

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

THÈSE
PRÉSENTÉE À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI
ET L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR
DOMINIC THIBEAULT
M. Sc.

ÉVALUATION DE L'IMPACT DE MODIFICATIONS CHIMIQUES SUR LE
POTENTIEL ANTICANCÉREUX DE PRODUITS NATURELS DE LA FORÊT
BORÉALE QUÉBÉCOISE

JUIN 2008

RÉSUMÉ

L'industrie forestière produit beaucoup de rebuts souvent peu utilisés tels que les écorces. D'ailleurs, on estime que 3,5 millions de tonnes d'écorces anhydres ont été produites au Québec en 2002. La nette majorité de ces écorces n'est pas valorisée et est incinérée pour la production énergétique. Actuellement, il existe peu de techniques au Québec autres que l'enfouissement et le brûlage pour disposer des résidus de l'industrie du bois de sciage. Ces déchets polluants et non valorisés par ces industries seraient donc une source très intéressante de produits finis. En effet, une vaste gamme de produits naturels présents au sein du règne végétal sont connus depuis fort longtemps pour avoir des propriétés thérapeutiques et pharmacologiques.

Certains triterpènes de la famille du lupane, présents dans les écorces externes du bouleau blanc (*Betula papyrifera*), sont des molécules naturelles connues depuis longtemps pour diverses activités biologiques intéressantes. Entre autres, le bétulinol et l'acide bétulinique sont réputés pour plusieurs actions antitumorales notables. Ces composés sont d'un grand intérêt dans le traitement des maladies cancéreuses compte tenue du coût élevé de production des médicaments de synthèse et de la résistance croissante des lignées cellulaires cancéreuses face aux traitements existants. À cela s'ajoute une très grande accessibilité de la matière première. Ainsi, le développement de nouveaux agents bioactifs d'origine naturel, dotés de mécanismes d'actions différents est pourvu d'un avenir très prometteur. Cependant, la faible hydrosolubilité des triterpènes du lupane est un facteur nuisible aux propriétés pharmacologiques et à un développement au-delà des études *in vitro*.

L'accroissement de l'hydrosolubilité et des propriétés pharmacologiques de triterpènes hydrophobes représente donc les objectifs de cette recherche doctorale. Pour ce faire, l'incorporation d'unités polaires et biocompatibles, ainsi que la modification même du squelette triterpénique a été effectuée. La glycosilation (greffage d'une unité sucre) et la glycérylation (greffage d'une unité glycérol) ont permis de générer plus d'une quarantaine de glycosides et (*R*)-glycérates triterpéniques en provenance du bétulinol, le composé prédominant dans les écorces externes de *Betula papyrifera*. Ces molécules synthétiques ont été testées pour évaluer leurs activités cytotoxiques sur les lignées cellulaires A-549, DLD-1 et WS1. La modification structurale a également permis de générer quelques nouveaux composés qui furent évalués sur les mêmes lignées cellulaires.

La grande majorité des glycosides préparés dans le cadre de notre étude se sont avérés être nullement antitumorale envers les cellules A-549 et DLD-1 alors que les rares composés qui ont démontré de bonnes valeurs de IC_{50} ($\approx 5-20 \mu M$) n'ont pas démontré de sélectivité en regard des cellules saines WS1. Bien que la solubilité en milieu aqueux des triterpènes employés a été améliorée, ces glycosides se sont révélés être des molécules dont la synthèse chimique et la purification peuvent être difficiles, avec des rendements très variables et une efficacité thérapeutique des plus incertaine. Les (*R*)-glycérates synthétisés sont également plus hydrosolubles que les triterpènes précurseurs et se sont révélés être des

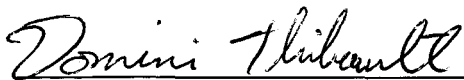
molécules beaucoup plus efficaces et prometteuses en tant qu'agents cytotoxiques. Les synthèses et purifications sont beaucoup plus faciles, simples et les rendements obtenus souvent supérieurs à ceux des glycosides. Chez les glycérate, des valeurs de IC_{50} ($\approx 16 \mu M$) comparables à l'acide bétulinique et près du bétulinol ont été mesurées sur les cellules A-549 et DLD-1, mais ces molécules ne sont pas sélectives en regard de WS1.

La modification structurale de triterpènes engendre fréquemment des réarrangements moléculaires chez la famille du lupane. Ces modifications génèrent très souvent des insaturations sur la molécule diminuant grandement la polarité de cette dernière et du même coup, abaissant l'hydrosolubilité d'une molécule déjà passablement peu hydrosoluble. Ces molécules très hydrophobes sont difficilement exploitables comme agents thérapeutiques. La synthèse de glycosides fut entreprise sur des composés générés accidentellement et certains de ces composés ont démontré de bonnes valeurs de IC_{50} ($\approx 20-30 \mu M$) sur les cellules A-549 et DLD-1; mais, une fois de plus, les composés ne sont pas sélectifs en regard de WS1.


Les altérations du squelette triterpénique doivent mener au développement de nouvelles molécules de plus grande polarité que son précurseur si l'on désire éviter l'incorporation d'une section polaire ou hydrophile. Ainsi, la synthèse de germanicanes similaire à l'acide machaéroécérique, triterpène présent chez *Machaerocereus eruca*, a été entreprise. Ce choix fut stimulé par trois facteurs: les résultats anticancéreux plus ou moins prometteurs obtenus jusqu'à présent, les études phytochimiques faisant de ce triterpène une molécule isolée mais jamais évaluée pour une quelconque bioactivité et sa synthèse apparemment aisée à partir du 28-oxoallobétulinol. Ce dernier est un triterpène aisément accessible et employé dans certaines études de la présente thèse. L'acide 19 β -machaéroécérique a pu être synthétisé mais ce dernier est peu anticancéreux comparé au 19 β -machaéroécérol, le composé le plus antitumorale de cette étude ($IC_{50} \approx 14-18 \mu M$). Aucun de ces germanicanes n'est sélectif en regard de WS1.

La synthèse de dérivés oxygénés de l' α -humulène, un projet très différent du projet initial, a également été entreprise mais ce projet fut abandonné suite aux multiples problèmes survenus et au manque de temps.

En somme, le greffage de groupements polaires et la modification structurale des triterpènes sont deux approches qui favorisent le développement de nouveaux agents thérapeutiques. Ainsi, ces recherches et les travaux futurs qui en découleront, pourront éventuellement mener au développement d'agents bioactifs efficaces tout en octroyant une haute valeur ajoutée à ce qui est considéré comme des déchets par les industries forestières.



Dominic Thibeault, Doctorant



André Pichette, Directeur

REMERCIEMENTS

Avant toute chose, j'aimerais spécifier que la présente thèse est écrite par articles scientifiques (chapitres 2 à 6) qui rapportent mes travaux de recherche, hormis le chapitre 7 qui traite de travaux qui n'ont pas abouti à une publication.

En premier lieu, je remercie mon directeur de recherche le docteur André Pichette pour m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche. Ainsi, j'ai eu la chance de poursuivre mon cheminement en synthèse organique et en chimie des produits naturels. J'ai également eu le privilège d'acquérir une précieuse expérience en enseignement. Il va sans dire que j'ai grandement développé mon autonomie, ma patience et mon jugement critique. Je veux en plus le remercier pour sa patience, sa bonté et pour ses judicieux conseils. Je remercie également mon codirecteur le docteur Jean Legault pour sa supervision du volet biologique de mes résultats.

Je ne veux pas oublier les gens autour de moi comme Serge Lavoie pour le support RMN et autres, Carole Grenon pour le service HPLC et Maxime LeBrun pour les tests anticancéreux. Il y a également deux étudiants parmi les quelques uns que j'ai supervisé durant mon doctorat que je veux remercier pour leurs aides en laboratoire: Éric Chiasson, qui terminera bientôt sa maîtrise en Ressources Renouvelables et Sébastien Vanier qui commence une maîtrise en synthèse organique avec le professeur Charrette à l'Université

de Montréal. Tous deux furent de bon travailleurs, seront de bons chimistes et demeureront de très bons amis.

Il y a une personne que je veux remercier particulièrement et il s'agit du docteur Jimmy Bouchard, que j'ai côtoyé pendant près de deux ans au laboratoire LASEVE après l'avoir connu à Québec lors de ma maîtrise. Nos connaissances de la chimie et nos conversations communes furent très bénéfiques dans l'avancement des projets de recherches du laboratoire. Ce fut un excellent camarade de travail mais avant tout, un très bon ami.

Je remercie tout le reste des membres du laboratoire LASEVE, peu importe leurs fonctions ou leurs statuts que j'ai côtoyés durant ces années et qui ont enduré mon caractère, mes sauts d'humeurs et ma personnalité particulière.

Je ne veux surtout pas oublier mes parents que j'ai probablement négligés trop souvent alors qu'ils étaient toujours derrière moi et qui se sont toujours intéressés à mes travaux. Je n'oublie pas mon frère et ma sœur bien sur qui ont toujours crus en moi. Un gros merci à toute ma famille!

Je remercie ma chérie, Kathy Pouliot, pour avoir été là quand j'en avais besoin, pour son soutien incessant lors de mes moments de stress, de tristesse et de frustration tout

comme pour sa patience envers toutes ces émotions négatives ainsi que mes nombreux défauts. Merci mon amour!

En terminant, je remercie tout mes autres amis (es) qui m'ont encouragés et soutenus tout au long de mon doctorat.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	II
REMERCIEMENTS.....	IV
TABLE DES MATIÈRES.....	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	XVI
LISTE DES FIGURES.....	XVII
LISTE DES SCHÉMAS.....	XVIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XIX
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1. ORIGINES DU PROJET DE RECHERCHE.....	1
2. REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	4
2.1. Effets anticancéreux de l'acide bétulinique.....	4
2.2. Autres activités biologiques de l'acide bétulinique.....	5
2.3. Activités biologiques des dérivés de l'acide bétulinique.....	6
2.4. Activités biologiques du bétulinol.....	7
2.5. Activités biologiques de dérivés du bétulinol.....	8
2.6. Sommaire sur les activités biologiques.....	9
2.7. Synthèse de l'acide bétulinique.....	9
3. ASPECT ENVIRONNEMENTAL.....	10
4. PRÉSENTATION DES CHAPITRES À SUIVRE.....	14
4.1. Chapitre 2 : Synthèse de saponines 3 β -O-monodesmosidique de type germanicane et lupane à partir du bétulinol et étude des relations structure-activité.....	14
4.2. Chapitre 3 : Synthèse et évaluation de la cytotoxicité de 3 β -O- β -D-maltosides et 3 β -O- β -D-lactosides de type lupane et germanicane.....	14

4.3. Chapitre 4 : Synthèse de saponines d'anhydrobétulinol à partir d'isomérisations oléfiniques acido-catalysées du bétulinol 3-acétate et évaluation de l'activité cytotoxique	15
4.4. Chapitre 5 : Synthèse et étude cytotoxique de (<i>R</i>)-D-glycérate de type lupane comme nouvelle classe de drogues triterpéniques.....	15
4.5. Chapitre 6 : Une approche efficace pour accéder aux germanicanes à partir du bétulinol.....	16
4.6. Chapitre 7 : Synthèse totale de l' α -humulène et de dérivés oxygénés	16
4.7. Chapitre 8 : Conclusion	16
RÉFÉRENCES	17
CHAPITRE 2 SYNTHÈSE DE SAPONINES 3 β -O-MONODESMOSIDIQUE DE TYPE GERMANICANE ET LUPANE À PARTIR DU BÉTULINOL ET ÉTUDE DES RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITÉ....	32
RÉSUMÉ	32
SYNTHESIS AND STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS STUDY OF CYTOTOXIC GERMANICANE- AND LUPANE-TYPE 3 β -O-MONODESMOSIDIC SAPONINS STARTING FROM BETULIN	34
GRAPHICAL ABSTRACT	35
ABSTRACT	36
1. INTRODUCTION	37
2. RESULTS AND DISCUSSION	40
2.1. Chemistry	40
2.2. Cytotoxic activity	42
3. CONCLUSION.....	47
4. EXPERIMENTAL	48
4.1. Chemicals	48
4.2. Betulin 3,28-diacetate (5)	50
4.3. Betulin 3-acetate (6)	51
4.4. 3-Acetylbetulinal (7).....	51
4.5. 3-Acetylbetulinic acid (8).....	52

4.6. Allyl betulinate (9)	53
4.7. Betulin 28-acetate (10)	54
4.8. Allobetulin (3)	55
4.9. 28-Oxoallobetulin (4)	55
4.10. General procedure for the synthesis of glycosides 11-22 and 29-34	56
4.11. General procedure for the synthesis of glycosides 23-28	57
4.12. Betulin 3 β -O- β -D-galactopyranoside (14)	58
4.13. Betulin 3 β -O- α -D-mannopyranoside (15)	58
4.14. Betulin 3 β -O- β -D-xylopyranoside (16)	59
4.15. Allobetulin 3 β -O- β -D-glucopyranoside (23)	60
4.16. Allobetulin 3 β -O- α -L-rhamnopyranoside (24)	60
4.17. Allobetulin 3 β -O- α -D-arabinopyranoside (25)	61
4.18. Allobetulin 3 β -O- β -D-galactopyranoside (26)	62
4.19. Allobetulin 3 β -O- α -D-mannopyranoside (27)	62
4.20. Allobetulin 3 β -O- β -D-xylopyranoside (28)	63
4.21. Betulinic acid 3 β -O- β -D-galactopyranoside (20)	64
4.22. Betulinic acid 3 β -O- α -D-mannopyranoside (21)	64
4.23. Betulinic acid 3 β -O- β -D-xylopyranoside (22)	65
4.24. 28-Oxoallobetulin 3 β -O- β -D-glucopyranoside (29)	65
4.25. 28-Oxoallobetulin 3 β -O- α -L-rhamnopyranoside (30)	66
4.26. 28-Oxoallobetulin 3 β -O- α -D-arabinopyranoside (31)	67
4.27. 28-Oxoallobetulin 3 β -O- β -D-galactopyranoside (32)	67
4.28. 28-Oxoallobetulin 3 β -O- α -D-mannopyranoside (33)	68
4.29. 28-Oxoallobetulin 3 β -O- β -D-xylopyranoside (34)	69
4.30. Cell lines and culture conditions	69
4.31. Cytotoxicity assay	70
ACKNOWLEDGMENTS	71

REFERENCES AND NOTES	72
CHAPITRE 3 SYNTHÈSE ET ÉVALUATION DE LA CYTOTOXICITÉ DE 3 β -O- β -D-MALTOSIDES ET 3 β -O- β -D-LACTOSIDES DE TYPE LUPANE ET GERMANICANE	85
RÉSUMÉ	85
SYNTHESIS AND CYTOTOXIC EVALUATION OF LUPANE AND GERMANICANE-TYPE 3 β -O- β -D-MALTOSIDES AND 3 β -O- β -D-LACTOSIDES	87
GRAPHICAL ABSTRACT	88
ABSTRACT	89
1. INTRODUCTION	90
2. RESULTS AND DISCUSSION	92
2.1. Chemistry	92
2.2. Cytotoxic activity	94
3. CONCLUSION	96
4. EXPERIMENTAL	97
4.1. Chemicals	97
4.2. Synthesis of activated D-maltose and D-lactose	99
4.3. General procedure for synthesis of glycosides 6a-b , 8a-b , 9a-b	101
4.4. General procedure for synthesis of glycosides 7a-b	102
4.5. Betulin 3 β -O- β -D-maltopyranoside (6a)	102
4.6. Betulinic acid 3 β -O- β -D-maltopyranoside (7a)	103
4.7. Allobetulin 3 β -O- β -D-maltopyranoside (8a)	103
4.8. 28-Oxoallobetulin 3 β -O- β -D-maltopyranoside (9a)	104
4.9. Betulin 3 β -O- β -D-lactopyranoside (6b)	105
4.10. Betulinic acid 3 β -O- β -D-lactopyranoside (7b)	106
4.11. Allobetulin 3 β -O- β -D-lactopyranoside (8b)	106
4.12. 28-Oxoallobetulin 3 β -O- β -D-lactopyranoside (9b)	107
4.13. Cell lines and culture conditions	108

4.14. Cytotoxicity assay	108
ACKNOWLEDGMENTS	110
REFERENCES AND NOTES	111
CHAPITRE 4 SYNTHÈSE DE SAPONINES D'ANHYDROBÉTULINOL À PARTIR D'ISOMÉRISATIONS OLÉFINIQUES ACIDO-CATALYSÉES DU BÉTULINOL 3-ACÉTATE ET ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ CYTOTOXIQUE.....	116
RÉSUMÉ	116
SYNTHESIS OF ANHYDROBETULIN SAPONINS FROM ACID-CATALYZED OLEFINIC ISOMERISATION OF BETULIN 3-ACETATE AND EVALUATION OF CYTOTOXIC ACTIVITY	118
GRAPHICAL ABSTRACT	119
ABSTRACT	120
1. INTRODUCTION	121
2. RESULTS AND DISCUSSION	124
2.1. Chemistry	124
2.2. Cytotoxic activity	128
3. CONCLUSION.....	130
4. EXPERIMENTAL	131
4.1 Chemicals	131
4.2. Compounds 6b and 7b	133
4.3. General procedure for synthesis of glycosides 8-11	134
4.4. Anhydrobetulin 3 β -O- α -D-arabinopyranoside (8)	135
4.5. Anhydrobetulin 3 β -O- β -D-glucopyranoside (9)	135
4.6. Anhydrobetulin 3 β -O- α -D-mannopyranoside (10)	136
4.7. Anhydrobetulin 3 β -O- α -L-rhamnopyranoside (11)	137
4.8. Cell lines and culture conditions.....	137
4.9. Cytotoxicity assay	138
ACKNOWLEDGMENTS	139

REFERENCES AND NOTES	140
CHAPITRE 5 SYNTHÈSE ET ÉTUDE CYTOTOXIQUE DE (<i>R</i>)-D-GLYCÉRATES DE TYPE LUPANE COMME NOUVELLE CLASSE DE DROGUES TRITERPÉNIQUES	150
RÉSUMÉ	150
SYNTHESIS AND CYTOTOXIC STUDY OF LUPANE-TYPE (<i>R</i>)-D-GLYCERATES AS A NOVEL CLASS OF TRITERPENIC DRUGS.....	152
GRAPHICAL ABSTRACT	153
ABSTRACT	154
1. INTRODUCTION	155
2. RESULTS AND DISCUSSION	158
2.1. Chemistry	158
2.2. Cytotoxic activity	159
3. CONCLUSION.....	161
4. EXPERIMENTAL	163
4.1. Chemicals	163
4.2. (<i>R</i>)-(-)-2,2-Dimethyl-1,3-dioxan-4-ylmethyl p-toluenesulfonate (3).....	164
4.3. (<i>R</i>)-2,3-Isopropylidene-D-glyceryl betulinate (4a)	165
4.4. (<i>R</i>)-2,3-Isopropylidene-D-glyceryl-3-acetylbetulinate (4b).....	166
4.5. (<i>R</i>)-D-Glyceryl betulinate (5a).....	167
4.6. (<i>R</i>)-D-Glyceryl-3-acetylbetulinate (5b)	167
4.7. Betulin 3,28-di-(<i>R</i>)-[2,3-isopropylidene]-D-glycerate (6a).....	168
4.8. Betulin 3-acetate-28-(<i>R</i>)-[2,3-isopropylidene]-D-glycerate (6b)	169
4.9. Betulin 28-acetate-3-(<i>R</i>)-[2,3-isopropylidene]-D-glycerate (6c).....	170
4.10. Betulin 3,28-di-(<i>R</i>)-D-glycerate (7a)	171
4.11. Betulin 3-acetate-28-(<i>R</i>)-D-glycerate (7b)	171
4.12. Betulin 28-acetate-3-(<i>R</i>)-D-glycerate (7c)	172
4.13. Cell lines and culture conditions.....	173

4.14. Cytotoxicity assay	173
ACKNOWLEDGMENTS	175
REFERENCES AND NOTES	176
CHAPITRE 6 UNE APPROCHE EFFICACE POUR ACCÉDER AUX GERMANICANES À PARTIR DU BÉTULINOL	181
RESUME	181
USEFUL APPROACH TO ACCESS GERMANICANES FROM BETULIN	182
GRAPHICAL ABSTRACT	183
ABSTRACT	184
1. INTRODUCTION	185
2. RESULTS AND DISCUSSION	187
2.1 Chemistry	187
2.2 Cytotoxic activity	188
3. CONCLUSION.....	190
4. EXPERIMENTAL	191
4.1 Chemicals	191
4.2 19 β -machaeroceryl (6).....	192
4.3 19 β -Machaeroceryl 28-acetate (7) and 19 β -machaeroceryl 3,28-diacetate (8).....	193
4.4 19 β -Machaeroceryl 28-acetate-3-pivaloate (9).....	194
4.5 19 β -Machaeroceryl 3-pivaloate (10)	195
4.6 28-Oxoallobetulin 3-pivaloate (11)	196
4.7 Machaeroceryl-19-one 28-acetate-3-pivaloate (12).....	196
4.8 Machaeroceryl-19-one 3-pivaloate (13)	197
4.9 Machaeroceryl-19-one 3-pivaloate aldehyde (14)	198
4.10 19 β -Machaeroceric acid (16).....	198
4.11 Cell lines and culture conditions.....	199
4.12 Cytotoxicity assay	200

ACKNOWLEDGMENTS	201
REFERENCES AND NOTES	202
CHAPITRE 7 SYNTHÈSE TOTALE DE L' α -HUMULÈNE ET DE DÉRIVÉS OXYGÉNÉS	209
1. ORIGINES DU PROJET	209
2. DEUX APPROCHES POUR LA PRÉPARATION DE DÉRIVÉS DE L' α -HUMULÈNE	212
2.1. Synthèse totale à partir du géraniol	212
2.2. Préparation de dérivés à partir de l' α -humulène	214
3. SYNTHÈSE DE L' α -HUMULÈNE À PARTIR DU GÉRANIOLE	216
3.1. Synthèse de l' α -humulène à partir du géraniol avec le groupe protecteur TBDMS	216
3.2. Synthèse de l' α -humulène à partir du géraniol avec le groupe protecteur acétate	217
3.3. Voie de synthèse avec le groupe protecteur trichloroacétate	221
3.4. Travaux visant la synthèse d'un époxyde d' α -humulène	223
4. CONCLUSION	226
5. PARTIE EXPÉRIMENTALE	227
5.1. Géranyl-TBDMS (2)	228
5.2. 8-Hydroxygéranyl-TBDMS (3) et 4-hydroxygéranyl-TBDMS (4)	229
5.3. Géranyl-acétate (5)	230
5.4. 8-Hydroxygéranyl-acétate (6)	231
5.5. 8-(Méthylcarbonate)géranyl-acétate (7)	232
5.6. 8-(Méthylcarbonate)géraniol (8) et 1,8-carbonate de géraniol (9)	232
5.7. Géranyl-trichloroacétate (10)	233
5.8. 8-Hydroxygéranyl-trichloroacétate (11)	234
5.9. 8-(Méthylcarbonate)géranyl-trichloroacétate (12)	235
5.10. (R,R)-2,3-Époxygéraniol (13)	235
5.11. (R,R)-2,3-Époxygéranyl-TBDMS (14)	236
5.12. (R,R)-2,3-Époxy-8-hydroxygéranyl-TBDMS (15)	237

5.13. (<i>R,R</i>)-2,3-Époxy-8-(méthylcarbonate)géranyl-TBDMS (16)	238
5.14. (<i>R,R</i>)-2,3-Époxy-8-(méthylcarbonate)géraniol (17)	239
RÉFÉRENCES	241
CHAPITRE 8 CONCLUSION	245
8.1 CHAPITRES 2 ET 3	245
8.2 CHAPITRE 4	246
8.3 CHAPITRE 5	247
8.4 CHAPITRE 6	248
8.5 CHAPITRE 7	249
8.6 RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES	250

LISTE DES TABLEAUX

Table 2-1. In vitro cytotoxicity of lupane and germanicane triterpenes (1-4, 8) and saponins (11-34).	83
Table 3-1. In vitro cytotoxicity of lupane and germanicane saponins.....	115
Table 4-1. ¹ H and ¹³ C NMR chemical shift (in ppm) ^a of ring D and E of 10 , 10^b and 7b	148
Table 4-2. In vitro cytotoxicity of anhydrobetulin saponins 8-11	149
Table 5-1. In vitro cytotoxicity of (<i>R</i>)-D-glycerates.	179
Table 6-1. In vitro cytotoxicity of studied compounds.....	208
Tableau 7-1. Conditions réactionnelles mises à l'essai pour la formation de l'alcool allylique en position 8.....	219
Tableau 7-2. Rendements d'oxydation dans divers solvants pour la formation de l'alcool allylique en position 8.....	220

LISTE DES FIGURES

Figure 1-1 Principaux triterpènes rencontrés chez <i>Betula</i>	3
Figure 2-1. Structures of lupane (1, 2) and germanicane-type (3, 4) triterpenes.....	79
Figure 2-2. Trichloroacetimidate (TCA) sugar donors used for the glycosidation.	79
Figure 3-1. Structures of lupane (1 and 2) and germanicane-type (3 and 4) triterpenes. ...	113
Figure 4-1. Triterpenes with contracted ring A generated from betulin.	144
Figure 4-2. Mechanism of ring E expansion.....	145
Figure 6-1. Structure of some germanicanes	205
Figure 7-1. Structure et numérotation des carbones de l' α -humulène.....	210
Figure 7-2. Résumé du plan synthétique de Corey.....	214
Figure 7-3. Structure et numérotation du géraniol.....	216
Figure 7-4. Voie de synthèse avec le groupe protecteur TBDMS.....	217
Figure 7-5. Voie de synthèse avec le groupe protecteur acétate.....	218
Figure 7-6. Voie de synthèse avec le groupe protecteur trichloroacétate.....	222
Figure 7-7. Voie de synthèse avec l'époxyde de géraniol.	224

LISTE DES SCHÉMAS

Scheme 2-1. Synthesis of 3-acetylbetulinic acid (8).....	80
Scheme 2-2. Synthesis of betulin (11-16) and allobetulin (23-28) saponins.....	81
Scheme 2-3. Synthesis of betulinic acid (17-22) and 28-oxoallobetulin (29-34) saponins.	82
Scheme 3-1. Synthesis of triterpenic D-maltosides and D-lactosides.	114
Scheme 4-1. Synthesis of saponins from 6b and 7b	146
Scheme 4-2. C-18 angle and ΔE (kcal/mol) of two hypothetical intermediates for the acid-catalysed isomerisation of 7b	147
Scheme 5-1. Syntheses of (<i>R</i>)-D-glycerates.....	178
Scheme 6-1. Synthesis of compound 6	206
Scheme 6-2. Synthesis of compound 11	206
Scheme 6-3. Synthesis of compound 16	207

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A-549	Carcinome de poumon humain (lignée cellulaire)
Ac	Acétate
Ac ₂ O	Anhydride acétique
Acetone- <i>d</i> 6	Acétone deutéré
ACN	Acétonitrile
AcOH	Acide acétique
Ag ₂ CO ₃	Carbonate d'argent
Al(<i>i</i> -OPr) ₃	Isopropoxyde d'aluminium (III)
Ara	Arabinose
BH ₃	Borane
Br ₂	Brome diatomique
Br s	Broad singlet
C	Carbone
CaH ₂	Hydruure de calcium
CCM	Chromatographie sur couche mince
CDCl ₃	Chloroforme deutéré
CHCl ₃	Chloroforme
CH ₂ Cl ₂	Dichlorométhane
COSY	CORrelation SpectroscopY
Cs ₂ CO ₃	Carbonate de césium
CuSO ₄	Sulfate de cuivre
d	Doublet
dd	Doublet de doublet
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DLD-1	Adénocarcinome colorectal humain (lignée cellulaire)
DEAD	Azodicarboxylate de diéthyle

DEPT-135	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (impulsion du proton à 135°)
DIBAL-H [®]	Hydruure de diisobutylaluminium
DIPEA	Diisopropyléthylamine
DMAP	4-Diméthylaminopyridine
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
Et ₃ N	Triéthylamine
EtOAc	Acétate d'éthyle
Eq ou éq	Équivalent
FeCl ₃	Chlorure de fer (III)
Fe(NO ₃) ₃	Nitrate de fer (III)
g	Gramme
Gal	Galactose
Glu	Glucose
H	Hydrogène
HBr	Acide bromhydrique
H ₂ O	Eau
H ₂ SO ₄	Acide sulfurique
HCl	Acide chlorhydrique
HIP	1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-phenylisopropyl
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRMS	High Resolution Mass Spectra
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
<i>i</i> -PrOH	Alcool isopropylique
IR	Infrared
K	Potassium
K ₂ CO ₃	Carbonate de potassium
kg	Kilogramme

km	Kilomètre
KMnO ₄	Permanganate de potassium
KOH	Hydroxyde de potassium
Lact	Lactose
Li	Lithium
LiAlH ₄	Hydruure de lithium et d'aluminium
m	Multiplet
M	Molaire (concentration molaire)
Malt	Maltose
Man	Mannose
MeOH	Méthanol
MgSO ₄	Sulfate de magnésium
MHz	Mégahertz
Mmol	Millimole
NaBH ₄	Borohydruure de sodium
NaCl	Chlorure de sodium
NaClO ₂	Chlorite de sodium
NaH ₂ PO ₄	Phosphate de sodium monobasique
NaIO ₄	Périodate de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
Na ₂ SO ₄	Sulfate de sodium
NH ₃	Ammoniaque
NH ₄ Cl	Chlorure d'ammonium
NMO	Oxyde de <i>N</i> -méthylmorpholine
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PCC	Chlorochromate de pyridinium
Pd(PPh ₃) ₄	Tetrakis(triphenylphosphine) de palladium (0)
Ph	Phényle
PPh ₃	Triphénylphosphine

Pyr- d_5	Pyridine deutéré
Rha	Rhamnose
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
rt	Room temperature
s	Singlet
SAR	Structure activity relationship
SD	Standard deviation
SeO ₂	Dioxyde de sélénium
SiO ₂	Dioxyde de silicium
SnCl ₂	Chlorure d'étain (II)
<i>t</i> -BuOH	alcool <i>tert</i> -butylique
TBAF	Fluorure de tétrabutylammonium
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldiméthylsilyle
TBDMSCl	Chlorure de <i>tert</i> -butyldiméthylsilyle
TBHP	<i>tert</i> -Butylhydroperoxyde
THF	Tétrahydrofuranne
Ti(O- <i>i</i> Pr) ₄	Isopropoxyde de titane (IV)
Tf ₂ O	Anhydride trifluorométhanesulfonique
TMSOTf	Trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle
TPAP	Perruthénate de tétrapropylammonium
WS1	Fibroblaste de peau humaine normale (lignée cellulaire)
Xyl	Xylose

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1. Origines du projet de recherche

La forêt boréale nord-américaine est une immense richesse naturelle qui recouvre ce territoire depuis moins de 10 000 ans.¹ Ce décor, autant parsemé de forêts qui s'étendent à perte de vue que de lacs et rivières innombrables, fait partie de la vie des hommes depuis ses premiers jours en cette zone froide et nordique. À l'échelle mondiale, la zone boréale ceinture tout l'hémisphère nord. Dans cette zone, on peut dénombrer trois domaines de végétation, soit la toundra forestière, la taïga et la forêt boréale proprement dite. Celle-ci est sans contredit, l'un des plus grands écosystèmes forestiers de la planète avec une proportion de 26 % des forêts mondiales.¹ De toutes ces étendues forestières, le Canada en dispose d'environ 20 % et le Québec est la province canadienne qui en possède la plus grande superficie. Au Québec, la forêt représente 46% de notre territoire et la forêt boréale en occupe la majeure partie (560 000 km²).¹ Ainsi, on peut clairement affirmer que notre province est dotée non seulement d'un paysage impressionnant et immense, mais aussi d'une richesse et d'une diversité naturelle très importante.

Les études portant sur la forêt boréale peuvent être très diversifiées. En fait, seulement au Saguenay-Lac-St-Jean, il existe un nombre impressionnant de projets de

recherche sur la forêt boréale, tant au point de vue aquatique que végétal et ce, dans le but de comprendre et de percer les mystères de ce rouage complexe qu'est la dynamique de ce vaste écosystème.^{2,3} Mais aussi étonnant que cela puisse paraître, la forêt boréale québécoise avec plus de 2800 espèces végétales,⁴ demeure probablement un des endroits du monde où la recherche phytochimique est la moins avancée.

Dans la forêt boréale québécoise, les conifères sont les plus abondants avec 75 % de tous les arbres qui s'y retrouvent, suivi des feuillus avec le 25 % restant.¹ Le bouleau blanc ou bouleau à papier (*Betula papyrifera*) fût l'espèce sélectionnée pour le projet de cette thèse et les raisons en sont nombreuses. Avant d'aborder l'aspect scientifique ayant motivé ce choix, il est intéressant de rappeler que cette plante nous est connue depuis fort longtemps et pour cause : si l'on regarde dans le passé, bien avant les débuts de la colonisation de l'Amérique du Nord par les Européens, cet arbre blanchâtre donnait aux Amérindiens l'écorce idéale pour la fabrication de leurs canots.⁵ Lors de la colonisation, un des principaux moteurs économiques de la Nouvelle-France était la traite des fourrures de castor. Pour accéder aux zones de chasse et de trappe, il fallait user de canots légers, robustes et rapides pour naviguer dans les eaux tumultueuses de l'Amérique du Nord. Puisque les Amérindiens avaient maîtrisé l'art de la confection de ce type de canot, ces embarcations furent très utiles pour les besoins commerciaux de l'époque. Ainsi, le bouleau blanc est devenu en quelque sorte, un outil essentiel pour l'essor économique de l'époque et est également devenu un représentant majeur des feuillus de la forêt boréale québécoise très prisé pour ses propriétés calorifiques importantes.

Au delà de son impact notable sur notre histoire, il y a un aspect nettement plus intéressant qui nous a amené à effectuer des recherches sur cette plante. En fait, le bouleau blanc est connu depuis plusieurs années pour la production de composés triterpéniques dans ses écorces.⁶ Toutefois, il n'y a que le bouleau blanc qui possède cette propriété mais également d'autres variétés de *Betula* comme par exemple, le bouleau jaune (*Betula alleghaniensis*), communément appelé *merisier* au Québec. Les composés organiques que l'on retrouve dans les écorces externes de diverses variétés de bouleaux sont majoritairement des triterpènes pentacycliques⁷⁻²⁰ de la famille du lupane comme ceux illustrés à la figure 1-1. Le lupéol est le triterpène majoritaire dans les écorces externes du bouleau jaune (*Betula alleghaniensis*)^{11,12} alors que c'est le bétulinol que l'on retrouve en plus grande concentration dans les écorces du bouleau blanc (*Betula papyrifera*)⁸⁻¹⁰ pouvant aller jusqu'à 30 kg dans 100 kg d'écorces secs bien qu'en moyenne, le laboratoire LASEVE obtient environ 20 kg pour 100 kg d'écorces sèches.

