_8$ $[M]^{\ddagger}$ 784.3036, found 784.3016.

UV/Vis λ_{max} 254, 280 nm.

(–)-133a **(–)-(2*R*,3*S*)-*trans*-8-((*E*)-Benzyl prop-2-enoate)-5,7,3',4',5'-pentakis(benzyloxy) flavan-3-ol**



CAS : New product
CF : $C_{60}H_{52}O_9$
EM : 916.3611
MW : 917.05 g.mol^{-1}

According to the litterature,[268] to a solution of DMAP (37 mg, 0.306 mmol), piperidine (30 µL, 0.306 mmol) and phenylmethyl hydrogen propanedioate **8** (208 mg, 1.07 mmol) in anhydrous DMF (2 mL) previously stirred at r.t. for 30 min was added a solution of aldehyde **132a** (400 mg, 0.51 mmol) in anhydrous DMF (5 mL). The resulting mixture was stirred at r.t. under nitrogen atmosphere until the aldehyde was completely consumed (20 h). The mixture was then diluted with EtOAc (100 mL), washed successively with NH_4Cl (2 × 30 mL), $NaHCO_3$ (2 × 30 mL), water (2 × 30 mL), and brine (2 × 30 mL), then dried over anhydrous Na_2SO_4, filtered and concentrated in *vacuo*. The residue was first purified by column chromatography on silica gel with cyclohexane/EtOAc (8:2 to remove impurities, then 7:3) to afford the expected α,β-unsaturated product **133a** as a yellowish solid (356 mg, 76%, 38% ee). This mixture was then separated by semi-preparative HPLC (Daicel Chiralpak® IA column, 25 cm × 10 mm diameter, 0-60 min : *n*-hexane/*i*-PrOH/$CHCl_3$ = 60:0.4:39.6, 10 mL/min) to afford the enantiomer **(+)-133a** as a yellowish solid (96 mg, 20% yield based on **132a**) and the enantiomer **(–)-133a** as an off-white sticky solid (180 mg, 39% yield based on **132a**) with identical NMR spectra as the **(+)-133a**.

R$_f$ = 0.55 [Cyclohexane/EtOAc (7:3)].

HPLC analysis, t_R minor enantiomer = 19.3 min, t_R major enantiomer = 22.7 min (Daicel Chiralpak® IA column, 25 cm × 4.6 mm diameter, 0-60 min : *n*-hexane/*i*-PrOH/$CHCl_3$ = 64:1:35, 1.0 mL/min).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.90 (bs, 1H, 3-OH), 2.68 (dd, ^2J = 16.6 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 8.3 Hz, 1H, H4a), 2.99 (dd, ^2J = 16.6 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 5.5 Hz, 1H, H4b), 3.92-3.99 (m, 1H, H3), 4.78 (d, $^3J_{2\text{-}3}$ = 7.5 Hz, 1H, H2), 5.03 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.09 (s, 6H, 3O*CH*$_2$Ph), 5.16 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.19 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 6.25 (s, 1H, H6), 6.75 (s, 2H, H2' and H6'), 6.96 (d, $^3J_{12\text{-}11trans}$ = 16.2 Hz, 1H, H12), 7.24-7.49 (m, 30H, 30HAr), 8.31 (d, $^3J_{11\text{-}12trans}$ = 16.3 Hz, 1H, H11).

^{13}C-NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$) δ168.5 (C_{13}=O), 158.7, 158.4 (ArC-5, ArC-7), 154.9 (ArC-9), 152.9 (ArC-3', ArC-5'), 138.4 (ArC-4'), 137.8, 136.8, 136.5, 136.5, 136.3 (ArC), 135.8 (CH-11), 133.1 (ArC-1'), 128.6 (overlapping), 128.5, 128.4 (overlapping), 128.1 (overlapping), 128.0, 127.8 (overlapping), 127.7, 127.4, 127.1, 127.0 (ArCH), 117.9 (CH-12), 106.1 (ArCH-2', ArCH-6'), 105.8 (ArC-8), 102.6 (ArC-10), 91.2 (ArCH-6), 81.6 (CH-2), 75.2, 71.2, 70.8, 70.0 (O*CH*$_2$Ph), 67.5 (CH-3), 65.6 (O*CH*$_2$Ph), 27.1 (CH_2-4).

IR (ZnSe) ν_{max} 3464, 3031, 2925, 1702, 1598, 1121, 735, 696 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 939.4 (100) $[M+Na]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{60}H_{52}O_9Na$ $[M+Na]^+$ 939.3503, found 939.3505.

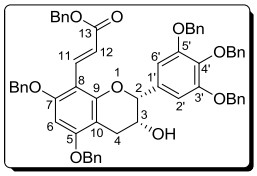
UV/Vis λ_{max} 252, 316 nm.

m.p. 177-178 °C.

Major enantiomer $[\alpha]_D^{25}$ –114.0° (*c* 1.00, $CHCl_3$).
DC (λ_{max} (nm), Δε) 250, –9.0 ; 312, –15.7 (0.25 mg/mL, CH_3CN, 25 °C).

Minor enantiomer $[\alpha]_D^{25}$ +77.3° (*c* 1.00, $CHCl_3$).
DC (λ_{max} (nm), Δε) 249, +7.9 ; 312, +14.1 (0.25 mg/mL, CH_3CN, 25 °C).

(–)-133b **(–)-(2*R*,3*R*)-*cis*-8-((*E*)-Benzyl prop-2-enoate)-5,7,3',4',5'-pentakis(benzyloxy) flavan-3-ol**



CAS : New product
CF : $C_{60}H_{52}O_9$
EM : 916.3611
MW : 917.05 g.mol^{-1}

According to the litterature,[268] to a solution of aldehyde **132b** (291 mg, 0.371 mmol) in dry DMF (2 mL) was added dropwise a mixture of DMAP (9.1 mg, 74.2 µmol), piperidine (7.3 µL, 74.2 µmol) and phenylmethyl hydrogen propanedioate **8** (144 mg, 0.742 mmol) in dry DMF (2 mL) previously stirred at r.t. under argon atmosphere for 1 h earlier. The reaction mixture was then stirred at r.t. under argon for 16 h. After which time, it was diluted with EtOAc (150 mL), washed successively with 0.5 M HCl aqueous solution (4 × 5 mL), water (10 mL), $NaHCO_3$ (4 × 10 mL), and brine (2 × 25 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4, filtered and concentrated. The resulting residue was purified by column chromatography with cyclohexane/EtOAc (9:1 to remove impurities, then 85:15) to give the expected α,β-unsaturated product **133b** as a yellowish foam (262 mg, 77%, 42% ee). This mixture was then separated by semi-preparative HPLC (Daicel Chiralpak® IA column, 25 cm × 10 mm diameter, 0-60 min : *n*-hexane/i-PrOH/$CHCl_3$ = 59:1:40, 10 mL/min) to afford the enantiomer **(–)-133b** as an off-white sticky solid (170 mg, 50% yield based on **132b**) and the enantiomer **(+)-133b** as a yellowish solid (75 mg, 22% yield based on **132b**) with identical NMR spectra as the (–)-enantiomer.

R$_f$ = 0.58 [Cyclohexane/EtOAc (7:3)].

HPLC analysis, t_R major enantiomer = 19.7 min, t_R minor enantiomer = 23.6 min (Daicel Chiralpak® IA column, 25 cm × 4.6 mm diameter, 0-40 min : *n*-hexane/*i*-PrOH/$CHCl_3$ = 59:1:40, 1.0 mL/min).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.63 (d, $^3J_{OH-3}$ = 4.0 Hz, 1H, OH), 2.91 (dd, ^2J = 17.3 Hz, $^3J_{4-3}$ = 4.2 Hz, 1H, H4a), 3.03 (dd, ^2J = 17.4 Hz, $^3J_{4-3}$ = 1.4 Hz, 1H, H4b), 4.26 (bs, 1H, H3), 5.02 (s, 3H, O*CH*$_2$Ph, H2), 5.09 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.14 (d, ^2J = 12.5 Hz, 1H, O*CH*Ph), 5.15 (s, 6H, 3O*CH*$_2$Ph), 5.20 (d, ^2J = 12.6 Hz, 1H, O*CH*Ph), 6.23 (s, 1H, H6), 6.87 (s, 2H, H2', H6'), 7.02 (d, $^3J_{12\text{-}11trans}$ = 16.2 Hz, 1H, H12), 7.24-7.49 (m, 30H, 30HAr), 8.38 (d, $^3J_{11\text{-}12trans}$ = 16.2 Hz, 1H, H11).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 168.5 (C_{13}=O), 159.3, 158.4, 154.9 (ArC-5, ArC-7, ArC-9), 153.1 (ArC-3', ArC-5'), 138.2 (ArC-4'), 137.9, 137.0, 136.6, 136.5, 136.4 (ArC), 136.0 (CH-11), 133.1 (ArC-1'), 128.6 (overlapping), 128.5, 128.4 (overlapping), 128.1 (overlapping), 128.0, 127.8 (overlapping), 127.7, 127.5, 127.1, 127.0 (ArCH), 117.8 (CH-12), 106.0 (ArC-8), 105.5 (ArCH-2', ArCH-6'), 101.4 (ArC-10), 91.3 (ArCH-6), 78.8 (CH-2), 75.2, 71.2, 70.8, 70.0 (O*CH*$_2$Ph), 65.7 (CH-3), 65.6 (O*CH*$_2$Ph), 27.7 (CH_2-4).

IR (ZnSe) ν_{max} 3481, 3032, 2925, 1701, 1598, 1216, 1120, 734, 696 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 915.4 (100) $[M-H]^-$.

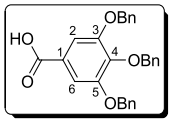
HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{60}H_{52}O_9Na$ $[M+Na]^+$ 939.3503, found 939.3501.

UV/Vis λ_{max} 252, 316 nm.

Major enantiomer $[\alpha]_D^{25}$ –221.5° (*c* 1.00, $CHCl_3$)
DC (λ_{max} (nm), Δε) 232, –3.9 ; 309, –14.9 (0.25 mg/mL, CH_3CN, 25 °C).

Minor enantiomer $[\alpha]_D^{25}$ +225.4° (*c* 1.00, $CHCl_3$).
DC (λ_{max} (nm), Δε) 232, +2.7 ; 310, +10.2 (0.25 mg/mL, CH_3CN, 25 °C).

134 3,4,5-Tris(benzyloxy)benzoic acid



CAS : 1486-48-2
CF : $C_{28}H_{24}O_5$
EM : 440.1624
MW : 440.49 g.mol^{-1}

Compound **134** was prepared by using a modification of the procedure described in the literature.[346,350] To a stirred ice-cold solution of **124** (1.36 g, 3 mmol) in a mixture of ethanol/THF (1:1, v/v, 25 mL) was added NaOH (192 mg, 4.8 mmol). The reaction mixture was heated to reflux at 80 °C for 2 h. The solvent was removed, the residue was then redissolved in THF (40 mL) and subsequently cooled to 0 °C before addition of HCl 1M aqueous solution (5 mL) and stirred for 30 min. The resulting mixture was diluted with EtOAc (150 mL) and washed with brine (3 × 20 mL), dried over Na_2SO_4, filtered and evaporated. The residue was taken up in THF (30 mL) and filtered through a pad of silice (0.5 cm), and the pad was then washed with THF (30 mL). Evaporation of the solvent furnished the expected product **134** as a yellowish solid (1.32 g, 99%).

R_f = 0.13 [Cyclohexane/EtOAc (8:2)].

^{1}H-NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 5.04 (s, 2H, CH_2), 5.18 (s, 4H, $2CH_2$), 7.34 (s, 2H, H2, H6), 7.27-7.48 (m, 15H, 15HAr), 12.9 (bs, 1H, OH).

^{13}C-NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ 166.8 (C=O), 152.0 (ArC-3, ArC-5), 141.0 (ArC-4), 137.4 (ArC), 136.8 (ArC), 128.4 (ArCH), 128.2 (ArCH), 128.1 (ArCH), 127.9 (ArCH), 127.6 (ArCH), 126.0 (ArC-1), 108.2 (ArCH-2, ArCH-6), 74.2 (CH_2), 70.2 (CH_2).

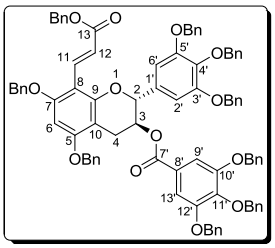
IR (ZnSe) ν_{max} 3418, 2924, 1686, 1595, 1432, 1337, 1130, 732, 693 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 463.2 (100) $[M+Na]^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{28}H_{24}O_5Na$ $[M+Na]^+$ 463.1516, found 463.1530.

m.p. 196.2-197.4 °C [lit.[350] 194-195 °C (EtOH), lit.[366] 196-196.5 °C (benzene-PET)].

(–)-135a **(–)-(2*R*,3*S*)-*trans*-8-((*E*)-Benzyl prop-2-enoate)-5,7-bis(benzyloxy)-2-[3,4,5-tris(benzyloxy)phenyl]chroman-3-yl 3,4,5-tris(benzyloxy)benzoate



CAS : New product
CF : $C_{88}H_{74}O_{13}$
EM : 1338.5129
MW : 1339.52 g.mol^{-1}

According to the litterature,[337] to a solution of **(–)-133a** (70 mg, 76.3 µmol) and 3,4,5-tris(benzyloxy)benzoic acid (**134**, 50 mg, 114,5 µmol) in CH_2Cl_2/THF (2:1, v/v, 6 mL) were added DMAP (7 mg, 53,4 µmol), Et_3N (53 µL, 382 µmol), and EDCI.HCl (37 mg, 191 µmol) at 0 °C. After stirring for 14 h at r.t., the reaction was quenched by adding NH_4Cl (7 mL) at 0 °C. The products were extracted with EtOAc (3 × 15 mL) and the combined organic extracts were washed with brine (30 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4, and concentrated in *vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/EtOAc = 9:1) to afford the desired product **(–)-135a** as white solid (88 mg, 86%).

R_f = 0.45 [Cyclohexane/EtOAc (7:3)].

HPLC analysis, t_R = 6.4 min (Daicel Chiralpak® IA column, 25 cm × 4.6 mm diameter, 0-35 min : *n*-hexane/*i*-PrOH/$CHCl_3$ = 64:1:35, 1.0 mL/min).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2.74 (dd, ^2J = 17.2 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 4.8 Hz, 1H, H4a), 2.89 (dd, ^2J = 17.1 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 4.4 Hz, 1H, H4b), 4.95 (s, 4H, 2O*CH*$_2$Ph), 5.02 (s, 4H, 2O*CH*$_2$Ph), 5.04 (s, 4H, 2O*CH*$_2$Ph), 5.06 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.16 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.19 (s, 2H, O*CH*$_2$Ph), 5.37 (d, $^3J_{2\text{-}3}$ = 4.8 Hz, 1H, H2), 5.50-5.55 (m, 1H, H3), 6.25 (s, 1H, H6), 6.64 (s, 2H, H2', H6'), 6.99 (d, $^3J_{12\text{-}11trans}$ = 16.2 Hz, 1H, H12), 7.24-7.43 (m, 47H, H9', H13', 45HAr), 8.36 (d, $^3J_{11\text{-}12trans}$ = 16.3 Hz, 1H, H11).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 168.6 (C_{13}=O), 165.2 ($C_{7'}$=O), 158.6, 158.5, 154.5 (ArC-5, ArC-7, ArC-9), 152.9 (ArC-3', ArC-5'), 152.4 (ArC-10', ArC-12'), 142.7 (ArC-11'), 138.3 (ArC-4'), 137.8, 137.4, 136.8, 136.5 (overlapping), 136.4, 136.2 (ArC), 135.8 (CH-11), 133.0 (ArC-1'), 128.7 (ArCH), 128.6 (ArCH), 128.5 (ArCH), 128.4 (overlapping), 128.2 (ArCH), 128.1 (overlapping), 128.0, 127.9 (overlapping), 127.7, 127.6, 127.4, 127.2, 127.1 (ArCH), 124.8 (ArC-8'), 118.0 (CH-12), 109.2 (ArCH-9', ArCH-13'), 105.7 (ArC-8), 105.5 (ArCH-2', ArCH-6'), 101.5 (ArC-10), 91.0 (ArCH-6), 78.0 (CH-2), 75.1 (overlapping), 71.2, 71.1, 70.8, 70.1 (O*CH*$_2$Ph), 68.9 (CH-3), 65.8 (O*CH*$_2$Ph), 22.7 (CH_2-4).

IR (ZnSe) ν_{max} 3032, 2926, 1712, 1599, 1214, 1116, 735, 696 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 1361.5 (100) $[M+Na]^+$.

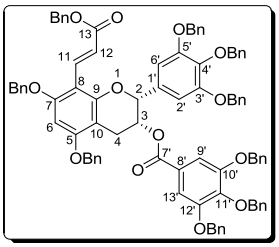
HRMS (FD-TOF) calcd for $C_{88}H_{74}O_{13}$ $[M]^{\ddagger}$ 1338.5129, found 1338.5157.

UV/Vis λ_{max} 248, 312 nm.

$[\alpha]_D^{25}$ –22.3° (*c* 1.00, $CHCl_3$).

DC (λ_{max} (nm), $\Delta\varepsilon$) 228, +78.8 ; 252, –28.7 ; 317, –10.0 (0.25 mg/mL, CH_3CN, 25 °C).

(–)-135b **(–)-(2*R*,3*R*)-*cis*-8-((*E*)-Benzyl prop-2-enoate)-5,7-bis(benzyloxy)-2-[3,4,5-tris(benzyloxy)phenyl]chroman-3-yl 3,4,5-tris(benzyloxy)benzoate



CAS : New product
CF : $C_{88}H_{74}O_{13}$
EM : 1338.5129
MW : 1339.52 g.mol^{-1}

According to the procedure described in the litterature,[337] to a solution of 3,4,5-tris(benzyloxy)benzoic acid (**134**, 43 mg, 99 µmol), DMAP (1.2 mg, 9.9 µmol), Et_3N (34 µL, 246 µmol), and EDCI.HCl (28 mg, 146 µmol) in dry THF (0.75 mL) at 0 °C was added a solution of **(–)-133b** (45 mg, 49 µmol) in dry CH_2Cl_2 (1.5 mL). After stirring for 20 h at r.t. under protection from the light, the reaction was quenched by adding a saturated aqueous solution of NH_4Cl (2 mL) at 0 °C. The resulting mixture was diluted with EtOAc (30 mL), washed with saturated aqueous solution of NH_4Cl (4 × 5 mL), brine (5 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4, filtered and concentrated in *vacuo*. The remaining residue was absorbed on silica gel and purified by column chromatography, eluting with *n*-hexane/toluene/EtOAc = 3:3:0.25 then 3:3:0.5, to yield the expected product **(–)-135b** as an off-white sticky solid (58 mg, 88%) and to recover the non-reacted starting material **(–)-133b** (3 mg).

R$_f$ = 0.40 [*n*-hexane/toluene/EtOAc (3:3:0.5)].

HPLC analysis, t_R = 12.2 min (Daicel Chiralpak® IA column, 25 cm × 4.6 mm diameter, 0-35 min : *n*-hexane/*i*-PrOH/$CHCl_3$ = 59:1:40, 1.0 mL/min).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3.10-3.11 (m, 2H, H4), 4.83-5.17 (m, 18H, 9×O*CH*$_2$Ph) 5.19 (s, 1H, H2), 5.69-5.70 (m, 1H, H3), 6.28 (s, 1H, H6), 6.86 (s, 2H, H2', H6'), 7.07 (d, $^3J_{12\text{-}11trans}$ = 16.2 Hz, 1H, H12), 7.21-7.43 (m, 47H, H9', H13', 45HAr), 8.46 (d, $^3J_{11\text{-}12trans}$ = 16.2 Hz, 1H, H11).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 168.5 (C_{13}=O), 164.9 ($C_{7'}$=O), 159.0, 158.5, 155.3 (ArC-5, ArC-7, ArC-9), 153.0 (ArC-3', ArC-5'), 152.3 (ArC-10', ArC-12'), 142.6 (ArC-11'), 138.2 (ArC-4'), 137.8, 137.4, 136.9, 136.5, 136.4, 136.3, 136.2 (ArC), 135.9 (CH-11), 132.8 (ArC-1'), 128.7, 128.6, 128.4, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 128.1, 127.9, 127.8, 127.8, 127.8, 127.7, 127.6, 127.4, 127.2, 127.1 (ArCH), 124.8 (ArC-8'), 118.0 (CH-12), 108.9 (ArCH-9', ArCH-13'), 106.0 (ArCH-2', ArCH-6'), 105.9 (ArC-8), 101.2 (ArC-10), 91.2 (ArCH-6), 78.0 (CH-2), 75.1, 75.0, 71.2, 70.9, 70.8, 70.1 (O*CH*$_2$Ph), 67.7 (CH-3), 65.7 (O*CH*$_2$Ph), 26.0 (CH_2-4).

IR (ZnSe) ν_{max} 3032, 2928, 1712, 1598, 1215, 1115, 734, 696 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 1361.5 (100) $[M+Na]^+$.

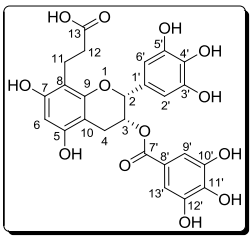
HRMS (FD-TOF) calcd for $C_{88}H_{74}O_{13}$ $[M]^{\ddagger}$ 1338.5129, found 1338.5143.

UV/Vis λ_{max} 248, 312 nm.

$[\alpha]_D^{25}$ –193.0° (*c* 1.00, $CHCl_3$).

DC (λ_{max} (nm), $\Delta\varepsilon$) 228, –29.9 ; 249, –3.6 ; 308, –43.7 (0.25 mg/mL, CH_3CN, 25 °C).

(–)-136d **(–)-(2*R*,3*R*)-8-(Propanoic acid)epigallocatechin-3-gallate**



CAS : New product
CF : $C_{25}H_{22}O_{13}$
EM : 530.1060
MW : 530.43 g.mol^{-1}

To a stirred solution of per-*O*-benzyl-8-benzyloxy acrylate epigallocatechin-3-gallate (**(–)-135b**, 58 mg, 43.3 µmol) in a previously degassed mixture of THF/MeOH/CH_2Cl_2 (4:4:1, v/v/v, 6.3 mL) under argon atmosphere was added 10 wt % Pd/C (46 mg Pd/C, 43.3 µmol Pd). Vacuum and H_2 were alternated, and the mixture was then stirred at r.t. under an H_2 atmosphere for 20 h. After which time, TLC showed the completion of the reaction. The solvents were evaporated at r.t., the resulting crude residue was dissolved in acetone/water (9/1, v/v, 3 mL), filtered through cotton/Celite® (*via* a Pasteur pipet) and the solid was washed with acetone/water (9/1, v/v, 5 × 1 mL). The filtrate was concentrated under reduced pressure to afford the expected product **(–)-136d** as a pale pink powder in quantitative yield (23 mg) without further purification.

R_f = 0.35 [C18 reverse phase TLC, 30% CH_3CN/0.1% HCOOH].

HPLC analysis, t_R = 23.2 min (Varian Microsorb C18 column, 25 cm × 10 mm diameter, 5µm; method: 0-25 min: 0 to 30% CH_3CN/0.1% HCOOH, 25-35 min: 30 to 100% CH_3CN/0.1% HCOOH, 1.0 mL/min).

^{1}H-NMR (300 MHz, acetone-d_6/D_2O (95:5)) δ 2.57-2.67 (m, 2H, H12), 2.83-3.05 (m, 4H, H4, H11), 5.07 (s, 1H, H2), 5.44 (bs, 1H, H3), 6.08 (s, 1H, H6), 6.71 (s, 2H, H2', H6'), 7.03 (s, 2H, H9', H13').

^{13}C-NMR (75 MHz, acetone-d_6/D_2O (95:5)) δ 177.6 (C_{13}=O), 166.5 ($C_{7'}$=O), 155.1, 154.9, 154.3 (ArC-5, ArC-7, ArC-9), 146.1 (ArC-3', ArC-5'), 145.7 (ArC-10', ArC-12'), 138.8 (ArC-11'), 132.8 (ArC-4'), 130.8 (ArC-1'), 121.4 (ArC-8'), 109.9 (ArCH-9', ArCH-13'), 106.8 (ArC-8), 106.3 (ArCH-2', ArCH-6'), 98.8 (ArC-10), 96.5 (ArCH-6), 77.9 (CH-2), 69.6 (CH-3), 35.1 (CH_2-12), 26.6 (CH_2-4), 19.2 (CH_2-11).

IR (ZnSe) ν_{max} 3363, 1693, 1617, 1537, 1453, 1344, 1237, 1101, 1036 cm^{-1}.

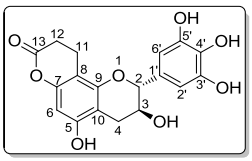
LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 529.1 (100) $[M–H]^-$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{25}H_{21}O_{13}$ $[M–H]^-$ 529.0987, found 529.0995.

UV/Vis λ_{max} 242, 277 nm.

$[\alpha]_D^{25}$ –169.2° (*c* 1.00, acetone/H_2O (9:1)).

(–)-137a **(–)-(2*R*,3*S*)-Gallocatechin-7,8-caprolactone**



CAS : New product
CF : $C_{18}H_{16}O_8$
EM : 360.0845
MW : 360.31 g.mol^{-1}

Debenzylation and reduction of compound **(–)-133a** (36 mg, 39.3 µmol) in mixture of THF/MeOH/CH_2Cl_2 (4:4:1, v/v/v, 6.75 mL) was carried out under H_2 atmosphere at r.t. for 20 h in the presence of 10 wt % Pd/C (30 mg Pd/C, 28.2 µmol Pd). Upon completion, the reaction mixture was filtered through Celite®, and the solid was washed with acetone (30 mL). After evaporation of the solvents, the resulting acid **136a** was redissolved in anhydrous DMF (1.5 mL), and EDCI.HCl (9 mg, 47.1 µmol) was added. The reaction mixture was stirred at r.t. for 19 h under argon atmosphere, after which time TLC indicated complete consumption of the starting material to give the corresponding lactone gallocatechin. The reaction mixture was diluted with EtOAc (10 mL) and quenched by adding a saturated aqueous solution of NH_4Cl (10 mL). The aqueous phase was then extracted with EtOAC (3 × 25 mL). The combined organic layers were washed with brine (25 mL), dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated in *vacuo*. The remaining residue was absorbed on silica gel and purified by column chromatography, eluting with CH_2Cl_2/MeOH = 9:1, to yield the expected product **(–)-137a** as an off-white solid (7 mg, 49%).

R$_f$ = 0.6 [CH_2Cl_2/MeOH (8:2)].

^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3CN) δ 2.50 (dd, ^2J = 16.5 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 7.8 Hz, 1H, H4a), 2.64-2.69 (m, 2H, H12), 2.75-2.84 (m, 3H, H4b, H11), 3.95-4.02 (m, 1H, H3), 4,65 (d, $^3J_{2\text{-}3}$ = 7.2 Hz, 1H, H2), 6.15 (s, 1H, H6), 6.40 (s, 2H, H2', H6').

^{13}C-NMR (75 MHz, CD_3CN) δ169.7 (C_{13}=O), 155.3, 152.7, 152.1 (ArC-5, ArC-7, ArC-9), 146.2 (ArC-3', ArC-5'), 133.1, 131.5 (ArC-1', ArC-4'), 107.1 (ArCH-2', ArCH-6'), 105.3, 102.8 (ArC-8, ArC-10), 96.4 (ArCH-6), 82.4 (CH-2), 67.6 (CH-3), 29.5 (CH_2-12), 28.0 (CH_2-4), 18.0 (CH_2-11).

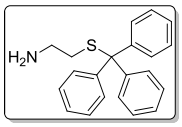
IR (ZnSe) ν_{max} 3394, 2919, 2850, 1744, 1618, 1455, 1113, 1059 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 359.1 (100) $[M–H]^–$.

HRMS (FD-TOF) calcd for $C_{18}H_{16}O_8$ $[M]^{‡}$ 360.0845, found 360.0852.

$[\alpha]_D^{25}$ –23.6° (*c* 0.86, CH_3CN).

140 **2-[(Triphenylmethyl)thio]ethanamine**



CAS : 1095-85-8
CF : $C_{21}H_{21}NS$
EM : 319.1395
MW : 319.46 g.mol^{-1}

Compound 2-[(triphenylmethyl)thio]ethanamine (**140**) was prepared by an adaption of the procedure reported by Liu *et al.*[352] To a stirred solution of 2-mercaptoethylamine (815 mg, 10.56 mmol) in CH_2Cl_2 anhydrous (4 mL) at 0 °C under argon atmosphere, was added dropwise trifluoroacetic acid (TFA, 1.6 mL) followed by chlorotriphenylmethane (2,68 g, 9.60 mmol) to afford dark brown solution. The solution mixture was stirred for 2 h at 0 °C under Ar then concentrated and dissolved in $CHCl_3$ (5 mL). The resulting solution was stirred vigorously mixed with 3 M NaOH (8 mL) at r.t. for 1 h. The suspension was then extracted with $CHCl_3$ (3 × 60 mL), the combined organics layers were washed with brine (3 × 30 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated to afford the desired product **140** as a yellowish solid in quasi-quantitative yield without further purification (3,03 g, 9.47 mmol).

R_f = 0.57 [CH_2Cl_2/MeOH (9:1)].

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.39 (bs, 2H, NH_2), 2.35 (t, ^3J = 6.5 Hz, 2H, CH_2-S), 2.60 (t, ^3J = 6.5 Hz, 2H, CH_2-NH_2), 7.21-7.27 (m, 3H, 3CHAr), 7.29-7.34 (m, 6H, 6CHAr), 7.47-7.50 (m, 6H, 6CHAr).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 144.7 (ArC), 129.3 (ArCH), 127.6 (ArCH), 126.4 (ArCH), 66.3 (Cq), 40.8 (CH_2-NH_2), 36.0 (CH_2-S).

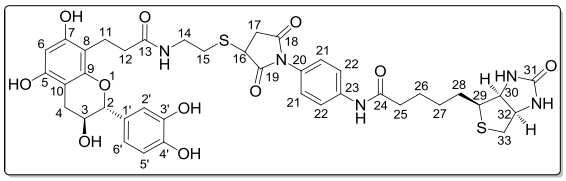
IR (ZnSe) ν_{max} 3370, 3055, 3028, 2920, 2858, 1594, 1488, 1444, 1033, 743, 700 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 243.1 (84) [Trityl]$^+$, 342.3 (100) [M+Na]$^+$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{21}H_{21}NNaS$ [M+Na]$^+$ 342.1292, found 342.1285.

m.p. 94-96 °C [lit.[367] 90-93 °C from petroleum ether].

143a **Catechin-8-biotin maleimide adduct**



CAS : New product
CF : $C_{40}H_{45}N_5O_{11}S_2$
EM : 835.2557
MW : 835.94 g.mol^{-1}

To a stirred solution of (2*R*,3*S*)-8-lactone catechin **6a** (13 mg, 38 µmol) in distilled CH_3CN (2 mL) was added 2-[(triphenylmethyl)thio]ethanamine (**140**, 12 mg, 38 µmol). The reaction mixture was stirred at room temperature overnight under argon atmosphere. After complete consumption of the lactone monitored by TLC, the solvent was evaporated and the crude mixture was purified by column chromatography, eluting with CH_2Cl_2/MeOH (98:2) to furnish the expected product **141** (20 mg, 80%) as a white solide [R_f = 0.60, CH_2Cl_2/MeOH (9:1)]. The detritylation of the compund **141** (12 mg, 18 µmol) was carried out in presence of triisopropylsilane (20 µL, 90 µmol) and trifluoroacetic acid (15 µL, 180 µmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (2 mL) at r.t. for 4 h using a procedure reported by Basit et *al*.[353] After removing of the solvent and volatiles under reduced pressure, the residual byproduct was triturated with *n*-hexane/CH_2Cl_2 mixture (1:1, 5 × 2 mL) and dried *in vacuo* to afford the free thiol **142** [R_f = 0.20, CH_2Cl_2/MeOH (9:1)] which was taken up in DMSO-d_6 (0.5 mL) prior to the addition a solution of biotin maleimide **50** (6 mg, 14.5 µmol) in DMSO-d_6. The mixture was shaken at 40 °C for 4 h after which time ^{1}H-NMR analysis indicated completion of the reaction. After removing of DMSO-d_6 by extracting with Et_2O/$CHCl_3$ (9:1, 10 × 1 mL), the resulting precipitate was washed carefully with EtOAc (3 × 0.5 mL) then with Et_2O/$CHCl_3$ (9:1, 3 × 0.5 mL), and dried under high vacuum to furnish the product **143a** (9.6 mg, 80%) as a yellowish solid.

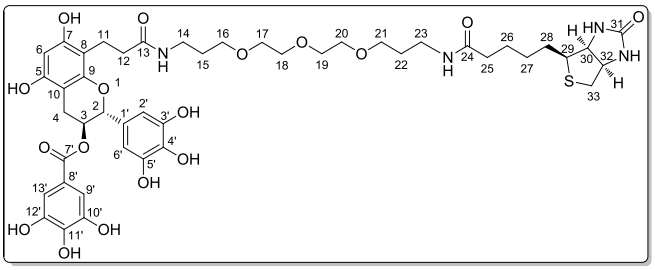
^{1}H-NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 1.34-1.43 (m, 2H, H27), 1.45-1.72 (m, 4H, H26, H28), 2.07-2.18 (m, 1H, H15a), 2.33 (t, $^3J_{25\text{-}26}$ = 7.3 Hz, 2H, H25), 2.38-2.92 (m, 10H, H4, H11, H12, H15b, H17a, H33), 3.11-3.19 (m, 1H, H29), 3.26-3.32 (m, 3H, H14, H17b), 3.74-3.82 (m, 1H, H3), 4.09-4.16 (m, 2H, H16, H30), 4.27-4.33 (m, 1H, H32), 4.56 (d, $^3J_{2\text{-}3}$ = 7.0 Hz, 1H, H2), 4.88 (d, ^3J = 5.0, 1H, C3-OH), 5.97 (s, 1H, H6), 6.37 (s, 1H, C_{32}-NH), 6.45 (s, 1H, C_{30}-NH), 6.59 (dd, $^3J_{6'\text{-}5'}$ = 8.2 Hz, $^3J_{6'\text{-}2'}$ = 1.7 Hz, 1H, H6'), 6.68 (d, $^3J_{5'\text{-}6'}$ = 8.1 Hz, 1H, H5'), 6.71 (d, $^3J_{2'\text{-}6'}$ = 1.7 Hz, 1H, H2'), 7.18 (d, $^3J_{21\text{-}22}$ = 8.8 Hz, 2H, H21), 7.68 (d, $^3J_{22\text{-}21}$ = 8.9 Hz, 2H, H22), 7.94 (t, J = 5.6 Hz, 1H, C_{13}-NH), 8.85 (bs, 2H, Ar-OH), 8.95 (s, 1H, Ar-OH), 8.99 (s, 1H, Ar-OH), 10.07 (s, 1H, C_{24}-NH).

^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ 176.1, 174.4 (C_{18}=O, C_{19}=O), 172.9 (C_{13}=O), 171.5 (C_{24}=O), 162.8 (C_{31}=O), 153.8, 153.7 (ArC-5, ArC-7), 153.0 (ArC-9), 144.8, 144.7 (ArC-3', ArC-4'), 139.3 (ArC-23), 131.0 (ArC-1'), 127.4 (ArCH-21), 126.9 (C20), 119.3 (ArCH-22), 117.9 (ArCH-6'), 115.1 (ArCH-5'), 114.3 (ArCH-2'), 105.1 (ArC-8), 99.1 (ArC-10), 95.2 (ArCH-6), 80.9 (CH-2), 66.4 (CH-3), 61.1 (CH-30), 59.3 (CH-32), 55.4 (CH-29), 39.8 (CH_2-33) and 39.4 (CH-16) hidden in the solvent residual signals, observed on the DEPT135 and HSQC spectrums, 38.2 (CH_2-14), 36.3 (CH_2-25), 36.2 (CH_2-17), 35.2 (CH_2-12), 30.6 (CH_2-15), 28.3 (CH_2-27), 28.1 (CH_2-28), 27.7 (CH_2-4), 25.1 (CH_2-26), 18.5 (CH_2-11).

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 836.0 (100) $[M+H]^+$.

UV/Vis λ_{max} 202, 225, 250 nm (lit.[242]).