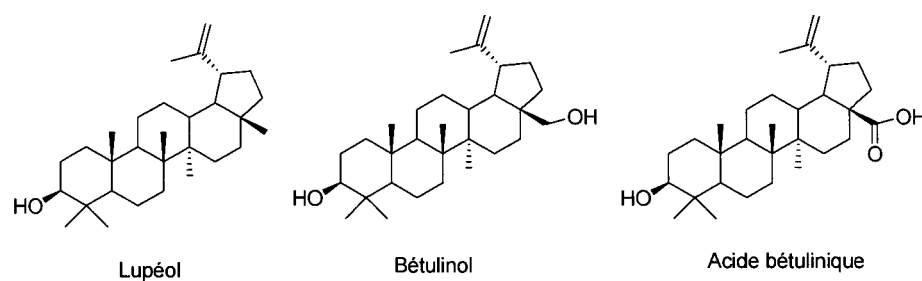


Figure 1-1 Principaux triterpènes rencontrés chez *Betula*.

Ces molécules et quelques autres (lupénone, bétulone, bétulinol-3-caféate, acide bétulinique-3-caféate, acide bétulonique, acide oléanolique, acide oléanolique-3-acétate, β -sitostérol) sont rapportées depuis déjà longtemps dans la littérature. Mais il y a plus

d'une dizaine d'années, des recherches portant sur des triterpènes présents dans les écorces de bouleaux²¹⁻²⁴ ont mis en évidence des activités biologiques notables (anticancéreuses, anti-VIH, etc.) ce qui a intensifié les études sur ces composés. D'ailleurs, le laboratoire LASEVE de l'UQAC s'intéresse depuis près de 10 ans aux produits naturels bioactifs extraits des écorces de bouleau blanc et de bouleau jaune. Deux raisons importantes motivent cet intérêt : 1) le potentiel de développement biopharmaceutique de ces triterpènes et dérivés dans le domaine du cancer et 2) la volonté de mettre au point des voies de valorisation fines des écorces de bouleau. Ainsi, la section 2 qui suit présente une revue sommaire des activités biologiques de ces triterpènes qui se veut complémentaires à celles qui ont été rapportées dans la littérature.²⁵⁻²⁸ Des considérations environnementales justifiant l'intérêt d'étudier le potentiel d'utilisation thérapeutique des écorces de bouleaux seront abordées à la section 3.

2. Revue de la littérature

2.1. Effets anticancéreux de l'acide bétulinique

Généralement, la cytotoxicité de l'acide bétulinique ne dépasse pas celle de composés commerciaux déjà en cours d'utilisation pour les divers cancers étudiés. Néanmoins, l'acide bétulinique que l'on retrouve en très petite quantité chez *Betula papyrifera* est connu depuis un bon moment pour son fort potentiel anticancéreux sur des mélanomes humains (cancer de la peau) sans affecter les cellules saines.^{24,29} D'autres

activités anticancéreuses ont été rapportées pour ce composé³⁰⁻³⁸ et certains reviews font une description exhaustive des diverses activités de ce triterpène du lupane.^{39,40} Également, l'acide bétulinique a récemment été rapporté comme agent anti-leucémique.^{25,31,41} Les mécanismes d'action de l'acide bétulinique ont été étudiés^{32-34,36,37,40,42,43} afin de mieux comprendre son fonctionnement. Il est clairement établi que ce triterpène agit par un mécanisme d'apoptose sur les cellules cancéreuses. En plus de ses diverses activités anticancéreuses, des publications récentes discutent des effets combinés de l'acide bétulinique avec d'autres drogues anticancéreuses,⁴⁴ tout comme avec des radiations ionisantes.⁴⁵ En fait, des effets cytotoxiques ont été bonifiés en combinant certains médicaments ou traitements anticancéreux avec l'acide bétulinique.

2.2. Autres activités biologiques de l'acide bétulinique

L'acide bétulinique possède des activités thérapeutiques intéressantes autres qu'anticancéreuses. Il permet d'inhiber une enzyme impliquée dans le mécanisme de réparation de l'ADN, soit la β -polymérase.⁴⁶ Ainsi, l'activité de la bléomycine (un agent antitumoral), qui agit en causant des dommages à l'ADN des cellules cancéreuses, est accentuée en présence d'acide bétulinique. Par contre, cette activité biologique pourrait comporter un certain risque puisque l'inhibition de la β -polymérase peut mener à une hypersensibilité face aux agents carcinogéniques ou mutagéniques. L'activité antibactérienne de l'acide bétulinique a été démontrée avec *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pneumoniae* et elle est comparable au sulfate de

gentamicin.³⁵ Une activité antimalariale modérée a également été rapportée pour ce triterpène.⁴⁷ Un autre effet intéressant de l'acide bétulinique c'est que, sous forme d'onguent, il augmente la synthèse de collagène (protéine responsable de l'élasticité de la peau qui se détruit avec l'âge et les rayons UV) d'un facteur six. Ainsi, sous forme de crème, l'acide bétulinique pourrait prévenir l'apparition des rides⁴⁸ en tant que cosmétique. Finalement, un review récent fait une description détaillée de diverses activités biologiques autres qu'anticancéreuses (antiviral, antibactérien, anti-inflammatoire, bronchovasodilatateurs, analgésiques et autres) de l'acide bétulinique.³⁹

2.3. Activités biologiques des dérivés de l'acide bétulinique

Il est commun de concevoir des analogues synthétiques de composés bioactifs naturels dans le but de trouver des molécules plus efficaces. Ainsi, des dérivés amides de l'acide bétulinique sont jusqu'à 3 fois plus actifs contre les mélanomes (MEL-2) que l'acide bétulinique.⁴⁹ Des phtalates de l'acide bétulinique ont démontré un potentiel thérapeutique nettement plus élevé que ce dernier contre certaines lignées cellulaires leucémiques et cancéreuses de la peau.³¹ Diverses lignées cellulaires cancéreuses furent testées pour évaluer la toxicité de composés bromés de l'acide bétulinique ainsi que ceux de type hydrazine.⁵⁰ De cette étude, la majorité des dérivés ne sont pas aussi actifs que l'acide bétulinique mais certains ont des activités similaires, voire même supérieure dans quelques cas. Les vertus de l'acide bétulinique et ses dérivés ont également suscité un intérêt très marqué dû à leurs propriétés anti-VIH puisque cette maladie représente encore

un fléau épidémique à l'échelle mondiale. Plusieurs études avec des résultats concluants ont démontré l'activité anti-VIH de plusieurs dérivés de l'acide bétulinique.⁵¹⁻⁵⁷ D'ailleurs, des revues de la littérature sur les activités anti-VIH des dérivés de l'acide bétulinique ont été publiées récemment.⁵⁸⁻⁶⁰ Une légère activité anti-inflammatoire a été démontrée pour le caféate de l'acide bétulinique depuis un bon moment déjà.⁶¹ Également, un dérivé de l'acide bétulinique de type benzylester est antibactérien face à *Staphylococcus epidermidis*⁶² avec une activité comparable au chloramphenicol alors que l'acide bétulinique ne démontre aucune activité dans cette même étude. En plus d'un potentiel antibactérien, des activités antivirales notables de certains amides de l'acide bétulinique et bétulonique ont été rapportées pour combattre l'herpès HSV-1^{63,64} et aussi l'influenza A.⁶⁴ De plus, des modifications structurales de l'acide bétulinique (altération du cycle A, modifications au niveau du carbone C-20) ont été effectuées afin de générer des agents cytotoxiques contre plusieurs lignées cellulaires cancéreuses. Plusieurs de ces dérivés ont démontré de très bonnes activités anticancéreuses⁶⁵⁻⁶⁶ supérieures à l'acide bétulinique alors que d'autres ont perdu en cytotoxicité.^{67,68} Finalement, plusieurs dérivés de l'acide bétulinique font l'objet de plusieurs brevets⁶⁹⁻⁷³ pour des applications pharmacologiques telles qu'antiangiogéniques et anticancéreuses.

2.4. Activités biologiques du bétulinol

Le bétulinol ainsi que le lupéol et l'acide bétulinique ont déjà démontré des propriétés anti-inflammatoires contre des réactions causées par le TPA (12-O-

tetradecanoylphorbol-13-acetate), un composé très utilisé pour l'étude rapide de l'activité anti-inflammatoire.⁷⁴ D'autres recherches ont démontré le pouvoir anti-inflammatoire de ces lupanes.⁷⁵⁻⁷⁷ Bien que nettement moins connu pour ce genre d'activité, le bétulinol a présenté une activité cytotoxique envers les cellules cancéreuses 5WA16 (cellules intramusculaires).⁷⁸ Autre activité intéressante, le bétulinol agit à plus faible dose que l'Acyclovir,⁷⁹ un médicament généralement employé pour traiter l'herpès. En plus, il y a un effet synergique entre le bétulinol et l'Acyclovir.⁸⁰ Le bétulinol permet également de diminuer considérablement la sensibilité au cadmium des cellules HepG2 issue du foie humain.⁸¹ Par ailleurs, le risque de formation de pierres aux reins (causée par l'oxalate de calcium) est diminué chez le rat si une administre de lupéol ou de bétulinol par voie orale est effectuée.⁸²

2.5. Activités biologiques de dérivés du bétulinol

En plus des dérivés de l'acide bétulinique, des dérivés du bétulinol ont également été synthétisés et plusieurs ont démontré des activités anti-VIH très intéressantes⁸³⁻⁸⁶ et même égales ou supérieures à celles de l'AZT,⁸⁵⁻⁸⁶ un médicament couramment employé dans le traitement de cette maladie. Des pouvoirs anti-inflammatoires équivalents à ceux de l'Orthophen® sont également connus pour certains dérivés du bétulinol,⁸⁷ tout comme un potentiel de protection contre la cytotoxicité du cadmium.⁸⁸

2.6. Sommaire sur les activités biologiques

Les activités biologiques des triterpènes (ou des dérivés de ces derniers) issus des écorces de bouleau blanc sont nombreuses et variées. À la lecture de ces dernières pages, on constate que ces produits sont à la base d'une série de dérivés présentant un fort potentiel biopharmaceutique. Il est clair que des études supplémentaires méritent d'être effectuées afin de permettre le développement de nouveaux agents thérapeutiques plus efficaces. Des résultats de recherches du LASEVE indiquent qu'il est possible de bonifier l'activité biologique de composés triterpéniques bioactifs par des modifications structurales.⁸⁹⁻⁹⁴ Les travaux de Gauthier⁸⁹ visant à évaluer l'impact de la présence d'une section sucre sur l'activité d'un triterpène tel que l'acide bétulinique indiquent clairement le bien fondé de ces modifications structurales. En effet, ces travaux montrent que la présence d'une unité rhamnose en position 3 de l'acide bétulinique augmente l'activité anticancéreuse et favorise la sélectivité envers les cellules cancéreuses (le produit montre une toxicité plus grande envers les cellules cancéreuses).

2.7. Synthèse de l'acide bétulinique

La synthèse de l'acide bétulinique s'avère nécessaire afin d'entreprendre des études sur l'impact des modifications chimiques sur le potentiel anticancéreux de ce composé ainsi que certains de ses dérivés. Cependant, il a été brièvement fait mention à la section 2.1 de la faible abondance de l'acide bétulinique dans les écorces externes de *Betula*

papyrifera. Deux stratégies de synthèse de ce produit ont été élaborées à partir du bétulinol présent en grande quantité dans les écorces.^{95,96} Malheureusement, les méthodes rapportées dans ces articles comportent plusieurs faiblesses. La méthode de Kim *et al.*⁹⁵ entraîne la formation d'épimères difficiles à séparer, ce qui engendre une perte de rendement considérable. L'autre méthode requiert plusieurs étapes de synthèse.⁹⁶ Un brevet récemment publié présente une synthèse très efficace de l'acide bétulinique⁹⁷ sans génération d'épimères mais le nombre d'étapes demeure le même par rapport au groupe de Kim *et al.*⁹⁵ Notre équipe de recherche au laboratoire LASEVE a mis au point une méthode de synthèse similaire, sans connaissance de ces brevets à l'époque. Cependant, notre voie de synthèse procure un rendement total de 10% supérieur à celui rapporté dans ce brevet.⁹⁰ La voie de synthèse efficace de l'acide bétulinique à partir du bétulinol développée par notre groupe de recherche est détaillée au chapitre 2. Enfin, malheureusement lors de la rédaction de notre article, une procédure très efficace en une seule étape a été publiée en 2006 pour la formation de l'acide bétulinique à partir du bétulinol.⁹⁸

3. Aspect environnemental

L'identification de voies de valorisation des écorces est un enjeu important autant au niveau environnemental qu'économique. Les écorces de bouleau blanc sont disponibles en grande quantité car les industries de sciage de cette essence en génèrent de grandes quantités qui sont faiblement utilisées. En fait, on estime que 3,5 millions de tonnes métriques d'écorces anhydres⁹⁹ ont été produites au Québec en 2002 et que 15 % de ces

écorces sont des essences de bouleaux.⁹⁹ Il s'agit donc d'une quantité importante de matériel végétal dont l'industrie forestière doit disposer. Si l'on effectue un survol rapide des différentes façons de disposer de ces déchets, la combustion à des fins énergétiques (électricité et chaleur)¹⁰⁰⁻¹⁰⁴ est la principale technique employée contrairement à il y a environ 15 ans.¹⁰² En 1993, la quantité d'écorces non utilisées au Québec était à 46 % de la production totale¹⁰² contrairement à 6,5 % en 2002.⁹⁹ Heureusement, l'enfouissement^{100,101} qui était une façon très répandue de se départir des résidus forestiers dans le passé, est de moins en moins utilisé aujourd'hui.^{102,103} Les changements observés au niveau de la gestion des résidus s'expliquent par une croissance de la demande en énergie, mais aussi par la prise de conscience de l'impact environnemental de l'enfouissement. Cette pratique est très nuisible pour l'environnement, particulièrement au niveau des cours d'eau. En effet, divers produits chimiques naturellement présents dans certaines essences d'écorces comme des acides résiniques, des composés phénoliques tels les tannins et leurs produits de dégradations, sont entraînés avec le temps par les pluies et ces lixiviats contaminent les eaux souterraines et de surfaces.^{101,103,104} On estime même que l'intensité de pollution pour l'enfouissement est à 6 contre 1 pour la combustion à des fins énergétiques.¹⁰¹

Malgré les améliorations face au respect de l'environnement, les producteurs de pâtes et papiers investissent peu dans la recherche et le développement afin de valoriser leurs résidus^{100,101} comparativement à l'Europe, le Japon et les États-Unis. De plus, selon le CRCO (Conseil régional de concertation et de développement) du Saguenay-Lac-Saint-Jean, l'insuffisance de coordination en recherche, la méconnaissance des projets à venir et

des nouveaux marchés, la non-reconnaissance par les entreprises du potentiel régional en recherche, une culture entrepreneuriale centralisée et monopolisatrice ainsi que l'absence de formation en entrepreneurship forestier sont de grandes faiblesses pour l'avènement de projets de valorisation à haute valeur ajoutée.¹⁰⁵ Pourtant, il existe déjà depuis plusieurs années différents programmes d'aide financière offerts à l'industrie des produits forestiers, grande ou petite, pour augmenter leur efficacité, développer de nouvelles technologies ou de nouveaux produits, ainsi que développer des marchés d'exportation.¹⁰⁶

Les écorces de bouleaux ne semblent pas contenir, du moins au niveau des connaissances scientifiques actuelles, des concentrations appréciables de composés ayant un impact négatif sur l'environnement. Il demeure néanmoins important d'identifier des utilisations fines menant à des produits à haute valeur ajoutée, compte tenue du volume appréciable (15 %) des écorces de bouleaux produites par l'industrie.⁹⁹ Actuellement, la méthode la plus avantageuse pour régler le problème de la gestion des écorces serait un processus en trois étapes, soit l'extraction des composés chimiques présents dans les écorces, leurs combustions et/ou l'emploi agricole ou horticole, suivi de l'usage des cendres provenant de la combustion pour l'agriculture. Les composés extractibles pourraient alors être employés dans un vaste éventail d'applications pharmaceutiques, industrielles ou agricoles, alors que les écorces lessivées seraient brûlées pour la production énergétique ou autres applications. Il s'agirait ainsi d'une exploitation optimale des écorces avec un impact environnemental minimal. Nous sommes encore loin de voir ce jour arriver, mais s'il est possible d'utiliser d'un extrait végétal donné à une échelle

commerciale, l'implantation de ce procédé serait un grand pas de plus vers une gestion environnementale plus saine.

4. Présentation des chapitres à suivre

4.1. Chapitre 2 : Synthèse de saponines 3 β -O-monodesmosidique de type germanicane et lupane à partir du bétulinol et étude des relations structure-activité

Suite aux travaux récents de Gauthier et al.,⁸⁹ une étude plus étendue sur des 3-O-monosaponines triterpéniques fut entreprise afin d'évaluer le potentiel cytotoxique des glycosides du bétulinol, de l'acide bétulinique, de l'allobétulinol et du 28-oxoallobétulinol. Ce chapitre est rédigé en anglais sous la forme d'un article scientifique publié dans le journal *Bioorganic and Medicinal Chemistry* (*Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6144-6157).

4.2. Chapitre 3 : Synthèse et évaluation de la cytotoxicité de 3 β -O- β -D-maltosides et 3 β -O- β -D-lactosides de type lupane et germanicane

Les résultats du chapitre 2 nous ont incité à générer une deuxième banque de glycosides avec les quatre mêmes triterpènes employés auparavant, mais avec des disaccharides tels que le D-maltose et le D-lactose afin d'accroître l'hydrosolubilité des triterpènes et de générer des agents antitumoraux plus efficaces. Ce chapitre est rédigé en anglais sous la forme d'un article scientifique au stade de manuscrit préliminaire.

4.3. Chapitre 4 : Synthèse de saponines d'anhydrobétulinol à partir d'isomérisations oléfiniques acido-catalysées du bétulinol 3-acétate et évaluation de l'activité cytotoxique

En effectuant des recherches sur la synthèse de nouveaux triterpènes dans l'objectif de développer de nouveaux agents anticancéreux, nous avons accidentellement synthétisé deux triterpènes qui nous ont permis la conception de différentes saponines de l'anhydrobétulinol. Les aglycones n'étaient pas inconnus dans la littérature mais les 3 β -*O*-monosaponines de l'anhydrobétulinol sont de nouvelles molécules. Ce chapitre est rédigé en anglais sous la forme d'un article scientifique au stade d'une première ébauche.

4.4. Chapitre 5 : Synthèse et étude cytotoxique de (*R*)-D-glycérates de type lupane comme nouvelle classe de drogues triterpéniques

Afin d'obtenir de nouvelles molécules triterpéniques bioactives dotées de fonctions polaires biocompatibles dans le domaine du cancer, nous avons généré plusieurs (*R*)-D-glycérates du bétulinol et de l'acide bétulinique en remplacement aux glycosides. Ce chapitre est rédigé en anglais sous la forme d'un article scientifique qui sera éventuellement soumis au journal désigné.

4.5. Chapitre 6 : Une approche efficace pour accéder aux germanicanes à partir du bétulinol

Étant toujours à la recherche de nouveaux squelettes triterpéniques, la grande ressemblance de l'acide machaérocérique avec le 28-oxoallobétulinol nous a incitée à en effectuer la synthèse pour accéder aisément à la famille des germanicanes et en évaluer quelques dérivés. Ce chapitre est rédigé en anglais sous la forme d'un article scientifique publié dans le journal *Tetrahedron Letters* (*Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 8416-8419).

4.6. Chapitre 7 : Synthèse totale de l' α -humulène et de dérivés oxygénés

Ce chapitre rédigé en français résume les travaux de recherche effectués dans le but de compléter la synthèse totale de l' α -humulène et de quelques dérivés oxygénés. Les résultats non publiés de ce projet de recherche y sont présentés.

4.7. Chapitre 8 : Conclusion

Le dernier chapitre consiste en une conclusion à laquelle s'ajoute mes opinions et recommandations en ce qui concerne les divers projets de recherche reliés à cette thèse.

Références

1. Consortium de recherche sur la forêt boréale commerciale, **Au Royaume de la Forêt Boréale**, 2000, 64 pages.
2. Consortium de recherche sur la forêt boréale commerciale, **Bilan 1991-1996**, 1996, 38 pages.
3. Consortium de recherche sur la forêt boréale commerciale, **Bilan 1996-2001**, 2001, 64 pages.
4. Marie-Victorin, **Flore Laurentienne**, Les Presses de l'Université de Montréal, 1995, 3^e édition, 1083 pages.
5. Percy Knauth, **La forêt boréale en Amérique** (version française), Life-Time Editions, 1977, 184 pages.
6. Kaufman, P. B.; Cseke, L. J.; Warber, S.; Duke, J. A.; Briemann, H. L. **Natural products from plants**. CRC Press, Boca Raton, 1999, 343 pages.
7. Chari, V. M.; Neelakantan, S.; Seshadri, T. R. **Chemical components of *Betula utilis* & *Celtis australis***, *Ind. J. Chem.* **1968**, *6*, 231-234.
8. Seshadri, T. R.; Vedantham, T. N. C. ***Betulaceae* : Chemical examination of the barks and heartwoods of *Betula* species of american origin**, *Phytochemistry*, **1971**, *10*, 897-898.
9. Ekman, R. **The suberin monomers and triterpenoids from the Outer Bark of *Betula verrucosa* Ehrh**, *Holzforschung*, **1983**, *37*, 205-211.

10. O'Connel, M. M.; Bentley, M. D.; Campbell, C. S.; Cole, B. J. W. **Betulin and lupeol in bark from four white-barked birches**, *Phytochemistry*, **1988**, 27(2), 2175-2176.
11. Cole, B. J. W.; Bentley, M. D.; Hua, Y.; Bu, L. **Triterpenoid constituents in the outer bark of *Betula alleghaniensis* (yellow birch)**, *J. Wood Chem. Technol.* **1991**, 11(2), 209-223.
12. Habiyaemye, I.; Stevanovic-Janezic, T.; Riedl, B.; Garneau, F.-X.; Jean, F.-I. **Pentacyclic triterpene constituents of yellow birch bark from Quebec**, *J. Wood Chem. Technol.* **2002**, 22(2), 83-91.
13. Fuchino, H.; Satoh, T.; Tanaka, N. **Chemical evaluation of *Betula* species in Japan. I. Constituents of *Betula ermanii***, *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, 43(11), 1937-1942.
14. Fuchino, H.; Konishi, S.; Satoh, T.; Yagi, A.; Saitsu, K.; Tatsumi, T.; Tanaka, N. **Chemical evaluation of *Betula* species in Japan. II. Constituents of *Betula platyphylla* var. *japonica***, *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, 44(5), 1033-1038.
15. Fuchino, H.; Satoh, T.; Tanaka, N. **Chemical evaluation of *Betula* species in Japan. III. Constituents of *Betula maximowicziana***, *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, 44(9), 1748-1753.
16. Fuchino, H.; Satoh, T.; Shimizu, M.; Tanaka, N. **Chemical evaluation of *Betula* species in Japan. IV. Constituents of *Betula davurica***, *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, 46(1), 166-168.

17. Fuchino, H.; Satoh, T.; Yokochi, M.; Tanaka, N. **Chemical evaluation of *Betula* species in Japan. V. Constituents of *Betula ovalifolia***, *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, *46*(1), 169-170.
18. Fuchino, H.; Satoh, T.; Hida, J.; Terada, M.; Tanaka, N. **Chemical evaluation of *Betula* species in Japan. VI. Constituents of *Betula schmidtii***, *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, *46*(6), 1051-1053.
19. Ekman, R.; Sjöholm, R. **Betulinol 3-Caffeate in outer bark of *Betula verrucosa* Ehrh**, *Finnish Chem. Lett.* **1983**, 134-136.
20. Hua, Y.; Bentley, M. D.; Cole, B. J. W.; Murray, K. D.; Alford, A. R. **Triterpenes from the outer bark of *Betula nigra***, *J. Wood Chem. Technol.* **1991**, *11*(4), 503-516.
21. Anand, R.; Patnaik, G. K.; Kulshreshtha, D. K.; Dhawan, B. N. **Antiuro lithiatic activity of Lupeol, the active constituent isolated from *Craveta nurvala***, *Phytother. Res.* **1994**, *8*(7), 417-421.
22. Huang, F. Y.; Chung, B. Y.; Bentley, M. D.; Alford, R.A. **Colorado potatoe beetle antifeedants by simple modification of the birch bark triterpene betulin**, *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*(9), 2513-2516.
23. Lagemwa, F. N.; Huang, F.-Y.; Bentley, M. D.; Mendel, M. J.; Alford, A. R. **A *Heliothis zea* antifeedant from the abundant birchbark triterpene betulin**, *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*(2), 493-496.
24. Pisha, E.; Chai, H.; Lee, I. S.; Chagwedera, T. E.; Farnsworth, N. R.; Cordell, G. A.; Beecher, C. W.; Fong, H. H.; Kinghorn, A. D.; Brown, M.; Wani, M. C.; Wall, M. E.;

- Hieken, T. J.; Das Gupta, T. K.; Pezzuto, J. M. **Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis**, *Nat. Med.* **1995**, *1*, 1046-1051.
25. Mahato, S. B.; Nandy, A. K.; Roy, G. **Triterpenoids**, *Phytochemistry*, **1992**, *31*(7), 2199-2249.
26. Mahato, S. B.; Sen, S. **Advances in terpenoids research. 1990-1994**, *Phytochemistry*, **1997**, *44*(7), 1185-1236.
27. Lavoie, S. **Contribution à la synthèse de dérivés de l'acide bétulinique à partir du bétulinol extrait de l'écorce du bouleau blanc (*Betula papyrifera*)**, Mémoire de maîtrise, Département des Sciences Fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi, **2001**, 128 pages.
28. Patočka, J. **Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification**, *J. Appl. Biomed.* **2003**, *1*, 7-12.
29. Das Gupta, T. K.; Pezzuto, J. M. **Method and composition for selectively inhibiting melanoma using betulinic acid**, 1997, US Patent 5,658,947.
30. Kim, Y.-K.; Yoon, S. K.; Ryu, S. Y. **Cytotoxic triterpenes from Stem bark of *Physocarpus intermedius***, *Planta Med.* **2000**, *66*, 485-486.
31. Kvasnica, M.; Sarek, J.; Klinotova, E.; Dzubak, P.; Hajduch, M. **Synthesis of phthalates of betulinic acid and betulin with cytotoxic activity**, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 3447-3454.

32. Schmidt, M. L.; Kuzmanoff, K. L.; Ling-Indeck, L.; Pezzuto, J. M. **Betulinic acid induces apoptosis in human neuroblastoma cell lines**, *Eur. J. Cancer*, **1997**, *33*(12), 2007-2010.
33. Fulda, S.; Jeremias, I.; Pietsch, T.; Debatin, K.-M. **Betulinic acid. A new chemotherapeutic agent in the treatment of neuroectodermal tumors**, *Klinische Paediatric*, **1999**, *211*(4), 319-322.
34. Wick, W.; Grimm, C.; Wagenknecht, B.; Dichgans, J.; Weller, M. **Betulinic acid-induced apoptosis in glioma cells: A sequential requirement for new protein synthesis, formation of reactive oxygen species, and caspase processing**, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *289*(3), 1306-1312.
35. Setzer, W. N.; Setzer, M. C.; Bates, R. B.; Jackes, B. R. **Biologically active triterpenoids *Syncarpia glomulifera* bark extract from paluma, north Queensland, Australia**, *Planta Med.* **2000**, *66*, 176-177.
36. Fulda, S.; Jeremias, I.; Steiner, H. H.; Pietsch, T.; Debatin, K.-M. **Betulinic acid: a new cytotoxic agent against malignant brain-tumor cells**, *Int. J. Cancer*, **1999**, *82*, 435-441.
37. Zuco, V.; Supino, R.; Righetti, S. C.; Cleris, L.; Marchesi, E.; Gambacorti-Passerini, C.; Formelli, F. **Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells**, *Cancer Lett.* **2002**, *175*, 17-25.
38. Setzer, W. N.; Setzer, M. C. **Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents**, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 540-556.

39. Tolstikova, T. G.; Sorokina, I. V.; Tolstikov, G. A.; Tolstikov, A. G.; Flekhter, O. B.
Biological activity and pharmacological prospects of lupane terpenoids: I. Natural lupane derivatives, *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2006**, 32(1), 37-49.
40. Eiznhamer, D. A.; Xu, Z.-Q. **Betulinic acid: a promising anticancer candidate**, *IDrugs*, **2004**, 7(4), 359-373.
41. Gopal, D. V. R.; Narkar, A. A.; Badrinath, Y.; Wishra, K. P.; Joshi, D. S. **Betulinic acid induces apoptosis human chronic myelogenous leukemia (CML) cell line K-562 without altering the levels of Bcr-Abl**, *Toxicol. Lett.* **2005**, 155, 343-351.
42. Fulda, S.; Friesen, C.; Los, M.; Scaffidi, C.; Mier, W.; Benedict, M.; Nunez, G.; Krammer, P. H.; Peter, M. E.; Debatin, K.-M. **Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors**, *Cancer Res.* **1997**, 57, 4956-4964.
43. Fulda, S.; Susin, S. A.; Kroemer, G.; Debatin, K.-M. **Molecular ordering of apoptosis induced by anticancer drugs in neuroblastoma cells**, *Cancer Res.* **1998**, 58, 4453-4460.
44. Fulda, S.; Debatin, K.-M. **Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by betulinic acid**, *Neoplasia*, **2005**, 7(2), 162-170.
45. Selzer, E.; Pimentel, E.; Wacheck, V.; Schlegel, W.; Pehamberger, H.; Jansen, B.; Kodym, R. **Effects of betulinic acid alone and in combination with irradiation in human melanoma cells**, *J. Invest. Dermatol.* **2000**, 114(5), 935-940.
46. Ma, J.; Starck, S. R.; Hecht, S. M. **DNA polymerase β inhibitors from *Tetracera Boiviniana***, *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 1660-1663.

47. Bringmann, G.; Saeb, W.; Assi, L. A.; François, G.; Narayanan, A. S. S.; Peters, K.; Peters, E.-M. **Betulinic acid: isolation from *Triphyophyllum peltatum* and *Ancistrocladus heyneanus*, antimalarial activity and crystal structure of the benzyl ester**, *Planta Med.* **1997**, *63*, 255-257.
48. Cho, S. H.; Gottlieb, K. Santhanam, U. **Cosmetic compositions containing betulinic acid**, **1996**, US Patent 5,529,769.
49. Jeong, H. J.; Chai, H.-B.; Park, S.-Y.; Kim, D. S. H. L. **Preparation of amino acid conjugates of betulinic acid with activity against human melanoma**, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1201-1204.
50. Mukherjee, R.; Jaggi, M.; Siddiqui, M. J. A.; Srivastava, S. K.; Rajendran, P.; Vardhan, A.; Burman, A. C. **Synthesis and cytotoxicity of 3-O-acyl/3-hydrazine/2-bromo/20,29-dibromo betulinic acid derivatives**, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4087-4091.
51. Mayaux, J.-F.; Bousseau, A.; Pauwels, R.; Huet, T.; Hénin, Y.; Dereu, N.; Evers, M.; Soler, F.; Poujade, C.; De Clercq, E.; Le Pecq, J.-B. **Triterpene derivatives that block entry of human immunodeficiency virus type 1 into cells**, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, *91*, 3564-3568.
52. Evers, M.; Poujade, C.; Soler, F.; Ribeill, Y.; James, C.; Lelièvre, Y.; Guegen, J.-C.; Reisdorf, D.; Morize, I.; Pauwels, R.; De Clercq, E.; Hénin, Y.; Bousseau, A.; Mayaux J.-F.; Le Pecq, J.-B.; Dereu, N.; **Betulinic acid derivatives : a new class of human immunodeficiency type 1 specific inhibitors with a new mode of action**, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1056-1068.

53. Soler, F.; Poujade, C.; Evers, M.; Carry, J.-C.; Hénin, Y.; Bousseau, A.; Huet, T.; Pauwels, R.; De Clercq, E.; Mayaux, J.-F.; Le Pecq, J.-B.; Dereu, Norbert. **Betulinic acid derivatives : a new class of specific inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 entry**, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1069-1982.
54. Kashiwada, Y.; Hashimoto, F.; Cosentino, L. M.; Chen, C.-H.; Garret, P. E.; Lee, K.-H. **Betulinic acid and dihydrobetulinic acid as potent anti-VIH agents**, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1016-1017.
55. Hashimoto, F.; Kashiwada, Y.; Cosentino, L. M.; Chen, C.-H.; Garrett, P. E.; Lee, K.-H. **Anti-AIDS agents – XXVII. Synthesis and anti-HIV activity of betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives**, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*(12), 2133-2143.
56. Sun, I.-C.; Chen, C.-H.; Kashiwada, Y.; Wu, J.-H.; Wang, H.-K.; Lee, K.-H. **Anti-AIDS agents 49. Synthesis, anti-HIV, and anti-fusion activities of IC9564 analogues based on betulinic acid**, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4271-4275.
57. Huang, L.; Ho, P.; Lee, K.-H.; Chen, C.-H. **Synthesis and anti-HIV activity of bifunctional betulinic acid derivatives**, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 2279-2289.
58. Cichewicz, R. H.; Kouzi, S. A. **Chemistry, biological activity and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection**, *Med. Res. Rev.* **2004**, *24*(1), 90-114.
59. Aiken, C.; Chen, C. H. **Betulinic acid derivatives as HIV-1 antivirals**. *Trends Mol. Med.* **2005**, *11*(1), 31-36.

60. Yogeewari, P.; Sriram, D. **Betulinic acid and its derivatives: A review on their biological properties**, *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 657-666.
61. Otsuka, H.; Fujioka, S.; Komiya, T.; Goto, M.; Hiramatsu, Y.; Fujimura, H. **Studies on anti-inflammatory agents. V. A new anti-inflammatory constituent of *Pyracantha crenulata* Roem.** *Chem. Pharm. Bull.* **1981**, *29*(11), 3099-3104.
62. Schühly, W.; Heilmann, J.; Çalis, I.; Sticher, O. **New triterpenoids with antibacterial activity from *Zizyphus joazeiro***, *Planta Med.* **1999**, *65*, 740-743.
63. Flekhter, O. B.; Boreko, E. I.; Nigmatullina, L. R.; Tret'yakova, E. V.; Pavlova, N. I.; Baltina, L. A.; Nikolaeva, S. N.; Savinova, O. V.; Galin, F. Z.; Tolstikov, G. A. **Synthesis and antiviral activity of ureides and carbamates of betulinic acid and its derivatives**, *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2003**, *29*, 594-600.
64. Flekhter, O. B.; Boreko, E. I.; Nigmatullina, L. R.; Tret'yakova, E. V.; Pavlova, N. I.; Baltina, L. A.; Nikolaeva, S. N.; Savinova, O. V.; Eremin, V. F.; Galin, F. Z.; Tolstikov, G. A. **Synthesis and antiviral activity of betulonic acid amides and conjugates with amino acids**, *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2004**, *30*(1), 80-88.
65. Urban, M.; Sarek, J.; Klinot, J.; Korinkova, G.; Hajduch, M. **Synthesis of A-seco derivatives of betulinic acid with cytotoxic activity**, *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1100—1105.
66. Urban, M.; Tislerova, I.; Dzubak, P.; Hajduch, M. **Influence of esterification and modification of A-ring in a group of lupane acids on their cytotoxicity**, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5527-5535.

67. Symon, A. V.; Veselova, N. N.; Kaplun, A. P.; Vlasenkova, N. K.; Fedorova, G. A.; Lyutik, A. I.; Gerasimova, G. K.; Shvets, V. I. **Synthesis and antitumor activity of cyclopropane derivatives of betulinic and betulonic acids**, *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2005**, *31*(3), 286-291.
68. Kim, J. Y.; Koo, H.-M.; Kim, D. S. H. L. **Development of C-20 modified betulinic acid derivatives as antitumor agents**, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2405-2408.
69. Jaggi, M.; Ramadoss, S.; Rajendran, P.; Siddiqui, M. J. A. **Antiangiogenic activity of betulinic acid and its derivatives**, **2001**, US Patent 6,228,850.
70. Jaggi, M.; Ramadoss, S.; Rajendran, P.; Siddiqui, M. J. A. **Betulinic acid derivatives having antiangiogenic activity, processes for producing such derivatives and their use for treating tumour associated angiogenesis**, **2002**, US Patent 6,403, 816.
71. Ramadoss, S.; Jaggi, M.; Siddiqui, M. J. A. **Use of betulinic acid and its derivatives for inhibiting cancer growth and a method of monitoring this**, **2000**, US Patent 6,048,847.
72. Ramadoss, S.; Jaggi, M.; Siddiqui, M. J. A.; Khanna, A. B. **Use of betulinic acid derivatives for inhibiting cancer growth**, **2001**, US Patent 6,214,814.
73. Ramadoss, S.; Jaggi, M.; Siddiqui, M. J. A.; Khanna, A.S. **Betulinic acid derivatives for inhabiting cancer growth and process for the manufacture of betulinic acid**, **2003**, US Patent 6,670,345.
74. Yasukawa, K.; Takido, M.; Matsumoto, T.; Takeushi, M.; Nakagawa, S. **Sterol and triterpenes derivatives from plants inhibit the effects of a promoter, and**

- sitosterol and betulinic acid inhibit tumour formation in mouse skin in two-stage carcinogenesis**, *Oncology*, **1991**, *48*, 72-76.
75. Mañez, S.; Recio, M.D.C.; Giner, R.M.; Rios, J.-L. **Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation**, *Eur. J. Pharmacol.* **1997**, *334*, 103-105.
76. Kinoshita, K. Yang, Y.; Koyama, K.; Takahashi, K.; Nishino, H. **Inhibitory effect of some triterpenes from cacti on ³²Pi-incorporation into phospholipids of HeLa cells promoted by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate**, *Phytomedicine*, **1999**, *6*(2), 73-77.
77. Yasukawa, K.; Akihisa, T.; Yoshida, Z.-Y.; Takido, M. **Inhibitory effect of euphol, a triterpene alcohol for the roots of *Euphorbia kansui*, on tumour promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin**, *J. Pharm. Pharmacol.* **2000**, *52*, 119-124.
78. Sheth, K.; Bianchi, E.; Wiedhopf, R.; Cole, J.R. **Antitumour agents from *Alnus Oregona* (*Betulaceae*)**, *J. Pharm. Sci.* **1973**, *62*(1), 139-140.
79. Carlson, R. M.; Krasutsky, P. A.; Karim, M. R.-U. **Use of betulin and analogs thereof to treat herpes virus infection**, **1998**, US Patent 5,750,578.
80. Gong, Y.; Raj, K. M.; Luscombe, C. A.; Gadawski, I.; Tam, T.; Chu, J.; Gibson, D.; Carlson, R.; Sacks, S. L. **The synergistic effects of betulin with acyclovir against herpes simplex viruses**, *Antiviral Res.* **2004**, *64*, 127-130.
81. Miura, N.; Matsumoto, Y.; Miyari, S.; Nishiyama, S.; Naganuma, A. **Protective effects of triterpene compounds against the cytotoxicity of cadmium in HepG2 cells**, *Mol. Pharmacol.* **1999**, *56*, 1324-1328.

82. Malini, M. M.; Lenin, M.; Varalakshmi, P. **Protective effect of triterpenes on calcium oxalate crystal-induced peroxidative changes in experimental urolithiasis**, *Pharmacol. Res.* **2000**, *41*(4), 413-418.
83. Sun, I. C.; Shen, J. K.; Wang, H. K.; Cosentino, L. M.; Lee, K. H. **Anti AIDS agents. 32. Synthesis and anti HIV activity of betulin derivatives**, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1267-1272.
84. Sun, I.-C.; Wang, H.-K.; Kashiwada, Y.; Shen, J.-K.; Cosentino, L. M.; Chen, C.-H.; Yang, L.-M.; Lee, K.-H. **Anti-AIDS agents. 34. Synthesis and structure-activity relationships of Betulin derivatives as anti-HIV agents**, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4648-4657.
85. Kashiwada, Y.; Sekiya, M.; Ikeshiro, Y.; Fujioka, T.; Kilgore, N. R.; Wild, C. T.; Allaway, G. P.; Lee, K.-H. **3-O-Glutaryl-dihydrobetulin and related monoacyl derivatives as potent anti-VIH agents**, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5851-5853.
86. Kashiwada, Y.; Chiyo, J.; Ikeshiro, Y.; Nagao, T.; Okabe, H.; Cosentino, L. M.; Fowke, K.; Lee, K. H. **3,28-Di-O-(dimethylsuccinyl)-betulin Isomers as Anti-HIV agents**, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 183-185.
87. Flekhter, O.B.; Medvedeva, N.I.; Karachurina, L.T.; Baltina, L.A.; Zarudii, F.S.; Galin, F.Z.; Tolstikov, G.A. **Synthesis and anti-inflammatory activity of new acylated betulin derivatives**, *Pharm. Chem. J.* **2002**, *36*(9), 488-491.

88. Hiroya, K.; Takahashi, T.; Miura, N.; Naganuma, A.; Sakamoto, T. **Synthesis of betulin derivatives and their protective effects against the cytotoxicity of cadmium**, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3229-3236.
89. Gauthier, C.; Legault, J.; Lebrun, M.; Dufour, P.; Pichette, P. **Glycosilation of lupane-type triterpenoids as potent in vitro cytotoxic agents**, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6713-6725.
90. Thibeault, D.; Gauthier, C.; Legault, J.; Bouchard, J.; Dufour, P.; Pichette, A. **Synthesis and structure-activity relationships study of cytotoxic germanicane- and lupane-type 3 β -O monodesmosidic saponins starting from betulin**, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6144-6157. (voir chapitre 2).
91. Thibeault, D.; Legault, J.; Bouchard, J.; Pichette, A. **Useful approach to access germanicanes from betulin**, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 8416-8419. (voir chapitre 6).
92. Thibeault, D.; Legault, J.; Bouchard, J.; Vanier, S.; Pichette, A. Manuscrit préliminaire (voir chapitre 3).
93. Thibeault, D.; Legault, J.; Bouchard, J.; Pichette, A. Première ébauche (voir chapitre 4).
94. Thibeault, D.; Bouchard, J.; Legault, J.; Gagné, L.; Pichette, A. *Bioorg. Med. Chem.* Manuscrit préliminaire (voir chapitre 5).
95. Kim, D. S. H. L; Chen, Z.; Nguyen, T.; Pezzuto, J. M.; Qiu, S.; Lu, Z.-Z. **A concise semi-synthetic to betulinic acid from betulin**, *Synth. Commun.* **1997**, *27*(9), 1607-1612.

96. Kim, D. S. H. L.; Pezzuto, J. M.; Pisha, E. **Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma**, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 1707-1712.
97. Kratsutsky, P. A.; Carlson, R. M.; Nesterenko, V. V. **Method for manufacturing betulinic acid**, **2001**, US Patent 6,232,481.
98. Csuk, R.; Schmuck, K.; Schäfer, R. **A practical synthesis of betulinic acid**, *Tet. Lett.* **2006**, 47, 8769-8770.
99. Ministère des Ressources naturelles, de la Faune et des Parcs (MRNFP). Ressources et industries forestières, portrait statistique édition 2003, **2003**.
100. Bilan environnemental régional 1988-1999. La Forêt, CRE-02, États Généraux de l'Environnement 1998, 21 février **2003**, 94 pages.
101. Rapport d'enquête et d'audience publique du BAPE (Bureau d'Audiences Publiques sur l'Environnement) # 134 : Projet du Centre énergétique Indeck-Senneterre, **1999**, 123 pages.
102. Gouvernement du Québec. Ministère des forêts. Direction du Développement Industriel. Potentiel de développement de la cogénération à partir de biomasses industrielles au Québec, septembre **1993**, 53 pages.
103. Charbonneau, Y. Les déchets dangereux au Québec. Une gestion environnementale, Les Publications du Québec, **1990**, 265-271.
104. CREDDO (Le Conseil régional de l'environnement et du développement durable de l'Outaouais, Portrait environnementale de la région de l'Outaouais (07), Août **2004**, 95 pages.

105. CRCD (Conseil régional de concertation et de développement). Planification stratégique régionale du Saguenay-Lac-Saint-Jean : donnons-nous les moyens de construire notre avenir : analyses et perspectives sectorielle, 1994, 753 pages.
106. Ministère des ressources naturelles. Programmes d'aide financière offerts à l'industrie des produits forestiers, Direction du développement de l'industrie des produits forestiers, Service du développement technologique et industriel, 1996, 39 pages.

CHAPITRE 2

SYNTHÈSE DE SAPONINES 3 β -O-MONODESMOSIDIQUE DE TYPE GERMANICANE ET LUPANE À PARTIR DU BÉTULINOL ET ÉTUDE DES RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITÉ

Résumé

L'allobétulinol (3) et le 28-oxoallobétulinol (4), des triterpènes de type germanicane, peuvent être obtenus par le réarrangement de Wagner-Meerwein de triterpènes plus abondants de type lupane tel que le bétulinol (1) et l'acide bétulinique (2), respectivement. Les usages thérapeutiques de l'acide bétulinique (2) et de ses dérivés sont limités en raison de leurs faible hydrosolubilité et propriétés pharmacocinétiques. Dans le but de surmonter ce problème majeur, nous avons synthétisé et étudié l'activité anticancéreuse *in vitro* d'une série de saponines 3 β -O-monodesmosidiques dérivées du bétulinol (14-16), de l'acide bétulinique (20-22), de l'allobétulinol (23-28) et du 28-oxoallobétulinol (29-34) en utilisant six sucres naturels différents (D-glucose, L-rhamnose, D-arabinose, D-galactose, D-mannose et D-xylose). Cette étude de relations structure-activité a pu confirmer que les saponines d'acide bétulinique sont généralement de meilleurs agents anticancéreux *in vitro* que ceux dérivés du bétulinol à l'exception du 3 β -O- β -D-mannopyranoside de bétulinol (15) qui démontre une activité cytotoxique contre les lignés cellulaires humaines du carcinome du poumon (A-549) et de l'adénocarcinome

colorectal (DLD-1), avec des valeurs de IC_{50} oscillant entre 7.3 et 10.1 $\mu\text{mol/L}$. En outre, bien que la synthèse de nouvelles saponines de type germanicane a été effectuée avec succès, la bioactivité mesurée pour ces glycosides n'a pas été aussi élevée qu'anticipé puisqu'il n'y a que le $3\beta\text{-O-}\beta\text{-D-glucopyranoside}$ et le $3\beta\text{-O-}\beta\text{-D-galactopyranoside}$ d'allobétulinol (**23-24**) qui ont démontré une activité anticancéreuse modérée (IC_{50} 30-40 $\mu\text{mol/L}$).

Bioorg. Med. Chem. **2007**, *15*, 6144-6157

**Synthesis and structure-activity relationships study of cytotoxic germanicane- and
lupane-type 3 β -*O*-monodesmosidic saponins starting from betulin¹**

Dominic Thibeault², Charles Gauthier², Jean Legault, Jimmy Bouchard, Philippe Dufour,
and André Pichette³

Laboratoire d'Analyse et de Séparation des Essences Végétales (LASEVE)

Département des Sciences Fondamentales

Université du Québec à Chicoutimi, 555 boul. de l'Université

Chicoutimi, Québec, Canada, G7H 2B1

Keywords: Germanicane, Lupane, Glycoside, Anticancer.

¹This article is dedicated to the memory of Linda Grenon, secretary at the UQAC Fundamental Sciences Department, who passed away from lung cancer while the preparation of this article was in progress.

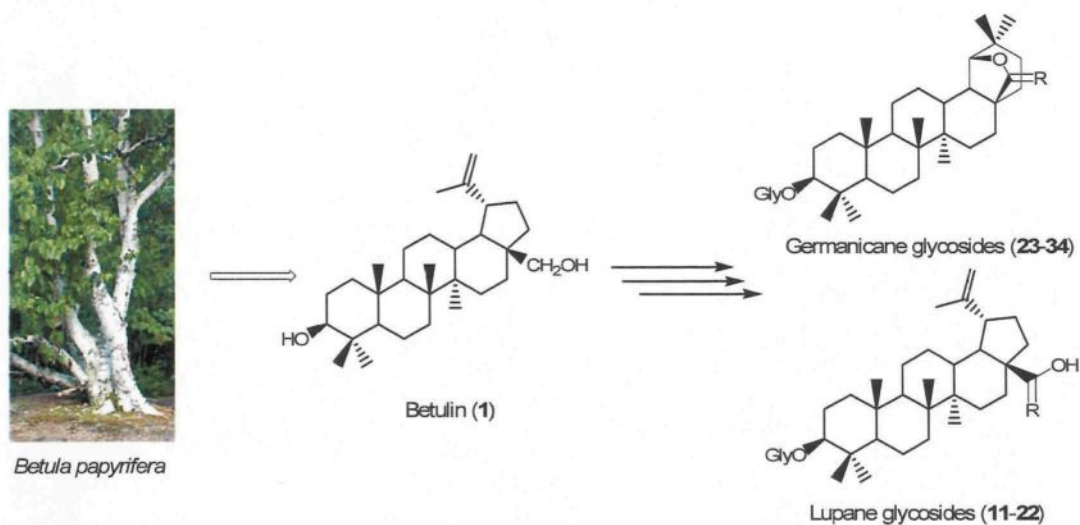
²These authors contributed equally to this work.

³Corresponding author. Tel: +1 418 545-5011; fax: +1 418 545-5012; e-mail: andre_pichette@uqac.ca

Graphical abstract

Synthesis and structure-activity relationships study of cytotoxic germanicane- and lupane-type 3 β -*O*-monodesmosidic saponins starting from betulin

Dominic Thibeault, Charles Gauthier, Jean Legault, Jimmy Bouchard, Philippe Dufour and
André Pichette



Starting from betulin (**1**) isolated from the outer bark of *Betula papyrifera*, we successfully synthesized a library of 3-*O*-monodesmosidic saponins (**11-34**) in order to enhance the hydrosolubility and the cytotoxicity of germanicane- and lupane-type triterpenes.

Abstract

Germanicane-type triterpenes allobetulin (**3**) and 28-oxoallobetulin (**4**) can be obtained by the Wagner-Meerwein rearrangement of the more available lupane-type triterpenes betulin (**1**) and betulinic acid (**2**), respectively. The medical uses of betulinic acid (**2**) and its derivatives are limited because of their poor hydrosolubility and pharmacokinetics properties. In order to overcome this major problem, we synthesized and studied the *in vitro* anticancer activity of a series of 3 β -*O*-monodesmosidic saponins derived from betulin (**14-16**), betulinic acid (**20-22**), allobetulin (**23-28**) and 28-oxoallobetulin (**29-34**) based on six different natural sugar residues (D-glucose, L-rhamnose, D-arabinose, D-galactose, D-mannose and D-xylose). This structure-activity relationships study confirmed that betulinic acid saponins are generally better *in vitro* anticancer agents than those derived from betulin with the exception of betulin 3 β -*O*- α -D-mannopyranoside (**15**) which exerted a potent cytotoxic activity against lung carcinoma (A-549) and colorectal adenocarcinoma (DLD-1) human cell lines with IC₅₀ ranging from 7.3 to 10.1 μ mol/L. Furthermore, although the synthesis of novel germanicane-type saponins was carried out with success, the bioactivity measured for these glycosides was not as high as we anticipated since only the 3 β -*O*- β -D-glucopyranoside and 3 β -*O*- β -D-galactopyranoside of allobetulin (**23**, **24**) showed moderate anticancer activity (IC₅₀ 30-40 μ mol/L).

1. Introduction

Lupane-type derivatives have attracted increased attention in the past decade¹ since they exhibit a broad range of biological and medicinal properties such as anticancer,² antitumoral,^{3,4} anti-inflammatory,⁵ anti-HIV,⁶ anti-malarial,⁷ and antifeedant⁸ activities. Among these lupanes, betulin (**1**) and betulinic acid (**2**) (figure 2-1) are natural pentacyclic triterpenes that can be found in the external bark of various *Betula* species such as *B. papyrifera*⁹. These compounds and more especially betulin (**1**) are regarded by the scientific community as accessible, abundant and valuable bioactive natural products which are present in the inner and the outer birch bark residues.¹⁰ Because of its selective anti-melanoma activity and its favourable therapeutic index,³ betulinic acid (**2**) is currently undergoing clinical trials at the National Cancer Institute (NCI). Nevertheless, the medical uses of betulinic acid (**2**) and its derivatives in the pharmaceutical industry are limited because of their poor hydrosolubility and pharmacokinetic properties (absorption, distribution, metabolism, and elimination).¹¹ To overcome this major problem, some laboratories have undertaken the synthesis of more water-soluble betulinic acid (**2**) derivatives. For example, it was reported that the introduction of polar moieties at the C-3 and C-28 positions such as amino acids¹² and phthalates¹³ enhances, in certain cases, the hydrosolubility and the anticancer activity of betulin (**1**) and betulinic acid (**2**).

Allobetulin (**3**) and 28-oxoallobetulin (**4**) (figure 2-1) are members of the germanicane-type triterpene family,¹⁴ a rare class of natural compounds. In contrast to the

well distributed oleanane-type triterpenes in the plant kingdom,¹⁵ the stereochemistry of the hydrogen atom at C-18 is in the α -configuration for the germanicanes rather than the β -configuration. Triterpenes **3** and **4** can be obtained by the Wagner-Meerwein rearrangement of the more abundant betulin (**1**) and betulinic acid (**2**), respectively, in the presence of Lewis or solid acids.^{16,17} Although the syntheses of allobetulin (**3**) and oxyallobetulin (**4**) and analogues were already reported in the literature,¹⁷⁻²⁴ few studies were reported regarding the development of their derivatives for potential therapeutic applications.^{25,26} This is probably due to the hydrophobic character of these compounds which complicates the solubilization and the formulation in several biological assays.

Triterpenoid glycosides, saponins, are widely distributed throughout the plant kingdom.²⁷ They are considered responsible for the bioactivity, including cytotoxic and anticancer activities, of several medicinal plants.^{28,29} The synthesis of glycosides is an interesting approach to enhance the hydrosolubility and, consequently, the pharmacological and pharmacokinetic properties of lead compounds.³⁰ Nonetheless, few studies exist in the literature regarding the synthesis and the biological evaluation of germanicane-^{25,31-33} and lupane-type³⁴⁻³⁸ saponins. To the best of our knowledge and with respect to the germanicane-type triterpenes, only 3 β -*O*-2-deoxy- α -glycopyranosides^{25,31} and 3 β -*O*- β -D-glucopyranoside^{32,33} of allobetulin (**3**) were synthesized and no screening of their bioactivities was reported. Moreover, natural saponins based on betulin (**1**), betulinic acid (**2**), allobetulin (**3**) and 28-oxoallobetulin (**4**) aglycones are especially rare.^{39,40} Braca and co-workers⁴⁰ reported the isolation of bidesmosidic saponins from the aerial parts of

Schefflera rotundifolia where the most active constituents have, interestingly, betulinic acid (**2**) as a residue.

Recently, we focused our attention on the synthesis of 3 β -*O*-monodesmosidic lupane-type saponins.⁴¹ Our results showed that adding a sugar moiety at the C-3 position can give stronger *in vitro* anticancer agents than betulinic acid (**2**). Moreover, glycosides of betulinic acid (**2**) showed a selectivity on the cancerous cells up to 12-fold higher than on healthy cells. These promising results prompted us to extend our study to the germanicane-type allobetulin (**3**) and 28-oxoallobetulin (**4**). In order to establish meaningful structure-activity relationships (SAR) and to modulate the pharmacokinetic properties of the triterpenes (**1-4**), we wanted to synthesize glycosides incorporating other natural sugar moieties. Hence, we report here the synthesis of several 3 β -*O*-monodesmosidic saponins derived from lupane- (**14-16**, **20-22**) and germanicane-type (**23-34**) triterpenes based on six different natural sugar residues (D-glucose, L-rhamnose, D-arabinose, D-galactose, D-mannose and D-xylose). Cytotoxicity of triterpenes and glycosides was assessed against lung carcinoma (A-549), colorectal adenocarcinoma (DLD-1) and normal skin fibroblasts (WS1) human cell lines. Also, *in silico* calculations of pharmacokinetic properties were carried out using the ADME prediction program QikProp^{42,43} version 2.5 in order to evaluate important pharmaceutical parameters such as lipophilicity (log *P*) and aqueous solubility (log *S*).

2. Results and discussion

2.1. Chemistry

2.1.1. Synthesis of 3-acetylbetulinic acid (8). The main source of betulin (**1**) used in this study was the available *Betula papyrifera* March. widely distributed in the boreal forest of North America. Finely powdered outer bark was heated under reflux in chloroform or methylene chloride to provide crude betulin (**1**). This extract was purified following the Eckerman et al.⁴⁴ procedure. Recrystallized betulin (**1**) was the starting material used directly for the synthesis of allobetulin (**3**) and 3-acetylbetulinic acid (**8**) while the latter was the precursor of allyl betulinate (**9**) and 28-oxoallobetulin (**4**). The synthetic pathway employed for the synthesis of 3-acetylbetulinic acid (**8**) (scheme 2-1) was inspired by the procedure developed by Krasutsky et al. with slight modifications.⁴⁵ Initially, betulin (**1**) was acetylated at the C-3 and C-28 positions with acetic anhydride (Ac_2O) and 4-dimethylaminopyridine (DMAP) in anhydrous pyridine to afford betulin 3,28-diacetate (**5**) in quantitative yield without further purification. Thereafter, compound **5** was deacetylated at the C-28 position in 86% isolated yield in the presence of five equivalents of aluminium isopropoxyde. Thirdly, the alcohol **6** was successively converted into aldehyde **7** using pyridinium chlorochromate (PCC) as oxidizing agent in 96% yield.⁴⁶ Finally, the crude aldehyde **7** was directly oxidized to 3-acetylbetulinic acid (**8**) by the combined action of sodium chlorite (NaClO_2) and sodium dihydrogenophosphate monohydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) in a *t*-BuOH/THF/2-methyl-2-butene mixture. This

procedure was developed by Clive and co-workers⁴⁷ and adapted for substrate **7** to afford compound **8** in only 60-70 min at room temperature in 81% isolated yield. To the best of our knowledge, this synthetic pathway (scheme 2-1) is the most efficient methodology for an easy access to 3-acetylbetulinic acid (**8**) and its derivatives.⁴⁸

2.1.2. Synthesis of saponins. The first series of glycosides (**14-16**, **23-28**) were synthesized according to the reaction sequence shown in scheme 2-2. In order to avoid multiple glycosylation reactions, betulin (**1**) was first acetylated at the C-28 position with Ac₂O/DMAP in pyridine to give betulin 28-acetate (**10**). Allobetulin (**3**) was obtained from the Wagner-Meerwein rearrangement of **1** by the action of Fe(NO₃)₃/SiO₂ (1:4) in refluxed CH₂Cl₂. Aglycone acceptors **10** and **3** were coupled with the appropriate trichloroacetimidate sugar donors⁴⁹ (figure 2-2) under the catalytic promotion of the Lewis acid trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate (TMSOTf).⁵⁰ Thereafter, deprotection of the acetyl and benzoyl groups (NaOH, MeOH/THF/H₂O 1:2:1) afforded betulin (**14-16**) and allobetulin (**23-28**) saponins in isolated yields ranging from 19-49% and 67-89% respectively (2 steps). The second series of glycosides (**20-22**, **29-34**) came from 3-acetylbetulinic acid (**8**) and were synthesized following to the reaction sequence shown in Scheme 3. In order to avoid the formation of by-products, the C-28 allyl ester **9** was first prepared as already reported by our group.⁴¹ 28-oxoallobetulin (**4**) was obtained from the Wagner-Meerwein rearrangement by the action of FeCl₃/SiO₂ (1:4) on the substrate **8** in refluxed CH₂Cl₂. Thereafter, the synthesis of glycosides with aglycone acceptors **9** and **4** was achieved using the same glycosylation protocol mentioned above. Deprotection of the

benzoyl groups afforded 28-oxoallobetulin saponins (**29-34**) in isolated yields ranging from 20-70% (2 steps). Betulinic acid saponins (**20-22**) were obtained after the supplementary deprotection of the allylic function under the catalytic action of tetrakis(triphenylphosphine) palladium(0) in isolated yields ranging from 23-58% (3 steps). The synthesis of other betulin (**11-13**) and betulinic acid (**17-19**) glycosides was previously reported by our group.⁴¹ As we expected, the presence of benzoyl protecting groups in position 2 of the sugar trichloroacetimidates directed the anomeric selectivity of the glycosidation reaction⁵¹ to give exclusively 1,2-*trans*-monodesmosides (β -D-glucopyranosides, α -L-rhamnopyranosides, α -D-arabinopyranosides, β -D-galactopyranosides, β -D-xylopyranosides and α -D-mannopyranosides). This was confirmed by the chemical shifts and the vicinal coupling constants of the anomeric protons in ¹H NMR experiments.⁵² The structures of all new synthesized saponins (**14-16**, **20-22**, **23-34**) were confirmed and elucidated by extended 1D and 2D NMR experiments (¹H, ¹³C, DEPT135, COSY, HSQC, HMBC), IR spectra and HRMS. Saponins **16**^{39d} and **18**^{39c} are naturally occurring products whose synthesis had not been reported in the literature until now.

2.2. Cytotoxic activity

The *in vitro* antiproliferative activity of these triterpenes (**1-4**, **8**) and saponins (**11-34**) was investigated against human lung carcinoma (A-549) and human colorectal adenocarcinoma (DLD-1) cancer cell lines. We chose these types of cancer because they

have a great incidence in the human population. Assessments were also carried out on normal human skin fibroblasts (WS1) to evaluate the differential selectivity of the target compounds. Cell lines cultured in essential medium were plated on 96-well microplates (5.0×10^3 cells per well), and allowed to adhere for 16 h before treatment at 37 °C in a humidified environment containing 5% CO₂. Thereafter, increasing concentrations of each compound in DMSO were added. The cell viability was assessed through the resazurin reduction test as previously described in the literature.⁵³ Measurements of fluorescence were carried out after 48 continuous hours of contact between compounds and cells. Results presented in Table 1 are expressed as the concentration inhibiting 50% of the cell growth (IC₅₀). Betulinic acid (**2**) was used as a positive control in this experimentation (IC₅₀ 10.3-15 µmol/L). Compounds with IC₅₀ values > 75 µmol/L were considered as inactive.

Our previously SAR investigations showed that adding a sugar moiety at the C-3 position of betulin (**1**) significantly decreased cytotoxicity compared to its carboxylic derivative **2**.⁴¹ This extended study revealed that there are some exceptions to this general tendency. In fact, betulin 3β-*O*-α-D-mannopyranoside (**15**) was found to exhibit more potent cytotoxicity than betulinic acid (**2**) with IC₅₀ values ranging from 7.3 to 10.1 µmol/L against cancer cell lines. In contrast to other sugars linked to the C-3 position of betulin (**1**) which suppress the anticancer activity, the specific stereochemistry of D-mannose seems to have a beneficial effect on the cytotoxicity of betulin (**1**). With regard to betulinic acid (**2**), we have previously shown that glycosidation at the C-3 position significantly increased both the activity and the selectivity toward cancer cell lines for D-glucose, L-rhamnose and

D-arabinose monosaccharides.⁴¹ In this study, betulinic acid 3 β -O- α -D-mannopyranoside (**21**) and betulinic acid 3 β -O- β -D-xylopyranoside (**22**) exerted moderate activity against A-549 (**21**: IC₅₀ 34 μ mol/L ; **22**: IC₅₀ 15 μ mol/L) and DLD-1 (**21**: IC₅₀ 15 μ mol/L; **22**: IC₅₀ 18 μ mol/L) with cytotoxicity profiles slightly inferior to aglycone **2**, while the 3 β -O- β -D-galactopyranoside **20** was inactive (IC₅₀ > 75 μ mol/L). Moreover, no significant increase in the selectivity was measured for these new betulinic acid (**2**) saponins. These results suggest that both the anticancer activity and the differential selectivity of betulinic acid (**2**) are strongly influenced by the nature of the carbohydrate moiety at the C-3 position. It is interesting to note that the 3 β -O-acetyl derivative of betulinic acid (**8**) was significantly less cytotoxic against human normal fibroblasts than against cancerous cell lines.

It appeared that modifications in the parent structure of lupane-type triterpenoids such as the loss of the isopropylene group at the C-20 position and the expansion of ring E to six carbons seem to have a deleterious effect on the cytotoxicity profile. Indeed, no significant diminution of the cancerous cells' growth was observed at the maximum tested concentration for both allobetulin (**3**) and 28-oxoallobetulin (**4**) (IC₅₀ > 75 μ mol/L). These results are in good agreement with those of Kim and coworkers⁵⁴ since they conclude that the C-20 isopropylene group of betulinic acid (**2**) is not a favourable position to derive in order to enhance the cytotoxicity. We thought that glycosidation could have a significant impact on the *in vitro* anticancer activity of these rare members of the germanicane-type triterpenoids family. Interestingly, 3 β -O- β -D-glucopyranoside and 3 β -O- β -D-galactopyranoside of allobetulin (**23**, **26**) exhibited moderate cytotoxicity toward cancer

cell lines with IC_{50} values ranging from 30 to 40 $\mu\text{mol/L}$. It should be noted that, contrary to betulinic acid (**2**), the introduction of these sugar moieties at the C-3 position of **3** resulted in an enhancement of the activity. Furthermore, all 3β -*O*-glycosides of 28-oxoallobetulin (**29-34**) were ineffective to inhibit the growth of the cancerous cell lines ($IC_{50} > 75 \mu\text{mol/L}$). In terms of SAR, these *in vitro* cytotoxic results suggest that lupane-type triterpenoid saponins are generally stronger anticancer agents than germanicane-type triterpenoid saponins and particularly those with betulinic acid (**2**) as aglycone.

2.3. Predicted lipophilicity and aqueous solubility

In order to pass through biological membranes (gastro-intestinal membrane, blood-brain barrier, cellular membrane, etc.), a therapeutic agent must be relatively soluble in water. In medicinal chemistry, the aqueous solubility and lipophilicity of a drug have proven to be important molecular parameters determining the absorption, the bioavailability and, sometimes, the bioactivity.⁵⁵ The aqueous solubility ($\log S$) reflects the concentration S of the compound in mol/L for a saturated aqueous solution in equilibrium with the crystalline material, while the lipophilicity is indicated by the logarithm of a partition coefficient ($\log P$) which reflects the concentration ratio of the drug at equilibrium partitioning between octanol and water phases.⁴² In this study, we have used the ADME prediction program QikProp version 2.5 to evaluate *in silico* these parameters (table 2-1). As we expected, adding a sugar moiety enhances the aqueous solubility ($> \log S$) and decreases the lipophilicity ($< \log P$) of lupane- and germanicane-type triterpenoids

(1-4). These theoretical results are in good agreement with our experimental results since glycosides were shown to be more soluble in polar solvents (DMSO, MeOH) used for *in vitro* bioassays than their corresponding aglycones (data not shown). Interestingly, all synthesized glycosides (**11-34**) have log *P* values smaller than 5. Thus, concerning the partition coefficient, these compounds satisfy one of the “Lipinski Rule-of-5” which is important to ensure a good intestinal absorption and permeation of the therapeutic agent when orally delivered.⁵⁶ Moreover, if we compare log *P* values of the most active betulinic acid (**2**) glycosides, we observe that the order of anticancer activity potential (**18** > **19** > **22** > **21**) generally follows the order of lipophilicity (**18** > **19** > **22** > **21**). Nevertheless, it is obvious that lipophilicity and aqueous solubility alone cannot be invoked to explain the difference in cytotoxicity of lupane- and germanicane-type triterpenoid saponins.

3. Conclusion

In summary, starting from betulin (**1**) isolated from the outer bark of *Betula papyrifera*, we successfully synthesized a library of 3 β -*O*-monodesmosidic saponins (**11-34**) having betulin (**1**), betulinic acid (**2**), allobetulin (**3**) and 28-oxoallobetulin (**4**) as aglycones, and β -D-glucopyranose, α -L-rhamnopyranose, α -D-arabinopyranose, β -D-galactopyranose, α -D-mannopyranose and β -D-xylopyranose as sugar moieties, in order to enhance the cytotoxicity and the hydrosolubility of germanicane- and lupane-type triterpenes. Saponins **16** and **18** are naturally occurring products whose synthesis had not been reported in the literature until now. This extended SAR study confirmed that saponins of betulinic acid (**17-22**) are generally better *in vitro* anticancer agents than those derived from betulin (**11-16**) with the exception of betulin 3 β -*O*- α -D-mannopyranoside (**15**) which exhibited a strongly potent cytotoxic activity against cancerous cell lines. Furthermore, although the synthesis of novel germanicane-type saponins was carried out with success, the bioactivity measured for these glycosides was not as high as we anticipated since only 3 β -*O*- β -D-glucopyranoside and 3 β -*O*- β -D-galactopyranoside of allobetulin (**23, 26**) showed moderate anticancer activity.