144a **GCG-bearing probe**



CAS : New product
CF : $C_{45}H_{58}N_4O_{17}S$
EM : 958.3518
MW : 959.02 g.mol^{-1}

Debenzylation and reduction of compound **(–)-135a** (36 mg, 26.9 µmol) in mixture of THF/MeOH/CH_2Cl_2 (4:4:1, v/v/v, 4 mL) was carried out under H_2 atmosphere at r.t. for 18 h in the presence of 10 wt % Pd/C (29 mg Pd/C, 26.9 µmol Pd). Upon completion, the reaction mixture was filtered through Celite®, and the solid was washed with acetone (40 mL). After evaporation of the solvents, the resulting acid was redissolved in anhydrous DMF (1 mL), and EDCI.HCl (6.8 mg, 35 µmol) was added. The reaction mixture was stirred at r.t. for 22 h, after which time analytical HPLC indicated complete consumption of the starting material to give the corresponding lactone gallocatechin gallate, **29** (14.5 mg, 32.3 µmol) was added, and the reaction mixture was stirred under nitrogen atmosphere first at 45 °C and then at 50 °C for a total of 60 h. Subsequently, the mixture was allowed to reach r.t., $NaHCO_3$ (11.3 mg, 135 µmol) was added and the stirring was continued for another 64 h at r.t. after which analytical HPLC showed the completion of the reaction. The solvent was partly evaporated, and the residue was directly purified by semi-preparative HPLC (0-35 min: 0 to 30% CH_3CN/0.1% HCOOH, Varian Microsorb C18 (25 × 250 mm, 5µm), flow rate 20 mL/min) to furnish, after drying, the probe **144a** as beige sticky solid (1.2 mg, 5% over 3 steps).

HPLC analysis, t_R acid = 22.9 min, t_R lactone = 28.2 min, t_R probe = 31.0 min (Varian Microsorb C18 column, 25 cm × 10 mm diameter, 5µm; method: 0-35 min: 0 to 30% CH_3CN/0.1% HCOOH, 35-45 min: 30 to 100% CH_3CN/0.1% HCOOH, 1.0 mL/min).

^{1}H-NMR (300 MHz, acetone-d_6/D_2O (95:5)) δ 1.27-1.38 (m, 2H, H27), 1.47-1.70 (m, 8H, H15, H22, H26, H28), 2.14 (t, $^3J_{25\text{-}26}$ = 7.2 Hz, 2H, H25), 2.44-2.49 (m, 2H, H12), 2.66 (d, ^2J = 12.3 Hz, 1H, H33a), 2.62-2.90 (m, 5H, H4, H11, H33b), 3.12-3.20 (m, 5H, H14, H23, H29), 3.35-3.53 (m, 12H, H16, H17, H18, H19, H20, H21), 4.27-4.31 (m, 1H, H30), 4.45-4.50 (m, 1H, H32), 5.03 (d, $^3J_{2\text{-}3}$ = 6.5 Hz, 1H, H2), 5.20-5.26 (m, 1H, H3), 6.07 (s, 1H, H6), 6.48 (s, 2H, H2', H6'), 6.99 (s, 2H, H9', H13'), 8.34 (s, 8Ar-OH, but intensity reduced by partial hydrogen-deuterium exchange).

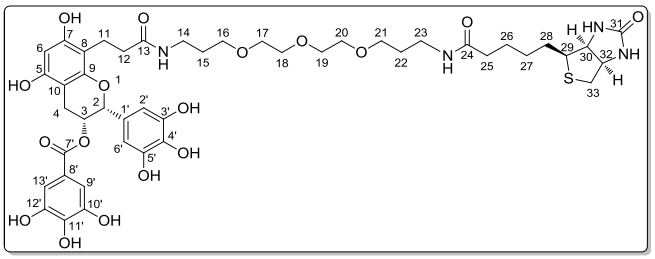
IR (ZnSe) ν_{max} 3394, 2922, 1694, 1624, 1454, 1226, 1102, 1026 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 957.2 (100) $[M–H]^–$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{45}H_{58}N_4O_{17}SNa$ $[M+Na]^+$ 981.3410, found 981.3447.

UV/Vis λ_{max} 232, 273 nm.

144b **EGCG-bearing probe**



CAS : New product
CF : $C_{45}H_{58}N_4O_{17}S$
EM : 958.3518
MW : 959.02 g.mol^{-1}

To a solution of (–)-(2*R*,3*R*)-8-(propanoic acid)epigallocatechin-3-gallate (**(–)-136d**, 23 mg, 43.3 µmol) in anhydrous DMF (0.7 mL), under argon atmosphere, was added EDCI.HCl (10 mg, 52 µmol). The mixture was stirred at r.t. for 24 h, after which time reverse phase TLC analysis indicated complete consumption of **(–)-136d** to give the corresponding lactone **137d** (R_f of lactone = 0.2, 30% CH_3CN/0.1% HCOOH). To this solution was then added **29** at one time (19.3 mg, 43.3 µmol), and the resulting mixture was argon-degased for 5 min before stirring under argon atmosphere first for 24 h at r.t. then for 48 h at 40 °C for another 48 h at 50 °C. After partial evaporation of the solvent under vacuum, the residue was purified on a flash chromatography systeme (PuriFlash450, Interchim) by C18 reverse phase column (C18 RediSep® R_f, Teledyne Isco, 13 g), eluting with 30% CH_3CN/0.1% HCOOH at flow rate 30 mL/min to afford, after drying and washing with CH_2Cl_2, the desired probe **144b** (5.6 mg, 13% over two steps) as a pale violet powder.

HPLC analysis, t_R = 16.5 min (Varian Microsorb C18 column, 25 cm × 10 mm diameter, 5µm; method: 0-25 min: 0 to 30% CH_3CN/0.1% HCOOH, 25-35 min: 30 to 100% CH_3CN/0.1% HCOOH, 1.0 mL/min).

R_f = 0.24 [C18 reverse phase TLC, 30% CH_3CN/0.1% HCOOH].

^{1}H-NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 1.25-1.31 (m, 2H, H27), 1.42-1.64 (m, 8H, H15, H22, H26, H28), 2.04 (t, $^3J_{25\text{-}26}$ = 7.4 Hz, 2H, H25), 2.30-2.36 (m, 2H, H12), 2.57 (d, ^2J = 12.4 Hz, 1H, H33a), 2.64-2.82 (m, 3H, H4α, H11), 2.81 (dd, ^2J = 12.4 Hz, $^3J_{33\text{-}32}$ = 5.1 Hz, 1H, H33b), 2.93 (dd, ^2J = 17.4 Hz, $^3J_{4\text{-}3}$ = 5.0 Hz, 1H, H4β), 3.03-3.12 (m, 5H, H14, H23, H29), 3.37-3.51 (m, 12H, H16, H17, H18, H19, H20, H21), 4.10-4.14 (m, 1H, H30), 4.28-4.32 (m, 1H, H32), 4.98 (s, 1H, H2), 5.35 (bs, 1H, H3), 5.99 (s, 1H, H6), 6.34 (s, 1H, NH-C_{32}), 6.40 (s, 1H, NH-C_{30}), 6.43 (s, 2H, H2', H6'), 6.79 (s, 2H, H9', H13'), 7.73 (t, ^3J = 5.3 Hz, 2H, NH-C_{13}, NH-C_{24}), 8.01 (s, 1H, C4'-OH), 8.68 (s, 2H, C3'-OH, C5'-OH), 8.89 (s, 1H, C11'-OH), 9.06 (s, 2H, C5-OH, C7-OH), 9.17 (s, 2H, C10'-OH, C12'-OH).

^{13}C-NMR (200 MHz, DMSO-d_6) δ 172.8 (C_{13}=O), 171.9 (C_{24}=O), 165.2 ($C_{7'}$=O), 162.7 (C_{31}=O), 153.9 (ArC-5, ArC-7), 153.2 (ArC-9), 145.7 (ArC-3', ArC-5'), 145.4 (ArC-10', ArC-12'), 138.5 (ArC-11'), 132.3 (ArC-4'), 128.9 (ArC-1'), 119.3 (ArC-8'), 108.7 (ArCH-9', ArCH-13'), 105.7 (ArC-8), 105.3 (ArCH-2', ArCH-6'), 97.4 (ArC-10), 95.6 (ArCH-6), 76.3 (CH-2), 69.7 (CH_2-18, CH_2-19), 69.5 (CH_2-17, CH_2-20), 68.1 (CH_2-16, CH_2-21), 67.9 (CH-3), 61.1 (CH-30), 59.2 (CH-32), 55.4 (CH-29), 39.8 (C-33, hidden in the solvent residual signals, observed on the DEPT135 and HSQC spectrum), 36.0 (CH_2-14), 35.7 (CH_2-23), 35.3 (CH_2-12), 35.2 (CH_2-25), 29.4 (CH_2-22), 29.3 (CH_2-15), 28.2 (CH_2-27), 28.0 (CH_2-28), 25.8 (CH_2-4), 25.3 (CH_2-26), 18.5 (CH_2-11).

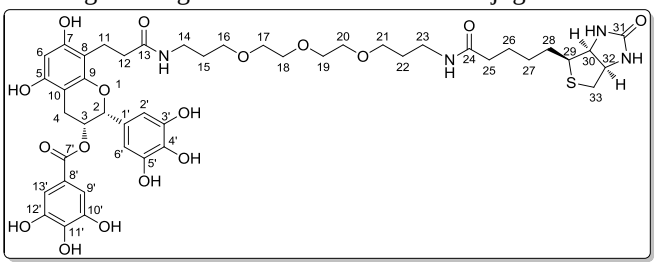
IR (ZnSe) ν_{max} 3370, 1692, 1679, 1620, 1612, 1452, 1219, 1099, 1039 cm^{-1}.

LRMS (ESIMS) *m/z* (rel. intensity) 959.3 (100) $[M+H]^+$, 981.4 (40) $[M+Na]^+$; negative mode: 957.3 (100) $[M–H]^–$.

HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{45}H_{59}N_4O_{17}S$ $[M+H]^+$ 959.3590, found 959.3621.

UV/Vis λ_{max} 233, 274 nm.

NMR signal assignments of EGCG-biotin conjugate **144b**



Position	δ_H (mult., *J* in Hz)	δ_C (mult.)	COSY	HSQC[a]	HMBC[b]
EGCG moiety					
2	4.98 (s)	76.3	H3, H4α, H4β, H2', H6'	C-2	
3	5.35 (bs)	67.9	H2, H4α, H4β	C-3	
4	α: 2.64-2.82 (m)	25.8	H3, H2, H4β	C-4	
	β: 2.93 (dd, 17.4, 5.0)		H3, H2, H4α		
5	-	153.9	-	-	
6	5.99 (s)	95.6	-	C-6	
7	-	153.9	-	-	
8	-	105.7	-	-	
9	-	153.2	-	-	
10	-	97.4	-	-	
1'	-	128.9	-	-	
2', 6'	6.43 (s)	105.3	H2, H6', H2'	C-2', C-6'	
3', 5'	-	145.7	-	-	
4'	-	132.3	-	-	
8'	-	119.3	-	-	
9', 13'	6.79 (s)	108.7	H13', H9'	C-9', C-13'	
10', 12'	-	145.4	-	-	
11'	-	138.5	-	-	
Hydroxyls (OH)					
5	9.06 (s)	-	-	-	
7	9.06 (s)	-	-	-	
4'	8.01 (s)	-	-	-	
3'	8.68 (s)	-	-	-	
5'	8.68 (s)	-	-	-	
11'	8.89 (s)	-	-	-	
10'	9.17 (s)	-	-	-	
12'	9.17 (s)	-	-	-	
Biotin-linker moiety					
11	2.64-2.82 (m)	18.5	H12	C-11	
12	2.30-2.36 (m)	35.3	H11	C-12	
14	3.03-3.12 (m)	36.0	C_{13}-NH, H15	C-14	
15	1.42-1.64 (m)	29.3	H14, H16	C-15	
16	3.37-3.51 (m)	68.1	H15	C-16	
17-20	3.37-3.51 (m)	69.7, 69.5	H17-18, H19-20, H21-22	C-17 - 20	
21	3.37-3.51 (m)	68.1	H22	C-21	
22	1.42-1.64 (m)	29.4	H21, H23	C-22	
23	3.03-3.12 (m)	35.7	H22, C_{24}-NH	C-23	
25	2.04 (t, 7.4)	35.2	H26	C-25	

Position	δ_H (mult., *J* in Hz)	δ_C (mult.)	COSY	HSQC[a]	HMBC[b]
26	1.42-1.64 (m)	25.3	H25	C-26	
27	1.25-1.31 (m)	28.2	H28	C-27	
28	1.42-1.64 (m)	28.0	H27	C-28	
29	3.03-3.12 (m)	55.4	H30	C-29	
30	4.10-4.14 (m)	61.1	H29, H32	C-30	
32	4.28-4.32 (m)	59.2	H30, H33b	C-32	
33	a: 2.57 (d, 12.4)	39.8	H33b	C-33	
	b: 2.81 (dd, 12.4, 5.1)		H32, H33a		
Carbonyls					
C_{13}=O	-	172.8	-	-	
C_{24}=O	-	171.9	-	-	
C_{31}=O	-	162.7	-	-	
$C_{7'}$=O	-	165.2	-	-	
Amides (NH)					
C_{13}-NH	7.73 (t, 5.3)	-	H14	-	
C_{24}-NH	7.73 (t, 5.3)	-	H23	-	
C_{30}-NH	6.40 (s)	-	C_{32}-NH	-	
C_{32}-NH	6.34 (s)	-	C_{30}-NH	-	

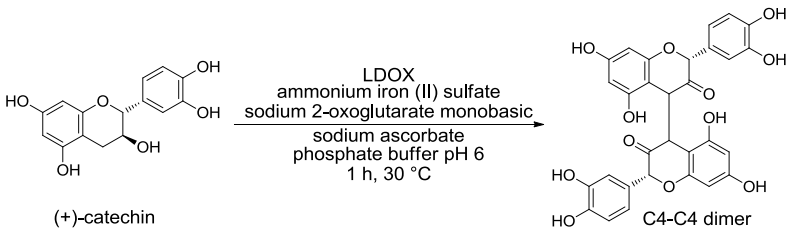
[a]Carbons directly bonded to the protons resonating at the ppm value indicated in the δ_H column. [b]Carbons are two, three or even four bonds away from the protons indicated in the left column.

3. Biological assays

3.1. Production and purification of recombinant LDOX

The pQE-30Xa vector containing the full-length coding region of LDOX in frame with an *N*-terminal His_6, amplified with a post veraison DNA library from *Vitis vinifera* cabernet sauvignon as template, was obtained from Dr. Bernard Gallois (UMR 5248, University of Bordeaux 1, France). Bacteria *E. coli* Origami™ cells (Novagen) were transformed with pQE-30Xa / LDOX constructs and grown at 37°C under agitation (220 rpm) in LB broth medium supplemented with 50 µg/ml of ampicillin until OD_{600} reached 1.1. Expression of fusion proteins was thereafter induced with 1 mM isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and bacteria were incubated at 15°C overnight under agitation. Bacterial cells were harvested by centrifugation (4500 g, 15 min, 4°C) and stored at –20°C until extraction and purification of recombinant LDOX. Bacteria containing His-tagged LDOX were resuspended in non-denaturing buffer (20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl and 5 mM imidazole, pH 7.9) and emulsified. Cell debris were removed by centrifugation at 45000g for 45 min at 4°C and supernatant containing fusion protein was applied on His·bind® resin affinity chromatography (Novabiochem) for 2 h. Resin was washed with a large volume of wash buffer (20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl and 20 mM imidazole, pH 7.9) and recombinant LDOX protein was eluted with wash buffer containing 250 mM imidazole. Finally, imidazole was removed from sample by dialysis and purified His-tagged LDOX was preserved in 0.2 M phosphate buffer pH 6 with 10% (vol/vol) of glycerol at –20°C until use. Protein concentration was measured by Bradford method using a protein-dye reagent (Bio-Rad) and BSA as a standard.[368]

3.2. LDOX enzyme assays with (+)-catechin



In order to evaluate LDOX enzyme activity, catechin (150 µM) was submitted to the enzymatic test with the partially purified LDOX (200 µg) in a reaction mixture (500 µL) containing 2-oxoglutarate (100 µM), ammonium iron (II) sulfate (50 µM) and sodium ascorbate (2.5 mM) and in 200 mM potassium phosphate buffer pH 6.0. The incubations were carried out in open vials under gentle shaking at 30°C for 1 h. After two extractions with 500 µL of EtOAc (HPLC grade), and solvent evaporation, the residue was diluted in 200 µL of MeOH (HPLC

grade) and then submitted to LC/MS analysis. C4-C4 dimer was detected by UV at 280 nm and caracterized by single ion monitoring at *m/z* 575 $[M+H]^+$.[99,243]

3.3. Production and extraction of *E. coli* proteins

Bacteria *E. coli* Origami™ cells (Novagen) were grown at 37 °C under agitation (220 rpm) in LB broth medium supplemented with 50 µg/ml of ampicillin. Expression of proteins was thereafter induced with 1 mM isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and bacteria were incubated at 15 °C overnight under agitation. Bacterial cells were harvested by centrifugation (8000 g, 15 min, 4 °C). The pellet was resuspended in 1 mL of non-denaturing buffer (phosphate 0.2 M, pH 7) and sonicated with a Sonifier® Cell Disruptor (Branson Ultrasonics). Cell debris were removed by centrifugation at 8000 *g* for 20 min at 4 °C and supernatant containing crude proteins was collected. Protein concentration (0.973 µg/µL) was measured by Bradford method using a protein-dye reagent (Bio-Rad) and BSA as a standard and kept at –20 °C until further use.