4. Experimental

4.1. Chemicals

Chemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich Co. Canada or Alfa Aesar Co. and were used as received. The usual solvents were obtained from VWR International Co. and were used as received. Dichloromethane (DCM) was distilled from anhydrous CaH_2 under an argon atmosphere. Tetrahydrofuran (THF) was distilled from sodium/benzophenone ketyl under an argon atmosphere. All anhydrous and air sensitive reactions were performed in oven-dried glassware under positive argon pressure. Tetrakis(triphenylphosphine) palladium(0) was prepared as mentioned in the literature⁵⁷ and stored under argon. Analytical thin-layer chromatography was performed with silica gel 60 F₂₅₄, 0.25 mm pre-coated TLC plates (Silicycle, Québec, Canada). Aliphatic compounds were visualised using aqueous sulphuric acid solution of ammonium heptamolybdate tetrahydrate (10 g/100 mL H_2SO_4 + 900 mL H_2O) and aromatic compounds were visualised using 254 nm and/or 365 nm UV wavelength. Flash column chromatographies were performed on 230-400 mesh silica gel R12030B (Silicycle, Québec, Canada). Infrared spectra (IR) were recorded with a Perkin-Elmer Spectrum One FT-IR spectrophotometer (Shelton, Connecticut, USA) on a NaCl window from a thin film of the analyzed compounds and only significant absorption bands were reported in cm^{-1} . Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a Bruker Avance spectrometer at 400 MHz (^1H) and 100 MHz (^{13}C), equipped with a 5 mm QNP probe. Elucidations of

chemical structures were based on ^1H , ^{13}C , COSY, HMBC, HSQC and DEPT-135 experiments. Signals are reported as m (multiplet), s (singlet), d (doublet), dd (doublet of doublet), ddt (doublet of doublet of triplet), br s (broad singlet) and coupling constants are reported in hertz (Hz). The chemical shifts are reported in ppm (δ) relative to residual solvent peak. The labile OH NMR signals appearing sometimes were not listed. Optical rotations were obtained in a solution of 10% MeOH in CHCl_3 (v/v) unless otherwise specified using sodium D line at ambient temperature on a Jasco DIP360 digital polarimeter. High-resolution mass spectra (HRMS) were obtained at the Department of Chemistry, Queen's University, Ontario, Canada. HPLC preparative methods for the purification of saponins **20**, **21** and **22** in DMSO (10 mg/mL) were carried out with an Agilent 1100 system equipped with a fraction collector using Zorbax ODS C18 column (21.2 x 250 mm; 7 $\mu\text{mol/L}$), at a flow rate of 16.0 mL/min with a column temperature of 25°C. Compounds were detected by UV absorption at 254 nm following this elution gradient: 70% to 100% B where B = MeOH and A = H_2O + 0.1% HCOOH in 30 min (increasing concentration of B by 1%/min).

Sugar donors 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- α,β -D-glucopyranose trichloroacetimidate, 2,3,4-tri-*O*-benzoyl- α,β -L-rhamnopyranose trichloroacetimidate, and 2,3,4-tri-*O*-benzoyl- α,β -D-arabinopyranose trichloroacetimidate were synthesized from D-glucose, L-rhamnose, and D-arabinose respectively following a procedure previously reported by our laboratory.⁴¹ 2,3,4,5-Tetra-*O*-benzoyl- α,β -D-galactopyranose trichloroacetimidate,⁵⁸ 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- α,β -D-mannopyranose trichloroacetimidate,⁵⁹ and 2,3,4-tri-*O*-

benzoyl- α,β -D-xylopyranose trichloroacetimidate⁴⁹ were prepared from D-galactose, D-mannose, and D-xylose respectively as previously reported. Crude betulin (**1**) was extracted from the outer bark of *Betula papyrifera* March. and recrystallized with an azeotropic mixture of 2-butanol/water (74:26) to afford **1** with an acceptable purity (>95%) according to GC-MS. The synthesis of lupane-type saponins (**11-13** and **17-19**) was already reported by our laboratory.⁴¹

4.2. Betulin 3,28-diacetate (**5**)

To a solution of betulin (**1**) (2.33 g, 5.26 mmol) dissolved in 20 mL of pyridine at room temperature was added 1.33 mL of Ac₂O (14.10 mmol) followed by 64 mg of DMAP (0.53 mmol) and stirred for 1 h. Fifty mL of CH₂Cl₂ and 50 mL of distilled water was then poured into the solution, the mixture was acidified with H₂SO₄ 6.2 M (25 mL) at 0 °C and then extracted three times with CH₂Cl₂ (25 mL). The combined organic phases were washed with saturated NaHCO₃ until pH \approx 7. The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. Simple filtration over silica gel using EtOAc/hexanes (2.5:97.5) as eluent afforded 2.77 g of compound **5** as a white solid in a quantitative yield: mp 216-218 °C, lit.⁶⁰ mp 223-224 °C; $[\alpha]_D^{20}$ +19.7° (c 1.67, CHCl₃); IR: 2945, 2872, 1738 (C=O), 1641, 1455, 1365, 1243 (C-O ester), 1030, 979, 883, 738. ¹H and ¹³C NMR spectral data of **5** were in agreement with those published in the literature.⁶¹

4.3. Betulin 3-acetate (6)

Compound **5** (250 mg, 0.470 mmol) and $\text{Al}(i\text{-PrOH})_3$ (490 mg, 2.35 mmol) were stirred under reflux in 8 mL of *i*-PrOH for 2 h. The crude mixture was concentrated under reduced pressure, diluted with CH_2Cl_2 (25 mL) and water (25 mL). The mixture was then extracted with CH_2Cl_2 (3×25 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel using EtOAc/hexanes (10:90 to 20:80) as eluent to afford 0.20 g (86% yield) of compound **6** as a white solid: mp 258-260 °C, lit.⁶⁰ mp 256-258 °C; $[\alpha]_D^{20} +25.7^\circ$ (*c* 0.92, CHCl_3); IR: 3438 (broad, OH), 2944, 2872, 1732 (C=O), 1454, 1374, 1245 (C-O ester), 1105, 1028 (C-OH), 979, 882, 738. ^1H and ^{13}C NMR spectral data of **6** were in agreement with those published in the literature.⁶²

4.4. 3-Acetylbetulinal (7)

Compound **6** (9.77 g, 20.2 mmol) and PCC (8.73 g, 40.3 mmol) were added to 980 mL of CH_2Cl_2 and stirred at room temperature for 2 h. Silica gel (30-50 g) was poured into the mixture and the solvent was evaporated under reduced pressure to dryness. The residual dry-pack was directly used for purification by flash chromatography on silica gel using EtOAc/hexanes (5:95) as eluent to afford 9.34 g (96% yield) of aldehyde **7** as a white solid: $[\alpha]_D^{20} +31.7^\circ$ (*c* 0.71), lit.⁶⁰ $[\alpha]_D^{20} + 30.3^\circ$ (*c* 2.0, CHCl_3); IR: 2943, 1731 (C=O), 1641, 1451, 1375, 1244 (C-O ester), 1027, 979, 883, 738. ^1H NMR (CDCl_3): 9.66 (s, 1H),

4.75 (br s, 1H, H-29), 4.62 (br s, 1H, H-29), 4.45 (dd, 1H, $J = 9.9$ Hz, $J = 5.8$ Hz, H-3), 2.86 (m, 1H), 2.20-0.70 (24H), 2.03 (s, 3H), 1.69 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.83 (s, 6H), 0.82 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3): 206.85, 171.19, 149.85, 110.34, 81.04, 59.47, 55.52, 50.51, 48.17, 47.69, 42.69, 40.97, 38.81, 38.54, 37.92, 37.22, 34.38, 33.35, 29.98, 29.36, 38.93, 28.07, 25.62, 23.82, 21.46, 20.89, 19.11, 18.28, 16.62, 16.34, 16.03, 14.36; HR-EI-MS m/z 482.3779 $[\text{M}]^+$, (calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_3$, 482.3760).

4.5. 3-Acetylbetulinic acid (**8**)

Compound **7** (1.00 g, 2.27 mmol) was dissolved in 50 mL of *t*-BuOH, 10 mL of distilled THF and 15 mL of 2-methyl-2-butene. The solution was stirred and cooled in an ice-bath. Then, 30 mL of freshly prepared solution of aqueous $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaClO}_2$ (2.50 g/2.50 g in 30 mL of distilled water) was slowly added to the solution and the mixture was stirred for 15 min. The mixture was then raised to rt and stirred for 1 h. Finally, the mixture was poured into 50 mL of a saturated solution of NH_4Cl and extracted three times with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated under reduced pressure. Purification of the crude product by flash chromatography using isocratic 7% ethyl acetate in hexanes as eluent afforded 772 mg (81% yield) of carboxylic acid **8** as a white solid: $[\alpha]_D^{20} +26.4^\circ$ (c 0.54, CHCl_3); IR: 2945, 1735 (C=O), 1696 (C=O), 1452, 1369, 1244 (C-O ester), 1027, 979. ^1H NMR (CDCl_3): 4.74 (br s, 1H, H-29), 4.61 (br s, 1H, H-29), 4.47 (dd, 1H, $J = 10.4$ Hz, $J = 5.6$ Hz, H-3), 3.00 (m, 1H), 2.30-0.70 (25H), 2.04 (s, 3H), 1.69 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.85 (s, 3H), 0.84 (s, 3H), 0.83 (s,

3H); ^{13}C NMR (CDCl_3): 182.19, 171.21, 150.51, 109.90, 81.09, 56.54, 55.55, 50.53, 49.40, 47.09, 42.56, 40.83, 38.56, 38.52, 37.95, 37.27, 37.19, 34.37, 32.30, 30.71, 29.84, 28.10, 25.58, 23.84, 21.48, 20.99, 19.50, 18.31, 16.62, 16.33, 16.19, 14.81; HR-EI-MS m/z 521.3629 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, (calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_4\text{Na}$, 521.3607).

4.6. Allyl betulinate (**9**)

Compound **8** (1.00 g, 2.01 mmol) was solubilized with 14 mL of anhydrous dimethylformamide (DMF) and the solution was stirred at 55 °C. Then, 831 mg of anhydrous K_2CO_3 (6.03 mmol) and 339 μL of allyl bromide (4.02 mmol) were added to the mixture and stirred at this temperature for 7 h. After cooling, CH_2Cl_2 was added and the organic layer was washed twice with HCl 10% and once with saturated NaHCO_3 . The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated under reduced pressure. The crude 3-acetoxy-28-allyl betulinate was dissolved in a 1:2:1 MeOH/THF/ H_2O (100 mL) solution containing NaOH (≈ 0.25 N) and stirred 3 h (TLC monitored). After, 50 mL of CH_2Cl_2 was added and the solution was neutralised with HCl 10% until pH 4 ~ 5 and extracted with CH_2Cl_2 three times with portions of 50 mL. Combined organic layers were dried over $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, filtered and evaporated under reduced pressure. Crude product was purified by flash chromatography on silica gel using EtOAc/hexanes (5:95 to 17.5:82.5) as eluent to afford 922 mg (93% yield for 2 steps) of compound **9** as a white solid: mp 152-154 °C; $[\alpha]_D^{20} +3.9^\circ$ (c 1.00, CHCl_3); IR: 3421, 2945, 2869, 1725, 1642, 1452, 1376, 1270,

1152, 1131, 1106, 1043, 982, 884, 738. ^1H and ^{13}C NMR spectral data of **9** were in agreement with those previously reported by our laboratory.⁴¹

4.7. Betulin 28-acetate (**10**)

Compound **1** (1.00 g, 2.07 mmol) and DMAP (28 mg, 0.21 mmol) were dissolved in 15 mL of pyridine and stirred at room temperature. Then, 0.21 mL of Ac_2O (2.07 mmol) was added dropwise and stirred one hour. After, the solution was diluted with 50 mL of CH_2Cl_2 and poured into a separatory funnel filled with ice and 40 mL of H_2SO_4 6.2 M was slowly added. The aqueous phase was extracted three times with CH_2Cl_2 (50 mL) and combined organic phases were dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel using EtOAc/hexanes (5:95 to 20:80) as eluent. Betulin 28-acetate (**10**) (0.80 g, 73% yield) was obtained with betulin 3,28-diacetate (**5**) (0.13 g, 11% yield) and starting betulin (**1**) (0.13 g, 13% yield), all as white solids: mp 210-212 °C; $[\alpha]_D^{20} +8.5^\circ$ (c 1.58, CHCl_3); IR: 3468 (broad, OH), 2942, 2870, 1739 (C=O), 1641, 1454, 1388, 1364, 1237 (C-O ester), 1033 (C-OH), 981, 883, 738. ^1H and ^{13}C NMR spectral data of **10** were in agreement with those published in the literature.⁶¹

4.8. Allobetulin (3)

This compound was prepared as previously reported¹⁶ following this procedure: 5.00 g of betulin (**1**) (11.29 mmol), dissolved in 500 mL of CH₂Cl₂ with a mixture of Fe(NO₃)₃/SiO₂ (1:4) grinded on a mortar (9.13 g/36.50 g, 22.58 mmol of Fe(NO₃)₃) were refluxed for 45 minutes. The solution was then filtered and washed with CH₂Cl₂ and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel using EtOAc/hexanes (10:90 to 20:80) as eluent to afford 3.60 g (72% yield) of allobetulin (**3**) as a white solid: $[\alpha]_D^{20} +44.5^\circ$ (*c* 0.65, CHCl₃); IR: 3452, 2926, 2863, 1450, 1386, 1264, 1180, 1138, 1088, 1042, 1005, 987, 971, 887, 810, 768, 737. ¹H NMR (CDCl₃): 3.76 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, H-28), 3.52 (s, 1H, H-19), 3.43 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-28), 3.19 (m, 1H, H-3), 2.00-1.00 (24H), 0.96 (s, 6H), 0.92 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.83 (s, 3H), 0.79 (s, 3H), 0.76 (s, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃): 88.06, 79.08, 71.39, 55.60, 51.20, 46.95, 41.60, 40.83, 40.73, 39.04, 39.01, 37.38, 36.87, 36.39, 34.26, 34.03, 32.83, 28.94, 28.11, 27.54, 26.58, 26.57, 26.39, 24.68, 21.11, 18.38, 16.62, 15.84, 15.52, 13.64; HR-EI-MS *m/z* 443.3905 [M + Na]⁺, (calcd for C₃₀H₅₀O₂Na, 443.3889).

4.9. 28-Oxoallobetulin (4)

Carboxylic acid **8** (500 mg, 1.00 mmol), was stirred under reflux in 25 mL of CH₂Cl₂ with a mixture of FeCl₃/SiO₂ (1:4) grinded on a mortar (0.50 g/1.95 g, 3.00 mmol of FeCl₃) for 3 h. The mixture was then filtered on celite and washed with CH₂Cl₂,

evaporated and dissolved in a 1:2:1 MeOH/THF/H₂O (50 mL) solution and was refluxed with 1.00 g of NaOH (25 mmol) overnight. Then, 25 mL of CH₂Cl₂ was added and the solution was neutralised with HCl 10% until pH 4 ~ 5 and extracted with CH₂Cl₂ three times with portions of 50 mL. Combined organic layers dried over Na₂S₂O₄, filtered and evaporated, afforded crude product who was purified by flash chromatography on silica gel with MeOH/CH₂Cl₂ (1:99 to 3:97) as eluent to give 417 mg (91% yield over 2 steps) of compound **4** as a white solid: $[\alpha]_D^{20} +51.7^\circ$ (*c* 0.49, CHCl₃); IR: 3377, 2941, 1760, 1446, 1388, 1153, 1119, 1045, 966, 922, 733. ¹H NMR (CDCl₃): 3.93 (s, 1H, H-19), 3.20 (dd, 1H, *J* = 11.2 Hz, *J* = 4.9 Hz, H-3), 2.00-0.50 (24H), 1.02 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.86 (s, 3H), 0.83 (s, 3H), 0.75 (s, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃): 179.86, 85.99, 78.89, 55.49, 51.23, 46.70, 46.09, 40.55, 39.91, 38.93, 38.87, 37.25, 36.00, 33.71, 33.54, 32.31, 31.93, 28.74, 27.94, 27.88, 27.35, 26.51, 25.54, 23.95, 20.87, 18.14, 16.53, 15.51, 15.34, 13.65; HR-EI-MS *m/z* 457.3696 [M + Na]⁺, (calcd for C₃₀H₄₈O₃Na, 457.3682).

4.10. General procedure for the synthesis of glycosides **11-22** and **29-34**

One equivalent of the appropriate acceptor and 1.5 equivalents of the appropriate donor were dissolved in dry CH₂Cl₂ (30 mM) with 4 Å molecular sieves and stirred at room temperature. TMSOTf (0.05 equivalent) was then added dropwise under an argon atmosphere while keeping rigorous anhydrous conditions. The reaction was usually performed in approximately 1.5 h and then neutralized by adding triethylamine (8 M). The crude mixture was filtered, and evaporated under reduced pressure. The residue was

dissolved in a NaOH 0.25 N solution of MeOH/THF/H₂O (0.01 M) and stirred at rt for 2 h. The mixture was diluted in CH₂Cl₂ and washed with HCl 10% and brine. The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography on silica gel using 2-10% MeOH in CH₂Cl₂ as eluent.

4.11. General procedure for the synthesis of glycosides 23-28

One equivalent of the appropriate acceptor and 1.5 equivalents of the appropriate donor were solubilized in dry CH₂Cl₂ (30 mM) with 4 Å molecular sieves and stirred at room temperature. TMSOTf (0.05 equivalent) was then added dropwise under an argon atmosphere while keeping rigorous anhydrous conditions. The reaction was usually performed in approximately 1.5 h and then neutralized by adding triethylamine (8 M). The crude mixture was filtered, and evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in a NaOH 0.25 N solution of MeOH/THF/H₂O (0.01 M) and stirred at room temperature for 2 h. The mixture was diluted in CH₂Cl₂ and washed with HCl 10% and brine. The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in a solution of triphenylphosphine (PPh₃) (0.6 equivalent) and pyrrolidine (2 equivalents) in dry THF (0.22 M), then Pd⁰(PPh₃)₄ (0.3 equivalent) was added and the resulting mixture was stirred 1-3 days at room temperature under argon atmosphere. After evaporation of the solvent under reduced pressure, the residue was purified by flash chromatography using 2-20% MeOH in CH₂Cl₂ as eluent.

4.12. Betulin 3 β -O- β -D-galactopyranoside (**14**)

This compound was prepared from **10** (250 mg, 0.52 mmol) to afford 60 mg of **14** (19% yield) as a white solid: $[\alpha]_D^{20} +9.5^\circ$ (*c* 0.60); IR: 3373, 2920, 2853, 1457, 1353, 1246, 1145, 1029, 973, 876. ^1H NMR (Pyr-*d*₅): 4.90 (m, 2H, H-1', H-29), 4.75 (s, 1H, H-29), 4.62 (s, 1H, H-4'), 4.51 (m, 3H, H-6' (2x), H-2'), 4.20 (m, 1H, H-3'), 4.16 (m, 1H, H-5'), 4.12 (m, 1H, H-28), 3.68 (m, 1H, H-28), 3.43 (m, 1H, H-3) 2.70-0.60 (25H), 1.78 (s, 3H), 1.33 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 0.80 (s, 3H); ^{13}C NMR (Pyr-*d*₅): 151.64, 110.33, 107.98, 89.14, 77.25, 75.91, 73.60, 70.72, 62.89, 59.82, 56.24, 51.02, 49.51, 48.94, 48.73, 43.37, 41.57, 40.05, 39.45, 37.95, 37.46, 35.26, 34.99, 30.78, 30.39, 28.52, 27.94, 27.27, 26.11, 21.45, 19.66, 18.87, 17.20, 16.75, 16.50, 15.33; HR-ESI-MS *m/z* 627.4214 [*M* + Na]⁺ (calcd for C₃₆H₆₀O₇Na, 627.4237).

4.13. Betulin 3 β -O- α -D-mannopyranoside (**15**)

This compound was prepared from **10** (261 mg, 0.54 mmol) to afford 159 mg of **15** (49% yield) as a white powder: $[\alpha]_D^{20} +57.5^\circ$ (*c* 0.58); IR: 3303, 2933, 2866, 1451, 1374, 1058, 1056, 978, 880, 679. ^1H NMR (Pyr-*d*₅): 5.61 (br s, 1H, H-1'), 4.90 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, H-29), 4.76 (s, 1H, H-29), 4.73 (m, 1H, H-4'), 4.64 (m, 1H, H-3'), 4.62 (m, 1H, H-6'), 4.57 (m, 1H, H-2'), 4.51 (m, 1H, H-5'), 4.45 (m, 1H, H-6'), 4.09 (d, 1H, *J* = 11.2 Hz, H-28), 3.67 (d, 1H, *J* = 10.7 Hz, H-28), 3.52 (dd, 1H, *J* = 11.5 Hz, *J* = 4.2 Hz, H-3), 2.70-0.60 (25H), 1.78 (s, 3H), 1.16 (s, 3H), 1.02 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.84 (s, 3H), 0.78 (s, 3H); ^{13}C

NMR (Pyr-*d*₅): 151.65, 110.33, 98.12, 81.99, 76.39, 73.63, 73.40, 69.61, 63.80, 59.82, 56.17, 50.94, 49.49, 48.92, 48.72, 43.34, 41.54, 39.10, 38.81, 37.93, 37.62, 35.25, 34.90, 30.77, 30.40, 29.27, 27.92, 26.05, 22.60, 21.42, 19.66, 18.88, 17.15, 16.67, 16.50, 15.33; HR-ESI-MS *m/z* 627.4243 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₆H₆₀O₇Na, 627.4237).

4.14. Betulin 3β-*O*-β-D-xylopyranoside (16)

This compound was prepared from **10** (251 mg, 0.52 mmol) to afford 81 mg of **16** (27% yield) as a white solid: $[\alpha]_D^{20} +2.4^\circ$ (*c* 0.38); IR: 3343, 2937, 2866, 1450, 1374, 1242, 1161, 1039, 974, 880, 635. ¹H NMR (Pyr-*d*₅): 4.90 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz, H-29), 4.88 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, H-1'), 4.75 (s, 1H, H-29), 4.40 (m, 1H, H-5'), 4.26 (m, 1H, H-4'), 4.19 (m, 1H, H-3'), 4.11 (d, 1H, *J* = 10.6 Hz, H-28), 4.06 (m, 1H, H-2'), 3.80 (m, 1H, H-5'), 3.68 (d, 1H, *J* = 10.4 Hz, H-28), 3.41 (dd, 1H, *J* = 11.7 Hz, *J* = 4.4 Hz, H-3), 2.70-0.70 (25H), 1.77 (s, 3H), 1.33 (s, 3H), 1.09 (s, 3H), 1.02 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 0.83 (s, 3H); ¹³C NMR (Pyr-*d*₅): 151.06, 110.35, 108.08, 89.07, 79.04, 75.97, 71.64, 67.54, 59.76, 56.24, 51.03, 49.50, 48.93, 48.72, 43.35, 41.58, 40.10, 39.41, 37.94, 37.51, 35.26, 34.96, 30.76, 30.41, 28.49, 27.94, 27.35, 26.06, 21.43, 19.64, 18.86, 17.20, 16.76, 16.51, 15.29; HR-ESI-MS *m/z* 597.4146 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₅H₅₈O₆Na, 597.4131).

4.15. Allobetulin 3 β -O- β -D-glucopyranoside (**23**)

This compound was prepared from **3** (80 mg, 0.18 mmol) to afford 82 mg of **23** (75% yield) as a white solid: $[\alpha]_D^{20} +20.3^\circ$ (*c* 0.57); IR: 3350, 2923, 2865, 1448, 1387, 1374, 1358, 1304, 1162, 1072, 1035, 1022, 893, 766. ^1H NMR (Pyr-*d*₅): 4.98 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-1'), 4.64 (m, 1H, H-6'), 4.45 (m, 1H, H-6'), 4.26 (m, 2H, H-3' and H-4'), 4.07 (m, 1H, H-2'), 4.04 (m, 1H, H-5'), 3.87 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-28), 3.68 (s, 1H, H-19), 3.51 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, H-28), 3.41 (m, 1H, H-3), 2.28 (m, 1H, H-2), 1.87 (m, 1H, H-2), 1.70-0.70 (22H), 1.34 (s, 3H), 1.07 (s, 3H), 1.03 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.88 (s, 3H), 0.84 (s, 3H), 0.79 (s, 3H); ^{13}C NMR (Pyr-*d*₅): 107.36, 89.21, 88.23, 79.18, 78.77, 76.21, 72.27, 71.63, 63.48, 56.37, 51.63, 47.52, 42.02, 41.31, 41.18, 40.04, 39.49, 37.51, 37.32, 36.92, 34.89, 34.61, 33.55, 29.60, 28.51, 27.18, 27.15, 27.11, 26.93, 24.97, 21.67, 18.79, 17.25, 17.07, 16.18, 14.05; HR-ESI-MS *m/z* 627.4220 [*M* + Na]⁺ (calcd for C₃₆H₆₀O₇Na, 627.4237).

4.16. Allobetulin 3 β -O- α -L-rhamnopyranoside (**24**)

This compound was prepared from **3** (100 mg, 0.23 mmol) to afford 110 mg of **24** (83% yield) as a white solid: $[\alpha]_D^{20} -3.3^\circ$ (*c* 0.27); IR: 3408, 2926, 1448, 1386, 1130, 1106, 1051, 974, 811. ^1H NMR (Pyr-*d*₅): 5.36 (d, 1H, *J* = 1.2 Hz, H-1'), 4.61 (m, 1H, H-2'), 4.50 (m, 1H, H-3'), 4.36 (m, 1H, H-5'), 4.34 (m, 1H, H-4'), 3.87 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz, H-28), 3.68 (s, 1H, H-19), 3.51 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-28), 2.00 (m, 1H, H-2), 1.90-0.60 (23H), 1.71 (d, 3H, *J* = 5.7 Hz, H-6'), 1.09 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.89 (s, 3H), 0.85 (s, 3H),

0.83 (s, 3H), 0.81 (s, 3H); ^{13}C NMR (Pyr- d_5): 104.89, 88.87, 88.22, 74.52, 73.33, 72.90, 71.62, 70.25, 56.11, 51.60, 47.50, 42.00, 41.29, 41.15, 39.70, 39.32, 37.49, 37.30, 36.91, 34.88, 34.53, 33.54, 29.58, 28.50, 27.13, 27.09, 26.90, 26.44, 24.96, 21.67, 18.92, 18.87, 17.01, 16.94, 16.16, 14.01; HR-ESI-MS m/z 611.4267 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{O}_6\text{Na}$, 611.4288).

4.17. Allobetulin 3 β -O- α -D-arabinopyranoside (**25**)

This compound was prepared from **3** (100 mg, 0.23 mmol) to afford 103 mg of **25** (79% yield) as a white solid: $[\alpha]_D^{20} +51.9^\circ$ (c 0.47); IR: 3343, 2939, 2926, 2871, 2855, 1450, 1386, 1337, 1290, 1252, 1069, 1033, 1001, 939, 767, 714. ^1H NMR (Pyr- d_5): 4.76 (d, 1H, $J = 7.1$ Hz, H-1'), 4.46 (m, 1H, H-2'), 4.41 (m, 1H, H-5'), 4.38 (m, 1H, H-4'), 4.23 (m, 1H, H-3'), 3.88 (m, 1H, H-5'), 3.85 (d, 1H, $J = 6.8$ Hz, H-28), 3.69 (s, 1H, H-19), 3.51 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz, H-28), 3.46 (dd, 1H, $J = 12.4$ Hz, $J = 4.6$ Hz, H-3), 2.03 (m, 1H, H-2), 1.80-0.60 (24H), 1.22 (s, 3H), 1.08 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.88 (s, 6H), 0.85 (s, 3H), 0.77 (s, 3H); ^{13}C NMR (Pyr- d_5): 103.39, 88.21, 85.19, 75.21, 72.96, 71.63, 70.03, 67.49, 56.74, 51.61, 47.51, 42.00, 41.30, 41.19, 39.26, 39.01, 37.69, 37.30, 36.90, 34.85, 34.58, 33.54, 29.57, 28.90, 27.12, 27.09, 26.90, 24.95, 24.16, 21.68, 18.96, 17.29, 16.95, 16.16, 14.00; HR-ESI-MS m/z 597.4130 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{58}\text{O}_6\text{Na}$, 597.4131).

4.18. Allobetulin 3 β -O- β -D-galactopyranoside (26)

This compound was prepared from **3** (100 mg, 0.23 mmol) to afford 91 mg of **26** (67% yield) as a white solid: $[\alpha]_D^{20} +21.6^\circ$ (*c* 0.41); IR: 3407, 2941, 2868, 1641, 1449, 1386, 1140, 1056, 978, 667. ^1H NMR (Pyr-*d*₅): 4.92, (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-1'), 4.63 (d, 1H, *J* = 3.0 Hz, H-4'), 4.53 (m, 2H, H-6'), 4.50 (m, 1H, H-2'), 4.22 (m, 1H, H-3'), 4.17 (m, 1H, H-5'), 3.87 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-28), 3.68 (s, 1H, H-19), 3.51 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-28), 3.41 (m, 1H, H-3), 2.32 (m, 1H, H-2), 1.92 (m, 1H, H-2), 1.70-0.70 (22H), 1.33 (s, 3H), 1.09 (s, 3H), 1.00 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.88 (s, 3H), 0.85 (s, 3H), 0.80 (s, 3H); ^{13}C NMR (Pyr-*d*₅): 107.57, 88.67, 87.82, 76.87, 75.48, 73.18, 71.22, 70.30, 62.49, 55.97, 51.23, 47.11, 41.60, 40.89, 40.77, 39.65, 39.12, 37.10, 36.90, 36.50, 34.47, 34.19, 33.14, 29.17, 28.09, 26.86, 26.72, 26.70, 26.50, 24.54, 21.25, 18.36, 16.79, 16.66, 15.76, 13.63; HR-ESI-MS *m/z* 627.4215 [*M* + Na]⁺ (calcd for C₃₆H₆₀O₇Na, 627.4237).

4.19. Allobetulin 3 β -O- α -D-mannopyranoside (27)

This compound was prepared from **3** (100 mg, 0.23 mmol) to afford 121 mg of **27** (89% yield) as a white solid: $[\alpha]_D^{20} +79.8^\circ$ (*c* 0.54); IR: 3364, 2924, 2868, 1443, 1386, 1123, 1069, 1033, 811, 713. ^1H NMR (Pyr-*d*₅): 5.62 (d, 1H, *J* = 1.2 Hz, H-1'), 4.76 (m, 1H, H-4'), 4.65 (m, 1H, H-3'), 4.63 (m, 1H, H-6'), 4.59 (m, 1H, H-2'), 4.50 (m, 1H, H-5'), 4.48 (m, 1H, H-6'), 3.87 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-28), 3.68 (s, 1H, H-19), 3.51 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, H-28), 3.51 (m, 1H, H-3), 1.84 (m, 1H, H-2), 1.70-0.70 (23H), 1.18, (s, 3H), 1.08 (s,

3H), 0.91 (s, 3H), 0.86 (s, 3H), 0.85 (s, 3H), 0.84 (s, 3H), 0.77 (s, 3H); ^{13}C NMR (Pyr- d_5): 98.09, 88.21, 81.85, 76.43, 73.67, 73.42, 71.62, 69.60, 63.81, 56.33, 51.55, 47.51, 42.02, 41.29, 41.16, 39.13, 38.88, 37.68, 37.30, 36.91, 34.85, 34.51, 33.54, 29.58, 29.26, 27.13, 27.08, 26.89, 24.95, 22.55, 21.65, 18.82, 17.17, 17.00, 16.16, 14.05; HR-ESI-MS m/z 627.4221 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{O}_7\text{Na}$, 627.4237).

4.20. Allobetulin 3 β -O- β -D-xylopyranoside (28)

This compound was prepared from **3** (100 mg, 0.23 mmol) to afford 110 mg of **28** (85% yield) as a white solid: $[\alpha]_D^{20} +17.7^\circ$ (c 0.57); IR: 3250, 2923, 1441, 1385, 1165, 1086, 1032, 969, 892, 767. ^1H NMR (Pyr- d_5): 4.88 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, H-1'), 4.43, (m, 1H, H-5'), 4.29 (m, 1H, H-4'), 4.22 (m, 1H, H-3'), 4.07 (m, 1H, H-2'), 3.87 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H-28), 3.82 (m, 1H, H-5'), 3.68 (s, 1H, H-19), 3.52 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H-28), 3.38 (m, 1H, H-3), 2.24 (m, 1H, H-2), 1.95 (m, 1H, H-2), 1.70-0.70 (22H), 1.33 (s, 3H), 1.09 (s, 3H), 1.02 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.88 (s, 3H), 0.85 (s, 3H), 0.79 (s, 3H); ^{13}C NMR (Pyr- d_5): 108.13, 89.01, 88.21, 79.06, 75.98, 71.65, 71.63, 67.56, 56.40, 51.66, 47.51, 42.00, 41.30, 41.18, 40.12, 39.54, 37.56, 37.30, 36.91, 34.86, 34.60, 33.54, 29.58, 28.45, 27.35, 27.13, 27.09, 26.91, 24.96, 21.67, 18.78, 17.19, 17.09, 16.18, 14.01; HR-ESI-MS m/z 597.4144 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{58}\text{O}_6$, 597.4131).

4.21. Betulinic acid 3 β -O- β -D-galactopyranoside (**20**)

This compound was prepared from **9** (207 mg, 0.42 mmol) to afford 111 mg of **20** (43% yield) as a white solid: $[\alpha]_D^{20}$ -3.9° (*c* 0.20); IR: 3325, 2936, 2864, 1687, 1449, 1375, 1214, 1152, 1056, 976, 879. ^1H NMR (Pyr-*d*₅): 4.96 (s, 1H, H-29), 4.90 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, H-1'), 4.77 (s, 1H, H-29), 4.63 (m, 1H, H-4'), 4.50 (m, 3H, H-6' (2x), H-2'), 4.21 (m, 1H, H-3'), 4.15 (m, 1H, H-5'), 3.56 (m, 1H, H-19), 3.42 (m, 1H, H-3) 2.80-0.60 (24H), 1.80 (s, 3H), 1.32 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 1.03 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.76 (s, 3H); ^{13}C NMR (Pyr-*d*₅): 179.32, 151.69, 110.35, 107.95, 89.11, 77.25, 75.91, 73.62, 70.66, 62.84, 57.02, 56.31, 51.20, 50.13, 48.16, 43.22, 41.45, 40.04, 39.44, 38.96, 37.98, 37.50, 35.13, 33.27, 31.59, 30.65, 28.51, 27.26, 26.46, 21.56, 19.84, 18.83, 17.18, 16.76, 16.74, 15.25; HR-ESI-MS *m/z* 641.4005 [*M* + Na]⁺ (calcd for C₃₆H₅₈O₈Na, 641.4029).

4.22. Betulinic acid 3 β -O- α -D-mannopyranoside (**21**)

This compound was prepared from **9** (201 mg, 0.40 mmol) to afford 58 mg of **21** (23% yield) as a white solid: $[\alpha]_D^{20}$ +71.6° (*c* 0.08); IR: 3382, 2944, 1686, 1440, 1376, 1241, 1106, 1058, 1028, 975, 881, 814. ^1H NMR (Pyr-*d*₅): 5.60 (br s, 1H, H-1'), 4.96 (br s, 1H, H-29), 4.78 (br s, 1H, H-29), 4.75 (m, 2H, H-4'), 4.63 (m, 2H, H-3', H-6'), 4.57 (br s, 1H, H-2'), 4.49 (m, 2H, H-5', H-6'), 3.55 (m, 1H, H-19), 3.53 (m, 1H, H-3), 3.00-0.50 (24H), 1.80 (s, 3H), 1.16 (s, 3H), 1.04 (s, 3H), 1.02 (s, 3H), 0.81 (s, 3H), 0.74 (s, 3H); ^{13}C NMR (Pyr-*d*₅): 179.29, 151.73, 110.35, 98.10, 81.95, 76.41, 73.67, 73.41, 69.63, 63.82,

57.01, 56.24, 51.12, 50.11, 50.06, 43.19, 41.43, 39.09, 38.92, 38.81, 37.98, 37.66, 35.04, 33.24, 31.57, 30.62, 29.26, 26.42, 22.56, 21.52, 19.82, 18.87, 17.13, 16.74, 16.65, 15.25; HR-ESI-MS m/z 641.4017 $[M + Na]^+$ (calcd for $C_{36}H_{58}O_8Na$, 641.4029).