3.4. Staining

3.4.1. Coomassie® Brilliant Blue

Visualization of protein bands in a polyacrylamide gel was accomplished by staining with Coomassie® Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad) overnight at room temperature under gentle agitation.[369]

3.4.2. Colloidal Coomassie® Blue

The fixing-staining solution was freshly prepared prior to staining by mixing 4/5 of the stock solution (0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 2% (w/v) phosphoric acid, 10% (w/v) ammonium sulfate in MilliQ water) with 1/5 of ethanol. The resulting solution was immediately added to cover the gel (50 mL per mini gel). The incubation wiht gentle shaking can be performed at room temperature for a minimum of 6 hours.[370]

3.4.3. Silver staining

This modified silver stain protocol, optimized for mini gels (~7 cm × 8 cm × 0.75^{-1} mm) was adapted from a procedure described by Benbouza et *al*.[371]

1. Washing	Distillated grade water (3 × 5 minutes)
2. Fixation	Fix the gel in 50 mL of solution A (50% EtOH (v/v), 10% AcOH (v/v), 0.1 M ammonium acetate, 40% (v/v) desionazed water) during 10 minutes under shaking (the gel can be incubated in this solution few days).
3. Rinse	Distillated grade water (2 × 10 minutes)
4. Sensibilisation	Incubate the gel during 5 minutes under shaking in 50 mL of 1x solution B by adding 40 mL of distillated water to 10 mL of 5x solution B (0.075 g $Na_2S_2O_3$ in 50 mL desionized water).
5. Rinse	Distillated grade water (2 × 5 minutes, same time as incubation times in solution B).
6. Coloration	Incubate the gel in the solution C (containing about 0.05-0.08 g of silver nitrate in 50 mL desionized water) during 10 minutes under shaking.
7. Rinse	Rinse rapidly the gel with distillated water and then with 10 mL of 1x solution D prepared by adding 40 mL of distillated water to 10 mL of 5x solution D (7.5 g Na_2CO_3 and 1 mg $Na_2S_2O_3$ in 50 mL distillated water) supplemented with 25 µL of 37% formaldehyde solution.
8. Development	Incubate the gel with the last 40 mL of 1x solution D until the staining appears.
9. Stop	Add 50 mL of solution E (5% glycine (w/v) or 10% acetic acid (v/v) in distillated water), shake for 5 minutes and then replace with distillated water. Do not let the gel into the solution E to prevent formation of silver aggregates.

3.5. Western blot

Western blot were carried out according to standard procedures.[185] After separation by SDS-PAGE, the proteins were transfered to nitrocellulose membrane (Wathman nitrocellulose transfert membrane, PROTAN®, Germany). After tranfer, the proteins on the membrane were stained with Ponceau S, then the membrane was washed twice with distillated water and Tris buffer saline supplemented with 0.05 % (vol/vol) Tween 20 (TBS-T) (3 × 10 mL). The membrane was blocked for 30 min at room temperature with a solution of 5 % (wt/vol) skimmed milk powder in TBS-T (10 mL). Incubation with the primary antibody was performed overnight at 4 °C (5 mL), followed by three washing steps with a solution of 5 % skimmed milk powder in TBS-T (3 × 10 mL) and incubation with the secondary antibody for 2 h at room temperature (15 mL). Antibodies were diluted in 5 % skimmed milk powder in TBS-T as follow: monoclonal anti-biotin from mouse (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Germany) 1:1000, secondary anti-mouse antibody conjugated to horseradish peroxidise (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) 1:10000. After three washes in TBS-T (3 × 10 mL) and one in PBS

(10 mL), membrane was treated with the Super Signal West Pico Chemoluminescent Substrate (Thermo Scientific, Rockford, USA) according to the manufacturer's instructions. The chemiluminescence detection was performed on Kodak photographic film (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) or on ChemiDoc™ MP System (Bio-Rad).

3.6. Probes A1, B1, B2 and LDOX experiments

3.6.1. Capture assays with probes A1, B1, B2 and LDOX enzyme

LDOX enzyme affinity assays were performed using a flavanol-bearing probes **A1**, **B1** or **B2** (8 µL of 113.6 µM aqueous solution, final concentration 9.1 µM) in the presence of partially purified LDOX (21 µL of 25 µM in 0.2 M phosphate buffer solution, final concentration 5.3 µM) in 100 µL of capture buffer (0.2 M phosphate buffer, pH 7, 0.5 mM dithiothrietol (DTT) and 0.05% (wt/vol) octyl-β-D-glucopyranoside). For negative controls, sodium ascorbate was added (1 µL of 5 mM solution, final concentration 50 µM) to avoid oxygen-mediated autooxidation of the probes due to potential presence of residual oxygen in the buffer solution. Incubations were carried out in 1.5 mL Eppendorf tubes under gentle shaking (1150 rpm) at 23 °C for 30 min. Chemical oxidative activation of probes **B1** and **B2** was performed using an aqueous solution of $NaIO_4$ (5 µL of 100 mM, final concentration of 5 mM). For activation of probe **A1**, sample in open vial placed at 2 cm from the UV lamp was irradiated at 312 nm (VL-215.MC, Vilbert Lourmat, irradiance 1.8 $mW.cm^{-2}$ at 15 cm) at 10 °C during 20 min. In all cases, the reaction was then left for 20 min after which the reaction was quenched by addition of 105 µL of buffer containing 0.2 M phosphate buffer, pH 7, 100 mM dithiothrietol (DTT) and 0.05% (wt/vol) octyl-β-D-glucopyranoside. Sample were gently shaked for 1 minute and then 22 µL of 5 M sodium chloride solution was added to a final concentration of 0.5 M and the resulting solution was incubated with streptavidin-coated magnetic beads (50 µL, Dynabeads®MyOne™ Streptavidin C1) for 1 hour at room temperature under shaking (1400 rpm). The beads were collected using a magnetic device and washed first with washing buffer (300 µL, 50 mM Tris-HCl, 0.5 mM DTT, 0.05% (wt/vol) octyl-β-D-glucopyranoside, 0.5 M NaCl, pH 7.5), then one time with washing buffer supplemented with 10 µM, four times with an aqueous solution of SDS 0.1% (300 µL × 4), three times with an acetonitrile/water mixture ([80:20], 300 µl × 3) and finally two times with MS grade water (300 µL × 2). A denaturing Laemmli buffer (30 µL) was then added to the beads, and the resulting solution was heated to 95°C for 10 minutes prior to electrophoretic analysis. A volume of 10 µL of each elution fraction was loaded onto 0.75 mm thick gel SDS-PAGE (12.5% acrylamide in running gel, 4% acrylamide in stacking gel). Proteins were visualized by Coomassie® blue staining procedure.

3.6.2. Competitive affinity assays with free catechin and with BSA

Competitive enzymatic affinity assays was performed using (+)-catechin-bearing probe **B1** (8 µL of 113.6 µM solution, final concentration 9.1 µM) in the presence of partially purified LDOX (15 µL of 32 µM in phosphate buffer solution, final concentration 4.8 µM) and (+)-catechin (10 µL of 9.1 mM solution, final concentration 910 µM) in 100 µL of capture buffer. Incubations were carried out in 1.5 mL Eppendorf tubes under gentle stirring (1150 rpm) at 23 °C for 30 min. The activation and enrichment protocol were the same as described for the capture assays.

Competitive enzymatic affinity assays were performed using (+)-catechin-bearing probe **B1** or (–)-epicatechin-bearing probe **B2** (8 µL of 113.6 µM solution, final concentration 9.1 µM) in the presence of partially purified LDOX (15 µL of 32 µM in phosphate buffer solution, final concentration 4.8 µM) and/or commercial BSA (sigma-Aldrich) (31 µl of 16 µM in phosphate buffer solution, final concentration 5.0 µM) in 100 µL of reaction buffer containing 0.2 M phosphate buffer, 0.5 mM DTT and 0.05% (wt/vol) octyl-β-D-glucopyranoside. Incubations were carried out in 1.5 mL Eppendorf tubes under gentle stirring (1150 rpm) at 23 °C for 30 min. The activation and enrichment protocol were the same as described for the capture assays.

3.6.3. Competitive affinity assays with LDOX and E. coli proteome

The *E. coli* protein mixture was first submitted to a depletion step in the aim of removing the maximum of proteins having an affinity for streptavidin or the capacity to be non-specifically retained by beads in the conditions used for capture and washing steps. Thus, *E. coli* proteins (1.5 mL at a concentration of 0.973 µg/µL) were incubated with 50 µL of streptavidin-coated magnetic beads (Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1) for 1 h at 23 °C with stirring. The supernatant was collected and incubated 2 more times with the same quantity of beads until the final protein concentration remains constant, i.e., 0.847 µg/µL). Competitive affinity assays were then performed in triplicate using 100 µg of a protein mixture composed of 99.5 µg of *E. coli* proteins (117.5 µL at 0.847 µg/µL in phosphate buffer solution 0.2 M, pH = 7) and 0.5 µg of partially purified LDOX (4.7 µL of 2.43 µM solution) in the presence of the (+)-catechin-bearing probe **B1** (1.8 µL of 11.3 µM solution) in 150 µL of capture buffer (0.2 M phosphate uffer, pH 7, 0.5 mM DTT and 0.05% (wt/vol) octyl-β-D-glucopyranoside). Incubations were carried out in 1.5 mL Eppendorf tubes under gentle stirring (1150 rpm) at 23 °C for 30 min, after which time $NaIO_4$ (16.7 µL of 10 mM solution, final concentration 1.0 mM) was added and the reaction was run for 15 min at 23 °C (1150 rpm). The reaction mixture

was then quenched by addition of 41.7 µL of buffer containing 0.2 M phosphate buffer, pH 7, 50 mM DTT and 0.05% (wt/vol) octyl-β-D-glucopyranoside. The samples were gently stirred for 1 min and then sodium chloride (23.1 µL of 5 M solution) was added to a final concentration of 0.5 M and the resulting solution was incubated with streptavidin-coated magnetic beads (25 µL, Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1) for 1 h at 23 °C under stirring (1400 rpm). The enrichment protocol was the same as described for the capture assays. Finally, 30 µL of 2X denaturing Laemmli buffer (100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 20% glycerol, 4% β-mercaptoethanol) were added to the beads, and the resulting solution was heated to 95 °C for 10 min under stirring (1400 rpm) prior to electrophoretic analysis.

3.7. Sample preparation and in-gel digestion prior to MS analysis

The proteins samples solubilized in Laemmli buffer were loaded onto 12% or 10% acrylamide SDS-PAGE. After a complete migration or a short migration limited to the first centimeter of the separation gel, the gel was revealed by colloidal Coomassie® blue R250 staining. Concerned bands were cut in slices of equal volume. Gel slices were distained in 25 mM NH_4HCO_3, 50% CH_3CN in water, rinsed twice with ultrapure water and shrunk in CH_3CN for 10 min for dehydrating. After CH_3CN removal, gel slices were dried at room temperature, resuspended in 10 mM DTT for 30 min at 56 °C followed by incubation in 100 mM iodoacetamide for 30 min at room temperature in dark. After solution removal, gel slices were dried again in CH_3CN and subsequently covered with the trypsin solution (10 ng/µl in 40 mM NH_4HCO_3 and 10% CH_3CN), rehydrated at 4 °C for 10 min, and finally incubated overnight at 37 °C. Slices were then incubated for 15 min after addition of 40 mM NH_4HCO_3 and 10% CH_3CN at room temperature with rotary shaking. The supernatant was collected, and an $H_2O/CH_3CN/HCOOH$ (47.5:47.5:5) extraction solution was added onto gel slices for 15 min. The extraction step was repeated twice. All supernatants were pooled and concentrated using a SpeedVac to a final volume of 45 µL. Digests were finally acidified by addition of 1.5 µL of formic acid (5%, v/v) and stored at –20 °C prior to nLC-MS/MS analysis. For MALDI-TOF analysis, the peptide samples were desalted on ZipTip C18 column (Millipore) according to the manufacturer's instructions.[128]

3.8. nLC-MS/MS analysis

The resulting peptide digests were analyzed on an Ultimate 3000 nanoLC system (Dionex) coupled to a nanospray LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer (ThermoFinnigan, San Jose, CA). Ten microliters of peptide digests were loaded onto a 300-µm-inner diameter (id) x

5-mm C18 PepMapTM trap column (LC Packings) at a flow rate of 30 µL/min. The peptides were eluted from the trap column onto an analytical 75-mm id x 15-cm C18 Pep-Map column (LC Packings) with a 2-40% linear gradient of solvent B in 48 min (solvent A was 0.1% formic acid in 5% CH_3CN, and solvent B was 0.1% formic acid in 80% CH_3CN). The separation flow rate was set at 200 nL/min. The mass spectrometer operated in positive ion mode at a 1.8-kV needle voltage and a 46-V capillary voltage. Data were acquired in a data-dependent mode, alternating an FTMS scan survey over the range m/z 300–1700 and six ion trap MS/MS scans with CID (Collision Induced Dissociation) as activation mode. MS/MS spectra were acquired using a 3-m/z unit ion isolation window and normalized collision energy of 35. Mono-charged ions and unassigned charge-state ions were rejected from fragmentation. Dynamic exclusion duration was set to 30 s.

3.9. Database search and results processing

Data were searched by SEQUEST through Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific Inc.) against the LDOX sequence embedded in the Reference Proteome Set of *Escherichia coli* (2014-05: 4270 entries). Spectra from peptides higher than 5000 Da or lower than 350 Da were rejected. The search parameters were as follows: mass accuracy of the monoisotopic peptide precursor and peptide fragments was set to 10 ppm and 0.6 Da respectively. Only b- and y-ions were considered for mass calculation. Oxidation of methionines (+16 Da) and carabamidomethylation of cysteines (+57 Da) were considered as variable modification. Two missed trypsin cleavages were allowed. Peptide validation was performed using Percolator algorithm[145] and only “high confidence” peptides were retained corresponding to a 1% False Positive Rate at peptide level. Results are given as “grouped” listing so as to present the minimal number of proteins covering all detected peptides. Hits with score below 1.6 and identified by one peptide only were not included in the final list of proteins. LDOX was unambiguously identified in each competitive affinity assay and the following results processing (Table 7 and Table 8) are representative of the triplicate analyses thus performed.

Sequence	XCorr
VESLSSSGIQSIPK	2.86
MVTSVAPR	2.02
IILKPLPETVSETEPPLFPPR	1.91
TQEALLSK	1.48
KINYYPK	1.31

Table 7. Sequence of unique peptides of LDOX identified by LC-MS/MS analysis of the fraction captured by the affinity strategy carried out over depleted *E.coli* proteome supplemented by 0.5 %/wt LDOX and corresponding identification scores (XCorr)

Accession	Description	Protein score	Sequence Coverage	Unique peptides
P0A853	Tryptophanase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tnaA PE=1 SV=1 - [TNAA_ECOLI]	99.25	35.88	18
P0ABT2	DNA protection during starvation protein OS=Escherichia coli (strain K12) GN=dps PE=1 SV=2 - [DPS_ECOLI]	47.56	49.10	8
P0ABD8	Biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=accB PE=1 SV=1 - [BCCP_ECOLI]	32.25	39.10	4
P06959	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex OS=Escherichia coli (strain K12) GN=aceF PE=1 SV=3 - [ODP2_ECOLI]	29.02	17.30	9
P0AB71	Fructose-bisphosphate aldolase class 2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fbaA PE=1 SV=2 - [ALF_ECOLI]	14.75	15.04	4
P35340	Alkyl hydroperoxide reductase subunit F OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ahpF PE=1 SV=2 - [AHPF_ECOLI]	12.17	14.01	6
P0CE47	Elongation factor Tu 1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tufA PE=1 SV=1 - [EFTU1_ECOLI]	11.30	16.24	6
P51093	**LDOX [LDOX_VITVI]**	**8.13**	**15.03**	**5**
P0ADY7	50S ribosomal protein L16 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplP PE=1 SV=1 - [RL16_ECOLI]	7.97	13.24	2
P60422	50S ribosomal protein L2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplB PE=1 SV=2 - [RL2_ECOLI]	6.37	12.09	2
P04982	D-ribose pyranase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rbsD PE=1 SV=3 - [RBSD_ECOLI]	6.10	10.07	1
P0A9Q7	Aldehyde-alcohol dehydrogenase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=adhE PE=1 SV=2 - [ADHE_ECOLI]	5.84	3.25	2
P0AE08	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ahpC PE=1 SV=2 - [AHPC_ECOLI]	5.31	21.39	3
P0A9G6	Isocitrate lyase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=aceA PE=1 SV=1 - [ACEA_ECOLI]	5.02	5.99	2
P0A7X3	30S ribosomal protein S9 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsI PE=1 SV=2 - [RS9_ECOLI]	4.53	15.38	2
P0A7L3	50S ribosomal protein L20 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplT PE=1 SV=2 - [RL20_ECOLI]	3.74	12.71	2
P21599	Pyruvate kinase II OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pykA PE=1 SV=3 - [KPYK2_ECOLI]	2.77	3.54	1
P0AFG6	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sucB PE=1 SV=2 - [ODO2_ECOLI]	2.74	4.44	1
P0AG55	50S ribosomal protein L6 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplF PE=1 SV=2 - [RL6_ECOLI]	2.22	3.95	1
P0AG44	50S ribosomal protein L17 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplQ PE=1 SV=1 - [RL17_ECOLI]	2.08	6.30	1
P0ADZ4	30S ribosomal protein S15 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsO PE=1 SV=2 - [RS15_ECOLI]	1.96	15.73	2
P08839	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ptsI PE=1 SV=1 - [PT1_ECOLI]	1.94	1.91	1
P0A7S9	30S ribosomal protein S13 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsM PE=1 SV=2 - [RS13_ECOLI]	1.90	7.63	1
P31057	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=panB PE=1 SV=1 - [PANB_ECOLI]	1.75	3.79	1
P0A799	Phosphoglycerate kinase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pgk PE=1 SV=2 - [PGK_ECOLI]	1.71	3.62	1

Table 8. Proteins identified by LC-MS/MS analysis of the fraction captured by the affinity strategy carried out over depleted *E. coli* proteome supplemented by 0.5 %/wt LDOX: accession number, description of the protein, protein score, number of unique peptides and deduced sequence coverage

3.10. MALDI-TOF analysis of the reaction capture of the LDOX by probe B1

A solution of probe **B1** (14.8 µM) and partially purified LDOX (8 µM) in 100 µl of phosphate buffer (0.2 M, pH 7.0) containing 0.5 mM dithiothrietol (DTT) was incubated in Eppendorf tube (1.5 mL). After stirring (1150 rpm) 30 min at 23 °C, $NaIO_4$ (7.4 µL of 100 mM solution) was added and the reaction was stirred for 5 min at 23 °C. The reaction was then quenched by addition of 74 µL of phosphate buffer (0.2 M, pH 7) containing 200 mM DTT. The sample was gentlely shaked for 1 min and then sodium chloride (20.2 µL of 5 M solution)

was added to a final concentration of 0.5 M. The resulting solution (201.6 µL) was concentrated four times by centrifugal filtration through a 10.000 MW Microcon (Millipore) at 14.000*g* for 10 min at 4 ºC to obtain a 100 µL solution used for MALDI-TOF analysis. The mixture was then spotted onto the MALDI stainless steel targets by using the dried droplet method (1 µL of obtained sample was mixed with 1 µL of sinapinic acid solution, 10 mg/mL in 0.1% TFA/50% CH_3CN/H_2O) and air-dried prior to analysis. Mass spectrometry analyses were performed on a MALDI-TOF-TOF Ultraflex III mass spectrometer (Bruker) in linear mode with MCP detector. Average masses were measured using an internal calibration with a mixture of trypsinogen, protein A, bovine serum albumin (simply and doubly charged) (respective theoretical average masses: 23981 Da, 44612 Da, 33215 Da and 66430 Da) (Sigma-Aldrich).