4.23. Betulinic acid 3 β -O- β -D-xylopyranoside (22)

This compound was prepared from **9** (200 mg, 0.40 mmol) to afford 138 mg of **22** (58% yield) as a white solid: $[\alpha]_D^{20} +11.9^\circ$ (c 0.15); IR: 3376, 2931, 2865, 1687, 1638, 1453, 1375, 1161, 1046, 974, 882. 1H NMR (Pyr- d_5): 4.96 (s, 1H, H-29), 4.87 (d, 1H, J = 7.0 Hz, H-1'), 4.78 (s, 1H, H-29), 4.39 (m, 1H, H-5'), 4.26 (m, 1H, H-4'), 4.20 (m, 1H, H-3'), 4.05 (m, 1H, H-2'), 3.80 (m, 1H, H-5'), 3.56 (m, 1H, H-19), 3.40 (m, 1H, H-3), 2.80-0.70 (24H), 1.79 (s, 3H), 1.32 (s, 3H), 1.11 (s, 3H), 1.04 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 0.78 (s, 3H); ^{13}C NMR (Pyr- d_5): 179.27, 151.67, 110.39, 108.09, 89.06, 79.05, 75.98, 71.64, 67.54, 57.01, 56.31, 51.20, 50.12, 48.16, 43.20, 41.46, 40.09, 39.45, 38.94, 37.97, 37.56, 35.11, 33.24, 31.57, 30.64, 28.48, 27.35, 26.44, 21.56, 19.81, 18.85, 17.18, 16.75 (2x), 15.22; HR-ESI-MS m/z 587.3961 $[M - H]^-$ (calcd for $C_{35}H_{55}O_7$, 587.3953).

4.24. 28-Oxoallobetulin 3 β -O- β -D-glucopyranoside (29)

This compound was prepared from **4** (80 mg, 0.18 mmol) to afford 56 mg of **29** (50% yield) as a white solid: $[\alpha]_D^{20} +23.1^\circ$ (c 0.41); IR: 3388, 2943, 2869, 1766, 1447, 1388, 1375, 1304, 1154, 1072, 1016, 969, 923, 532. 1H NMR (Pyr- d_5): 4.98 (d, 1H, J = 7.8

Hz, H-1'), 4.64 (m, 1H, H-6'), 4.45 (m, 1H, H-6'), 4.26 (m, 2H, H-3', H-4'), 4.08 (m, 1H, H-2'), 4.06 (s, 1H, H-19), 4.04 (m, 1H, H-5'), 3.40 (m, 1H, H-3), 2.28 (m, 1H, H-2), 2.00 (m, 1H, H-16), 1.86 (m, 2H, H-2, H-18), 1.70-0.70 (20H), 1.32 (s, 3H), 1.04 (s, 3H), 1.00 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.78 (s, 3H), 0.75 (s, 3H); ^{13}C NMR (Pyr- d_5): 179.92, 107.36, 89.16, 86.25, 79.16, 78.77, 76.19, 72.25, 63.48, 56.33, 51.72, 47.18, 46.60, 41.10, 40.55, 40.00, 39.47, 37.46, 36.88, 34.40, 34.11, 33.12, 32.44, 29.19, 28.65, 28.47, 27.14, 26.97, 26.38, 24.05, 21.51, 18.66, 17.19, 17.07, 15.86, 14.12; HR-ESI-MS m/z 641.4038 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{58}\text{O}_8\text{Na}$, 641.4029).

4.25. 28-Oxoallobetulin 3 β -O- α -L-rhamnopyranoside (30)

This compound was prepared from **4** (100 mg, 0.22 mmol) to afford 92 mg of **30** (70% yield) as a white solid: $[\alpha]_D^{20}$ -6.8° (c 0.27); IR: 3310, 2935, 1757, 1443, 1387, 1146, 1117, 1053, 965, 921, 810. ^1H NMR (Pyr- d_5): 5.36 (d, 1H, J = 1.2 Hz, H-1'), 4.62 (m, 1H, H-2'), 4.53 (m, 1H, H-3'), 4.37 (m, 1H, H-5'), 4.35 (m, 1H, H-4'), 4.07 (s, 1H, H-19), 3.17 (m, 1H, H-3), 2.00 (m, 1H, H-2), 2.00 (m, 1H, H-16), 1.87 (m, 1H, H-18), 1.80-0.60 (21H), 1.72 (d, 3H, J = 5.7 Hz, H-6'), 1.04 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.87 (s, 3H), 0.80 (s, 3H), 0.79 (s, 3H), 0.76 (s, 3H); ^{13}C NMR (Pyr- d_5): 179.94, 104.94, 88.84, 86.26, 74.53, 73.35, 72.92, 70.28, 56.10, 51.72, 47.19, 46.59, 41.08, 40.56, 39.69, 39.31, 37.47, 36.88, 34.34, 34.12, 33.13, 32.45, 29.20, 28.66, 28.48, 26.97, 26.43, 26.39, 24.06, 21.55, 18.95, 18.77, 17.05, 16.91, 15.87, 14.10; HR-ESI-MS m/z 625.4055 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{58}\text{O}_7\text{Na}$, 625.4080).

4.26. 28-Oxoallobetulin 3 β -O- α -D-arabinopyranoside (31)

This compound was prepared from **4** (250 mg, 0.10 mmol) to afford 26 mg of **31** (20% yield) as a white solid: $[\alpha]_D^{20} +50.9^\circ$ (*c* 0.25); IR: 3280, 2941, 2921, 1757, 1442, 1386, 1360, 1137, 1068, 1002, 965, 945, 921. ^1H NMR (Pyr-*d*₅): 4.75 (d, 1H, *J* = 7.1 Hz, H-1'), 4.45 (m, 1H, H-2'), 4.41 (m, 1H, H-5'), 4.38 (m, 1H, H-4'), 4.23 (m, 1H, H-3'), 4.07 (s, 1H, H-19), 3.85 (d, 1H, *J* = 12.6 Hz, H-5'), 3.43 (m, 1H, H-3), 2.20-0.70 (24H), 1.24 (s, 3H), 1.03 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.88 (s, 3H), 0.86 (s, 3H), 0.78 (s, 3H), 0.73 (s, 3H); ^{13}C NMR (Pyr-*d*₅): 179.95, 103.33, 86.23, 85.07, 75.20, 72.94, 70.01, 67.47, 56.71, 51.71, 47.18, 46.57, 41.10, 40.55, 39.24, 38.98, 37.65, 36.84, 34.38, 34.09, 33.10, 32.42, 29.16, 28.86, 28.63, 26.96, 26.37, 24.10, 24.03, 21.54, 18.84, 17.23, 16.96, 15.85, 14.06; HR-ESI-MS *m/z* 611.3935 [*M* + Na]⁺ (calcd for C₃₅H₅₆O₇Na, 611.3924).

4.27. 28-Oxoallobetulin 3 β -O- β -D-galactopyranoside (32)

This compound was prepared from **4** (100 mg, 0.22 mmol) to afford 83 mg of **32** (61% yield) as a white solid: $[\alpha]_D^{20} +28.0^\circ$ (*c* 0.47); IR: 3378, 2935, 1758, 1446, 1389, 1153, 1055, 966, 922, 756. ^1H NMR (Pyr-*d*₅): 4.91, (d, 1H, *J* = 7.7 Hz, H-1'), 4.63 (d, 1H, *J* = 3.0 Hz, H-4'), 4.53 (m, 2H, H-6'), 4.51 (m, 1H, H-2'), 4.22 (m, 1H, H-3'), 4.17 (m, 1H, H-5'), 4.07 (s, 1H, H-19), 3.40 (m, 1H, H-3), 2.32 (m, 1H, H-2), 2.01 (m, 1H, H-16), 1.90 (m, 1H, H-2), 1.88 (m, 1H, H-18), 1.70-0.70 (20H), 1.32 (s, 3H), 1.04 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.78 (s, 3H), 0.75 (s, 3H); ^{13}C NMR (Pyr-*d*₅): 179.94,

107.99, 89.02, 86.25, 77.29, 75.88, 73.58, 70.72, 62.91, 56.36, 51.75, 47.18, 46.59, 41.10, 40.56, 40.04, 39.52, 37.49, 36.88, 34.41, 34.12, 33.13, 32.44, 29.19, 28.66, 28.47, 27.24, 26.99, 26.39, 24.05, 21.53, 18.67, 17.16, 17.10, 15.87, 14.12; HR-ESI-MS m/z 641.4037 $[M + Na]^+$ (calcd for $C_{36}H_{58}O_8Na$, 641.4029).

4.28. 28-Oxoallobetulin 3 β -O- α -D-mannopyranoside (**33**)

This compound was prepared from **4** (100 mg, 0.22 mmol) to afford 62 mg of **33** (46% yield) as a white solid: $[\alpha]_D^{20} +83.1^\circ$ (c 0.30); IR: 3330, 2940, 1757, 1443, 1388, 1119, 1067, 965, 921. 1H NMR (Pyr- d_5): 5.62 (d, 1H, $J = 1.1$ Hz, H-1'), 4.76 (m, 1H, H-4'), 4.65 (m, 1H, H-3'), 4.63 (m, 1H, H-6'), 4.59 (m, 1H, H-2'), 4.50 (m, 1H, H-5'), 4.48 (m, 1H, H-6'), 4.06 (s, 1H, H-19), 3.51 (m, 1H, H-3), 1.99 (m, 1H, H-16), 1.86 (m, 1H, H-18), 1.84 (m, 1H, H-2), 1.70-0.70 (21H), 1.16 (s, 3H), 1.02 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.84 (s, 3H), 0.83 (s, 3H), 0.77 (s, 3H), 0.73 (s, 3H); ^{13}C NMR (Pyr- d_5): 179.99, 98.05, 86.23, 81.72, 76.44, 73.67, 73.42, 69.62, 63.84, 56.29, 51.66, 47.17, 46.59, 41.07, 40.54, 39.15, 38.87, 37.65, 36.84, 34.32, 34.11, 33.12, 32.43, 29.23, 29.18, 28.65, 26.95, 26.36, 24.04, 22.50, 21.51, 18.71, 17.12, 17.02, 15.85, 14.13; HR-ESI-MS m/z 641.4043 $[M + Na]^+$ (calcd for $C_{36}H_{58}O_8Na$, 641.4029).

4.29. 28-Oxoallobetulin 3 β -O- β -D-xylopyranoside (**34**)

This compound was prepared from **4** (100 mg, 0.22 mmol) to afford 28 mg of **34** (22% yield) as a white solid: $[\alpha]_D^{20} +37.3^\circ$ (*c* 0.07); IR: 3230, 2922, 2853, 1757, 1443, 1386, 1260, 1166, 1044, 966, 921, 712. ^1H NMR (Pyr-*d*₅): 4.88 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz, H-1'), 4.43 (m, 1H, H-5'), 4.28 (m, 1H, H-4'), 4.22 (m, 1H, H-3'), 4.07 (m, 1H, H-2'), 4.06 (s, 1H, H-19), 3.82 (m, 1H, H-5'), 3.37 (m, 1H, H-3), 2.24 (m, 1H, H-2), 1.95 (m, 1H, H-2), 1.80-0.70 (24 H), 1.32 (s, 3H), 1.03 (s, 3H), 1.00 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.89 (s, 3H), 0.79 (s, 3H), 0.78 (s, 3H); ^{13}C NMR (Pyr-*d*₅): 179.95, 108.16, 88.94, 86.24, 79.08, 75.98, 71.65, 67.57, 56.37, 51.76, 47.18, 46.58, 41.10, 40.55, 40.10, 39.52, 37.53, 36.85, 34.40, 34.10, 33.11, 32.44, 29.18, 28.65, 28.41, 27.32, 26.96, 26.38, 24.05, 21.53, 18.67, 17.13, 17.11, 15.86, 14.08; HR-ESI-MS *m/z* 611.3914 [*M* + Na]⁺ (calcd for C₃₅H₅₆O₇Na, 611.3924).

4.30. Cell lines and culture conditions

Human lung carcinoma (A-549), human colon adenocarcinoma (DLD-1), and human normal fibroblasts (WS1) cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). All cell lines were cultured in minimum essential medium containing Earle's salts and L-glutamine (Mediatech Cellgro, VA), to which was added 10% foetal bovine serum (Hyclone), vitamins (1X), penicillin (100 I.U./mL) and streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), essential amino acids (1X) and sodium pyruvate (1X) (Mediatech Cellgro, VA). Cells were kept at 37 °C in a humidified environment containing 5% CO₂.

4.31. Cytotoxicity assay

Exponentially growing cells were plated in 96-well microplates (Costar, Corning Inc.) at a density of 5×10^3 cells per well in 100 μL of culture medium and were allowed to adhere for 16 h before treatment. Increasing concentrations of each compound in DMSO (Sigma-Aldrich) were then added (100 μL per well) and the cells were incubated for 48 h. The final concentration of DMSO in the culture medium was maintained at 0.5% (v/v) to avoid solvent toxicity. Cytotoxicity was assessed using resazurin⁵³ on an automated 96-well Fluoroskan Ascent F1TM plate reader (Labsystems) using excitation and emission wavelengths of 530 and 590 nm, respectively. Fluorescence was proportional to the cellular metabolic activity in each well. Survival percentage was defined as the fluorescence in experimental wells compared to that in control wells after subtraction of blank values. Each experiment was carried out three times in triplicate. IC_{50} results were expressed as means \pm standard deviation.

Acknowledgments

This work was supported by grants from le Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT) and la Scierie Thomas-Louis-Tremblay de Sainte-Monique-de-Honfleur, Québec, Canada. We thank Sébastien Vanier for his contribution in organic synthesis.

References and notes

1. (a) Baglin, I.; Mitaine-Offer, A. C.; Nour, M.; Tan, K.; Cave, C.; Lacaille-Dubois, M. A. *Mini Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 525-539; (b) Cichewicz, R. H.; Kouzi, S. A. *Med. Res. Rev.* **2004**, *24*, 90-114; (c) Eiznhamer, D. A.; Xu, Z. Q. *IDrugs.* **2004**, *7*, 359-373; (d) Yogeewari, P.; Sriram, D. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 657-666; (e) Alakurtti, S.; Makela, T.; Koskimies, S.; Yli-Kauhaluoma, J. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, *29*, 1-13; (f) Dzubak, P.; Hajduch, M.; Vydra, D.; Hustova, A.; Kvasnica, M.; Biedermann, D.; Markova, L.; Sarek, J. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 394-411; (g) Tolstikova, T. G.; Sorokina, I. V.; Tolstikov, G. A.; Tolstikov, A. G.; Flekhter, O. B. *Bioorg. Khim.* **2006**, *31*, 42-55; (h) Tolstikova, T. G.; Sorokina, I. V.; Tolstikov, G. A.; Tolstikov, A. G.; Flekhter, O. B. *Bioorg. Khim.* **2006**, *32*, 291-307.
2. Mukherjee, R.; Kumar, V.; Srivastava, S. K.; Agarwal, S. K.; Burman, A. C. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2006**, *6*, 271-279.
3. Pisha, E.; Chai, H.; Lee, I. S.; Chagwedera, T. E.; Farnsworth, N. R.; Cordell, G. A.; Beecher, C. W.; Fong, H. H.; Kinghorn, A. D.; Brown, D. M. *Nat. Med.* **1995**, *1*, 1046-1051.
4. Saxena, B. B.; Zhu, L.; Hao, M.; Kisilis, E.; Katdare, M.; Oktem, O.; Bomshteyn, A.; Rathnam, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6249-6258.
5. (a) Safayhi, H.; Sailer, E. R. *Planta Med.* **1997**, *63*, 487-493; (b) Aguirre, M. C.; Delporte, C.; Backhouse, N.; Erazo, S.; Letelier, M. E.; Cassels, B. K.; Silva, X.; Alegria, S.; Negrete, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 5673-5677; (c) Honda, T.;

- Liby, K. T.; Su, X.; Sundararajan, C.; Honda, Y.; Suh, N.; Risingsong, R.; Williams, C. R.; Royce, D. B.; Sporn, M. B.; Gribble, G. W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 6306-6309.
6. (a) Fujioka, T.; Kashiwada, Y.; Kilkuskie, R. E.; Cosentino, L. M.; Ballas, L. M.; Jiang, J. B.; Janzen, W. P.; Chen, I.-S.; Lee, K. H. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 243-247; (b) Huang, L.; Ho, P.; Lee, K. H.; Chen, C. H. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 2279-2289.
 7. Steele, J. C.; Warhurst, D. C.; Kirby, G. C.; Simmonds, M. S. *Phytother. Res.* **1999**, *13*, 115-119.
 8. (a) Lugemwa, F. N.; Huang, F.-Y.; Bentley, M. D.; Mendel, M. J.; Alford, A. R. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 493-496; (b) Huang, F.-Y.; Chung, B. Y.; Bentley, M. D.; Alford, A. R. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2513-2516.
 9. (a) O'Connel, M. M.; Bently, M. D.; Campbell, C. S.; Cole, B. J. W. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 2175-2176; (b) Habiyaemye, I.; Stevanovic-Janezic, T.; Riedl, B.; Garneau, F.-X.; Jean, F.-I. *J. Wood Chem. Technol.* **2002**, *22*, 83-91.
 10. Krasutsky, P. A. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 919-942.
 11. Udeani, G. O.; Zhao, G. M.; Geun Shin, Y.; Cooke, B. P.; Graham, J.; Beecher, C. W.; Kinghorn, A. D.; Pezzuto, J. M. *Biopharm. Drug. Dispos.* **1999**, *20*, 379-383.
 12. Jeong, H.-J.; Chai, H.-B.; Park, S.-Y.; Kim, D. S. H. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1201-1204.
 13. Kvasnica, M.; Sarek, J.; Klinitova, E.; Dzubak, P.; Hajduch, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 3447-3454.

14. Ye. Y.; Kinoshita, K.; Koyama, K.; Takahashi, K.; Kondo, N.; Yuasa, H. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 456-460.
15. Connolly, J. D.; Hill, R. A. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 560-578.
16. Lavoie, S.; Pichette, A.; Garneau, F.-X.; Girard, M.; Gaudet, D. *Synthetic Communication*, **2001**, *31*, 1565-1571.
17. Li, T.-S.; Wang, J.-X.; Zheng, X.-J. *J. Chem. Soc.: Perkin Trans. 1* **1998**, 3957-3965.
18. Pettit, G. R.; Green, B. *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 4673-4675.
19. Pettit, G. R.; Green, B.; Bowyer, W. J. *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 2879-2883.
20. Berti, G.; Marsili, A.; Morelli, I. *Tetrahedron*, **1971**, *27*, 2217-2223.
21. Berti, G.; Bottari, F.; Marcili, A.; Morelli, I. *Tetrahedron*, **1971**, *27*, 2143-2152.
22. Flekhter, O. B.; Ashavina, O. Y.; Smirnova, I. E.; Baltina, L. A.; Gallin, F. Z.; Kabal'nova, N. N.; Tolstikov, G. A. *Chem. Nat. Compd.* **2004**, *40*, 141-143.
23. Medvedeva, N. I.; Flekhter, O. B.; Baltina, L. A.; Galin, F. Z.; Tolstikov, G. A. *Chem. Nat. Compd.* **2004**, *40*, 247-249.
24. Flekhter, O. B.; Medvedeva, N. I.; Karachurina, L. T.; Baltina, L. A.; Gallin, F. Z.; Zarudii, F. S.; Tolstikov, G. A. *Pharm. Chem. J.* **2005**, *39*, 401-404.
25. Baltina, L. A.; Flekhter, O. B.; Vasil'eva, E. V.; Tolstikov, G. A. *Russ. Chem. Bull.* **1997**, *46*, 577-581.
26. Valterova, I.; Klinot, J.; Vystrcil, A. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1983**, *48*, 649-661.
27. Sparg, S. G.; Light, M. E.; van Staden, J. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *94*, 219-243.

28. Liu, J.; Henkel, T. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1051-1064.
29. Rao, A. V.; Gurfinkel, D. M. *Drug. Metabol. Drug. Interact.* **2000**, *17*, 211-235.
30. Křen, V.; Martínková, L. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 1313-1338.
31. Baltina, L. A.; Flekhter, O. B.; Vasiljeva, E. V. *Mendeleev Commun.* **1996**, 63-64.
32. Odínokova, L. E.; Oshitok, G. I.; Denisenko, V. A.; Anufriev, V. F.; Tolkach, A. M.; Uvarova, N. I. *Chem. Nat. Compd.* **1984**, *2*, 168-173.
33. Odínokova, L. E.; Denisenko, M. V.; Denisenko, V. A.; Uvarova, N. I. *Chem. Nat. Compd.* **1988**, *2*, 212-217.
34. Klinotová, E.; Křeček, V.; Klinot, J.; Endová, M.; Eisenreichová, J.; Buděšínský, M.; Štícha, M. *Collect. Czech. Chem. C.* **1997**, *62*, 1776-1798.
35. Ohara, S.; Hishiyama, S. *Mokuzai Gakkaishi* **1994**, *40*, 444-451.
36. Ohara, S.; Ohira, T. *J. Wood Sci.* **2003**, *49*, 59-64.
37. Pakulski, Z. *Polish J. Chem.* **2005**, *79*, 361-367.
38. Samoshina, N. F.; Denisenko, M. V.; Denisenko, V. A.; Uvarova, N. I. *Chem. Nat. Compd.* **2003**, *39*, 575-582.
39. (a) Kariyone, T.; Ishimasa, S.; Shiomi, T. *J. Pharm. Soc. Japan* **1956**, *76*, 1210-1211; (b) Tiwari, K. P.; Minocha, P. K. *Phytochemistry* **1980**, *19*, 701-704; (c) Tiwari, K. P.; Srivastava, S. D.; Srivastava, S. K. *Phytochemistry* **1980**, *19*, 980-981; (d) Jain, S. A.; Srivastava, S. K. *Indian J. Pharm. Sci.* **1984**, 161-162; (e) Purohit, M. C.; Pant, G.; Rawat, M. S. M. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 2419; (f) Sung, T. V.; Peter-Katalinic, J.; Adam, G. *Phytochemistry* **1991**, *11*, 3717-3720; (g) Taylor, W. C. *Pure & Appl. Chem.* **1994**, *68*, 2375-2378; (h) De Tommasi, N.;

- Pizza, C. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 663-668; (i) Yook, C.-S.; Chang, S.-Y.; Hshiang, L.; Kwon Ko, S.; Jeong, J.-H.; Nohara, T. *Arch. Pharm. Res.* **1999**, *22*, 629-632; (j) Melek, F. R.; Miyase, T.; Abdel-Khalik, S. M.; Hetta, M. H.; Mahmoud, I. I. *Phytochemistry* **2002**, *60*, 185-195; (k) Cioffi, G.; Braca, A.; Autore, G.; Morelli, I.; Pinto, A.; Venturella, F.; De Tommasi, N. *Planta Med.* **2003**, *69*, 750-756; (l) Tapondjou, A. L.; Miyamoto, T.; Lacaille-Dubois, M.-A. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 2126-2132.
40. Braca, A.; Autore, G.; De Simone, F.; Marzocco, S.; Morelli, I.; Venturella, F.; De Tommasi, N. *Planta Med.* **2004**, *70*, 960-966.
 41. Gauthier, C.; Legault, J.; Lebrun, M.; Dufour, P.; Pichette, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6713-6725.
 42. Jorgensen, W. L.; Duffy, E. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1155-1158.
 43. Jorgensen, W. L.; Duffy, E. M. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, *54*, 355-366.
 44. Eckerman, C.; Ekman, R. *Paperi ja Puu – Papper och. Trä* **1985**, *3*, 100-106.
 45. Krasutsky, P. A.; Carlson, R. M.; Nesterenko, V. V. U. S. Patent 6,232,481 B1, 2001.
 46. Pichette, A.; Liu, H.; Roy, C.; Tanguay, S.; Simard, F.; Lavoie, S. *Synth. Commun.* **2004**, *34*, 3925-3937.
 47. Clive, D. L. J.; Wickens, P. L.; da Silva, G. V. J.; *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5532-5536.

48. During the writing of this paper, a practical one-step method for the synthesis of betulinic acid (**2**) starting from betulin (**1**) was reported: Csuk, R.; Schmuck, K.; Schäfer, R. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 8769-8770.
49. Schmidt, R. R.; Junq, K.-H. *Trichloroacetimidates*. In: *Carbohydrates in Chemistry and Biology, Part I: Chemistry of Saccharides*, Wiley-VCH, Weinheim, 2000, Vol 1 (B. Ernst, G.W. Hart, P. Sinaÿ, Eds.), pp. 5-59.
50. Deng, S.; Yu, B.; Xie, J.; Hui, Y. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7265-7266.
51. Flitsch, S. L. *Nature* **2005**, *437*, 201-202.
52. Agrawal, P. K. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3307-3330.
53. O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5421-5426.
54. Kim, J. Y.; Koo, H.-M.; Kim, D. S. H. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2405-2408.
55. Wermuth, C. G. *Practice of medicinal chemistry. 2nd Edition*, Elsevier Academic Press, San Diego, USA, 2003, 768 pp.
56. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug. Delivery Rev.* **1997**, *23*, 3-25.
57. Coulson, D. R. *Inorg. Synth.* **1972**, *13*, 121-124.
58. Rio, S.; Beau, J.-M. ; Jacquinet, J.-C. *Carbohydr. Res.* **1991**, *219*, 71-90.
59. Ikeda, T.; Kajimoto, T.; Kondo, H.; Wong, C.-H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 2485-2490.

60. Connolly, J. D.; Hill, R. A. *Dictionary of Triterpenoids. Di- and Higher Terpenoids*; Chapman and Hall: Cambridge, 1991; Vol. 2, 1460 p.
61. Hiroya, K.; Takahashi, T.; Miura, N.; Naganuma, A.; Sakamoto, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3229-3236.
62. Xu, Y.-C.; Bizuneh, A.; Walker, C. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9086-9089.

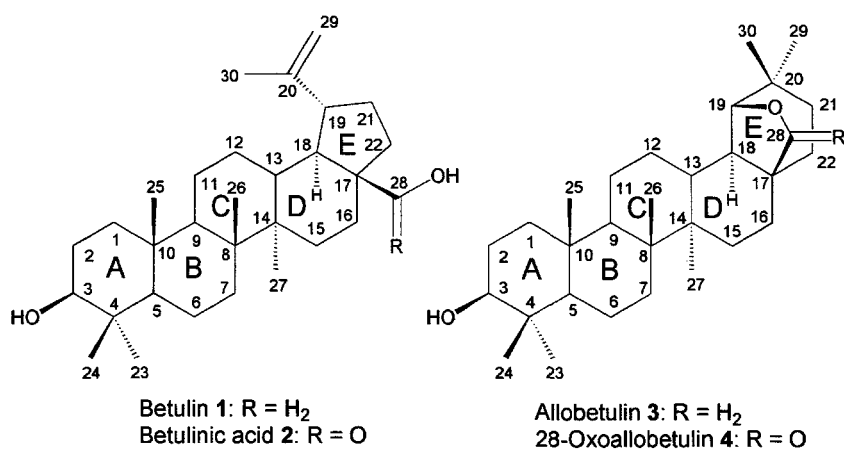


Figure 2-1. Structures of lupane (1, 2) and germanicane-type (3, 4) triterpenes.

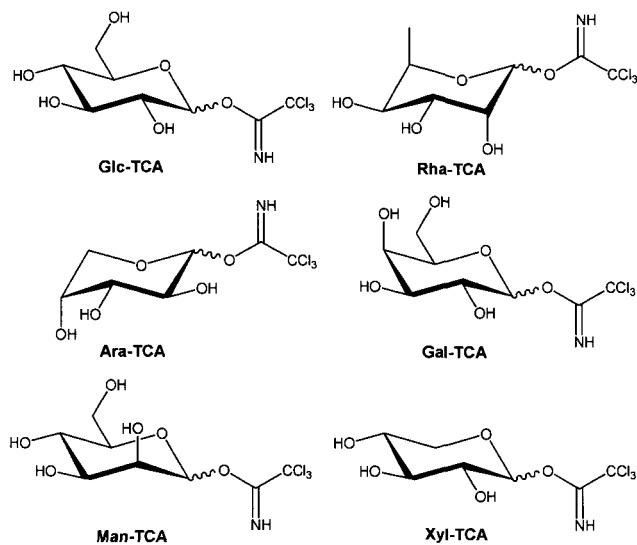
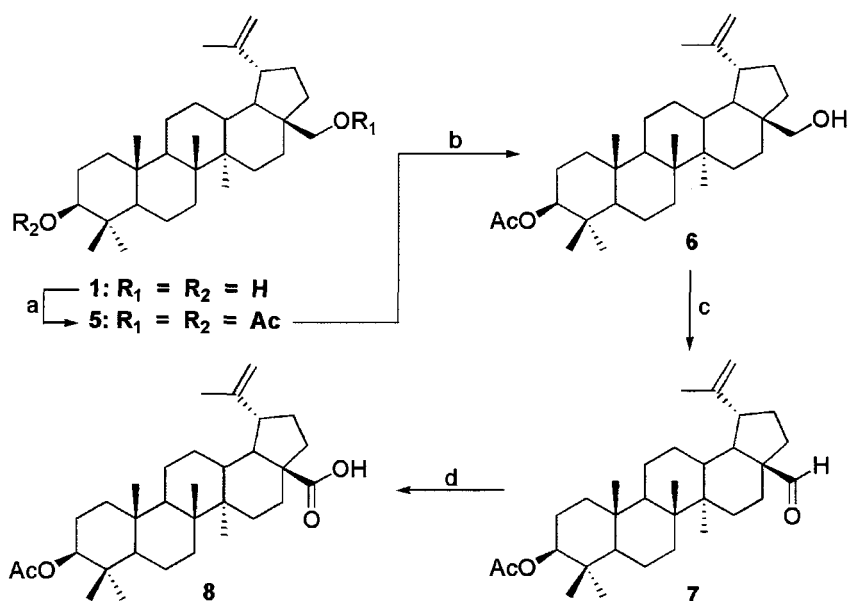
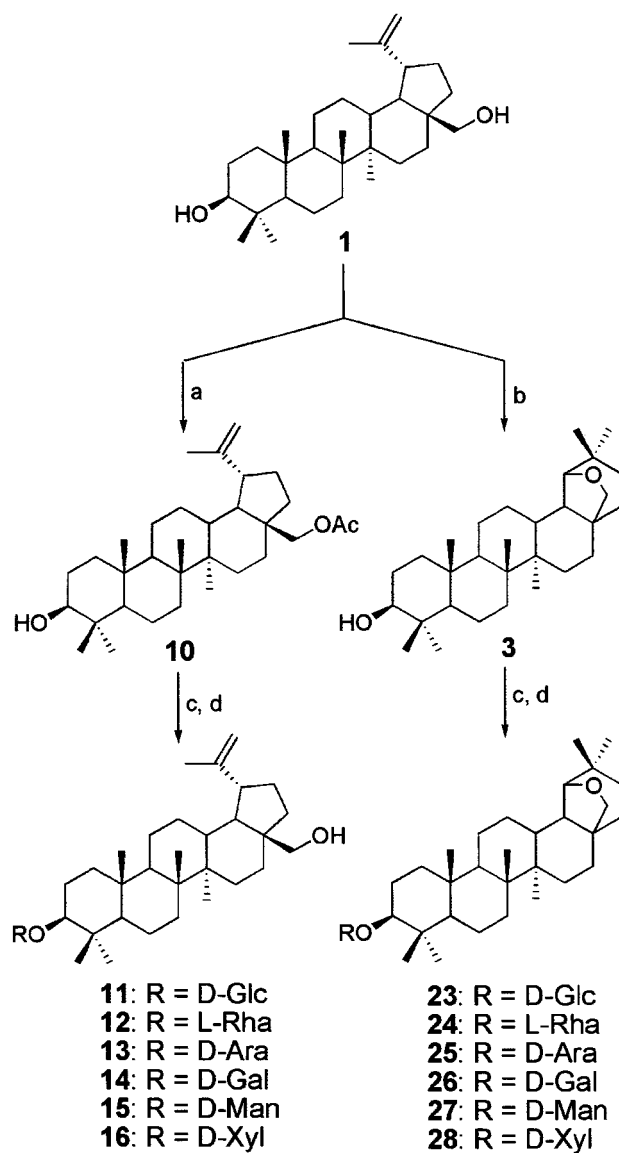


Figure 2-2. Trichloroacetimidate (TCA) sugar donors used for the glycosidation.



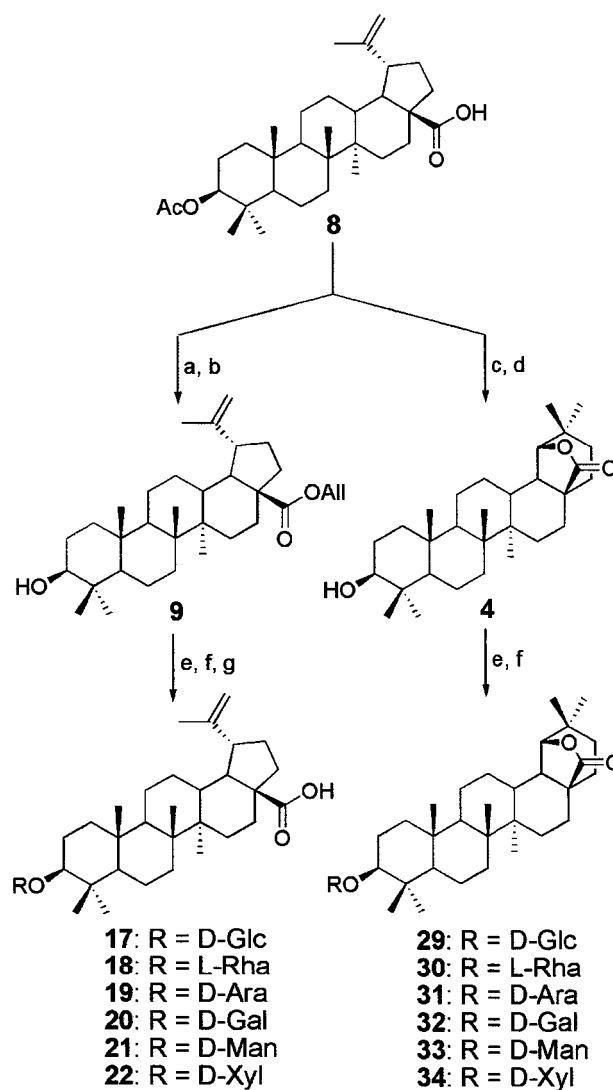
Scheme 2-1. Synthesis of 3-acetylbetulonic acid (**8**).