In-solution tryptic digestion

For in-solution digestion, 100 pmol of aliquots, equivalent to 4.3 µg of protein, were mixed with the trypsin solution (2 pmol/µL in 40 mM NH_4HCO_3 and 10% CH_3CN) to a final volume of 20 µL of 25 mM NH_4HCO_3 pH = 8,0 (50:1 substrate/enzyme). The reaction mixture was incubated overnight at 37 °C with gentle agitation. Then, the residual trypsin was inactivated by boiling the sample at 100 °C for 10 min.[126,283] The peptide solution was desalted by ZipTip C18 column (Millipore) (10 µL for an elution of 2 µL) or diluted with 0.1% TFA/50% CH_3CN/H_2O (2-fold over 2 µL). 1 µL of each sample was mixed with 1 µL of α-cyano-4-hydroxycinnamic acid solution (5 mg/mL in 0.1% TFA/50% CH_3CN/H_2O) subsequently spotted onto the MALDI sample stage and air-dried prior to analysis.

3.11. Photocleavable probes experiments

3.11.1. Labeling of LDOX with photocleavable probes experiments and controls

LDOX enzyme affinity assays were performed using a flavanol-bearing photocleavable probes **C1** or **C2** (1.7 µL of 600 µM aqueous solution, final concentration 10 µM) in the presence of partially purified LDOX (16.7 µL of 30 µM in 0.2 M phosphate buffer solution, final concentration 5 µM) in 100 µL of capture buffer (phosphate buffer salin, PBS (Euromedex), pH 7.4 or 0.2 M phosphate buffer, pH 7, 0.5 mM DTT and 0.05% (w/v) octyl-β-D-glucopyranoside). Capture experiments were carried out together with a negative control without probe to compare the results of the biotin-streptavidin enriched samples with the background of nonspecific protein binding on streptavidin-coated magnetic beads. Incubations were carried out in 1.5 mL PCR eppendorf tubes for 30 min under gentle shaking (1150 rpm) at 23 °C. Chemical oxidative activation of probes **C1** or **C2** was performed using an aqueous solution of $NaIO_4$ (2 µL of 50 mM, final concentration of 1 mM) for 5 min under gentle shaking (1150 rpm) at 23 °C. The reaction was quenched by addition of 1 µL of 1 M DTT in water

followed by manual shaking for 1 minute. For affinity purification, 23.4 µL of 5 M sodium chloride solution was added to a final concentration of 0.5 M.

3.11.2. Streptavidin affinity purification and photocleavage

The obtained solution was then incubated for 1 hour under shaking (1400 rpm) at 23 °C with streptavidin-coated magnetic beads (50 µL, Dynabeads®MyOne™ Streptavidin C1, previously washed with 250 µL of washing buffer containing 50 mM Tris-HCl, 0.5 mM DTT, 0.05% (w/v) octyl-β-D-glucopyranoside, 0.5 M NaCl, pH 7.5, then with 250 µL of 0.1% SDS aqueous solution and twice again with 250 µL of washing buffer). The beads were collected using a magnetic device and washed first with 300 µL of washing buffer, 300 µL of 10 µM biotin in washing buffer, then with 300 µL of washing buffer six times, 300 µL of MB grade water (Water Molecular Biology), 300 µL of 0.1% SDS aqueous solution six times, and finally with 300 µL of MB grade water. A further washing with 100 µL of 25 mM phosphate buffer, pH 7.4 was collected and referred to as the *last washing*.

The captured streptavidin beads were then resuspended in 100 µL of 25 mM phosphate buffer pH 7.4. The suspensions were carefully transferred into the cap of a new 1.5 mL PCR eppendorf tube, irradiated at 365 nm using an UV-hand lamp (VL-6.LC, Vilbert Lourmat, intensity 0.63 $mW.cm^{-2}$ at 15 cm) for 30 min at 4-10 °C from a distance of 2 cm above the samples while gentle shaking (650 rpm). For negative control, the sample was incubated in the same conditions without UV exposure. The supernatants were then evaporated to dryness by vacuum centrifugation (Concentrator Plus, Eppendorf) and referred to as the *photolysis eluate*. After irradiation, the beads were resuspended in 100 µL of 0.1 M glycine-HCl buffer pH 2.8 and the suspension was incubated for 30 minutes under shaking (1400 rpm) at 23 °C. The resulting supernatant was dried and referred to as the *acid eluate*. For other parallel experiments, after irradiation, the beads were washed with washing buffer (300 µL × 6), MB grade water (300 µL) and 0.1% SDS aqueous solution (300 µL × 6). All these supernatants were pooled, dried and referred to as the *post-photolysis washing*.

In order to increase the light sensitivity of photolabile 2-(2-nitrophenyl)ethyl protecting group, the washed beads from probe C2-labeled LDOX or probe C2-labeled BSA were resuspended in 100 µL of 25 mM degased phosphate buffer pH 7.4 containing 10, 100 or 1000 µM thioxanthone as sensitizer (previously prepared from thioxanthone solution in CH_3CN/EtOH (9:1, v/v) and degased phosphate buffer; at higher concentration, this sensitizer is not completely soluble) corresponding to 1, 10 or 100 equivalents in comparison with the probe quantities (calculated from the maximum binding capacity of the beads, according to the manufacturer). The irradiation experiments were then carried out similarly as described above.

3.11.3. SDS-PAGE of captured proteins

Each labeled sample as described above was mixed with 10 µL of 2X denaturing Laemmli buffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) glycerol, 10% (v/v) β-mercaptoethanol and 0.2% (w/v) bromphenol blue), and the resulting solutions were heated to 95°C for 10 minutes, while the remaining beads were eluted by boiling with 30 µL of 2X denaturing Laemmli buffer with conditions as specified above and the resulting supernatant was referred to as the *SDS eluate*. 10 µL of each obtained eluate were then subjected to electrophoresis on a 4-12.5% gradient SDS-PAGE and the gel was stained with Coomassie brilliant blue or silver.

3.11.4. In-solution tryptic digestion of labeled proteins and preparation of peptides for photocleavage

20 µL aliquots of labeled LDOX-probe **C2** at a concentration of 1.25 mg/mL, equivalent to 25 µg of protein, were submitted to an in-solution proteolysis: after reduction (2.2 µL of 100 mM DTT in water, final concentration of 10 mM, 1 hour, 56 °C, 1000 rpm shaking) and alkylation (7.4 µL of 100 mM iodoacetamide in water, final concentration of 25 mM, 30 min, 23 °C, 1000 rpm shaking in the dark), the sample was diluted with 100 mM NH_4HCO_3, pH 8.0 (29.6 µL, final concentration of 50 mM) and a trypsin solution (Proteomics Grade, Sigma Aldrich) was then added at a ratio 1:50 (w/w) of protease to substrate (40 µL of 12.5 ng/µL in 50 mM NH_4HCO_3 pH 8.0). The digestion reactions were incubated overnight at 37 °C. The residual trypsin was then inactivated by heat denaturation at 100°C for 10 min.[126,283] After evaporation using a Speedvac system (Concentrator Plus, Eppendorf), samples were resuspended in 100 µL of PBS pH 7.4 and stored at −20 °C until enrichment of biotinylated peptides.

100 µL of the obtained peptide solution was incubated for 1 hour under agitation (1400 rpm) at 23 °C with streptavidin-coated magnetic beads (50 µL, Dynabeads®MyOne™ Streptavidin C1, previously treated as described above and finally resupended in 50 µL of PBS pH 7.4). The beads were collected using a magnetic device and washed using the same procedure described above for the labeled proteins except that the washing buffer was replaced by PBS. A last washing with 100 µL of 25 mM phosphate buffer, pH 7.4 was collected and referred to as the *last washing*. The captured biotinylated peptides beads were resuspended in 100 µL of 25 mM phosphate buffer pH 7.4. The suspensions were carefully transferred into the cap of a new 1.5 mL PCR eppendorf tube, irradiated at 365 nm using an UV-hand lamp (VL-6.LC, Vilbert Lourmat, intensity 0.63 $mW.cm^{-2}$ at 15 cm) for 30 min at 4-10 °C from a distance of 2 cm above the samples while gentle shaking (650 rpm). The resulting supernatant was collected and referred to as the *photolysis eluate*. The remained beads after irradiation were

incubated with 100 µL of 0.1 M glycine-HCl buffer pH 2.8 for 30 minutes under shaking (1400 rpm) at 23 °C and the resulting supernatant was referred to as the *acid eluate*. All obtained supernatants were desalted on ZipTip C18 microcolumn and stored at −20 °C for the subsequent LC-MS/MS or MALDI-TOF analysis.

4. Surface plasmon resonance procedures

4.1. Materials

SPR experiments were performed at 25 °C on a BIAcore^{TM} 3000 apparatus (Biacore, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) using sensor chip CM5 (BIAcore). Buffer solutions were prepared to have the compositions specified in the following sections. Bovin serum albumin (Sigma), streptavidin (Roche Diagnostics), myoglobin (Aldrich), HRP,... were used without further purification and were prepared at the specified concentration in the running buffer. *N*-terminal His_6-tagged recombinant ANS from *Vitis vinifera*, was used partially purified and dialyzed against the running buffer. Each SPR experiment was performed in triplicate.

4.2. Protein solutions

a. BSA (66430 Da): 19.1 mg of lyophilized BSA (Aldrich) was allowed to dissolve slowly in 575 µL of running buffer, then this solution was diluted with running buffer successively to obtain the desired concentrations (6.25 nM, 25 nM and 500 nM).

b. Myoglobin (17120 Da): 9.1 mg of lyophilized myoglobin (from whale skeletal muscle, Aldrich) was allowed to dissolve slowly in 10 mL of running buffer, then this solution was diluted with running buffer successively to obtain the desired concentrations (6.25 nM, 25 nM and 500 nM).

c. ANS-histidine tagged (43400 Da): The LDOX stock solution (1.3 mg/mL = 30 µM), preserved in 0.2 M phosphate buffer pH 6 with 10% (vol/vol) of glycerol, was diluted with running buffer successively to obtain the desired concentrations (200 nM, 400 nM and 800 nM). These solutions were injected using the method below, right after preparation.

4.3. Polyphenol-biotin adduct solutions

The ligand solutions were prepared by dissolving the compound in pure DMSO to give a 1 mM solution, which was diluted to 25-100 nM with running buffer. All solutions were prepared fresh before immobilization. However, the DMSO 1 mM solution is stable over time (at least 3 months) when prepared with Ar-degassed DMSO and frozen right after preparation at –20°C.

4.4. Immobilization of polyphenol-biotin adducts on to SPR sensor chips using affinity capture method

The streptavidin was first immobilized to the sensor surface CM5[354,355,356] by the standard amine coupling protocol[239,358,235] in the following manner. After the sensor chip was docked to the Biacore™ 3000 instrument and primed with H_2O mQ for a few minutes, the sensor surface was first activated with a 7-min pulse of 200 mM EDC/50 mM NHS aqueous mixture using a flow rate of 5 µL/min. This was followed by a 7-min pulse of streptavidin (100 µg/mL) in 10 mM sodium acetate buffer, pH 5.5 (5 µL/min). Excess reactive groups were deactivated with a 7-min pulse of 1 M ethanolamine-HCl, pH 8.5 (5 µL/min). To remove any unbound streptavidin, 4 × 10 µL of 20 mM NaOH/1 M NaCl aqueous solution was injected on to the surface, followed by an injection of 40 µL of running buffer. The streptavidin functionalized surface (7000-8500 RU) was now ready for ligand affinity capture. To immobilize the polyphenol-biotin adduct, two prime with immobilization running buffer (sodium phosphate 50 mM, pH 7.0, NaCl 150 mM, P20 0.005%) was realized, a flow cell was selected and a 25-100 nM ligand solution in running buffer was injected at the flow rate of 5 µL/min over the surface until the desired level of immobilization (in RU) was obtained. Any remaining active sites of streptavidin were blocked by injecting a 1-minute pulse of 50 nM biotin solution in running buffer. One flow cell, treated under the same conditions except that no ligand was injected, was used to double-referenced the sensorgrams to remove instrument noises and the buffer contribution to the signal.[359] After the sensor surface biotinylation was completed, the flow cells were rinsed by injecting 5 µL of running buffer with DMSO (same concentration of DMSO as used for the polyphenol-biotin adduct solution) and the running buffer (at a flow rate of 5 µL/min) was allowed to run over the surface until a stable baseline was observed.

4.5. Binding assays

The binding experiments were performed in a indicated running buffer for each protein (generally sodium phosphate 50 mM, pH 7.0, NaCl 150 mM) in presence of 0.005 % of surfactant P20 (BIAcore) to prevent non specific binding of the proteins onto the sensorchip surface.[77] Running buffer was allowed to flow on to the SPR surface at a constant flow rate of 20 µL/min,[235] at 23 °C for 3 min, after which time a series of 3 concentrations (6.25-800 nM) of protein were injected across the sensor surface at a flow rate of 20 µL/min in increasing order of concentration and without regeneration of the surface in between injections (titration mode).[77,372,242] This mode of injection allows to study the interaction at different concentrations of protein, without “damaging the surface” with a possibly non effective regenerating agent. Each concentration was injected over a period of 150 s (50 µL) allowing 500 s between

injections of protein to allow dissociation of the polyphenol-protein complex. Afterwards, if no formation of polyphenol-protein complex was observed, the surface was rinsed by three successive running buffer injections, and a different protein was injected. On the contrary, if complex formation was observed, the regeneration step was realized by a series of 2-4 one-min pulses of 0.05% SDS solution (20 µL/min) until the baseline level was recovered.

The final sensorgrams are the result of the subtraction of three sensorgrams. To the sensorgram obtained for the analyte-ligand surface system is subtracted a sensorgram obtained for the analyte-reference surface system (surface without ligand, treated under the same conditions). To the resulting sensorgram is subtracted the sensorgram obtained for running buffer injected onto the ligand and reference surface systems, under the same conditions. This double referencing is done to remove instrument noises and the buffer's contribution to the SPR signal.[359]

Références bibliographiques

1 S. Quideau, D. Deffieux, C. Douat-Casassus and L. Pouységu, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, **50**, 586–621.

2 A. Crozier, M. N. Clifford and H. Ashihara, Eds., *Plant secondary metabolites: Occurrence, structure and role in the human diet*, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, 2006.

3 E. Haslam, *Practical Polyphenolics: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action*, Cambridge University Press, Cambridge, 1998.

4 A. Crozier, I. B. Jaganath and M. N. Clifford, *Nat. Prod. Rep.*, 2009, **26**, 1001–1043.

5 A. Crozier, H. Ashihara and F. Tomás-Barbéran, Eds., *Teas, cocoa and coffee: Plant Secondary Metabolites and Health*, Wiley-Blackwell, Oxford, UK, 2011.

6 J. Beauhaire, N. E. Es-Safi, F. D. Boyer, L. Kerhoas, C. Le Guernevé and P. H. Ducrot, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2005, **15**, 559–562.

7 S. B. Lotito and B. Frei, *Free Radic. Biol. Med.*, 2006, **41**, 1727–1746.

8 L. R. Ferguson, *Mutat. Res.*, 2001, **475**, 89–111.

9 K. B. Pandey and S. I. Rizvi, *Oxid Med Cell Longev.*, 2009, **2**, 270–278.

10 C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy and L. Jiménez, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004, **79**, 727–747.

11 M. Guéroux, M. Pinaud-Szlosek, E. Fouquet, V. De Freitas, M. Laguerre and I. Pianet, *Tetrahedron*, 2015, **71**, 3163–3170.

12 M. Zhu, J. David Phillipson, P. M. Greengrass, N. E. Bowery and Y. Cai, *Phytochemistry*, 1997, **44**, 441–447.

13 C. S. Yang, X. Wang, G. Lu and S. C. Picinich, *Nat. Rev. Cancer*, 2009, **9**, 429–439.

14 S. Sang, Z. Hou, J. D. Lambert and C. S. Yang, *Antioxid. Redox Signal.*, 2005, **7**, 1704–1714.

15 J. P. E. Spencer, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**, 1152–1161.

16 L. Chen and H.-Y. Zhang, *Molecules*, 2007, **12**, 946–957.

17 J. R. Gledhill, M. G. Montgomery, A. G. W. Leslie and J. E. Walker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, **104**, 13632–13637.

18 K. Khanbabaee and T. van Ree, *Nat. Prod. Rep.*, 2001, **18**, 641–649.

19 R. Tsao, *Nutrients*, 2010, **2**, 1231–46.

20 A. S. Zuiter, *Proanthocyanidin: Chemistry and Biology: From Phenolic Compounds to Proanthocyanidins*, Elsevier Inc., 2014.

21 T. Iwashina, *J. Plant Res.*, 2000, **113**, 287–299.

22 E. Grotewold, Ed., *The Science of Flavonoids*, Springer Science and Business Media, 2006.

23 L. Packer, Ed., *Flavonoids and Other Polyphenols*, Academic Press, 2001, vol. 335.

24 J. B. Harborne and C. A. Williams, *Phytochemistry*, 2000, **55**, 481–504.

25 O. M. Andersen and K. R. Markham, Eds., *Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications*, Taylor & Francis Group, 2006.

26 S. Martens, A. Preuß and U. Matern, *Phytochemistry*, 2010, **71**, 1040–1049.

27 S. Collin and J. Crouzet, *Polyphénols et procédés: Transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agro-alimentaire*, Lavoisier, 2011.