Reagents and conditions: a) Ac_2O (2.5 eq.), DMAP (0.1 eq.), pyridine, rt, quantitative; b) $Al(i-OPr)_3$ (5 eq.), *i*-PrOH, reflux 1.5 h, 86%; c) PCC (2 eq.), CH_2Cl_2 , rt, 2 h, 96%; d) $NaClO_2/NaH_2PO_4$, *t*-BuOH/THF/2-methyl-2-butene, 0 °C to rt, 60 min, 81%.



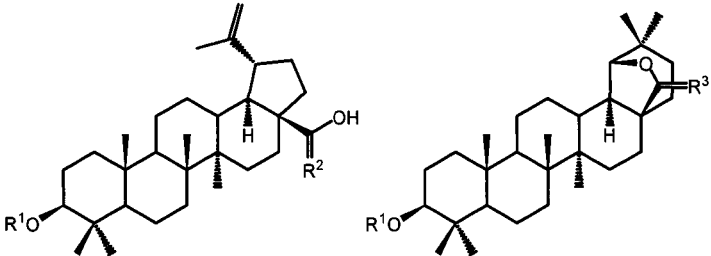
Scheme 2-2. Synthesis of betulin (**11-16**) and allobetulin (**23-28**) saponins.

Reagents and conditions: a) Ac_2O (1.05 eq.), pyridine, DMAP (0.1 eq.), rt, 2 h, 73%; b) $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3/\text{SiO}_2$, DCM, reflux, 45min, 72%; c) trichloroacetimidate (1.5 eq.), TMSOTf (0.05 eq.), 4 Å MS, DCM, rt, 1.5 h; d) NaOH 0.25 M, MeOH/THF/ H_2O , rt, 2 h.



Scheme 2-3. Synthesis of betulinic acid (**17-22**) and 28-oxoallobetulin (**29-34**) saponins.

Reagents and conditions: a) Allyl bromide (2 eq.), K_2CO_3 (3 eq.), DMF, 55 °C, 7 h; b) NaOH 0.25 M, MeOH/THF/H₂O, rt, 2 h, 93% (2 steps); c) $FeCl_3/SiO_2$, DCM, reflux, 3 h; d) NaOH 0.25 M, MeOH/THF/H₂O, reflux, overnight, 91% (2 steps); e) trichloroacetimidate (1.5 eq.), TMSOTf (0.05 eq.), 4 Å MS, DCM, rt, 1.5 h; f) NaOH 0.25 M, MeOH/THF/H₂O, rt, 2 h; g) $Pd(PPh_3)_4$ (0.3 eq.), PPh_3 (0.6 eq.), pyrrolidine (2 eq.), THF, rt, 1-3 d.

Table 2-1. In vitro cytotoxicity of lupane and germanicane triterpenes (**1-4, 8**) and saponins (**11-34**).


Compound	R ¹	R ²	R ³	Cell line IC ₅₀ (μmol/L ± SD) ^a			Log P ^e	Log S ^f
				A-549 ^b	DLD-1 ^c	WS1 ^d		
1	H	H ₂	-	3.80 ± 0.09 ^g	6.6 ± 0.3 ^g	3.58 ± 0.07 ^g	6.06	-6.70
2	H	O	-	10.3 ± 0.4 ^g	15.0 ± 0.3 ^g	12 ± 1 ^g	6.31	-6.91
3	H	-	H ₂	> 75	> 75	> 75	6.24	-7.44
4	H	-	O	> 75	> 75	> 75	5.55	-6.83
8	Ac	O	-	18 ± 2 ^h	20 ± 2 ^h	57 ± 6	7.16	-8.30
11	Glc	H ₂	-	> 75 ^e	> 75 ^e	> 75 ^e	3.80	-6.09
12	Rha	H ₂	-	22 ± 3 ^g	50 ± 10 ^g	33 ± 5 ^g	4.57	-6.32
13	Ara	H ₂	-	41 ± 3 ^g	63 ± 8 ^g	59 ± 5 ^g	4.43	-5.94
14	Gal	H ₂	-	> 75	> 75	> 75	3.86	-6.04
15	Man	H ₂	-	7.3 ± 0.4	10.1 ± 0.5	5.1 ± 0.6	4.08	-6.27
16	Xyl	H ₂	-	> 75	> 75	> 75	4.44	-6.64
17	Glc	O	-	> 75 ^e	32 ± 9 ^{gh}	> 75 ^g	4.03	-6.33
18	Rha	O	-	2.6 ± 0.6 ^{gh}	3.9 ± 0.4 ^{gh}	31 ± 3 ^g	4.81	-6.62
19	Ara	O	-	10 ± 2 ^{gh}	17 ± 3 ^{gh}	47 ± 5 ^g	4.76	-6.80
20	Gal	O	-	> 75	> 75	> 75	4.15	-6.13
21	Man	O	-	34 ± 4	15 ± 1	13 ± 3	4.08	-6.27
22	Xyl	O	-	15 ± 2	18 ± 2	20 ± 1	4.66	-6.75
23	Glc	-	H ₂	31 ± 3	40 ± 10	40 ± 4	3.95	-6.61
24	Rha	-	H ₂	> 75	> 75	> 75	4.71	-6.94
25	Ara	-	H ₂	> 75	> 75	> 75	4.73	-6.97
26	Gal	-	H ₂	30 ± 10	40 ± 10	30 ± 10	4.17	-6.30
27	Man	-	H ₂	> 75	> 75	> 75	3.99	-6.67
28	Xyl	-	H ₂	> 75	> 75	> 75	4.67	-6.96
29	Glc	-	O	> 75	> 75	> 75	3.32	-6.31
30	Rha	-	O	> 75	> 75	> 75	4.09	-6.56

31	Ara	-	O	> 75	> 75	> 75	4.00	-6.64
32	Gal	-	O	> 75	> 75	> 75	3.40	-6.29
33	Man	-	O	> 75	> 75	> 75	3.34	-6.16
34	Xyl	-	O	> 75	> 75	> 75	3.92	-6.57

Glc, β -D-glucopyranose; Rha, α -L-rhamnopyranose; Ara, α -D-arabinopyranose; Gal, β -D-galactopyranose; Man, α -D-mannopyranose; Xyl, β -D-xylopyranose; Ac, acetate.

^a Data represent mean values \pm standard deviation for three independent experiments made in triplicate.

^b Human lung carcinoma.

^c Human colorectal adenocarcinoma.

^d Human normal skin fibroblasts.

^e Predicted octanol/water partition coefficient.

^f Predicted aqueous solubility.

^g Results previously reported.⁴¹

^h Significantly more sensitive than fibroblasts; $p < 0.05$, Student's t-test.

CHAPITRE 3
SYNTHÈSE ET ÉVALUATION DE LA CYTOTOXICITÉ DE 3 β -O- β -D-
MALTOSIDES ET 3 β -O- β -D-LACTOSIDES DE TYPE LUPANE ET
GERMANICANE

Résumé

Récemment, notre groupe de recherche a rapporté la synthèse et l'effet cytotoxique de glycosides triterpéniques de type lupane et germanicane. Les résultats intéressants sur la cytotoxicité de certains composés obtenus précédemment nous ont incité à étendre cette étude en effectuant la glycosilation avec les mêmes aglycones préalablement employés (bétulinol (**1**), acide bétulinique (**2**), allobétulinol (**3**), et 28-oxoallobétulinol (**4**)) avec des unités disaccharides, soit le D-maltose et le D-lactose. Tous les 3 β -O- β -D-maltosides et les 3 β -O- β -D-lactosides des aglycones respectifs furent obtenus avec succès, mais dans la majorité des cas, la polarité de ces composés semble avoir un effet négatif sur la cytotoxicité. En fait, hormis les glycosides d'allobétulinols (**8a** et **8b**), les saponines obtenues sont moins cytotoxiques que les saponines monosaccharidiques correspondantes. Des activités anticancéreuses modérées à faibles (IC₅₀ de 31.5 à 129 μ M) sur les lignés cellulaires humaines de carcinome du poumon (A-549) et d'adénocarcinome colorectal (DLD-1) ont été obtenues pour les molécules de polarité plus faible (**8a** et **8b**) alors que les composés plus polaires n'ont démontré aucune activité anticancéreuse. Cette observation

pourrait suggérer que ces drogues sont trop polaires et ne peuvent pénétrer la couche lipidique cellulaire. Aucune sélectivité n'a été observée face à la ligné cellulaire humaine saine WS1 pour tous les composés synthétisés.

Article préliminaire

Synthesis and cytotoxic evaluation of lupane and germanicane-type 3 β -O- β -D-maltosides and 3 β -O- β -D-lactosides

Thibeault, D.; Legault, J.; Bouchard, J.; Vanier, S.; Pichette, A.*

Laboratoire d'Analyse et de Séparation des Essences Végétales (LASEVE)

Département des Sciences Fondamentales

Université du Québec à Chicoutimi, 555 boul. de l'Université

Chicoutimi, Québec, Canada, G7H 2B1

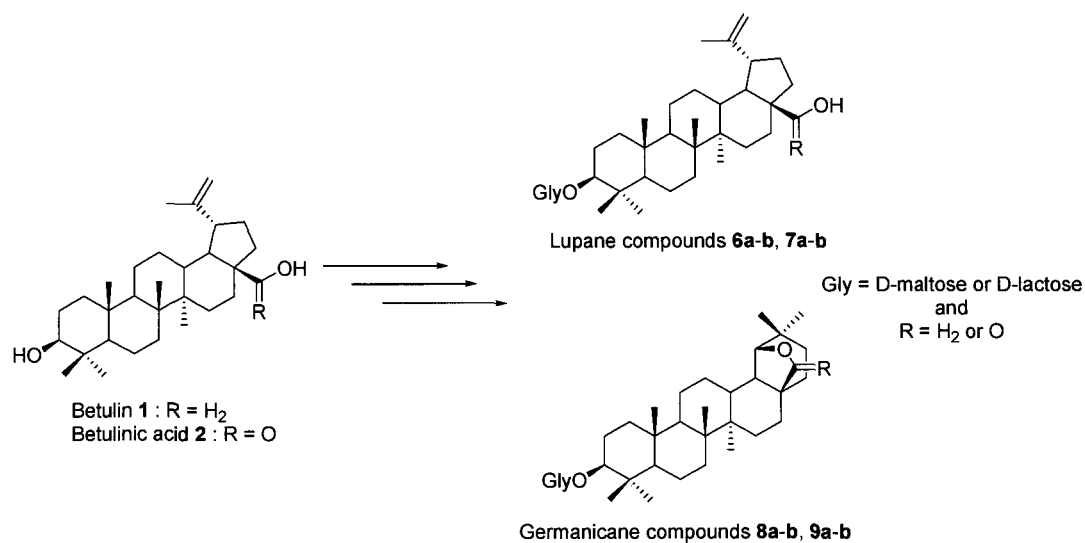
Keywords: Triterpenes; Glycosides; Disaccharides; D-Maltose; D-Lactose; Synthesis; Cytotoxicity

*Corresponding author. Tel: +1 418 545-5011; Fax: +1 418 545-5012; e-mail: andre_pichette@uqac.ca

Graphical abstract

Synthesis and cytotoxic evaluation of lupane and germanicane-type 3 β -O- β -D-maltosides and 3 β -O- β -D-lactosides

Thibeault, D.; Legault, J.; Bouchard, J.; Vanier, S.; Pichette, A*



Eight saponins from lupane- and germanicane-type triterpenes were synthesized with a combination of two disaccharides moieties such as D-maltose and D-lactose to evaluate their anticancerous potential on A-549 and DLD-1 human cell lines. The high polarity of these saponins seems to have a great influence on their bioactivity in vitro.

Abstract

Recently, our research group reported the synthesis and cytotoxic evaluation of lupane and germanicane-type triterpenic glycosides. The interesting results about cytotoxicity of some compounds previously obtained prompted us to extend this study by performing glycosilation of the same aglycons previously used (betulin (**1**), betulinic acid (**2**), allobetulin (**3**), and 28-oxoallobetulin (**4**)) with disaccharide units like D-maltose and D-lactose. All 3 β -O- β -D-maltosides and 3 β -O- β -D-lactosides of respective aglycons were synthesized successfully but in the majority of cases, the polarity of these compounds seems to affect negatively the cytotoxicity. In fact, except glycosides of allobetulinol (**8a** and **8b**), saponins obtained were less cytotoxic than their corresponding monosaccharidic saponins. Only moderate to poor anticancerous activity (IC₅₀ 31.5 to 129 μ M) on lung carcinoma (A-549) and colorectal adenocarcinoma (DLD-1) human cell lines were obtained for molecules of lower polarity (**8a** and **8b**) while more polar compounds did not exhibit any anticancerous activity. This observation could suggest that these drugs are too polar and cannot penetrate the cellular lipidic layer. No selectivity was observed in regard to the healthy WS1 human cell line for any compound synthesized.

1. Introduction

Triterpenes, a well known and largely distributed natural product family, are very interesting in regard to various therapeutical activities, but the poor hydrosolubility and pharmacokinetics properties of some of them are often the main problem to pursue their clinical investigations.^{1,2} Glycosilation of these bioactive triterpenes is a useful and efficient tool to enhance hydrosolubility and pharmacological properties (such as absorption, elimination, biodistribution and metabolism) of these drugs in aqueous media.³ Previously, we reported the synthesis and a structure-activity relationship (SAR) study of triterpenic glycosides (figure 3-1) derived from betulin (**1**), betulinic acid (**2**), allobetulin (**3**) and 28-oxoallobetulin (**4**) with some natural carbohydrate such as D-glucose, D-galactose, D-mannose, L-rhamnose, D-arabinose and D-xylose as anticancerous agents.^{4,5} These results prompted us to perform a series of more polar saponins with cheap and easily available carbohydrate moieties such as D-maltose and D-lactose with the same triterpenes. Therefore, we thought that we could improve therapeutic potential of these studied triterpenes since some compounds previously synthesized in our laboratory showed good anticancerous activities in vitro on A-549 and DLD-1 human cell lines.^{4,5}

3 β -O- β -D-disaccharidic lupane saponins are naturally occurring compounds which are few reported in literature.⁶⁻¹³ Furthermore, the synthesis of new 3 β -O- β -D-disaccharidic lupane saponins was a motivation to achieve our objective since it is even rarer to encounter the desired 3 β -O- β -D-maltosides or 3 β -O- β -D-lactosides of lupane family. In

fact, acetylated 3 β -O-[α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl]betulin (betulin 3 β -O- β -D-maltoside heptaacetylated) was previously synthesized by Uvarova et al. following the orthoester method.¹⁴ This compound was investigated for his ¹H NMR characteristics¹⁵ but also for his toxic effect on early embryogenesis of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*¹⁶ and hypolipidemic properties.¹⁷ The deacetylated version of this compound (betulin 3 β -O- β -D-maltoside, **6a**) was also reported in this study of embryogenesis toxicity.¹⁶ 3 β -O-[α -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl]betulinic acid (betulinic acid 3 β -O- β -D-maltoside, **11a**) was previously reported as a natural saponin isolated from the roots of *Acacia leucophloea*,⁷ a medicinal plant employed in Indian indigenous system of medicine. To the best of our knowledge, no other targeted glycoside of this study was mentioned in scientific community. In this article, we report the synthesis, characterisation and cytotoxic activities of 3 β -O- β -D-maltosides and 3 β -O- β -D-lactosides of betulin (**6a**, **6b**), betulinic acid (**7a**, **7b**), allobetulin (**8a**, **8b**) and 28-oxoallobetulin (**9a**, **9b**) on lung carcinoma (A-549), colorectal adenocarcinoma (DLD-1) and normal skin fibroblast (WS1) human cell lines.

2. Results and discussion

2.1. Chemistry

All aglycons used in this study like betulin (1), betulinic acid (2), allobetulin (3) and 28-oxoallobetulin (4) were previously obtained by our research group.⁵ The preparation of activated disaccharides for glycosilation coupling was performed following the Schmidt procedure.^{18,19} First, benzylation of both D-maltose and D-lactose was achieved in pyridine with benzoyl chloride and stirred overnight to afford octabenzoylated D-maltose and octabenzoylated D-lactose which were purified by trituration with methanol as described in experimental section with yields of 82% and 79%, respectively. Deprotection of anomeric hydroxyl groups of the two disaccharides were performed in two steps with HBr/AcOH 33% and Ag₂CO₃. Finally, a trichloroacetimidate function was introduced as activating group using trichloroacetonitrile and Cs₂CO₃. Heptabenzoyl α,β -D-maltosyl trichloroacetimidate was obtained in a 1:1 mixture with 30% yield over three steps from octabenzoylated D-maltose while heptabenzoyl α -D-lactosyl trichloroacetimidate was the only anomer observed with 73% yield over three steps from octabenzoylated D-lactose. ¹H, NMR spectrum analysis of heptabenzoyl α,β -D-maltosyl trichloroacetimidate confirmed the presence of two isomers with δ H 6.92 (1H, d, J = 3.2 Hz) for the β anomeric proton and δ H 6.24 (1H, d, J = 6.8 Hz) for the α anomeric proton. Furthermore, two broad singlets at δ H 8.68 and 8.60 are observed corresponding to the N-H functions.

Once activated disaccharides and glycoside acceptors in hands,⁵ glycosilation reactions were achieved following the Schmidt methodology¹⁸ with TMSOTf and as previously reported by Chwalek *et al.*¹⁹ to afford 3 β -O- β -D-glycosides exclusively (scheme 3-1). However, a modification in the work-up after deprotection was necessary since degradation of glycosides occurred and poor yields were obtained. The fragility of the anomeric linkage between the two carbohydrate units prompted us to use amberlite at pH \approx 4 instead of diluted HCl in the final workup after debenzoylation since cleavage in the disaccharide moieties was observed and 3 β -O- β -D-glucosides of the appropriate aglycon were isolated. In addition to instability in acidic media, the high polarity of the obtained glycosides led to the loss of compounds in aqueous phase during the extraction with CH₂Cl₂. Instead, removal of the amberlite particles by filtration followed by evaporation of solvents mixture was achieved. Glycosides were purified by flash chromatography with MeOH/DCM as eluent and all were obtained in moderate to good yield. 3 β -O- β -D-Maltopyranoside and 3 β -O- β -D-lactopyranoside of betulinic acid (**7a-b**) were obtained after deallylation of the corresponding purified debenzoylated glycosides with Pd(PPh₃)₄ in THF at room temperature for 1-3 days. Purification by flash chromatography afforded compound **7a** and **7b** in moderate yields with 33 and 41%, respectively. Further purification of the two last glycosides (**7a** and **7b**) by HPLC was needed for biological assay.

2.2. Cytotoxic activity

The attempt to improve cytotoxicity of investigated aglycons on cancerous A-549 and DLD-1 cell lines without effect healthy WS1 cell line by glycosilation with disaccharides did not afford better therapeutical agents than monodesmosidic saponins previously synthesized.^{4,5} No saponins of this study are as effective or better as betulin (**1**) or betulinic acid (**2**) (table 3-1). Interestingly, lupane saponins are ineffective while germanicane saponins are poor cytotoxic agents. 3 β -*O*- β -D-Maltopyranoside of allobetulin (**8a**) is the more efficient cytotoxic saponin of this study with IC₅₀ values of 31.5, 61 and 30 μ M on A-549, DLD-1 and WS1, respectively. 3 β -*O*- β -D-Lactopyranoside of allobetulin (**8b**) shown higher values of IC₅₀ but below 100 μ M for A549 and WS1, except on DLD-1 with 129 μ M. These results are far away from the efficient etoposide and not better than 5-FU, two chemotherapeutic drugs commonly used on lung and colon cancer treatment. Nevertheless, these two bioactive compounds have shown a better cytotoxicity on A-549 rather than DLD-1 but no differentiation was observed in regard to the healthy WS1 cell line. It is interesting to mention that IC₅₀ values of 3 β -*O*- β -D-glucopyranoside and 3 β -*O*- β -D-galactopyranoside of allobetulin⁵ are closely related to those of **8a**. Their similar structures could be related with their similar cytotoxic values. The poor cytotoxicity or inactivity of **8a-b** and **9a-b**, as supposed by Anisimov et al.,¹⁶ can be ascribed to the nature of the aglycon since 28-oxoallobetulin (**4**) never exhibited any cytotoxicity, even after glycosilation with monosaccharides⁵ and disaccharides (**9a-b**). However, saponins **8a-b** showed moderate to poor cytotoxicity compared to allobetulin (**3**) and some of its

glycosides⁵ which did not exhibit any cytotoxicity. Finally, it is presumable that the higher polarity of 3 β -*O*- β -D-disaccharidic saponins of betulin (**1**) and betulinic acid (**2**) affected negatively the cytotoxicity of those two aglycons.

3. Conclusion

The synthesis of all glycosides in this study was performed with success. Preparation of activated D-maltose and D-lactose following the Schmidt procedure was also successful, indicating a methodology as efficient with monosaccharides as with disaccharides. Even if all chemical synthesis were successful, compounds obtained did not afford better cytotoxic agents as previously reported.⁵ Germanicane compounds **8a** and **8b** have shown moderate to poor cytotoxicity, while others did not exhibit any anticancerous activity. The higher polarity of lupane drugs evaluated may be an important factor to explain observations of this study since these products could not be able to penetrate the cellular lipidic layer. As previously reported, increasing the polarity of triterpenes by glycosilation can be a good approach to develop efficient antitumoral agents. However, the development of too polar triterpenic saponins of lupane and germanicane types does not afford cytotoxic drugs. Incorporation of others polar groups and synthesis of new triterpenic aglycons are under investigation in our laboratory.

4. Experimental

4.1. Chemicals

Chemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich Co. Canada or Alfa Aesar Co. and were used as received. The usual solvents were obtained from VWR International Co. and were used as received. Dichloromethane (DCM) was distilled from anhydrous CaH_2 under an argon atmosphere. Tetrahydrofuran (THF) was distilled from sodium/benzophenone ketyl under an argon atmosphere. All anhydrous and air sensitive reactions were performed in oven-dried glassware under positive argon pressure. Tetrakis(triphenyl)phosphine palladium(0) was prepared as mentioned in the literature²⁰ and stored under argon. Analytical thin-layer chromatography was performed with silica gel 60 F₂₅₄, 0.25 mm pre-coated TLC plates (Silicycle, Québec, Canada). Aliphatic compounds were visualised using aqueous sulphuric acid solution of ammonium heptamolybdate tetrahydrate (10 g/100 mL H_2SO_4 + 900 mL H_2O) and aromatic compounds were visualised using 254 nm and/or 365 nm UV wavelength. Flash column chromatographies were performed on 230-400 mesh silica gel R12030B (Silicycle, Québec, QC, Canada). Infrared spectra (IR) were recorded with a Perkin-Elmer Spectrum One FT-IR spectrophotometer (Shelton, Connecticut, USA) on a NaCl window from a thin film of the analyzed compounds and only significant absorption bands were reported in cm^{-1} . Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a Bruker Avance spectrometer at 400 MHz (^1H) and 100 MHz (^{13}C), equipped with a 5 mm QNP probe. Elucidations of

chemical structures were based on ^1H , ^{13}C , COSY, NOESY, TOCSY, HMBC, HSQC and DEPT-135 NMR experiments. Signals are reported as m (multiplet), s (singlet), d (doublet), dd (doublet of doublet), br s (broad singlet) and coupling constants are reported in hertz (Hz). The chemical shifts are reported in ppm (δ) relative to residual solvent peak. The labile OH NMR signals appearing sometime were not listed. Optical rotations were obtained in methanol (unless otherwise specified) using sodium D line at ambient temperature on a Autopol[®] IV automatic polarimeter. High-resolution mass spectra (HRMS) were obtained at the Department of Chemistry, Queen's University, Ontario, Canada. HPLC preparative methods for the purification of saponins **7a** and **7b** in DMSO (20 mg/mL) were carried out with a Agilent 1100 system equipped with a fractions collector using Zorbax ODS C18 column (21.2 x 250 mm; 7 μm), at a flow rate of 16.0 mL/min with a column temperature of 25°C. Compounds were detected by UV absorption at 210 nm following this elution gradient: 40% to 50%B where B = ACN + 0.1% HCOOH and A = H₂O + 0.1% HCOOH in thirty minutes (increasing concentration of B by 1% per 3 minutes). Carbohydrate donors 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-benzoyl- α , β -D-glucopyranosyl trichloroacetimidate (α , β -D-maltose trichloroacetimidate) and 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-benzoyl- α -D-glucopyranose trichloroacetimidate (α -D-lactose trichloroacetimidate) were synthesized following Schmidt procedure.^{18,19} Betulin (**1**) was extracted from outer barks of *Betula papyrifera*.^{21,22} following a previously reported procedure.²³ Crude betulin (**1**) was recrystallized with an azeotropic mixture of 2-butanol/water (74:26) following the

process of Eckerman et al.²⁴ Synthesis and characterization of glycoside acceptors **3**, **4** and **5** were already reported by our laboratory.⁵

4.2. Synthesis of activated D-maltose and D-lactose

In a flame-dried glassware under argon, 20 g (55.51 mmol) of the appropriated disaccharide hydrate was stirred in 250 mL of dry pyridine with 0.68 g of DMAP (5.55 mmol) at 0 °C. Then, 128.8 mL (1110 mmol) of benzoyl chloride was added dropwise and stirred overnight. The crude mixture was diluted with 250 mL of water in an iced bath and 400 mL of H₂SO₄ 6.2 M was slowly added. Extraction with CH₂Cl₂ (3 x 500 mL) afforded the crude benzoylated disaccharide solution that was dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. Purification of the benzoylated product was performed as follow: the crude compound was dissolved in 2.5 L of boiling methanol and evaporated to afford 2 L of methanol solution. Precipitation of octabenzoylated disaccharide occurred and the mixture was cooled to 0°C, filtered, rinsed with cold methanol and dried to afford 53 g (82% yield) of octabenzoylated D-maltose and 51 g (79% yield) of octabenzoylated D-lactose as white solids. Thereafter, in a flame-dried glassware under argon, 10 g (8.51 mmol) of octabenzoylated disaccharide was stirred in 22 mL of dry CH₂Cl₂ at room temperature and 23 mL of HBr/AcOH 33% (127.64 mmol) was slowly added during 10 minutes and stirred for 3 hours. Saturated solution of NaHCO₃ was slowly added and the mixture was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 30 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The resulting crude product was redissolved in 50 mL

of acetone and 2 mL of water and 3.29 g (11.91 mmol) of Ag_2CO_3 was added and stirred one hour at room temperature. Na_2SO_4 was then added and the mixture was filtered on celite, rinsed with acetone and evaporated under reduced pressure. Then, the crude compound was redissolved in 113 mL of CH_2Cl_2 in anhydrous conditions with 0.28 g (0.85 mmol) of Cs_2CO_3 and stirred for 30 minutes. Finally, 8.60 mL (85.95 mmol) of trichloroacetonitrile was slowly added during 30 minutes and the mixture was stirred for 5 hours. Filtration on celite and evaporation under reduced pressure afforded the crude trichloroacetimidate compound who was purified by flash chromatography with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (100/0 to 99/1) to afford 3.0 g (30% yield) of 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-benzoyl- α,β -D-glucopyranosyl trichloroacetimidate (α,β -D-maltose hepta-*O*-benzoyl trichloroacetimidate) and 7.55 g (73% yield) of 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-benzoyl- α -D-glucopyranose trichloroacetimidate (α -D-lactose hepta-*O*-benzoyl trichloroacetimidate) as white solids.

α,β -D-maltose hepta-*O*-benzoyl trichloroacetimidate: $[\alpha]_D^{20} + 94.1^\circ$ (c 3.82, CHCl_3); IR: 1730, 1677, 1602, 1452, 1315, 1268, 1178, 1094, 1069, 1026, 971, 835, 796, 707. ^1H NMR (CDCl_3): 8.68 (br s, 1H, NH β -trichloroacetimidate), 8.60 (br s, 1H, NH α -trichloroacetimidate), 8.40-7.20 (aromatic protons), 6.72 (d, 1H, $J = 3.2$ Hz, trichloroacetimidate anomeric H- β), 6.24 (d, 1H, $J = 6.8$ Hz, trichloroacetimidate anomeric H- α), 5.81 (d, 1H, $J = 3.8$ Hz, H-1' of α -trichloroacetimidate), 5.78 (d, 1H, $J = 3.8$ Hz, H-1' of β -trichloroacetimidate), 5.76-4.20 (aliphatic protons); ^{13}C NMR (CDCl_3): 166.5-164.5 (14 C=O), 160.8 (β -O-C=NH), 160.6 (α -O-C=NH), 134.0-128.0 (aromatic carbons), 96.7 (C-1', β -trichloroacetimidate), 96.5 (C-1', α -trichloroacetimidate), 95.5 (C-1, β -

trichloroacetimidate), 93.0 (C-1, α -trichloroacetimidate), 90.7 (CCl₃, α -trichloroacetimidate), 90.4 (CCl₃, β -trichloroacetimidate), 75.0-62.0 (aliphatic carbons); HRMS m/z 1236.1993 [M + Na]⁺, (calcd for C₆₃H₅₀Cl₃NO₁₈Na, 1236.1991). **α -D-lactose hepta-*O*-benzoyl trichloroacetimidate:** $[\alpha]_D^{20} + 72.4^\circ$ (c 3.12, CHCl₃); IR: 1730, 1677, 1602, 1584, 1492, 1451, 1315, 1267, 1177, 1107, 1094, 1069, 1027, 971, 920, 834, 796, 707. ¹H and ¹³C NMR spectral data were in agreement with those published in the literature.¹⁹ HRMS m/z 1236.2040 [M + Na]⁺, (calcd for C₆₃H₅₀Cl₃NO₁₈Na, 1236.1991).

4.3. General procedure for synthesis of glycosides 6a-b, 8a-b, 9a-b

One equivalent of the appropriate acceptor and 1.5 equivalent of the appropriate donor were solubilized in dry CH₂Cl₂ (30 mM) with 4Å molecular sieves and stirred at room temperature. At this time, TMSOTf (trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate) (0.05 equiv) was added dropwise under argon atmosphere while keeping rigorous anhydrous conditions. The reaction was usually performed in approximately 1.5 h and then neutralized by adding triethylamine (6 eq). The crude mixture was filtered, and evaporated under reduced pressure. The residue was redissolved in a NaOH 0.25 N solution of MeOH/THF/H₂O (1/2/1 v/v) and stirred at room temperature for 2 h. The mixture was neutralized with amberlite pH \approx 4, filtered, rinsed with MeOH/CH₂Cl₂ and evaporated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography on silica gel using 5-20% MeOH in CH₂Cl₂ as eluent.

4.4. General procedure for synthesis of glycosides 7a-b

This procedure is the same as above with the following step: the purified debenzoylated compound was dissolved in a solution of triphenylphosphine (PPh₃) (0.6 equiv) and pyrrolidine (2 equiv) in dry THF (0.22 M). Then Pd⁰(PPh₃)₄ (0.3 equiv) was added and the resulting mixture was stirred 1-3 days at room temperature under argon atmosphere. After evaporation of the solvent under reduced pressure, the residue was purified by flash chromatography using 10-25% MeOH in CH₂Cl₂ as eluent. A more pure saponin can be obtained by preparative HPLC method as previously described above.

4.5. Betulin 3β-*O*-β-D-maltopyranoside (6a)

This compound was prepared from betulin 28-acetate⁵ (250 mg, 0.52 mmol) to afford 158 mg (40% yield) of **6a** as a white solid. $[\alpha]_D^{20}$ +39.7° (*c* 0.91); IR: 3364, 2941, 2870, 1453, 1375, 1148, 1105, 1072, 1025, 880. ¹H NMR (Pyr-*d*₅): 5.96 (d, 1H, *J* = 3.5 Hz, H-1''), 4.89 (s, 1H, H-29), 4.88 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-1'), 4.74 (s, 1H, H-29), 4.62 (m, 3H, H-6'', H-5'', H-3''), 4.52 (br s, 2H, H-6' (2x)), 4.36 (m, 3H, H-6'', H-4', H-3'), 4.19 (m, 2H, H-2'', H-4''), 4.04 (m, 1H, H-2'), 3.86 (m, 1H, H-5'), 3.68 (m, 1H, H-19), 3.38 (dd, 1H, *J* = 11.6 Hz, *J* = 4.0 Hz, H-3), 2.80-0.60 (24H), 1.78 (s, 3H), 1.32 (s, 3H), 1.08 (s, 3H), 1.00 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.78 (s, 3H); ¹³C NMR (Pyr-*d*₅): 151.6, 110.3, 107.1, 103.5, 89.4, 81.7, 78.4, 77.0, 75.9, 75.7, 75.7, 74.9, 72.2, 63.1, 62.5, 59.8, 56.2, 51.0, 49.5, 48.9, 48.7, 43.4, 41.5, 40.0, 39.3, 37.9, 37.4, 35.2, 34.9, 30.8, 30.4, 28.5, 27.9, 27.0, 26.1, 21.4,

19.7, 18.8, 17.2, 16.7, 16.5, 15.3; HRMS m/z 789.4763 $[M + Na]^+$, (calcd for $C_{42}H_{70}O_{12}Na$, 789.4764).

4.6. Betulinic acid 3 β -O- β -D-maltopyranoside (**7a**)

This compound was prepared from allyl betulinate⁵ (200 mg, 0.40 mmol) to afford 110 mg (33% yield) of **7a** as a white solid. $[\alpha]_D^{20} +33.8^\circ$ (c 1.01), lit.⁷ $[\alpha]_D^{20} +28.0^\circ$ (C_5H_5N); IR: 3373, 2941, 2866, 1686, 1452, 1375, 1236, 1148, 1105, 1072, 1025, 881. 1H NMR (Pyr- d_5): 5.96 (d, 1H, $J = 3.6$ Hz, H-1''), 4.95 (br s, 1H, H-29), 4.88 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, H-1'), 4.77 (br s, 1H, H-29), 4.62 (m, 3H, H-6'', H-5'', H-3''), 4.52 (br s, 2H, H-6' (2x)), 4.37 (m, 3H, H-6'', H-4', H-3'), 4.21 (m, 2H, H-2'', H-4''), 4.04 (m, 1H, H-2'), 3.86 (m, 1H, H-5'), 3.55 (m, 1H, H-19), 3.37 (m, 1H, H-3), 2.80-0.60 (24H), 1.80 (s, 3H), 1.31 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 1.02 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.74 (s, 3H); ^{13}C NMR (Pyr- d_5): 179.4, 151.7, 110.3, 107.1, 103.5, 89.4, 81.7, 78.4, 77.0, 75.9, 75.7, 75.7, 74.9, 72.2, 63.1, 62.5, 57.0, 56.2, 51.1, 50.1, 48.1, 43.2, 41.4, 40.0, 39.31, 38.9, 38.0, 37.5, 35.1, 33.2, 31.6, 30.6, 28.5, 27.0, 26.4, 21.5, 19.8, 18.8, 17.2, 16.7, 16.8, 15.2; HRMS m/z 803.4575 $[M + Na]^+$, (calcd for $C_{42}H_{68}O_{13}Na$, 803.4557).