28 R. W. Hemingway, L. Y. Foo and L. J. Porter, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1982, 1209–1216.

29 J. B. Harborne, Ed., *The Flavonoids: Advances in Research since 1980*, Springer US, Boston, MA, 1988.

30 D.-Y. Xie and R. A. Dixon, *Phytochemistry*, 2005, **66**, 2127–2144.

31 R. A. Dixon, D.-Y. Xie and S. B. Sharma, *New Phytol.*, 2005, **165**, 9–28.

32 M. Monagas, C. Gómez-Cordovés, B. Bartolomé, O. Laureano and J. M. Ricardo da Silva, *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 6475–6481.

33 M. Papagiannopoulos, B. Zimmermann, A. Mellenthin, M. Krappe, G. Maio and R. Galensa, *J. Chromatogr. A*, 2002, **958**, 9–16.

34 J. Clark-Lewis, L. Jackman and T. Spotswood, *Aust. J. Chem.*, 1964, **17**, 632–648.

35 L. J. Porter, R. Y. Wong and B. G. Chan, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1985, 1413–1418.

36 L. J. Porter, in *Natural Products of Woody Plants*, ed. J. W. Rowe, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1989, pp. 651–690.

37 R. W. Hemingway, F. L. Tobiason, G. Wayne McGraw and J. P. Steynberg, *Magn. Reson. Chem.*, 1996, **34**, 424–433.

38 L. Y. Foo and L. J. Porter, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1983, 1535–1543.

39 A. C. Fletcher, L. J. Porter, E. Haslam and R. K. Gupta, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1977, 1628–1637.

40 J. A. Delcour, D. Ferreira and D. G. Roux, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1983, 1711–1717.

41 S. Quideau, *eLS. John Wiley Sons, Ltd Chichester*, 2013.

42 D. Metodiewa, A. K. Jaiswal, N. Cenas, E. Dickancaité and J. Segura-Aguilar, *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, **26**, 107–116.

43 R. R. Watson, *Polyphenols in Plants : Isolation , Purification and Extract Preparation*,

Academic Press Elsevier, 2014.

44 T. De Bruyne, L. Pieters, H. Deelstra and A. J. Vlietinck, *Biochem. Syst. Ecol.*, 1999, **27**, 445–459.

45 T. De Bruyne, L. Pieters, M. Witvrouw, E. De Clercq, D. Vanden Berghe and A. J. Vlietinck, *J. Nat. Prod.*, 1999, **62**, 954–958.

46 P.-C. Leung and H. Fong, Eds., *Alternative treatment for cancer (Annals of traditional chinese medicine)*, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Toh Tuck Link, Singapore, 2007.

47 K. Ohmori, N. Ushimaru and K. Suzuki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, **101**, 12002–12007.

48 J. Wang, M. G. Ferruzzi, L. Ho, J. Blount, E. M. Janle, B. Gong, Y. Pan, G. A. N. Gowda, D. Raftery, I. Arrieta-Cruz, V. Sharma, B. Cooper, J. Lobo, J. E. Simon, C. Zhang, A. Cheng, X. Qian, K. Ono, D. B. Teplow, C. Pavlides, R. A. Dixon and G. M. Pasinetti, *J. Neurosci.*, 2012, **32**, 5144–5150.

49 R. D. Alharthy and C. J. Hayes, *Tetrahedron Lett.*, 2010, **51**, 1193–1195.

50 Y.-J. Wang, P. Thomas, J.-H. Zhong, F.-F. Bi, S. Kosaraju, A. Pollard, M. Fenech and X.-F. Zhou, *Neurotox. Res.*, 2009, **15**, 3–14.

51 D. J. Graves and J. Lew, *U.S. Patent*, 2011, US 20110263696 A1.

52 J. R. Carlson, B. A. Bauer, A. Vincent, P. J. Limburg and T. Wilson, *Mayo Clin. Proc.*, 2007, **82**, 725–732.

53 Shankar, Sharmila, S. Ganapathy and R. K. Srivastava, *Front. Biosci.*, 2007, **12**, 4881–4899.

54 S. M. Chacko, P. T. Thambi, R. Kuttan and I. Nishigaki, *Chin. Med.*, 2010, **5**, 1–9.

55 T. Zhang, J. Zhang, P. Derreumaux and Y. Mu, *J. Phys. Chem. B*, 2013, **117**, 3993–4002.

56 S. Guo, J. Yan, T. Yang, X. Yang, E. Bezard and B. Zhao, *Biol. Psychiatry*, 2007, **62**, 1353–1362.

57 K. Osanai, K. R. Landis-Piwowar, Q. P. Dou and T. H. Chan, *Bioorg. Med. Chem.*, 2007, **15**, 5076–5082.

58 N. Ahmad, D. K. Feyes, R. Agarwal, H. Mukhtar and A.-L. Nieminen, *J. Natl. Cancer Inst.*, 1997, **89**, 1881–1886.

59 N. Khan, F. Afaq, M. Saleem, N. Ahmad and H. Mukhtar, *Cancer Res.*, 2006, **66**, 2500–2505.

60 S. Nam, D. M. Smith and Q. P. Dou, *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 13322–13330.

61 T. Tanaka, T. Ishii, D. Mizuno, T. Mori, R. Yamaji, Y. Nakamura, S. Kumazawa, T. Nakayama and M. Akagawa, *Free Radic. Biol. Med.*, 2011, **50**, 1324–1335.

62 J. Qin, L.-P. Xie, X.-Y. Zheng, Y.-B. Wang, Y. Bai, H.-F. Shen, L.-C. Li and R. Dahiya,

Biochem. Biophys. Res. Commun., 2007, **354**, 852–857.

63 M. Leone, D. Zhai, S. Sareth, S. Kitada, J. C. Reed and M. Pellecchia, *Cancer Res.*, 2003, **63**, 8118–8121.

64 H. Tsuneki, M. Ishizuka, M. Terasawa, J.-B. Wu, T. Sasaoka and I. Kimura, *BMC Pharmacol.*, 2004, **4**, 18–27.

65 S. I. Kreydiyyeh, E. A.-H. Baydoun and Z. M. Churukian, *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 1994, **108**, 359–365.

66 L. Mander and H.-W. Liu, Eds., *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology, Volume 3: Development & Modification of Bioactivity*, Elsevier Ltd., 2010.

67 K. Krohn, I. Ahmed, M. John, M. C. Letzel and D. Kuck, *Eur. J. Org. Chem.*, 2010, **2010**, 2544–2554.

68 D. Umeda, S. Yano, K. Yamada and H. Tachibana, *J. Biol. Chem.*, 2008, **283**, 3050–3058.

69 D. Whitford, *Proteins: Structure and Function*, John Wiley & Sons, Ltd, 2005.

70 D. C. Liebler, *Introduction to proteomics: Tools for the new biology*, Humana Press Inc., 2002.

71 K. V Brinda and S. Vishveshwara, *Biophys. J.*, 2005, **89**, 4159–4170.

72 J. Zheng and V. D. Ramirez, *Br. J. Pharmacol.*, 2000, **130**, 1115–1123.

73 T. Kumamoto, M. Fujii and D.-X. Hou, *Mol. Cell. Biochem.*, 2009, **332**, 33–41.

74 G. Cozza, P. Bonvini, E. Zorzi, G. Poletto, M. A. Pagano, S. Sarno, A. Donella-Deana, G. Zagotto, A. Rosolen, L. A. Pinna, F. Meggio and S. Moro, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 2363–2366.

75 H. Tachibana, K. Koga, Y. Fujimura and K. Yamada, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2004, **11**, 380–381.

76 S. Quideau, M. Jourdes, D. Lefeuvre, D. Montaudon, C. Saucier, Y. Glories, P. Pardon and P. Pourquier, *Chem. Eur. J.*, 2005, **11**, 6503–6513.

77 C. Douat-Casassus, S. Chassaing, C. Di Primo and S. Quideau, *Chembiochem*, 2009, **10**, 2321–2324.

78 G. U. Nienhaus, Ed., *Protein–Ligand Interactions: Methods and Applications*, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 2005.

79 C. Le Bourvellec and C. M. G. C. Renard, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2012, **52**, 213–248.

80 V. de Freitas and N. Mateus, *Curr. Org. Chem.*, 2012, **16**, 724–746.

81 P. Bandyopadhyay, A. K. Ghosh and C. Ghosh, *Food Funct.*, 2012, **3**, 592–605.

82 V. Receveur-Bréchot, J.-M. Bourhis, V. N. Uversky, B. Canard and S. Longhi, *Proteins*, 2006, **62**, 24–45.

83 A. Papadopoulou and R. A. Frazier, *Trends Food Sci. Tech.*, 2004, **15**, 186–190.

84 M. Kusuda, T. Hatano and T. Yoshida, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2006, **70**, 152–160.

85 A. a. Watrelot, C. Le Bourvellec, A. Imberty and C. M. G. C. Renard, *Biomacromolecules*, 2013, **14**, 709–718.

86 A. Watrelot, "Interactions non-covalentes entre les polyphénols et les pectines. Etude sur un substrat modèle : la pomme", Thèse de doctorat d'université, Université d'Avignon et des pays du Vaucluse, 2013

87 J. P. McManus, K. G. Davis, J. E. Beart, S. H. Gaffney, T. H. Lilley and E. Haslam, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1985, 1429–1438.

88 E. Haslam, *Biochem. J.*, 1974, **139**, 285–288.

89 A. E. Hagerman, M. E. Rice and N. T. Ritchard, *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**, 2590–2595.

90 A. J. Charlton, N. J. Baxter, M. L. Khan, A. J. G. Moir, E. Haslam, A. P. Davies and M. P. Williamson, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 1593–1601.

91 M. Li and A. E. Hagerman, *J. Agric. Food Chem.*, 2014, **62**, 3768–3775.

92 T. K. Maiti, K. S. Ghosh and S. Dasgupta, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.*, 2006, **64**, 355–362.

93 J. Shi, J. Wang, Y. Zhu and J. Chen, *Luminescence*, 2014, **29**, 522–530.

94 G. Schmauch, C. Chamault, P. Teissedre and C. Saucier, *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 2010, **44**, 67–74.

95 E. Steiner, T. Becker and M. Gastl, *J. Inst. Brew.*, 2010, **116**, 360–368.

96 L. Wang, E. Santos, D. Schenk and M. Rabago-Smith, *Antioxidants*, 2014, **3**, 559–568.

97 J. Xiao, G. Kai, X. Ni, F. Yang and X. Chen, *Mol. BioSyst.*, 2011, **7**, 1883–1890.

98 J. Xiao, F. Mao, F. Yang, Y. Zhao, C. Zhang and K. Yamamoto, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2011, **55**, 1637–1645.

99 C. Chalumeau, D. Deffieux, S. Chaignepain and S. Quideau, *Chembiochem*, 2011, **12**, 1193–1197.

100 F. Canon, "Contribution de la spectrométrie de masse à l'étude des interactions entre les protéines salivaires riches en proline et les tanins", Thèse de doctorat du Centre international d'études supérieures en sciences agronomiques, Université Montpellier, 2010.

101 M. Gallo, G. Vinci, G. Graziani, C. De Simone and P. Ferranti, *Food Res. Int.*, 2013, **54**, 406–415.

102 N. Muzet, B. Guillot, C. Jelsch, E. Howard and C. Lecomte, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, **100**, 8742–8747.

103 R. C. Wilmouth, J. J. Turnbull, R. W. D. Welford, I. J. Clifton, A. G. Prescott and C. J. Schofield, *Structure*, 2002, **10**, 93–103.

104 R. W. D. Welford, I. J. Clifton, J. J. Turnbull, S. C. Wilson and C. J. Schofield, *Org. Biomol. Chem.*, 2005, **3**, 3117–3126.

105 O. Cala, E. J. Dufourc, E. Fouquet, C. Manigand, M. Laguerre and I. Pianet, *Langmuir*, 2012, **28**, 17410–17418.

106 O. Cala, S. Fabre, N. Pinaud, E. J. Dufourc, E. Fouquet, M. Laguerre and I. Pianet, *Planta Med.*, 2011, **77**, 1116–1122.

107 C. Pascal, F. Paté, V. Cheynier and M.-A. Delsuc, *Biopolymers*, 2009, **91**, 745–756.

108 F.-F. Liu, X.-Y. Dong, L. He, A. P. J. Middelberg and Y. Sun, *J. Phys. Chem. B*, 2011, **115**, 11879–11887.

109 Y. Takaoka, A. Ojida and I. Hamachi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, **52**, 4088–4106.

110 U. Rix and G. Superti-Furga, *Nat. Chem. Biol.*, 2009, **5**, 616–624.

111 Y. Liu and M. Guo, *Proteomics*, 2014, **14**, 399–411.

112 F. Huang, B. Zhang, S. Zhou, X. Zhao, C. Bian and Y. Wei, *Chin. J. Cancer*, 2012, **31**, 507–518.

113 J. J. Fischer, O. Y. Graebner Neé Baessler and M. Dreger, *Methods Mol Biol.*, 2012, **795**, 135–147.

114 D. K. Nomura, M. M. Dix and B. F. Cravatt, *Nat. Rev. Cancer*, 2010, **10**, 630–638.

115 R. Aebersold and D. R. Goodlett, *Chem. Rev.*, 2001, **101**, 269–295.

116 D. Figeys, *Meth. Biochem. Anal.*, 2005, **45**, 1–62.

117 M. R. Wilkins, K. L. Williams, R. D. Appel and D. F. Hochstrasser, Eds., *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics*, Springer, 1997.

118 D. Nedelkov and R. W. Nelson, *New and emerging proteomic techniques*, Humana Press, 2006.

119 Z. R. Gregorich, Y.-H. Chang and Y. Ge, *Pflugers Arch.*, 2014, **466**, 1199–1209.

120 Z. R. Gregorich and Y. Ge, *Proteomics*, 2014, **14**, 1195–1210.

121 J. Whitelegge, *Expert Rev. Proteomics*, 2014, **10**, 127–129.

122 J. C. Tran, L. Zamdborg, D. R. Ahlf, J. E. Lee, A. D. Catherman, K. R. Durbin, J. D. Tipton, A. Vellaichamy, J. F. Kellie, M. Li, C. Wu, S. M. M. Sweet, B. P. Early, N. Siuti, R. D. LeDuc, P. D. Compton, P. M. Thomas and N. L. Kelleher, *Nature*, 2011, **480**, 254–258.

123 Y. Zhang, B. R. Fonslow, B. Shan, M.-C. Baek and J. R. Yates, *Chem. Rev.*, 2013, **113**, 2343–2394.

124 R. L. Gundry, M. Y. White, C. I. Murray, L. A. Kane, Q. Fu, B. A. Stanley and J. E. Van Eyk, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2009, Unit 10.25.

125 P. Matsudaira, *Methods Enz.*, 1990, **182**, 602–613.

126 S. Duban-Deweer, J. Hachani, B. Deracinois, R. Cecchelli, C. Flahaut and Y.

Karamanos, in *Proteomics - Human Diseases and Protein Functions*, ed. T. K. Man, InTech, 2012, pp. 391–416.

127 H. K. Hustoft, H. Malerod, S. R. Wilson, L. Reubsaet, E. Lundanes and T. Greibrokk, *A Critical Review of Trypsin Digestion for LC-MS Based Proteomics*, InTech, 2012.

128 M. B. Strader, D. L. Tabb, W. J. Hervey, C. Pan and G. B. Hurst, *Ana. Chem.*, 2006, **78**, 125–134.

129 P. Feist and A. B. Hummon, *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, **16**, 3537–3563.

130 J. R. Wiśniewski, A. Zougman, N. Nagaraj and M. Mann, *Nat. Methods*, 2009, **6**, 359–362.

131 R. L. Gundry, M. Y. White, C. I. Murray, L. a. Kane, Q. Fu, B. a. Stanley and J. E. Van Eyk, *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, 2009, **10.25**, 1–23.

132 P. Lescuyer, M. Chevallet and T. Rabilloud, *M/S Médecine Sci.*, 2004, **20**, 587–592.

133 A. Makarov, E. Denisov, A. Kholomeev, W. Balschun, O. Lange, K. Strupat and S. Horning, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 2113–2120.

134 J. R. Yates, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 1629–1640.

135 B. Thiede, W. Höhenwarter, A. Krah, J. Mattow, M. Schmid, F. Schmidt and P. R. Jungblut, *Methods*, 2005, **35**, 237–247.

136 J. J. Coon, J. E. P. Syka, J. Shabanowitz and D. F. Hunt, *Biotechniques*, 2005, **38**, 519–523.

137 O. Alzate, Ed., *Neuroproteomics*, Boca Raton (FL): CRC Press, 2010.

138 R. Aebersold and M. Mann, *Nature*, 2003, **422**, 198–207.

139 L. Miguet, "Nouvelles méthodologies dans l'analyse protéomique par spectrométrie de masse. Application à la recherche de biomarqueurs dans le cadre des leucémies", Thèse de doctorat d'université, Université Louis Pasteur de Strasbourg, 2006.

140 K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita and Y. Yoshida, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1988, **2**, 151–153.

141 M. Karas and F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, 1988, **60**, 2299–2301.

142 J. K. Lewis, J. Wei and G. Siuzdak, *Encycl. Anal. Chem.*, 2000, 5880–5894.

143 H. S. Chen, T. Rejtar, V. Andreev, E. Moskovets and B. L. Karger, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 7816–7825.

144 F. Burlina, S. Sagan, G. Bolbach and G. Chassaing, *Nat. Protoc.*, 2006, **1**, 200–205.

145 L. Käll, J. D. Canterbury, J. Weston, W. S. Noble and M. J. MacCoss, *Nat. Methods*, 2007, **4**, 923–925.

146 S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman, *J. Mol. Biol.*, 1990, **215**, 403–410.

147 D. Ren, N. A. Penner, B. E. Slentz and F. E. Regnier, *J. Prot. Res.*, 2004, **3**, 37–45.

148 G. L. Corthals, V. C. Wasinger, D. F. Hochstrasser and J. C. Sanchez, *Electrophoresis*, 2000, **21**, 1104–1115.

149 E. S. Baker, T. Liu, V. A. Petyuk, K. E. Burnum-Johnson, Y. M. Ibrahim, G. A. Anderson and R. D. Smith, *Genome Med.*, 2012, **4**, 63.

150 C. Chalumeau, "Développement d'outils chimiques pour l'élucidation de la biosynthèse des flavonoïdes du raisin : Anthocyanes versus proanthocyanidines", Thèse de doctorat d'université, Université de Bordeaux 1, 2010.

151 M. J. Evans and B. F. Cravatt, *Chem. Rev.*, 2006, **106**, 3279–3301.

152 Y. Liu, M. P. Patricelli and B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, **96**, 14694–14699.

153 D. Kidd, Y. Liu and B. F. Cravatt, *Biochemistry*, 2001, **40**, 4005–4015.

154 K. T. Barglow and B. F. Cravatt, *Nat. Methods*, 2007, **4**, 822–827.

155 G. M. Simon and B. F. Cravatt, *J. Biol. Chem.*, 2010, **285**, 11051–11055.

156 D. Greenbaum, K. F. Medzihradszky, A. Burlingame and M. Bogyo, *Chem. Biol.*, 2000, **7**, 569–581.

157 D. A. Jeffery and M. Bogyo, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2003, **14**, 87–95.

158 A. M. Sadaghiani, S. H. Verhelst and M. Bogyo, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2007, **11**, 20–28.

159 K. Wang, T. Yang, Q. Wu, X. Zhao, E. C. Nice and C. Huang, *Expert Rev. Proteomics*, 2012, **9**, 293–310.

160 C. M. Kam, A. S. Abuelyaman, Z. Li, D. Hudig and J. C. Powers, *Bioconjug. Chem.*, 1993, **4**, 560–567.

161 M. C. Hagenstein and N. Sewald, *J. Biotechnol.*, 2006, **124**, 56–73.

162 B. F. Cravatt, A. T. Wright and J. W. Kozarich, *Annu. Rev. Biochem.*, 2008, **77**, 383–414.

163 C. M. Salisbury and B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 2184–2194.

164 T. Böttcher, M. Pitscheider and S. A. Sieber, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, **49**, 2680–2698.

165 R. E. Wang, C. R. Hunt, J. Chen and J. S. Taylor, *Bioorg. Med. Chem.*, 2011, **19**, 4710–4720.

166 L. Yu, H. Liu, W. Li, F. Zhang, C. Luckie, R. B. van Breemen, G. R. J. Thatcher and J. L. Bolton, *Chem. Res. Toxicol.*, 2004, **17**, 879–888.

167 D. Rotili, M. Altun, R. B. Hamed, C. Loenarz, A. Thalhammer, R. J. Hopkinson, Y.-M. Tian, P. J. Ratcliffe, A. Mai, B. M. Kessler and C. J. Schofield, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 1488–1490.

168 L. Burdine, T. G. Gillette, H.-J. Lin and T. Kodadek, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**,

11442–11443.

169 S. Michaelis, A. Marais, A. K. Schrey, O. Y. Graebner, C. Schaudt, M. Sefkow, F. Kroll, M. Dreger, M. Glinski, H. Koester, R. Metternich and J. J. Fischer, *J. Med. Chem.*, 2012, **55**, 3934–3944.

170 T. Sugimoto, T. Fujii, Y. Hatanaka, S. Yamamura and M. Ueda, *Tetrahedron Lett.*, 2002, **43**, 6529–6532.

171 T. Fujii, T. Sugimoto, S. Yamamura and M. Ueda, *Tetrahedron Lett.*, 2003, **44**, 2497–2499.

172 C. Xu, E. Soragni, C. J. Chou, D. Herman, H. L. Plasterer, J. R. Rusche and J. M. Gottesfeld, *Chem. Biol.*, 2009, **16**, 980–989.

173 H. Köster, D. P. Little, P. Luan, R. Muller, S. M. Siddiqi, S. Marappan and P. Yip, *Assay Drug Dev. Technol.*, 2007, **5**, 381–390.

174 R. Orth and S. A. Sieber, *J. Org. Chem.*, 2009, **74**, 8476–8479.

175 J. J. Fischer, S. Michaelis, A. K. Schrey, O. G. nee Graebner, M. Glinski, M. Dreger, F. Kroll and H. Koester, *Toxicol. Sci.*, 2010, **113**, 243–253.

176 T. Lenz, P. Poot, E. Weinhold and M. Dreger, in *Chemical Proteomics: Methods and Protocols*, eds. G. Drewes and M. Bantscheff, Humana Press, 2011, pp. 97–125.

177 L. Wirsing, K. Naumann and T. Vogt, *Anal. Biochem.*, 2011, **408**, 220–225.

178 J. J. Fischer, O. Y. Graebner Baessler, C. Dalhoff, S. Michaelis, A. K. Schrey, J. Ungewiss, K. Andrich, D. Jeske, F. Kroll, M. Glinski, M. Sefkow, M. Dreger and H. Köster, *J. Proteome Res.*, 2010, **9**, 806–817.

179 L. Dubinsky, B. P. Krom and M. M. Meijler, *Bioorg. Med. Chem.*, 2012, **20**, 554–570.

180 Y. Luo, C. Blex, O. Baessler, M. Glinski, M. Dreger, M. Sefkow and H. Köster, *Mol. Cell. Proteomics*, 2009, **8**, 2843–2856.

181 C. Dalhoff, M. Hüben, T. Lenz, P. Poot, E. Nordhoff, H. Köster and E. Weinhold, *ChemBioChem*, 2010, **11**, 256–265.

182 M. Hashimoto and Y. Hatanaka, *Eur. J. Org. Chem.*, 2008, 2513–2523.

183 E. a. Bayer and M. Wilchek, *J. Chromatogr. A*, 1990, **510**, 3–11.

184 T. K. T. Nguyễn, Ed., *Magnetic Nanoparticles From Fabrication to Clinical Applications*, CRC Press, 2006.

185 H. Towbin, T. Staehelin and J. Gordon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, **76**, 4350–4354.

186 G. C. Adam, J. Burbaum, J. W. Kozarich, M. P. Patricelli and B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 1363–1368.

187 Z. Wang, N. D. Udeshi, M. O'Malley, J. Shabanowitz, D. F. Hunt and G. W. Hart, *Mol. Cell. Proteomics*, 2010, **9**, 153–160.

188 J. J. Fischer, O. Graebner, M. Dreger, M. Glinski, S. Baumgart and H. Köster, *J. Biomed. Biotech.*, 2011, 1–5.

189 A. P. Seddon and K. T. Douglas, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1981, **102**, 15–21.

190 *Thermo Scientific: Avidin-Biotin Technical Handbook*, Thermo Scientific, 2009.

191 T. Meier and F. Fahrenholz, Eds., *A Laboratory Guide to Biotin-Labeling in Biomolecule Analysis*, Birkhäuser Basel, Basel, 1996.

192 U. K. Laemmli, *Nature*, 1970, **227**, 680–685.

193 D. Mellacheruvu, Z. Wright, A. L. Couzens, J.-P. Lambert, N. A. St-Denis, T. Li, Y. V Miteva, S. Hauri, M. E. Sardiu, T. Y. Low, V. A. Halim, R. D. Bagshaw, N. C. Hubner, A. Al-Hakim, A. Bouchard, D. Faubert, D. Fermin, W. H. Dunham, M. Goudreault, Z.-Y. Lin, B. G. Badillo, T. Pawson, D. Durocher, B. Coulombe, R. Aebersold, G. Superti-Furga, J. Colinge, A. J. R. Heck, H. Choi, M. Gstaiger, S. Mohammed, I. M. Cristea, K. L. Bennett, M. P. Washburn, B. Raught, R. M. Ewing, A.-C. Gingras and A. I. Nesvizhskii, *Nat. Methods*, 2013, **10**, 730–736.

194 J. Szychowski, A. Mahdavi, J. J. L. Hodas, J. D. Bagert, J. T. Ngo, P. Landgraf, D. C. Dieterich, E. M. Schuman and D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 18351–18360.

195 H.-Y. H. Kim, K. A. Tallman, D. C. Liebler and N. A. Porter, *Mol. Cell. Proteomics*, 2009, **8**, 2080–2089.

196 X. Bai, S. Kim, Z. Li, N. J. Turro and J. Ju, *Nucl. Acids Res.*, 2004, **32**, 535–541.

197 J. D. Hirsch, L. Eslamizar, B. J. Filanoski, N. Malekzadeh, R. P. Haugland, J. M. Beechem and R. P. Haugland, *Anal. Biochem.*, 2002, **308**, 343–357.

198 K. Hofmann, S. W. Wood, C. C. Brinton, J. a Montibeller and F. M. Finn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, **77**, 4666–4668.

199 E. Morag, E. A. Bayer and M. Wilchek, *Biochem. J.*, 1996, **316**, 193–199.

200 G. O. Reznik, S. Vajda, C. R. Cantor and T. Sano, *Bioconjug. Chem.*, 2001, **12**, 1000–1004.

201 M. Howarth, D. J.-F. Chinnapen, K. Gerrow, P. C. Dorrestein, M. R. Grandy, N. L. Kelleher, A. El-Husseini and A. Y. Ting, *Nat. Methods*, 2006, **3**, 267–73.

202 G. Leriche, L. Chisholm and A. Wagner, *Bioorg. Med. Chem.*, 2012, **20**, 571–582.

203 G. Leriche, "Etude de fonctions chimiques clivables en milieux biologiques et leurs applications en protéomique chimique et imagerie de fluorescence", Thèse de doctorat d'université, Université de Strasbourg, 2012.

204 L. I. Willems, W. A. Van der Linden, N. Li, K.-Y. Li, N. Liu, S. Hoogendoorn, G. A. Van der Marel, B. I. Florea and H. S. Overkleeft, *Acc. Chem. Res.*, 2011, **44**, 718–729.

205 E. Weerapana, A. E. Speers and B. F. Cravatt, *Nat. Protoc.*, 2007, **2**, 1414–1425.

206 G. Leriche, G. Budin, L. Brino and A. Wagner, *Eur. J. Org. Chem.*, 2010, 4360–4364.

207 F. Landi, C. M. Johansson, D. J. Campopiano and A. N. Hulme, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 56–59.

208 K. D. Park, R. Liu and H. Kohn, *Chem. Biol.*, 2009, **16**, 763–72.

209 A. Dirksen, S. Yegneswaran and P. E. Dawson, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, **49**, 2023–2027.

210 J. Olejnik, S. Sonar, E. Krzymañska-Olejnik and K. J. Rothschild, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, **92**, 7590–7594.

211 K. J. Rothschild, S. M. Sonar and J. Olejnik, *U.S. Patent*, 1999, US 005986076A.

212 J. Olejnik, E. Krzymañska-Olejnik and K. J. Rothschild, *Nuc. Acids Res.*, 1996, **24**, 361–366.

213 M. W. Pandori, D. A. Hobson, J. Olejnik, E. Krzymanska-Olejnik, K. J. Rothschild, A. A. Palmer, T. J. Phillips and T. Sano, *Chem. Biol.*, 2002, **9**, 567–573.

214 J. Olejnik, H. C. Lüdemann, E. Krzymanska-Olejnik, S. Berkenkamp, F. Hillenkamp and K. J. Rothschild, *Nucl. Acids Res.*, 1999, **27**, 4626–4631.

215 R. G. Handwerger and S. L. Diamond, *Bioconjug. Chem.*, 2007, **18**, 717–723.

216 Z. Wang, N. D. Udeshi, M. O'Malley, J. Shabanowitz, D. F. Hunt and G. W. Hart, *Mol. Cell. Proteomics*, 2010, **9**, 153–160.

217 H. Zhao, E. S. Sterner, E. B. Coughlin and P. Theato, *Macromolecules*, 2012, **45**, 1723–1736.

218 C. G. Bochet, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2001, 125–142.

219 P. Klán, T. Šolomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov and J. Wirz, *Chem. Rev.*, 2013, **113**, 119–191.

220 H. Yu, J. Li, D. Wu, Z. Qiu and Y. Zhang, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 464–473.

221 G. Mayer and A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, **45**, 4900–4921.

222 M. A. Azagarsamy and K. S. Anseth, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, **125**, 14048–14052.

223 J. A. Barltrop, P. J. Plant and P. Schofield, *Chem. Commun.*, 1966, 822.

224 A. Patchornik, B. Amit and R. B. Woodward, *J. Am. Chem. Soc.*, 1970, **92**, 6333–6335.

225 W. M. Horspool and F. Lenci, Eds., *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*, CRC Press, 2003, vol. 95.

226 J. F. Cameron and J. M. J. Frechet, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 4303–4313.

227 A. P. Pelliccioli and J. Wirz, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2002, **1**, 441–458.

228 Y. V Il'ichev, M. A. Schwörer and J. Wirz, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 4581–4595.

229 W. E. Georgianna, H. Lusic, A. L. McIver and A. Deiters, *Bioconjug. Chem.*, 2010, **21**, 1404–1407.

230 H. Zhou, J. A. Ranish, J. D. Watts and R. Aebersold, *Nat. Biotechnol.*, 2002, **20**, 512–515.

231 P. D. Senter, M. J. Tansey, J. M. Lambert and W. A. Blättler, *Photochem. Photobiol.*, 1985, **42**, 231–237.

232 R. W. Wood, *Phil. Magm.*, 1902, **4**, 396–402.

233 N. J. de Mol and M. J. E. Fischer, *Methods Mol. Biol.*, 2010, **627**, 1–14.

234 R. L. Rich and D. G. Myszka, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2000, **11**, 54–61.

235 GE Healthcare, *Biacore Sensor Surface Handbook*, www.biacore.com, 2008.

236 GE Healthcare, *Biacore Assay Handbook*, www.biacore.com, 2012.

237 J. Homola, S. S. Yee and G. Gauglitz, *Sens. Actuators, B*, 1999, **54**, 3–15.

238 GE Healthcare, *Product information: Biacore® 3000*, www.biacore.com, 2003.

239 P. Schuck, L. F. Boyd and P. S. Andersen, *Curr. Protoc. Cell Biol.*, 2001, **17**, 17.6.1–17.6.22.

240 J. Buijs and G. C. Franklin, *Brief. Funct. Genomic Proteomic*, 2005, **4**, 39–47.

241 S. Quideau, C. Douat-Casassus, D. M. Delannoy López, C. Di Primo, S. Chassaing, R. Jacquet, F. Saltel and E. Genot, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, **50**, 5099–5104.

242 D. M. Delannoy Lopez, "Synthèse de dérivés de polyphénols bioactifs pour l'étude de leurs interactions avec les protéines", Thèse de doctorat d'université, Université de Bordeaux 1, 2012.

243 F. Wellmann, M. Griesser, W. Schwab, S. Martens, W. Eisenreich, U. Matern and R. Lukačin, *FEBS Lett.*, 2006, **580**, 1642–1648.

244 E. L. Vodovozova, *Biochem.*, 2007, **72**, 1–20.

245 R. Narain, Ed., *Chemistry of Bioconjugates: Synthesis, Characterization, and Biomedical Applications*, John Wiley & Sons, Inc., 2014.

246 C. J. Shields, D. R. Chrisope, G. B. Schuster, A. J. Dixon, M. Poliakoff and J. J. Turner, *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, **109**, 4723–4726.

247 T. Kodadek, I. Duroux-Richard and J.-C. Bonnafous, *TRENDS Pharmacol. Sci.*, 2005, **26**, 210–217.

248 B. Liu, L. Burdine and T. Kodadek, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 15228–15235.

249 B. Liu, C. T. Archer, L. Burdine, T. G. Gillette and T. Kodadek, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 12348–12349.

250 A. C. Obermeyer, J. B. Jarman, C. Netirojjanakul, K. El Muslemany and M. B. Francis, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, **53**, 1057–1061.

251 A. C. Obermeyer, J. B. Jarman and M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 9572–9579.

252 C. R. Behrens, J. M. Hooker, A. C. Obermeyer, D. W. Romanini, E. M. Katz and M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 16398–16401.

253 E. Petit, "Réactivité de Polyphénols du Vin sous Conditions Oxydantes - Hémisynthèse

des Mongolicaïnes, et d'Adduits entre Polyphénols et Thiols Odorants", Thèse de doctorat d'université, Université de Bordeaux 1, 2013.

254 J. J. Turnbull, M. J. Nagle, J. F. Seibel, R. W. D. Welford, G. H. Grant and C. J. Schofield, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, **13**, 3853–3857.

255 H. Carrié, "Développement de sondes moléculaires appliquées a l'étude de la biosynthèse des flavonoïdes", Thèse de doctorat d'université, Université de Bordeaux 1, 2013.

256 K. D. Sears, R. L. Casebier, H. L. Hergert, G. H. Stout and L. E. McCandlish, *J. Org. Chem.*, 1974, **39**, 3244–3247.

257 P. Kiatgrajai, J. D. Wellons, L. Gollob and J. D. White, *J. Org. Chem.*, 1982, **47**, 2910–2912.

258 J. Kennedy, M. Munro, H. Powell, L. Porter and L. Foo, *Aust. J. Chem.*, 1984, **37**, 885–892.

259 J. Muskifa, R. A. Khan, I. A. Khan and D. Ferreira, *Org. Prep. Proced. Int.*, 2004, **36**, 61–67.

260 P. J. Steynberg, R. J. J. Nel, H. van Rensburg, B. C. B. Bezuidenhoudt and D. Ferreira, *Tetrahedron*, 1998, **54**, 8153–8158.

261 L. J. Romanczyk Jr., A. P. Kozikowski, W. Tückmantel and M. E. Lippman, *U.S. Patent*, 2002, US 006420572B1.

262 E. Kiehlmann, P. J. Van der Merwe and H. K. L. Hundt, *Org. Prep. Proc. Int.*, 1983, **15**, 341–348.

263 W. Tückmantel, A. P. Kozikowski and L. J. Romanczyk, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 12073–12081.

264 F.-D. Boyer, J. Beauhaire, M. T. Martin and P.-H. Ducrot, *Synthesis*, 2006, **2006**, 3250–3260.

265 G. Goetz, A. Fkyerat, N. Métais, M. Kunz, R. Tabacchi, R. Pezet and V. Pont, *Phytochemistry*, 1999, **52**, 759–767.

266 W. S. Wadsworth and W. D. Emmons, *J. Am. Chem. Soc.*, 1961, **83**, 1733–1738.

267 B. M. O'Leary, T. Szabo, N. Svenstrup, C. A. Schalley, A. Lützen, M. Schäfer and J. Rebek, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 11519–11533.

268 B. List, A. Doehring, M. T. Hechavarria Fonseca, A. Job and R. Rios Torres, *Tetrahedron*, 2006, **62**, 476–482.

269 D. Felder, M. G. Nava, M. del P. Carreón, J.-F. Eckert, M. Luccisano, C. Schall, P. Masson, J.-L. Gallani, B. Heinrich, D. Guillon and J.-F. Nierengarten, *Helv. Chim. Acta.*, 2002, **85**, 288–319.