4.7. Allobetulin 3 β -O- β -D-maltopyranoside (**8a**)

This compound was prepared from **3** (100 mg, 0.23 mmol) to afford 91 mg (53% yield) of **8a** as a white solid. $[\alpha]_D^{20} +55.5^\circ$ (c 0.71); IR: 3366, 2925, 2866, 1452, 1388,

1374, 1148, 1105, 1073, 1025, 929, 906, 811, 767. ^1H NMR (Pyr- d_5): 5.97 (d, 1H, $J = 3.6$ Hz, H-1''), 4.90 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H-1'), 4.64 (m, 3H, H-6'', H-5'', H-3''), 4.55 (m, 2H, H-6' (2x)), 4.38 (m, 3H, H-6'', H-4', H-3'), 4.22 (m, 2H, H-2'', H-4''), 4.05 (m, 1H, H-2'), 3.89 (m, 1H, H-5'), 3.87 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, H-28), 3.68 (s, 1H, H-19), 3.51 (d, 1H, $J = 7.2$ Hz, H-28), 3.37 (dd, 1H, $J = 11.6$ Hz, $J = 4.0$ Hz, H-3), 2.80-0.60 (24H), 1.33 (s, 3H), 1.09 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.87 (s, 3H), 0.84 (s, 3H), 0.77 (s, 3H); ^{13}C NMR (Pyr- d_5): 107.1, 103.5, 89.3, 88.2, 81.8, 78.4, 77.1, 75.9, 75.7, 75.7, 74.9, 72.2, 71.6, 63.1, 62.6, 56.3, 51.6, 47.5, 42.0, 41.3, 41.2, 40.0, 39.4, 37.5, 37.3, 36.9, 34.9, 34.6, 33.5, 29.6, 28.5, 27.1, 27.1 (2x), 26.9, 24.9, 21.6, 18.8, 17.2, 17.0, 16.2, 14.0; HRMS m/z 789.4767 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, (calcd for $\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{12}\text{Na}$, 789.4764).

4.8. 28-Oxoallobetulin 3 β -O- β -D-maltopyranoside (9a)

This compound was prepared from **4** (100 mg, 0.22 mmol) to afford 118 mg (69% yield) of **9a** as a white solid. $[\alpha]_D^{20} +50.5^\circ$ (c 1.03); IR: 3367, 2939, 2866, 1759, 1446, 1389, 1376, 1153, 1069, 1026, 967, 922, 840. ^1H NMR (Pyr- d_5): 5.96 (d, 1H, $J = 3.5$ Hz, H-1''), 4.86 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, H-1'), 4.59 (m, 3H, H-6'', H-5'', H-3''), 4.50 (m, 2H, H-6' (2x)), 4.33 (m, 3H, H-6'', H-4', H-3'), 4.18 (m, 2H, H-2'', H-4''), 4.05 (s, 1H, H-19), 4.01 (m, 1H, H-2'), 3.86 (m, 1H, H-5'), 3.68 (m, 1H, H-19), 3.34 (dd, 1H, $J = 12.0$ Hz, $J = 4.4$ Hz, H-3), 2.80-0.60 (24H), 1.30 (s, 3H), 1.03 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.89 (s, 3H), 0.78 (s, 3H), 0.74 (s, 3H); ^{13}C NMR (Pyr- d_5): 179.9, 107.1, 103.4, 89.3, 86.3, 81.7, 78.4, 77.0, 75.8, 75.6, 74.8, 72.2, 63.1, 62.6, 56.3, 51.7, 47.2, 46.6, 41.1, 40.5, 39.9, 39.4,

37.4, 36.9, 34.4, 34.1, 33.1, 32.4, 29.2, 28.6, 28.4, 27.0 (2x), 26.9, 26.4, 24.0, 21.5, 18.6, 17.2, 17.0, 15.8, 14.1; HRMS m/z 803.4586 $[M + Na]^+$, (calcd for $C_{42}H_{68}O_{13}Na$, 803.4557).

4.9. Betulin 3 β -O- β -D-lactopyranoside (**6b**)

This compound was prepared from betulin 28-acetate⁵ (200 mg, 0.41 mmol) to afford 168 mg (53% yield) of **6b** as a white solid. $[\alpha]_D^{20} +5.6^\circ$ (c 1.57); IR: 3366, 2941, 2867, 1453, 1375, 1071, 1027, 979, 881, 786. 1H NMR (Pyr- d_5): 5.13 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz, H-1''), 4.90 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz, H-1'), 4.89 (br s, 1H, H-29), 4.74 (br s, 1H, H-29), 4.56 (m, 3H, H-2'', H-6' (2x)), 4.52 (m, 1H, H-4''), 4.46 (m, 1H, H-6''), 4.42 (m, 1H, H-6''), 4.30 (m, 2H, H-4', H-3'), 4.16 (m, 2H, H-5'', H-3''), 4.10 (m, 1H, H-28), 4.08 (m, 1H, H-2'), 3.96 (m, 1H, H-5'), 3.67 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H-28), 3.35 (dd, 1H, $J = 11.6$ Hz, $J = 3.6$ Hz, H-3), 2.70-0.60 (24H), 1.77 (s, 3H), 1.32 (s, 3H), 1.08 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.79 (s, 3H); ^{13}C NMR (Pyr- d_5): 151.6, 110.3, 106.9, 106.2, 89.4, 82.9, 77.6, 77.3, 76.6, 75.7, 75.6, 72.9, 70.4, 62.9, 62.4, 59.8, 56.2, 51.0, 49.5, 48.9, 48.7, 43.3, 41.6, 40.0, 39.4, 37.9, 37.4, 35.2, 35.0, 30.8, 30.4, 28.5, 27.9, 27.1, 26.1, 21.4, 19.7, 18.8, 17.2, 16.7, 16.5, 15.3; HRMS m/z 789.4766 $[M + Na]^+$, (calcd for $C_{42}H_{70}O_{12}Na$, 789.4764).

4.10. Betulinic acid 3 β -O- β -D-lactopyranoside (**7b**)

This compound was prepared from allyl betulinate⁵ (200 mg, 0.40 mmol) to afford 135 mg (41% yield) of **7b** as a white solid. $[\alpha]_D^{20}$ -1.2° (*c* 1.25); IR: 3367, 2941, 2866, 1699, 1553, 1450, 1375, 1218, 1158, 1072, 1025, 977, 882, 785. ¹H NMR (Pyr-*d*₅): 5.14 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz, H-1''), 4.90 (br s, 1H, H-29), 4.91 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz, H-1'), 4.77 (br s, 1H, H-29), 4.59 (m, 3H, H-2'', H-6' (2x)), 4.52 (m, 1H, H-4''), 4.47 (m, 1H, H-6''), 4.42 (m, 1H, H-6''), 4.31 (m, 2H, H-4', H-3'), 4.18 (m, 2H, H-5'', H-3''), 4.08 (m, 1H, H-2'), 3.97 (m, 1H, H-5'), 3.55 (m, 1H, H-19), 3.36 (dd, 1H, *J* = 11.8 Hz, *J* = 4.4 Hz, H-3), 2.80-0.60 (24H), 1.79 (s, 3H), 1.31 (s, 3H), 1.11 (s, 3H), 1.03 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 0.75 (s, 3H); ¹³C NMR (Pyr-*d*₅): 179.3, 151.7, 110.3, 106.9, 106.3, 89.4, 82.9, 77.6, 77.3, 76.7, 75.7, 75.6, 72.9, 70.4, 62.9, 62.4, 57.0, 56.3, 51.2, 50.1, 48.2, 43.2, 41.4, 40.0, 39.4, 38.9, 38.0, 37.5, 35.1, 33.3, 31.6, 30.6, 28.5, 27.1, 26.4, 21.6, 19.8, 18.8, 17.2, 16.8, 16.7, 15.2; HRMS *m/z* 803.4552 [M + Na]⁺, (calcd for C₄₂H₆₈O₁₃Na, 803.4557).

4.11. Allobetulin 3 β -O- β -D-lactopyranoside (**8b**)

This compound was prepared from **3** (100 mg, 0.23 mmol) to afford 42 mg (24% yield) of **8b** as a white solid. $[\alpha]_D^{20}$ +13.6° (*c* 0.31); IR: 3373, 2942, 2925, 1450, 1386, 1374, 1161, 1073, 1056, 1037, 979, 893, 769. ¹H NMR (Pyr-*d*₅): 5.14 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-1''), 4.91 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-1'), 4.57 (m, 3H, H-2'', H-6' (2x)), 4.52 (m, 1H, H-4''), 4.46 (m, 1H, H-6''), 4.42 (m, 1H, H-6''), 4.32 (m, 2H, H-4', H-3'), 4.17 (m, 2H, H-5'', H-

3''), 4.09 (m, 1H, H-2'), 3.99 (m, 1H, H-5'), 3.87 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, H-28), 3.67 (s, 1H, H-19), 3.51 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, H-28), 3.34 (dd, 1H, $J = 11.7$ Hz, $J = 4.1$ Hz, H-3), 2.30-0.60 (24H), 1.32 (s, 3H), 1.08 (s, 3H), 1.02 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.87 (s, 3H), 0.84 (s, 3H), 0.78 (s, 3H); ^{13}C NMR (Pyr- d_5): 107.0, 106.3, 89.3, 88.2, 82.9, 77.6, 77.3, 76.7, 75.7, 75.6, 72.9, 71.6, 70.4, 63.0, 62.4, 56.4, 51.6, 47.5, 42.0, 41.3, 41.2, 40.0, 39.5, 37.5, 37.3, 36.9, 34.9, 34.6, 33.5, 29.6, 28.4, 27.1, 27.1 (2x), 26.9, 24.9, 21.7, 18.8, 17.2, 17.1, 16.2, 14.0; HRMS m/z 789.4765 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, (calcd for $\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{12}\text{Na}$, 789.4764).

4.12. 28-Oxoallobetulin 3 β -O- β -D-lactopyranoside (9b)

This compound was prepared from **4** (157 mg, 0.34 mmol) to afford 74 mg (28% yield) of **9b** as a white solid. $[\alpha]_D^{20} +25.9^\circ$ (c 0.20); IR: 3373, 2935, 2866, 1759, 1446, 1389, 1376, 1330, 1155, 1118, 1071, 1053, 967, 922, 779. ^1H NMR (Pyr- d_5): 5.15 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz, H-1''), 4.91 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, H-1'), 4.59 (m, 3H, H-2'', H-6' (2x)), 4.53 (m, 1H, H-4''), 4.48 (m, 1H, H-6''), 4.42 (m, 1H, H-6''), 4.33 (m, 2H, H-4', H-3'), 4.18 (m, 2H, H-5'', H-3''), 4.09 (m, 1H, H-2'), 4.06 (s, 1H, H-19), 3.99 (m, 1H, H-5'), 3.33 (dd, 1H, $J = 11.0$ Hz, $J = 3.8$ Hz, H-3), 2.30-0.60 (24H), 1.31 (s, 3H), 1.03 (s, 3H), 1.00 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.89 (s, 3H), 0.78 (s, 3H), 0.74 (s, 3H); ^{13}C NMR (Pyr- d_5): 179.9, 107.0, 106.3, 89.3, 86.2, 82.9, 77.6, 77.3, 76.7, 75.7, 75.6, 72.9, 70.5, 63.0, 62.4, 56.3, 51.7, 47.2, 46.6, 41.1, 40.5, 40.0, 39.4, 37.5, 36.9, 34.4, 34.1, 33.1, 32.4, 29.2, 28.7, 28.4, 27.1, 27.0, 26.4, 24.0, 21.5, 18.7, 17.2, 17.1, 15.9, 14.1; HRMS m/z 803.4568 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, (calcd for $\text{C}_{42}\text{H}_{68}\text{O}_{13}\text{Na}$, 803.4557).

4.13. Cell lines and culture conditions

Human lung carcinoma (A-549), human colon adenocarcinoma (DLD-1) and human normal fibroblasts (WS1) cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). All cell lines were cultured in minimum essential medium containing Earle's salts and L-glutamine (Mediatech Cellgrow, VA), to which were added 10% foetal bovine serum (Hyclone), vitamins (1x), penicillin (100 IU/mL), streptomycin (100 µg/mL), essential amino acids (1x) and sodium pyruvate (1x) (Mediatech Cellgrow, VA). Cells were kept at 37 °C in a humidified environment containing 5% CO₂.

4.14. Cytotoxicity assay

Exponentially growing cells were plated in 96-well microplates (Costar, Corning Inc.) at a density of 5×10^3 cells per well in 100 µL of culture medium and were allowed to adhere for 16 h before treatment. Increasing concentrations of each compound in DMSO (Sigma-Aldrich) were then added (100 µL per well) and the cells were incubated for 48 h. The final concentration of DMSO in the culture medium was maintained at 0.5% (v/v) to avoid solvent toxicity. Cytotoxicity was assessed using resazurine²⁵ on an automated 96-well Fluoroskan Ascent F1™ plate reader (Labsystems) using excitation and emission wavelengths of 530 and 590 nm, respectively. Fluorescence was proportional to the cellular metabolic activity in each well. Survival percentage was defined as the fluorescence in experimental wells compared to that in control wells after subtraction of

blank values. Each experiment was carried out three times in triplicate. IC₅₀ results were expressed as means \pm standard deviation.

Acknowledgments

This work was supported by grants from le Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (fonds forestier 02) and by the Chaire de recherche sur les agents anticancéreux d'origine naturelle of Université du Québec à Chicoutimi. We thank Philippe Dufour for his contribution in organic synthesis.

References and notes

1. Mahato, S. B.; Sen, S. *Phytochemistry*, **1997**, *44*, 1185-1236.
2. Udeani, G. O.; Zhao, G. M.; Geun Shin, Y.; Cooke, B. P.; Graham, J.; Beecher, C. W.; Kinghorn, A. D.; Pezzuto, J. M. *Biopharm. Drug. Dispos.* **1999**, *20*, 379-383.
3. Křen, V.; Martinková, L. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 1303-1328.
4. Gauthier, C.; Legault, J.; Lebrun, M.; Dufour, P.; Pichette, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6713-6725.
5. Thibeault, D.; Gauthier, C.; Legault, J.; Bouchard, J.; Dufour, P.; Pichette, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6144-6157.
6. Hiller, K.; Nguyen, K. Q. C.; Franke, P. Z. *Chem.* **1978**, *18*, 260-261.
7. Mishra, M.; Srivastava, S. K. *Indian J. Pharm. Sci.* **1985**, *47*, 154-155.
8. Purohit, M. C.; Pant, G.; Rawat, M. S. M. *Phytochemistry*, **1991**, *30*, 2419.
9. Wencai, Y.; Zhaoning, J.; Yun, T.; Yuxin, W.; Mingshi, W.; Shouxun, Z. *J. China Pharm. Univ.* **1996**, *27*, 425-428.
10. Ye, W.-C.; Ji, N.-N.; Zhao, S.-X.; Liu, J.-H.; Ye, T.; McKervey, M. A.; Stevenson, P. *Phytochemistry*, **1996**, *42*, 799-802.
11. De Tomassi, N.; Pizza, C. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 663-668.
12. Ye, W.; Zhang, Q.; Hsiao, W. W. L.; Zhao, S.; Che, C.-T. *Planta Med.* **2002**, *68*, 183-186.
13. Gao, X.-D.; Ye, W.-C.; Yu, A. C. H.; Zhang, Y.; Tan, R.-X.; Li, M.; Hsiao, W. L. *W. Planta Med.* **2003**, *69*, 171-174.

14. Uvarova, N. I.; Oshitok, G. I.; Elyakov, G. B. *Carbohydr. Res.* **1973**, *27*, 79-87.
15. Dzizenko, A. K.; Isakov, V. V.; Uvarova, N. I.; Oshitok, G. I.; Elyakov, G. B. *Carbohydr. Res.* **1973**, *27*, 249-253.
16. Anisimov, M. M.; Shentsova, E. B.; Shcheglov, V. V.; Strigina, L. I.; Uvarova, N. I.; Levina, E. V.; Oshitok, G. I.; Elyakov, G. B. *Toxicon*, **1978**, *16*, 31-36.
17. Ivanov, A. S.; Zakharova, T. S.; Odinkova, L. E.; Uvarova, N. I. *Khim. – Farm. Zh.* **1987**, *21*, 1091-1094.
18. Schmidt, R. R.; Junq, K.-H. *Trichloroacetimidates. In: Carbohydrates in Chemistry and Biology, Part I: Chemistry of Saccharides*, Wiley-VCH, Weinheim, 2000, Vol 1 (B. Ernst, G.W. Hart, P. Sinaÿ, Eds.), pp. 5-59.
19. Chwalek, M.; Plé, K.; Voutquenne-Nazabadioko, L. *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *52*, 965-971.
20. Coulson, D. R. *Inorg. Synth.* **1972**, *XIII*, 121.
21. Seshadri, T. R.; Vedantham, T. N. C. *Phytochemistry*, **1971**, *10*, 897-898.
22. O'Connel, M. M.; Bentley, M. D.; Campbell, C. S.; Cole, B. J. W. *Phytochemistry*, **1988**, *27*, 2175-2176.
23. Lavoie, S.; Pichette, A.; Garneau, F.-X.; Girard, M.; Gaudet, D. *Synth. Commun.*, **2001**, *31*, 1565-1571.
24. Eckerman, C.; Ekman, R. *Paperi ja Puu – Papper och. Trä* **1985**, *3*, 100-106.
25. O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5421-5426.

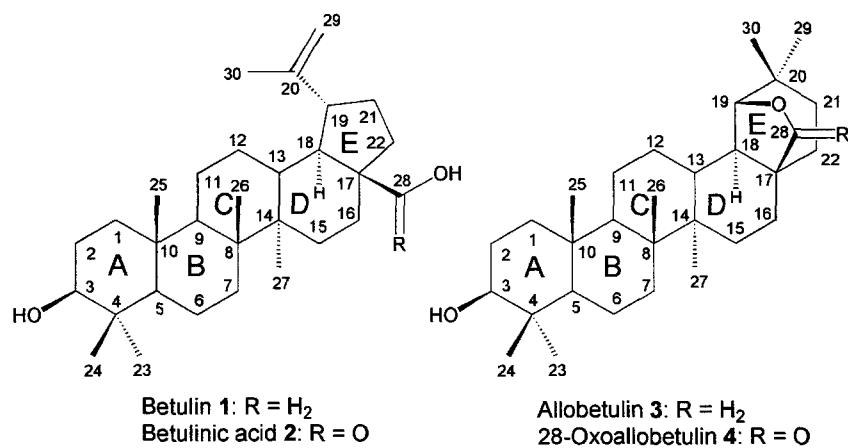
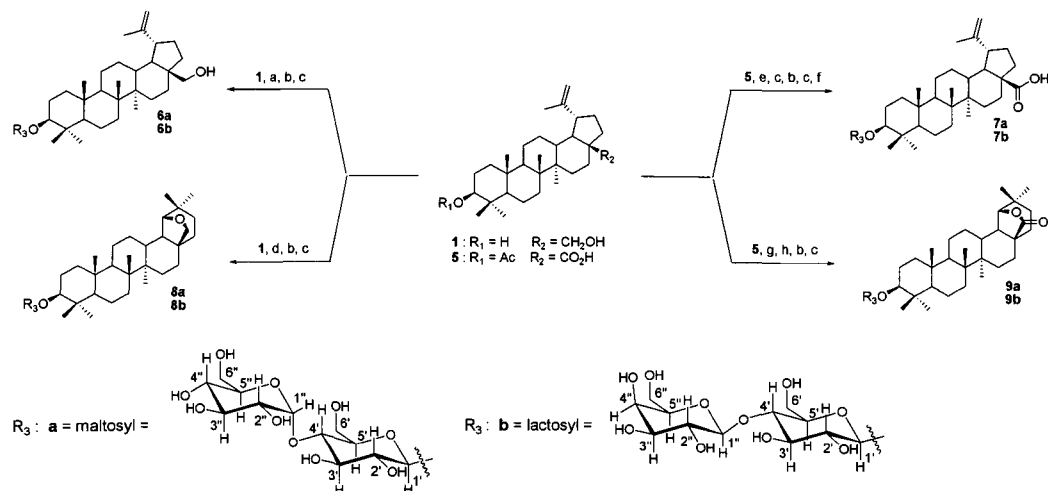
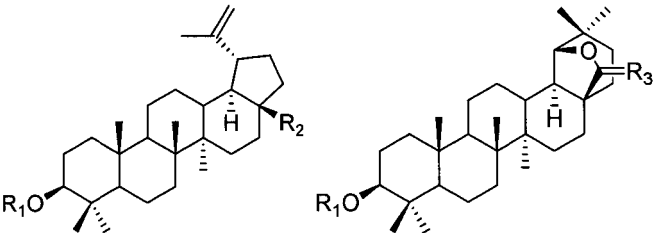


Figure 3-1. Structures of lupane (1 and 2) and germanicane-type (3 and 4) triterpenes.



Scheme 3-1. Synthesis of triterpenic D-maltosides and D-lactosides.

Reagents and conditions: a) Ac_2O (1.05 eq.), pyridine, DMAP (0.1 eq.), rt, 2 h; b) trichloroacetimidate activated carbohydrate (1.5 eq.), TMSOTf (0.05 eq.), 4Å MS, DCM, rt, 1.5 h; c) NaOH 0.25 M, MeOH, THF, H_2O , rt, 2 h; d) $Fe(NO_3)_3/SiO_2$, DCM, reflux, 1 h; e) allyl bromide (2 eq.), K_2CO_3 (3 eq.), DMF, 55 °C, 7 h; f) $Pd(PPh_3)_4$ (0.3 eq.), PPh_3 (0.6 eq.), pyrrolidine (2 eq.), THF, rt, 1-3 d; g) $FeCl_3/SiO_2$, DCM, reflux, 3 h; h) NaOH 0.25 M, MeOH, THF, H_2O , reflux, overnight.

Table 3-1. In vitro cytotoxicity of lupane and germanicane saponins.


Compound	R ¹	R ²	R ³	Cell line IC ₅₀ (μM ± SD) ^a		
				A-549 ^b	DLD-1 ^c	WS1 ^d
1	H	CH ₂ OH	-	3.80 ± 0.09 ^e	6.6 ± 0.3 ^e	3.58 ± 0.07 ^e
2	H	CO ₂ H	-	10.3 ± 0.4 ^e	15.0 ± 0.3 ^e	12 ± 1 ^e
3	H	-	H ₂	> 150	> 150	> 150
4	H	-	O	> 150	> 150	> 150
6a	malt	CH ₂ OH	-	> 150	> 150	> 150
6b	lact	CH ₂ OH	-	> 150	> 150	> 150
7a	malt	CO ₂ H	-	> 150	> 150	> 150
7b	lact	CO ₂ H	-	> 150	> 150	> 150
8a	malt	-	H ₂	31.5 ± 7.1	61 ± 10	30 ± 4
8b	lact	-	H ₂	83 ± 3	129 ± 6	67 ± 11
9a	malt	-	O	> 150	> 150	> 150
9b	lact	-	O	> 150	> 150	> 150

lact, β-D-lactopyranose; malt, β-D-maltopyranose.

^a Data represent mean values ± standard deviation for three independent experiments made in triplicate.^b Human lung carcinoma.^c Human colorectal adenocarcinoma.^d Human normal skin fibroblasts.^e Results previously reported (ref. 3).

CHAPITRE 4
SYNTHÈSE DE SAPONINES D'ANHYDROBÉTULINOL À PARTIR
D'ISOMÉRISATIONS OLÉFINIQUES ACIDO-CATALYSÉES DU BÉTULINOL
3-ACÉTATE ET ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ CYTOTOXIQUE

Résumé

En recherchant de nouvelles structures triterpéniques pour le développement d'agents antitumoraux, nous avons généré les composés **6a** et **7a** avec un bon rendement à partir du bétulinol 3-acétate (**5**) via une expansion du cycle E dans le squelette du lupane. L'hydrolyse de ces terpènes suivit de la glycosilation de **6b** avec des trichloroacétimides de sucres, catalysées par un acide de Lewis, ont induit une isomérisation pour fournir les saponines de l'anhydrobétulinol **8-11**, quatre nouveaux glycosides de E-homolupanes, par isomérisation de l'alcène terminal. La même réaction avec **7b** a généré deux saponines inséparables et l'analyse RMN d'un mélange a révélé qu'une des deux saponines était celle visée (sans réarrangement oléfinique). La seconde saponine était composée de la section anhydrobétulinol provenant de deux isomérisations subséquentes des liaisons oléfiniques de l'unité triterpène. Peu importe que **6b** ou **7b** soit utilisé comme aglycones, les composés finaux obtenus sont **8-11**. Des modélisations moléculaires de deux intermédiaires oléfiniques suggèrent que l'alcène terminal de **7b** devrait s'isomériser en premier, suivi du double lien endocyclique. Le contraire semble induire une conformation énergétiquement

désavantagée. La cytotoxicité des composés **8-11** a été évaluée sur deux lignées de cellules cancéreuses (A-549 et DLD-1) et une lignée de cellules saines (WS-1). Les résultats obtenus montrent que les saponines, à l'exception de **11**, inhibent la croissance des cellules cancéreuses avec des valeurs d'IC₅₀ variant entre 23.5 et 48.5 µM.

Première ébauche d'un article

**Synthesis of anhydrobetulin saponins from acid-catalyzed olefinic isomerisation of
betulin 3-acetate and evaluation of cytotoxic activity**

Thibeault, D.; Legault, J.; Bouchard, J.; Pichette, A.*

Laboratoire d'Analyse et de Séparation des Essences Végétales (LASEVE)

Département des Sciences Fondamentales

Université du Québec à Chicoutimi, 555 boul. de l'Université

Chicoutimi, Québec, Canada, G7H 2B1

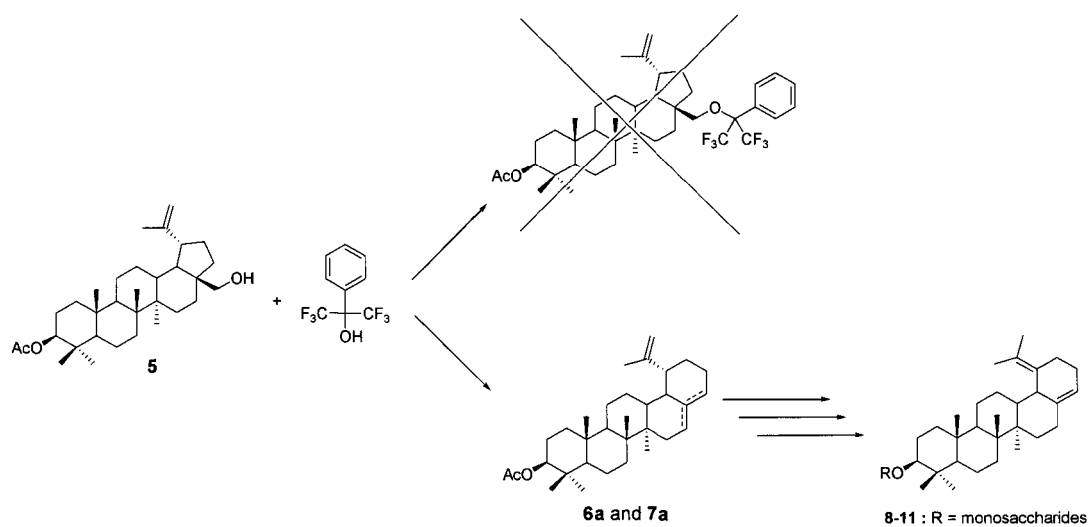
Keywords: Anhydrobetulin; Betulin; Cytotoxicity; Isomerisation; Synthesis; Triterpenes

*Corresponding author. Tel: +1 418 545 5011; Fax: +1 418 545 5012; e-mail:
andre_pichette@uqac.ca

Graphical abstract

Synthesis of anhydrobetulin saponins from acid-catalyzed olefinic isomerisation of betulin 3-acetate and evaluation of cytotoxic activity

Thibeault, D.; Legault, J.; Bouchard, J.; Pichette, A.*



Unexpected rearrangement and acid-catalyzed isomerisation of betulin 3-acetate (**5**) led to the formation of four new saponins of anhydrobetulin with good *in vitro* activity of about 20-30 μM on cancerous A-549 and DLD-1 human cell lines.

Abstract

In searching new triterpenic backbones for the development of antitumoral agents, we generated compounds **6a** and **7a** in good yields from **5** via a ring expansion of cycle E in the lupane skeleton. Hydrolysis of these triterpenes followed by glycosilation of **6b** with trichloroacetimidate carbohydrates, catalyzed by a Lewis acid, induced an isomerization to afford saponins of anhydrobetulin **8-11**, four new E-homolupane glycosides, by isomerisation of the terminal alkene. The same reaction with **7b** generated two inseparable saponins and NMR analysis of a mixture revealed that one of those two saponins was the targeted one (without olefinic rearrangement). The second saponin was composed of anhydrobetulin moiety from two subsequent isomerizations of olefinic bonds on triterpene unit. Whatever **6b** or **7b** are used as aglycons, final compounds are **8-11**. Molecular modelling of two olefinic intermediates suggest that terminal alkene in **7b** should isomerize first, followed by the endocyclic double bond. The contrary seems to induce an energetically disfavoured conformation. Cytotoxicity of compounds **8-11** was evaluated on two cancerous cell lines (A-549 and DLD-1) and one healthy cell line (WS1). Results obtained show that saponins, except **11**, inhibit cellular growth of cancerous cells with IC₅₀ values varying between 23.5 and 48.5 μ M.

1. Introduction

Cancer research and treatments are fields of actuality and strongly investigated. In the aim to develop new and efficient anticancer agents, previous results of our research group¹⁻³ about the synthesis and cytotoxic evaluation of saponins from lupane and germanicane family, two classes of naturally occurring natural compounds, prompted us to use other aglycons. In fact, very few of these glycosides, especially those of germanicane frame, was interesting enough on human cancerous cell lines investigated to pursue an *in vivo* evaluation. Even if the synthesis of glycosides is a useful and efficient tool to enhance the hydrosolubility and pharmacological properties of some drugs,⁴ it is not certain that glycosilation will always afford antitumoral compounds if aglycon do not show any cytotoxicity as previously observed.^{2,3} Moreover, Anisimov et al. suggested that cytotoxic activity of glycosides is closely related to the nature of the aglycon,⁵ which is in accordance with our previous results. Since glycosilation of inactive triterpenes is not always successful to afford efficient anticancer agents, the discovery of new aglycon remains an important field of research in the development of new bioactive saponins.

Betulin is well known for his reactivity in acidic media firstly to perform a E-ring expansion generating allobetulin and a further A-ring contraction to generate two dehydrated compounds, namely 19 β ,28-epoxy-A-*neo*-18 α -olean-3(5)-ene (**1**, also called α -apoallobetulin) and 19 β ,28-epoxy-A-*neo*-5 β -methyl-25-nor-18 α -olean-9-ene (**2**) (figure 4-1). Contraction of the ring A of allobetulin to afford compounds **1** and **2** has been

previously studied and much reported in the literature.⁶⁻¹⁴ However, it is possible to produce allobetulin exclusively by a cautious choice of a relatively weak Lewis acid. With stronger Lewis acid, the cycle A rearrangement occurs after the ring E expansion.¹⁵ However, this alteration of cycle A with preservation of the five-membered cycle E was very few reported and **3** (as acetylated form) was obtained as a glycosilation by-product of 3-acetylbetulin in poor yields.^{10,11} To the best of our knowledge, compound **4**, a regioisomer of **3**, was never reported. Therefore, an efficient synthesis of these two triterpenes could afford the opportunity to develop new molecules that can be largely derivatized as chemotherapeutic agents.

Thus, incorporation of the HIP (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-phenylisopropyl alcohol) protective group¹⁶ under Mitsunobu conditions at the C-28 position of betulin 3-acetate (**5**) was considered to afford a robust and efficient alcohol protective group to prevent the acid-catalyzed Wagner-Meerwein rearrangement of ring E.^{2,15} Unfortunately, no HIP protective group was obtained on the primary alcohol of **5**. Instead, the C-17(22) single bond of **5** was replaced by a C-22(28) single bond and further elimination generated the two E-homolupanes **6a** and **7a** in a ratio of about 80:20, respectively (figure 4-2). Those two triterpenes were previously reported by Protiva et al.^{17,18} but obtained by dehydration with phosphorous pentachloride¹⁸ or phosphorous oxychloride¹⁹ (both for **6a**). Very similar compounds were obtained via some hydrogenated tosylate derivatives (from corresponding 28-lupanol derivatives)²⁰ which were stable enough to be isolated. Acetate hydrolysis of these accessible triterpenes afforded hydrophobous **6b** and **7b**, both suitable for

glycosilation (scheme 4-1). Instead of **3** and **4** as previous objectives, these unforeseen E-homolupanes were derivatized. Hence, we report the synthesis, characterisation and cytotoxic evaluation of new triterpenic saponins on cancerous A-549, DLD-1 and healthy WS1 human cell lines.

2. Results and discussion

2.1. Chemistry

The attempt of introducing HIP protective group with betulin 3-acetate (**5**) in Mitsunobu conditions afforded compound **6a** and **7a** with 42% yield in a ratio of about 80:20, respectively. Since a good activation of C-28 alcohol can afford **6a** and **7a**, trifluoromethanesulfonic anhydride in pyridine with DMAP were used to generate a better activated alcohol than tosylated products previously used.²⁰ This non isolable compound generated the same compounds **6a** and **7a** with 87% yield in the same ratio of 80:20. Hydrolysis of acetates afforded **6b** and **7b** which were inseparable by flash column chromatography. Isolation of the two triterpenes by HPLC (see experimental section) afforded the aglycons needed to this study. Activation of D-glucose, L-rhamnose, D-mannose and D-arabinose as trichloroacetimidates following Schmidt methodology²¹ were previously synthesized and used in our laboratory^{1,2} to perform lupane and germanicane saponins.

All glycosilations reactions were performed with compound **6b** and **7b** as described in experimental section. Glycosilations with activated carbohydrates and TMSOTf in anhydrous conditions, followed by debenzoylation were achieved. Configuration of α and β anomeric protons of carbohydrate moieties were compared and in accordance to saponins previously obtained.^{1,2} Surprisingly, isomerization of the terminal olefinic bond in C-

20(29) occurred during glycosidations of **6b** to afford the unexpected anhydrobetulin²²⁻²⁴ triterpenic moiety. These saponins (compound **8-11**), obtained in good yields (64-88%) illustrated on scheme 4-1, were obtained after isomerization of the isopropenyl olefinic bond to afford a tetrasubstituted alkene. A simple NMR analysis of HMBC spectrum of 3 β -O- α -D-mannopyranoside of anhydrobetulin (**10**) was sufficient to clearly indicate this double bond migration since its two methyls at 1.74 and 1.68 ppm clearly showed the evidence of a tetrasubstituted olefin with carbons at 131.5 and 123.4 ppm. This acidic olefinic isomerization of was previously reported by Fuchino et al.²⁵

A more surprising reaction occurred with glycosides of **7b**. In all cases but with D-glucose (maybe due to a longer reaction time), a mixture of two inseparable compounds (\approx 1:1 ratio), even by HPLC, was obtained after glycosilation process. In the reaction between activated D-glucose and the minor regioisomer **7b**, only 3 β -O- β -D-glucopyranoside of anhydrobetulin (**9**) was obtained as a single compound. All NMR spectra of the two saponins synthesized from aglycon **6b** and **7b** with activated D-glucose were identical in all respect. The C-16 olefinic bond has isomerized to the C-17(28) position and the lost of initial isopropenyl moiety was also observed during glycosilations of **6b**. This isomerization seems to tend on the more stable C-17(28) alkene as observed during the formation of **6a** and **7a** where **6a** was the most predominant compound.