270 K. M. Bonger, S. Hoogendoorn, C. J. van Koppen, C. M. Timmers, H. S. Overkleeft and

G. A. van der Marel, *ChemMedChem*, 2009, **4**, 2098–2102.

271 G. R. Srinivasa, S. N. N. Babu, C. Lakshmi and D. C. Gowda, *Synth. Commun.*, 2006, **34**, 1831–1837.

272 Y. Kojima, T. Sunazuka, K. Nagai, K. Julfakyan, T. Fukuda, H. Tomoda and S. Omura, *J. Antibiot.*, 2008, **61**, 297–302.

273 M. J. Bowman and J. Chmielewski, *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, **17**, 967–976.

274 S. Fixon-Owoo, F. Levasseur, K. Williams, T. N. Sabado, M. Lowe, M. Klose, A. Joffre Mercier, P. Fields and J. Atkinson, *Phytochemistry*, 2003, **63**, 315–334.

275 R. J. Bergeron and J. S. McManis, *J. Org. Chem.*, 1988, **53**, 3108–3111.

276 D. Bonnet, B. Ilien, J. Galzi, S. Riché, C. Antheaune and M. Hibert, *Bioconjug. Chem.*, 2006, **17**, 1618–1623.

277 I. Alfonso, M. Bolte, M. Bru, M. I. Burguete, S. V Luis and J. Rubio, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 6137–6144.

278 Z.-Y. Chen, Q. Y. Zhu, Y. F. Wong, Z. Zhang and H. Y. Chung, *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**, 2512–2516.

279 K. Upadhya, I. K. Khattak and B. Mullah, *Nucleos. Nucleot. Nucl.*, 2005, **24**, 919–922.

280 X. Zhou, J. Shearer and S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 9046–9047.

281 R. K. Garlick and R. W. Gieset, *Biochem. J.*, 1990, **268**, 611–613.

282 S. Meinel, S. Ruhs, K. Schumann, N. Strätz, K. Trenkmann, B. Schreier, I. Grosse, J. Keilwagen, M. Gekle and C. Grossmann, *Nucl. Acids Res.*, 2013, **41**, 8045–8060.

283 G. Xu, S. B. Y. Shin and S. R. Jaffrey, *ACS Chem. Biol.*, 2011, **6**, 1015–1020.

284 D. Saran and D. H. Burke, *Bioconjug. Chem.*, 2007, **18**, 275–279.

285 L. Kammari, T. Šolomek, B. P. Ngoy, D. Heger and P. Klán, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 11431–11433.

286 M. Ratel, A. Provencher-Girard, S. S. Zhao, J. Breault-Turcot, J. Labrecque-Carbonneau, M. Branca, J. N. Pelletier, A. R. Schmitzer and J. F. Masson, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 5770–5777.

287 K. Susumu, H. T. Uyeda, I. L. Medintz, T. Pons, J. B. Delehanty and H. Mattoussi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 13987–13996.

288 J. Szychowski, A. Mahdavi, J. J. L. Hodas, J. D. Bagert, J. T. Ngo, P. Landgraf, D. C. Dieterich, E. M. Schuman and D. a Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 18351–18360.

289 R. G. Sherrill and E. E. Sugg, *J. Org. Chem.*, 1995, **60**, 730–734.

290 N. Pendem, Y. R. Nelli, C. Douat, L. Fischer, M. Laguerre, E. Ennifar, B. Kauffmann and G. Guichard, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, **52**, 4147–4151.

291 S. Takamori, S. Yamaguchi, N. Ohashi and T. Nagamune, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 3013–3015.

292 P. Bottari, R. Aebersold, F. Turecek and M. H. Gelb, *Bioconjug. Chem.*, 2004, **15**, 380–388.

293 D. D'Addona and C. G. Bochet, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**, 5227–5229.

294 G. L. Hamilton and B. J. Backes, *Tetrahedron Lett.*, 2006, **47**, 967–968.

295 T. Koopmans, F. J. Dekker and N. I. Martin, *RSC Adv.*, 2012, **2**, 2244–2246.

296 F.-T. Liu and N. J. Leonard, *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, **101**, 996–1005.

297 D. B. Melville, D. S. Genghof and J. M. Lee, *J. Biol. Chem.*, 1954, **208**, 503–512.

298 D. Wöll, S. Walbert, K.-P. Stengele, T. J. Albert, T. Richmond, J. Norton, M. Singer, R. D. Green, W. Pfleiderer and U. E. Steiner, *Helv. Chim. Acta*, 2004, **87**, 28–45.

299 D. Wöll, N. Lukzen and U. E. Steiner, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2012, **11**, 533–538.

300 D. Wöll, S. Laimgruber, M. Galetskaya, J. Smirnova and W. Pfleiderer, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 12148–12158.

301 M. C. Pirrung, T. M. Dore, Y. Zhu and V. S. Rana, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 5313–5315.

302 P. Zuman and B. Shah, *Chem. Rev.*, 1994, **94**, 1621–1641.

303 M. C. Pirrung, Y. R. Lee, K. Park and J. B. Springer, *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, 5042–5047.

304 C. Auzanneau, D. Montaudon, R. Jacquet, S. Puyo, L. Pouységu, D. Deffieux, A. Elkaoukabi-Chaibi, F. De Giorgi, F. Ichas, S. Quideau and P. Pourquier, *Mol. Pharmacol.*, 2012, **82**, 134–141.

305 N. Toda, S. Asano and C. F. Barbas, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, **52**, 12592–12596.

306 S. Le Gac, E. Schwartz, M. Koepf, J. J. L. M. Cornelissen, A. E. Rowan and R. J. M. Nolte, *Chem. Eur. J.*, 2010, **16**, 6176 – 6186.

307 J. F. W. Keana, M. D. Ogan, Y. Lü, M. Beer and J. Varkey, *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, **108**, 7957–7963.

308 K. Thibaudeau, R. Léger, X. Huang, M. Robitaille, O. Quraishi, C. Soucy, N. Bousquet-Gagnon, P. van Wyk, V. Paradis, J.-P. Castaigne and D. Bridon, *Bioconjug. Chem.*, 2005, **16**, 1000–1008.

309 F. G. Mizori and S. M. Dershem, *U.S. Patent*, 1999, US 005973166A.

310 A. P. Kozikowski, W. Tückmantel and Y. Hu, *J. Org. Chem.*, 2001, **66**, 1287–1296.

311 F. He, Q. H. Pan, Y. Shi and C. Q. Duan, *Molecules*, 2008, **13**, 3007–3032.

312 A. P. Kozikowski, W. Tückmantel, G. Böttcher and L. J. Romanczyk, *J. Org. Chem.*, 2003, **68**, 1641–1658.

313 A. Saito, N. Nakajima, A. Tanaka and M. Ubukata, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2002, **66**, 1764–1767.

314 A. Saito, N. Nakajima, N. Matsuura, A. Tanaka and M. Ubukata, *Heterocycles*, 2004,

62, 479–489.

315 K. Ohmori, T. Shono, Y. Hatakoshi, T. Yano and K. Suzuki, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, **50**, 4862–4867.

316 I. Tarascou, K. Barathieu, Y. André, I. Pianet, E. J. Dufourc and E. Fouquet, *Eur. J. Org. Chem.*, 2006, **2006**, 5367–5377.

317 A. Saito, N. Nakajima, A. Tanaka and M. Ubukata, *Tetrahedron*, 2002, **58**, 7829–7837.

318 N.-E. Es-Safi, C. Le Guernevé, L. Kerhoas and P.-H. Ducrot, *Tetrahedron*, 2006, **62**, 2705–2714.

319 C. Hendrik, L. Mouton, J. A. Steenkamp, D. A. Young, B. C. B. Bezuidenhoudt and D. Ferreira, *Tetrahedron*, 1990, **46**, 6885–6894.

320 K. Ohmori, N. Ushimaru and K. Suzuki, *Tetrahedron Lett.*, 2002, **43**, 7753–7756.

321 C. H. L. Mouton, D. Ferreira and J. A. Steenkamp, in *Plant Polyphenols*, eds. R. W. Hemingway and P. E. Laks, Springer US, Plenum Press: New York, 1992, pp. 133–141.

322 I. Tarascou, "Synthèse et caractérisation de procyanidines oligomères pour l'identification de tanins du raisin et du vin", Thèse de doctorat d'université, Université de Bordeaux 1, 2005.

323 M. A. Blanchette, W. Choy, J. T. Davis, A. P. Essenfeld, S. Masamune, W. R. Roush and T. Sakai, *Tetrahedron Lett.*, 1984, **25**, 2183–2186.

324 H. Tanaka, A. Chino and T. Takahashi, *Tetrahedron Lett.*, 2012, **53**, 2493–2495.

325 L. Li and T. H. Chan, *Org. Lett.*, 2001, **3**, 739–741.

326 S. B. Wan, K. R. Landis-Piwowar, D. J. Kuhn, D. Chen, Q. P. Dou and T. H. Chan, *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, **13**, 2177–2185.

327 L. Actis-Goretta, F. Viton, D. M. Barron and F. Dionisi, *U.S. Patent*, 2014, US 20140171631A1.

328 F. Romanov-Michailidis, F. Viton, R. Fumeaux, A. Lévèques, L. Actis-Goretta, M. Rein, G. Williamson and D. M. Barron, *Org. Lett.*, 2012, **14**, 3902–3905.

329 C. Huo, G. Shi, W. H. Lam, D. Chen, Q. C. Cui, Q. P. Dou and T. H. Chan, *Can. J. Chem.*, 2008, **86**, 495–502.

330 S. B. Wan, Q. Ping Dou and T. H. Chan, *Tetrahedron*, 2006, **62**, 5897–5904.

331 T.-J. Ding, X.-L. Wang and X.-P. Cao, *Chin. J. Chem.*, 2006, **24**, 1618–1624.

332 K. Krohn, I. Ahmed and M. John, *Synthesis*, 2009, 779–786.

333 S. Jew, H. Kim, S. Bae, J. Kim and H. Park, *Tetrahedron Lett.*, 2000, **41**, 7925–7928.

334 S. Jew, D. Lim, S. Bae, H. Kim, J. Kim, J. Lee and H. Park, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2002, **13**, 715–720.

335 H. van Rensburg, P. S. van Heerden, B. C. B. Bezuidenhoudt and D. Ferreira, *Tetrahedron Lett.*, 1997, **38**, 3089–3092.

336 T. Higuchi, K. Ohmori and K. Suzuki, *Chem. Lett.*, 2006, **35**, 1006–1007.

337 K. Ohmori, T. Yano and K. Suzuki, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 2693–2696.

338 J. C. Anderson, H. Grounds, S. Reeves and P. W. Taylor, *Tetrahedron*, 2014, **70**, 3485–3490.

339 Y. Liu, X. Li, G. Lin, Z. Xiang, J. Xiang, M. Zhao, J. Chen and Z. Yang, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 4625–4629.

340 G. Lin, L. Chang, Y. Liu, Z. Xiang, J. Chen and Z. Yang, *Chem. Asian J.*, 2013, **8**, 700–704.

341 B. Nay, M. Collet, M. Lebon, C. Chèze and J. Vercauteren, *Tetrahedron Lett.*, 2002, **43**, 2675–2678.

342 Z. Shi and C. He, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 5964–5965.

343 H. Kawamoto, F. Nakatsubo and K. Murakami, *Synth. Commun.*, 1996, **26**, 531–534.

344 H.-F. Chow, Z.-Y. Wang and Y.-F. Lau, *Tetrahedron*, 1998, **54**, 13813–13824.

345 P. M. Tadross, C. D. Gilmore, P. Bugga, S. C. Virgil and B. M. Stoltz, *Org. Lett.*, 2010, **12**, 1224–1227.

346 X. Su, D. S. Surry, R. J. Spandl and D. R. Spring, *Org. Lett.*, 2008, **10**, 2593–2596.

347 S. Quideau and J. Ralph, *J. Agric. Food Chem.*, 1992, **40**, 1108–1110.

348 Z. Wei, J. Michael Moldowan, J. Dahl, T. P. Goldstein and D. M. Jarvie, *Org. Geochem.*, 2006, **37**, 1421–1436.

349 P. Chattopadhyay and P. S. Pandey, *Tetrahedron*, 2006, **62**, 8620–8624.

350 G. Malik, A. Natangelo, J. Charris, L. Pouységu, S. Manfredini, D. Cavagnat, T. Buffeteau, D. Deffieux and S. Quideau, *Chem. Eur. J.*, 2012, **18**, 9063–9074.

351 A. Sánchez, E. Pedroso and A. Grandas, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 309–311.

352 R. Liu, R. Liew, J. Zhou and B. Xing, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, **46**, 8799–8803.

353 H. Basit, A. Van Der Heyden, C. Gondran, B. Nysten, P. Dumy and P. Labbé, *Langmuir*, 2011, **27**, 14317–14328.

354 S. Löfås, B. Johnsson, Å. Edström, A. Hansson, G. Lindquist, R.-M. M. Hillgren and L. Stigh, *Biosens. Bioelectron.*, 1995, **10**, 813–822.

355 B. Johnsson, S. Löfås, G. Lindquist, A. Edström, R. M. Müller Hillgren and A. Hansson, *J. Mol. Recogn.*, 1995, **8**, 125–131.

356 B. Johnsson, S. Löfås and G. Lindquist, *Anal. Biochem.*, 1991, **198**, 268–277.

357 A. Holmberg, A. Blomstergren, O. Nord, M. Lukacs, J. Lundeberg and M. Uhlén, *Electrophoresis*, 2005, **26**, 501–510.

358 M. J. E. Fischer, *Methods Mol. Biol.*, 2010, **627**, 55–73.

359 D. G. Myszka, *J. Mol. Recognit.*, 1999, **12**, 279–284.

360 G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz,

J. E. Bercaw and K. I. Goldberg, *Organometallics*, 2010, **29**, 2176–2179.

361 R. A. G. Smith and J. R. Knowles, *J. Am. Chem. Soc.*, 1973, **95**, 5072–5073.

362 H. S. Wong, E. I. Tolpin and W. N. Lipscomb, *J. Med. Chem.*, 1974, **17**, 785–791.

363 E. Kallin, H. Lönn and T. Norberg, *Glycoconjugate J.*, 1986, **3**, 311–319.

364 A. B. Reed, B. A. Lanman, S. Neira, P. E. Harrington, K. K. C. Sham, M. Frohn, A. J. Pickrell, A. S. Tasker, A. Gore, M. Fiorino, A. Itano, M. McElvain, S. Middleton, H. Morrison, H. Xu, Y. Xu, M. Wong and V. J. Cee, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012, **22**, 1779–1783.

365 H. Carrié, D. T. Tran, S. Rousseau, S. Chaignepain, J.-M. Schmitter, D. Deffieux and S. Quideau, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 9387–9389.

366 R. O. Clinton and T. A. Geissman, *J. Am. Chem. Soc.*, 1943, **65**, 85–87.

367 F. I. Carroll, H. M. Dickson and M. E. Wall, *J. Org. Chem.*, 1965, **30**, 33–38.

368 M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, 1976, **72**, 248–254.

369 T. S. Meyer and B. L. Lamberts, *Biochim. Biophys. Acta*, 1965, **107**, 144–145.

370 N. Dyballa and S. Metzger, *J. Vis. Exp.*, 2009, **30**, e1431.

371 H. Benbouza, J. Jacquemin, J. Baudoin and G. Mergeai, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 2006, **10**, 77 – 81.

372 C. Di Primo, *J. Mol. Recognit.*, 2008, **21**, 37–45.

Titre : Conception et synthèse de sondes moléculaires pour l'étude d'interactions polyphénol-protéine

Résumé : Les polyphénols sont des métabolites secondaires d'origine végétale. Ces substances naturelles connues pour leurs pouvoirs antioxydants et anti-radicalaires, contribuent à la protection de la santé humaine notamment contre les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, mais également contre certains cancers et diabètes. Dans certains cas, ces effets biologiques bénéfiques pour la santé pourraient également être liés à une interaction spécifique polyphénol-protéine peu étudiée à ce jour par manque d'outils moléculaires adaptés.

Les travaux effectués au cours de cette thèse ont consisté à concevoir, à synthétiser et à évaluer des sondes moléculaires polyvalentes porteuses de polyphénols comme substrats d'affinité pour l'analyse des interactions polyphénol-protéine. Dans ce contexte, de nombreuses sondes arborant différents types de polyphénols ont été synthétisées. Ces différentes sondes pourront être utilisées en protéomique chimique du type "Affinity-Based Protein Profiling" (ABPP) pour identifier au sein d'un mélange complexe de protéines, une protéine ayant une affinité spécifique pour un polyphénol donné. Ces mêmes sondes permettront également d'étudier de manière qualitative les interactions d'un polyphénol avec une protéine donnée en temps réel par la technique de résonance plasmonique de surface (SPR).

Mots clés : polyphénols, flavonoïdes, EGCG, procyanidine B2, sondes moléculaires, protéomique chimique, ABPP, SPR.

Title : Design and synthesis of molecular probes for studying polyphenol-protein interactions

Abstract : Polyphenols are plant secondary metabolites. These natural substances, known for their antioxidant and anti-free radical properties, generally contribute to the protection of human health not only against cardiovascular and neurodegenerative diseases, but also against certain cancers and diabetes. In some cases, these beneficial biological effects could also be related to specific polyphenol-protein interactions. However, studying this type of interactions has suffered from the lack of adequate molecular tools.

The work carried out during this thesis has included designing, synthesizing and evaluating modulable polyfunctional molecular probes carrying polyphenols as affinity substrates to analyze polyphenol-protein interactions. In this context, various probes harboring different kinds of polyphenols were synthesized. These probes could be used in chemical proteomics following an "Affinity-Based Protein Profiling" approach (ABPP) to identify a protein within complex protein mixtures, which has a specific affinity with a given polyphenol. These probes will also allow studying the interactions of a polyphenol with a given protein in real time in a qualitative way by surface plasmon resonance (SPR).

Keywords : polyphenols, flavonoids, EGCG, procyanidin B2, molecular probes, chemical proteomics, ABPP, SPR.

Institut des Sciences Moléculaires (ISM) - Université de Bordeaux

CNRS UMR 5255, Bâtiment A12, 351 cours de la libération, 33405 TALENCE cedex