Of course, identification of both compounds generated after the glycosilation reaction of **7b** with all remaining carbohydrates other than D-glucose was performed. Since

these two compounds were inseparable, a NMR analysis of the 3 β -*O*- α -D-mannopyranoside mixture obtained from glycosilation of the minor aglycon **7b** with activated D-mannose was undertaken. With HMBC spectrum analysis of the 3 β -*O*- α -D-mannopyranoside saponins mixture and ^{13}C spectrum comparison with that of 3 β -*O*- α -D-mannopyranoside of anhydrobetulin (**10**), the presence of the latter was unambiguous (table 4-1). Next, HMBC and HSQC analysis of the mixture revealed a correlation of a methyl at 1.74 ppm with terminal olefinic carbons at 111.5 ppm and 150.7 ppm, respectively and a tertiary carbon at 56.5 ppm. With the latter carbon assigned as C-19 in the aglycon analysis of **7b**, the retention of isopropenyl moiety of the unidentified compound was clear. Since the terminal olefin was evident, the position of the endocyclic double bond remained to resolve. We supposed that alkene at C-16 was preserved and comparison of ^{13}C NMR of the mixture with that of aglycon **7b** strongly suggest the position of the olefin at C-16. To confirm the identity of the second saponin, we performed a complete NMR analysis of the second compound on the mixture.

Very few differences in ^1H NMR shifting was observed in positions of all H-23, H-24, H-25 and H-26 methyls of **10** and **10'**, the latter identified as the unknown compound (table 4-1). However, significant differentiation of the two molecular structures was observed at this point of the analysis. While H-26 methyl at 0.94 ppm and H-27 methyl at 0.93 ppm of **10** correlated each others with C-8 and C-14 quaternary carbons on HMBC spectrum, H-26' methyl at 0.95 ppm and H-27' methyl at 1.17 ppm of **10'** correlated each others with the two others C-8' and C-14' carbons on HMBC spectrum. Since C-15 and C-

15' are the only secondary carbons who can be identified by HMBC analysis with H-27 methyls, their distinction was essential. HMBC analysis revealed that H-27' methyl of **10'** at 0.93 ppm correlate with a secondary carbon at 32.1 ppm with two protons at 2.09 and 1.54 ppm, while the H-27 methyl of **10** correlate with a secondary carbon at 35.2 ppm with two protons at 1.56 and 1.40 ppm. These informations suggest that olefinic bond of **10'** could be at the C-16 position since carbon at 35.2 ppm was previously assigned as C-15 in **10** and the shielding of his two protons (table 4-1) do not suggest the proximity of an olefinic group. Moreover, a deshielded proton at 2.09 ppm of carbon C15' at 32.1 ppm suggest the proximity of an alkene functionality.

A COSY correlation between the H-15' at 1.54 ppm and the olefinic proton at 5.48 ppm showed the presence of the C-16 alkene in the unknown compound. Even if no correlation was observed with the other H-15' proton at 2.09 ppm and the same olefinic proton at 5.48 ppm, the position of the alkene function was clear since the shielding of this H-15' proton at 2.09 ppm suggest his presence.

Analysis of olefinic protons in COSY spectrum of the mixture afforded others information about the positions of the two alkenes. Firstly on saponin **10**, H-28 at 5.46 ppm show many long-range coupling with some near protons; H-28 correlate with H-16 at 2.10 ppm, H-18 at 3.04 ppm and both H-22 protons at 2.05 ppm. While **10** was easy to identify, **10'** was much difficult. However, a very weak COSY long-ranged coupling of the olefinic proton at 5.48 ppm with another at 1.90 ppm gives other information confirming the

position of the C-16 alkene in compound **10'**. In the analysis of the aglycon **7b**, the proton at 1.91 ppm is attributed to the C-28 carbon. Hence, the deshielded H-15' at 2.09 ppm correlate with olefinic proton at 5.48 ppm and the weak long-ranged coupling effect between the last with that of 1.90 ppm (assigned as C-28'), confirmed the presence of the C-16 alkene in **10'**. Finally, comparison of the aglycon **7b** ^{13}C NMR spectrum with that of 3 β -*O*- α -D-mannopyranoside mixture confirmed the identity of the second molecule obtained after glycosilation process (table 4-1).

During glycosilation of **7b**, is the terminal olefinic bond that isomerized first, followed by the C-16 \rightarrow C-17(28) migration, or the intracyclic isomerization must be occurring first? Preliminary molecular modelling suggested that C-16 \rightarrow C-17(28) olefin migration could occur after the terminal isomerization since in scheme 4-2, energy level of intermediate **A** is favoured by 4.5 kcal/mol compared to **B**. Furthermore, C17-C18-C19 angle of **A** is a little closer of the theoretical 109.5° value for a sp^3 carbon than **B**.

2.2. Cytotoxic activity

The four new saponins **8-11** obtained as unexpected compounds were tested on cancerous cell lines A-549, DLD-1 and on healthy cell line WS1. Saponins showed cytotoxic activity in the order of about 20-30 μM except **11**. Interestingly, 3 β -*O*- α -L-rhamnopyranoside of lupanes² afforded good cytotoxicity but not with anhydrobetulin. Compound **8** was a little less efficient with IC_{50} of 48.5 μM on DLD-1 (table 4-2). As

previously expected, the research of new triterpenic aglycons can afford new cytotoxic saponins. However, betulin and betulinic acid remains better anticancerous agents. A previous report in literature mentions that modification of the C-20 position in lupane series can be negative for an optimization of cytotoxicity.²⁶ It could be interesting to compare the lost of isopropenyl moiety of saponins **8-11** with a saponin's substructure of **7b** since it was not possible to isolate a pure saponin of **7b**.

3. Conclusion

The research of new aglycons for triterpenic saponins synthesis was partially successful since the anhydrobetulin frame was previously reported in literature but not as glycosides. In better of our knowledge, saponins of anhydrobetulin **8-11** were never synthesized nor isolated. Olefinic isomerizations of the two aglycons **6b** and **7b** in acidic media during glycosilation were observed to generate a single aglycon moiety. Molecular modelling of two hypothetic intermediates could suggest that endocyclic alkene migration of **7b** occurs after the terminal olefin to afford the anhydrobetulin frame. All IC₅₀ for saponins **8**, **9** and **10** were between 20 and 50 μ M on A-549 and DLD-1 human cell lines but no selectivity was observed in regard to the healthy WS1 human cell line. We are pursuing the synthesis of other new triterpenes for synthesis of derivatives. The incorporation of other polar and biocompatible groups on triterpenes is also in progress to develop new and efficient cytotoxic agents.

4. Experimental

4.1 Chemicals

Chemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich Co. Canada or Alfa Aesar Co. and were used as received. The usual solvents were obtained from VWR International Co. and were used as received. Dichloromethane (DCM) was distilled from anhydrous CaH_2 under an argon atmosphere. Tetrahydrofuran (THF) was distilled from sodium/benzophenone ketyl under an argon atmosphere. All anhydrous and air sensitive reactions were performed in oven-dried glassware under positive argon pressure. Analytical thin-layer chromatography was performed with silica gel 60 F₂₅₄, 0.25 mm pre-coated TLC plates (Silicycle, Quebec, Canada). Aliphatic compounds were visualised using aqueous sulphuric acid solution of ammonium heptamolybdate tetrahydrate (10 g/100 mL H_2SO_4 + 900 mL H_2O) and aromatic compounds were visualised using 254 nm and/or 365 nm UV wavelength. Flash column chromatographies were performed on 230-400 mesh silica gel R12030B (Silicycle, Quebec, QC, Canada). Infrared spectra (IR) were recorded with a Perkin-Elmer Spectrum One FT-IR spectrophotometer (Shelton, Connecticut, USA) on a NaCl window from a thin film of the analyzed compounds and only significant absorption bands were reported in cm^{-1} . Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a Bruker Avance spectrometer at 400 MHz (^1H) and 100 MHz (^{13}C), equipped with a 5 mm QNP probe. Elucidations of chemical structures were based on ^1H , ^{13}C , COSY, HMBC, HSQC and DEPT-135 NMR experiments. Signals are reported as m (multiplet), s

(singlet), d (doublet), dd (doublet of doublet), br s (broad singlet) and coupling constants are reported in hertz (Hz). The chemical shifts are reported in ppm (δ) relative to residual solvent peak. The labile OH NMR signals sometime appearing were not listed. Optical rotations were obtained using sodium D line at ambient temperature on a Autopol[®] IV automatic polarimeter. High-resolution mass spectra (HRMS) were obtained at the Department of Chemistry, Queen's University, Ontario, Canada. The geometry optimizations of the electronic ground state (S_0) were carried out at the DFT level^{27,28} with the hybrid B3LYP exchange-correlation functional,^{29,30} and the split-valence 6-31G* basis set.³¹ DFT/B3LYP/6-31G* has been found to be an accurate formalism for calculating the structural properties of many molecular systems³² and these molecular modeling were performed at the Department of Chemistry, Université de Montréal, Quebec, Canada. HPLC preparative methods for the purification of triterpenes **6b** and **7b** in THF (100 mg/mL) were carried out with a Agilent 1100 system equipped with a fractions collector using Zorbax ODS C18 column (9.4 x 250 mm; 5 μ m), at a flow rate of 16.0 mL/min with a column temperature of 25°C. Compounds were detected by UV absorption at 210 nm following this isocratic elution: 20/60/20 H₂O/ACN/THF during 27 minutes. Syntheses of betulin 3-acetate (**5**), glycoside donors 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- α,β -D-glucopyranose trichloroacetimidate, 2,3,4-tri-*O*-benzoyl- α,β -L-rhamnopyranose trichloroacetimidate, 2,3,4-tri-*O*-benzoyl- α,β -D-arabinopyranose trichloroacetimidate and 2,3,4,5-tetra-*O*-benzoyl- α,β -D-mannopyranose trichloroacetimidate were previously reported by our research group.^{1,2}

4.2. Compounds 6b and 7b

In a flame-dried glassware under argon, 1.07 g of betulin 3-acetate (**5**) (2.21 mmol) was dissolved in 10 mL of pyridine with 2.7 mg (0.22 mmol) of DMAP and the solution was stirred at 0°C. Then, 0.56 mL (3.32 mmol) of trifluoromethanesulfonic anhydride was added dropwise and after 15 minutes, the temperature was raised to room temperature. After 90 minutes, 10 mL of water was added and the mixture was diluted with diethyl ether. The organic phase was washed 5 times with HCl 10%, 5 times with a solution of CuSO₄ 1M and one time with water. The aqueous phases were washed with CH₂Cl₂ one time and combined organic phases were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude products **6a** and **6b** were dissolved in MeOH/THF/H₂O (15/30/15 mL) with 0.88 g (22 mmol) of NaOH and the mixture was refluxed 2 hours. The solution was acidified with HCl 10% until pH 5~6, extracted with CH₂Cl₂ three times and combined organic phases were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography with EtOAc/hexanes (2:98) as eluent to afford 749 mg (80% yield) of **6b** and **7b** mixture as a white solid from betulin 3-acetate (**5**). Preparative HPLC (see above) was performed to isolates **6b** and **7b**.

Compound **6b**: $[\alpha]_D^{20}$ -27.4° (*c* 1.03, CHCl₃), lit.¹⁸ $[\alpha]_D^{20}$ -29.0° (*c* 0.33, CHCl₃); IR: 3295, 2938, 2867, 1449, 1387, 1372, 1263, 1185, 1106, 1080, 1042, 944, 883, 804, 740; ¹H NMR (CDCl₃): 5.35 (m, 1H, H-28), 4.73 (br s, 1H, H-29), 4.65 (br s, 1H, H-29), 3.19 (dd, 1H, *J* = 11.7 Hz, *J* = 5.3 Hz, H-3), 0.80-2.20 (25H), 1.76 (s, 3H), 1.04 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.83 (s, 3H), 0.76 (s, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃): 150.9, 141.7, 118.5, 109.0, 79.1,

55.5, 50.6, 46.2, 44.1, 42.4, 41.1, 41.0, 39.0, 38.9, 37.3, 34.3, 33.9, 32.9, 28.1, 27.9, 27.6, 26.7, 23.7, 22.6, 21.4, 18.5, 16.5, 16.0, 15.5, 15.0; HR-EI-MS m/z 424.3701 $[M]^+$, (calcd for $C_{30}H_{48}O$, 424.3705). Compound **7b**: $[\alpha]_D^{20}$ +91.4° (c 1.09, $CHCl_3$); IR: 3400, 2927, 2867, 1446, 1387, 1375, 1264, 1184, 1076, 1032, 990, 975, 947, 886, 740; 1H NMR ($CDCl_3$): 5.37 (d, 1H, J = 6.4 Hz, H-16), 4.77 (br s, 1H, H-29), 4.60 (br s, 1H, H-29), 3.19 (dd, 1H, J = 11.2 Hz, J = 4.9 Hz, H-3), 1.67 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.85 (s, 3H), 0.83 (s, 3H), 0.76 (s, 3H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$): 150.3, 139.3, 119.8, 110.8, 79.2, 56.0, 55.5, 50.9, 44.5, 40.6, 40.5 (2x), 39.0, 38.9, 37.2, 36.8, 34.2, 33.7, 31.5, 28.3, 28.1, 28.0, 27.6, 20.9, 19.3, 18.3, 16.5, 16.2, 15.7, 15.5; HR-EI-MS m/z 424.3705 $[M]^+$, (calcd for $C_{30}H_{48}O$, 424.3705).

4.3. General procedure for synthesis of glycosides 8-11

One equivalent of the appropriate acceptor and 1.5 equivalent of the appropriate donor were solubilized in dry CH_2Cl_2 (30 mM) with 4Å molecular sieves and stirred at room temperature. At this time, TMSOTf (trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate) (0.05 equivalent) was added dropwise under argon atmosphere while keeping rigorous anhydrous conditions. The reaction was usually performed in approximately 1.5 h and then neutralized by adding triethylamine. The crude mixture was filtered, and evaporated under reduced pressure. The residue was redissolved in a NaOH 0.25 N solution of MeOH/THF/ H_2O (1/2/1) and stirred at room temperature for 2 h. The mixture was diluted in CH_2Cl_2 and washed with HCl 10% and brine. The organic phase was dried over Na_2SO_4 ,

filtered and evaporated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography on silica gel using 1-5% MeOH in CH₂Cl₂ as eluent.

4.4. Anhydrobetulin 3 β -O- α -D-arabinopyranoside (**8**)

This compound was prepared from **6b** (200 mg, 0.47 mmol) in the same manner described above to afford 190 mg (72% yield) of **8** as a white solid. $[\alpha]_D^{20}$ -57.5° (*c* 2.10, THF); IR: 3383, 2940, 2866, 1695, 1451, 1388, 1378, 1317, 1262, 1174, 1140, 1088, 1071, 1002, 948, 805, 784, 712; ¹H NMR (Pyr-*d*₅): 5.46 (d, 1H, *J* = 4.0 Hz, H-28), 4.75 (d, 1H, *J* = 6.9 Hz, H-1'), 4.45 (m, 1H, H-2'), 4.40 (m, 1H, H-5'), 4.37 (m, 1H, H-4'), 4.22 (m, 1H, H-3'), 3.84 (m, 1H, H-5'), 3.47 (dd, 1H, *J* = 11.0 Hz, *J* = 4.2 Hz, H-3), 3.04 (d, 1H, *J* = 10.7 Hz, H-18), 2.61 (d, 1H, *J* = 9.7 Hz, H-21), 1.74 (s, 3H), 1.67 (s, 3H), 1.26 (s, 3H), 1.20 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.89 (s, 3H), 0.79 (s, 3H); ¹³C NMR (Pyr-*d*₅): 143.9, 131.5, 123.4, 118.2, 103.5, 85.4, 75.2, 73.0, 70.1, 67.5, 56.7, 51.6, 45.5, 43.1, 42.9, 41.8, 39.3, 39.1, 37.7, 35.2, 34.9, 33.1, 29.0, 28.1, 26.6, 24.7, 24.3, 22.0, 21.6, 20.4, 19.1, 17.3, 16.9, 16.5, 15.5; HRMS *m/z* 579.4009 [M + Na]⁺, (calcd for C₃₅H₅₆O₅Na, 579.4025).

4.5. Anhydrobetulin 3 β -O- β -D-glucopyranoside (**9**)

This compound was prepared from **6b** (100 mg, 0.24 mmol) in the same manner described above to afford 88 mg (64% yield) of **9** as a white solid. $[\alpha]_D^{20}$ -69.9° (*c* 1.20, DMSO); IR: 3354, 2942, 2835, 1650, 1450, 1387, 1270, 1163, 1104, 1076, 1033, 739; ¹H

NMR (Pyr-*d*₅): 5.46 (d, 1H, *J* = 4.1 Hz, H-28), 4.99 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz, H-1'), 4.65 (m, 1H, H-6'), 4.47 (m, 1H, H-6'), 4.32 (m, 1H, H-3'), 4.27 (m, 1H, H-4'), 4.08 (m, 1H, H-5'), 3.45 (dd, 1H, *J* = 11.8 Hz, *J* = 4.3 Hz, H-3), 3.05 (d, 1H, *J* = 11.3 Hz, H-18), 2.61 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz, H-21), 2.40-0.60 (22H), 1.73 (s, 3H), 1.68 (s, 3H), 1.35 (s, 3H), 1.21 (s, 3H), 1.04 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.80 (s, 3H); ¹³C NMR (Pyr-*d*₅): 143.9, 131.5, 124.0, 118.2, 107.4, 89.3, 79.2, 78.8, 76.2, 72.3, 63.5, 56.3, 51.6, 45.5, 43.0, 42.9, 41.7, 40.0, 39.5, 37.5, 35.2, 34.9, 33.1, 28.5, 28.1, 27.2, 26.1, 24.7, 21.9, 21.5, 20.4, 18.8, 17.3, 17.00, 16.4, 15.5; HRMS *m/z* 609.4130 [M + Na]⁺, (calcd for C₃₆H₅₈O₆Na, 609.4131).

4.6. Anhydrobetulin 3β-*O*-α-D-mannopyranoside (10)

This compound was prepared from **6b** (100 mg, 0.24 mmol) in the same manner described above to afford 122 mg (88% yield) of **10** as a white solid. [α]_D²⁰ -33.4° (*c* 0.97, DMSO); IR: 3285, 2926, 2863, 1447, 1387, 1372, 1260, 1123, 1094, 1056, 1027, 974, 804; ¹H NMR (Pyr-*d*₅): 5.62 (br s, 1H, H-1'), 5.45 (d, 1H, *J* = 3.8 Hz, H-28), 4.75 (m, 1H, H-4'), 4.65 (m, 1H, H-3'), 4.62 (m, 1H, H-6'), 4.58 (m, 1H, H-2'), 4.50 (m, 1H, H-5'), 4.47 (m, 1H, H-6'), 3.53 (dd, 1H, *J* = 11.6 Hz, *J* = 4.4 Hz, H-3), 3.03 (d, 1H, *J* = 11.4 Hz, H-18), 2.60 (d, 1H, *J* = 10.0 Hz, H-21), 2.30-0.60 (22H), 1.73 (s, 3H), 1.68 (s, 3H), 1.18 (s, 3H), 1.15 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.86 (s, 3H), 0.79 (s, 3H); ¹³C NMR (Pyr-*d*₅): 143.8, 131.5, 123.9, 118.2, 98.1, 81.9, 76.4, 73.7, 73.4, 69.6, 63.8, 56.3, 51.5, 45.5, 43.0, 42.9, 41.7, 39.1, 38.9, 37.7, 35.2, 34.8, 33.0, 29.2, 28.0, 26.5, 24.7, 22.6, 21.9, 21.5, 20.4, 18.9, 17.2, 16.9, 16.4, 15.5; HRMS *m/z* 609.4143 [M + Na]⁺, (calcd for C₃₆H₅₈O₆Na, 609.4131).

4.7. Anhydrobetulin 3 β -*O*- α -L-rhamnopyranoside (**11**)

This compound was prepared from **6b** (100 mg, 0.24 mmol) in the same manner described above to afford 118 mg (88% yield) of **11** as a white solid. $[\alpha]_D^{20}$ -126.4° (*c* 0.84, THF); IR: 3353, 2937, 2861, 1448, 1387, 1260, 1128, 1052, 983, 912, 836, 810; ^1H NMR (Pyr-*d*₅): 5.46 (d, 1H, *J* = 3.8 Hz, H-28), 5.37 (br s, 1H, H-1'), 4.61 (br s, 1H, H-2'), 4.52 (m, 1H, H-3'), 4.37 (m, 1H, H-5'), 4.34 (m, 1H, H-4'), 3.20 (dd, 1H, *J* = 11.4 Hz, *J* = 4.5 Hz, H-3), 3.04 (d, 1H, *J* = 11.2 Hz, H-18), 2.61 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, H-21), 2.30-0.60 (22H), 1.74 (s, 3H), 1.71 (d, 3H, *J* = 5.6 Hz, H-6'), 1.67 (s, 3H), 1.19 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.83 (s, 3H), 0.82 (s, 3H); ^{13}C NMR (Pyr-*d*₅): 143.9, 131.5, 123.9, 118.2, 104.9, 88.9, 74.5, 73.4, 72.9, 70.3, 56.1, 51.5, 45.5, 43.0, 42.9, 41.7, 39.7, 39.3, 37.5, 35.2, 34.8, 33.1, 28.5, 28.1, 26.5, 26.5, 24.7, 21.9, 21.5, 20.4, 18.9 (2x), 17.0 (2x), 16.4, 15.5; HRMS *m/z* 593.4194 [*M* + Na]⁺, (calcd for C₃₆H₅₈O₅Na, 593.4181).

4.8. Cell lines and culture conditions

Human lung carcinoma (A-549), human colon adenocarcinoma (DLD-1) and human normal fibroblasts (WS1) cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). All cell lines were cultured in minimum essential medium containing Earle's salts and L-glutamine (Mediatech Cellgrow, VA), to which were added 10% foetal bovine serum (Hyclone), vitamins (1x), penicillin (100 IU/mL), streptomycin

(100 µg/mL), essential amino acids (1x) and sodium pyruvate (1x) (Mediatech Cellgrow, VA). Cells were kept at 37 °C in a humidified environment containing 5% CO₂.

4.9. Cytotoxicity assay

Exponentially growing cells were plated in 96-well microplates (Costar, Corning Inc.) at a density of 5×10^3 cells per well in 100 µL of culture medium and were allowed to adhere for 16 h before treatment. Increasing concentrations of each compound in DMSO (Sigma-Aldrich) were then added (100 µL per well) and the cells were incubated for 48 h. The final concentration of DMSO in the culture medium was maintained at 0.5% (v/v) to avoid solvent toxicity. Cytotoxicity was assessed using resazurine³³ on an automated 96-well Fluoroskan Ascent F1TM plate reader (Labsystems) using excitation and emission wavelengths of 530 and 590 nm, respectively. Fluorescence was proportional to the cellular metabolic activity in each well. Survival percentage was defined as the fluorescence in experimental wells compared to that in control wells after subtraction of blank values. Each experiment was carried out three times in triplicate. IC₅₀ results were expressed as means ± standard deviation.

Acknowledgments

This work was supported by grants from le Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (fonds forestier 02) and by the Chaire de recherche sur les agents anticancéreux d'origine naturelle of Université du Québec à Chicoutimi. We also thank Dr. Michel Belletête of Université de Montréal for molecular modelling.

References and notes

1. Gauthier, C.; Legault, J.; Lebrun, M.; Dufour, P.; Pichette, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6713-6725.
2. Thibeault, D.; Gauthier, C.; Legault, J.; Bouchard, J.; Dufour, P.; Pichette, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6144-6157.
3. Author's results not published.
4. Křen, V.; Martínková, L. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 1303-1328.
5. Anisimov, M. M.; Shentsova, E. B.; Shcheglov, V. V.; Strigina, L. I.; Uvarova, N. I.; Levina, E. V.; Oshitok, G. I.; Elyakov, G. B. *Toxicon*, **1978**, *16*, 31-36.
6. Pettit, G. R.; Green, B.; Bowyer, W. J. *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 2879-2883.
7. Klinot, J.; Vystreil, A. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1964**, *29*, 516-530.
8. Berti, G.; Bottari, F.; Marsili, A.; Morelli, I. *Tetrahedron*, **1971**, *27*, 2143-2152.
9. Berti, G.; Marsili, A.; Morelli, I. *Tetrahedron*, **1971**, *27*, 2217-2223.
10. Odínokova, L. É.; Oshitok, G. I.; Denisenko, V. A.; Anufriev, V. F.; Tolkach, A. M.; Uvarova, N. I. *Chem. Nat. Compd.* **1984**, *2*, 168-173.
11. Odínokova, L. É.; Denisenko, M. V.; Denisenko, V. A.; Uvarova, N. I. *Chem. Nat. Compd.* **1988**, *2*, 178-183.
12. Medvedeva, N. I.; Flekhter, O. B.; Baltina, L. A.; Galin, F. Z.; Tolstikov, G. A. *Chem. Nat. Compd.* **2004**, *40*, 247-249.
13. Medvedeva, N. I.; Flekhter, O. B.; Tretyakova, E. V.; Galin, F. Z.; Baltina, L. A.; Spirikhin, L. V.; Tolstikov, G. A. *Russ. J. Org. Chem.* **2004**, *40*, 1140-1145.

14. Kvasnica, M.; Tislerova, I.; Sarek, J.; Sejbal, J.; Cisarova, I. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2005**, *70*, 1447-1464.
15. Lavoie, S.; Pichette, A.; Garneau, F.-X.; Girard, M.; Gaudet, D. *Synth. Commun.*, **2001**, *31*, 1565-1571.
16. Cho, H.-S.; Yu, J.; Falck, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 8354-8355.
17. Protiva, J.; Lepsa, L.; Klinotova, E.; Klinot, J.; Krecek, V.; Vystrcil, A. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1981**, *46*, 2734-2741.
18. Protiva, J.; Krecek, V.; Kreckova, J.; Klinotova, E.; Vystrcil, A. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1983**, *48*, 928-936.
19. Flekhter, O. B.; Boreko, E. I.; Nigmatullina, L. R.; Pavlova, N. I.; Medvedeva, N. I.; Nikolaeva, S. N.; Ashavina, O. A.; Savinova, O. V.; Baltina, L. A.; Galin, F. Z.; Tolstikov, G. A. *Pharm. Chem. J.* **2004**, *38*, 355-358.
20. Vystrcil, A.; Krecek, V.; Budesinsky, M. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1974**, *39*, 2494-2506.
21. Schmidt, R. R.; Junq, K.-H. *Trichloroacetimidates. In: Carbohydrates in Chemistry and Biology, Part I: Chemistry of Saccharides*, Wiley-VCH, Weinheim, 2000, Vol 1 (B. Ernst, G.W. Hart, P. Sinaý, Eds.), pp. 5-59.
22. Vystrcil, A.; Krecek, V.; Budesinsky, M. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1983**, *48*, 1499-1507.
23. Vystrcil, A.; Krecek, V.; Protiva, J.; Budesinsky, M. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1991**, *56*, 886-904.

24. Krecek, V.; Hilgard, S.; Budesinsky, M.; Vystrcil, A. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1995**, *60*, 619-635.
25. Fuchino, H.; Nozawa, O.; Tanaka, N. *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, *42*, 1745-1749.
26. Kim, J. Y.; Koo, H.-M.; Kim, D. S. H. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2405-2408.
27. Hohenberg, P.; Kohn, W. *Phys. Rev.* **1964**, *136*, B864-B871.
28. Kohn, W.; Sham, L.J. *Phys. Rev.* **1965**, *140*, A1133-A1138.
29. Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Montgomery, J.A.; Vreven, T. Jr.; Kudin, K.N.; Burant, J.C.; Millam, J.M.; Iyengar, S.S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, B.; Rega, G.N.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J.E.; Hratchian, H.P.; Cross, J.B.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R.E.; Yazyev, O.; Austin, A.J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J.W.; Ayala, P.Y.; Morokuma, K.; Voth, G.A.; Salvador, P.; Dannenberg, J.J.; Zakrzewski, V.G.; Dapprich, S.; Daniels, A.D.; Strain, M.C.; Farkas, O.; Malick, D.K.; Rabuck, A.D.; Raghavachari, K.; Foresman, J.B.; Ortiz, J.V.; Cui, Q.; Baboul, A.G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B.B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R.L.; Fox, D.J.; Keith, T.; Al-Laham, M.A.; Peng, C.Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P.M.W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M.W.; Gonzalez, C.; Pople, J.A. Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 2003.

30. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R.G. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785-789.
31. Ditchfield, R.; Hehre, W.J.; Pople, J.A. *J. Chem. Phys.* **1971**, *54*, 724.
32. Tretiak, S.; Mukamel, S. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 3171-3212.
33. O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5421-5426.

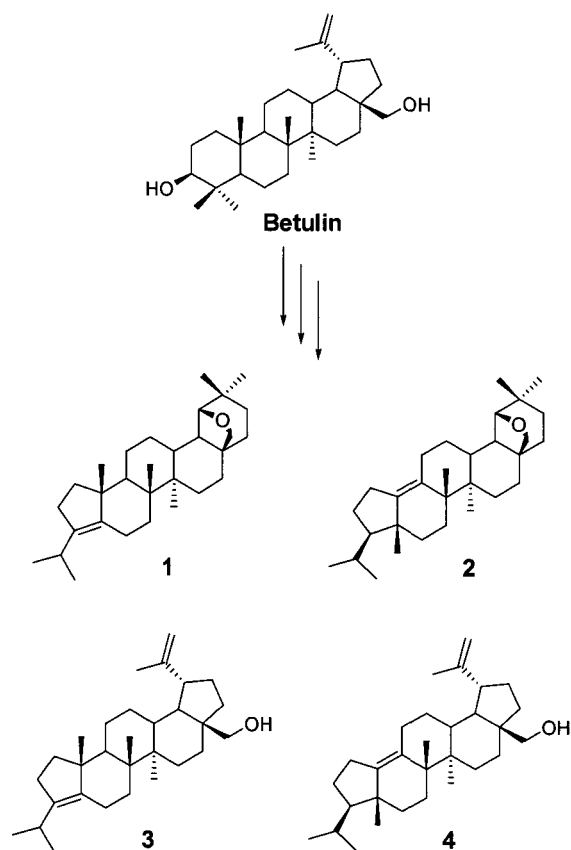


Figure 4-1. Triterpenes with contracted ring A generated from betulin.

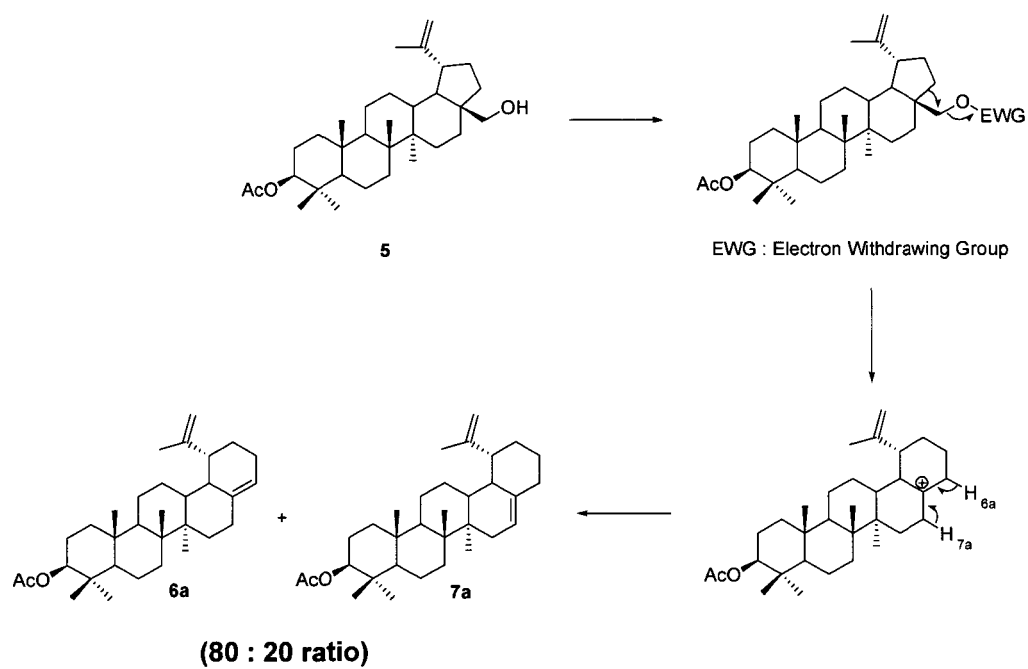
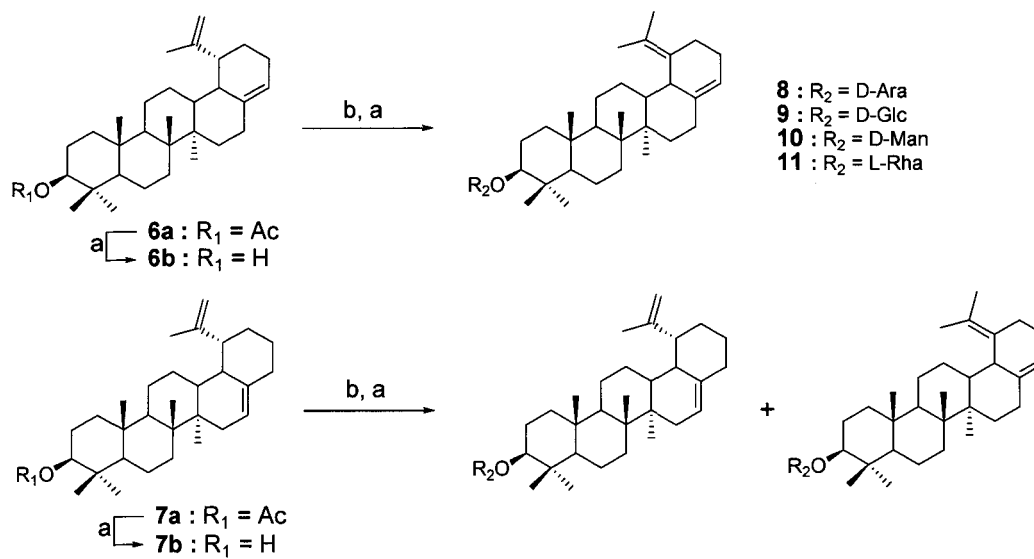
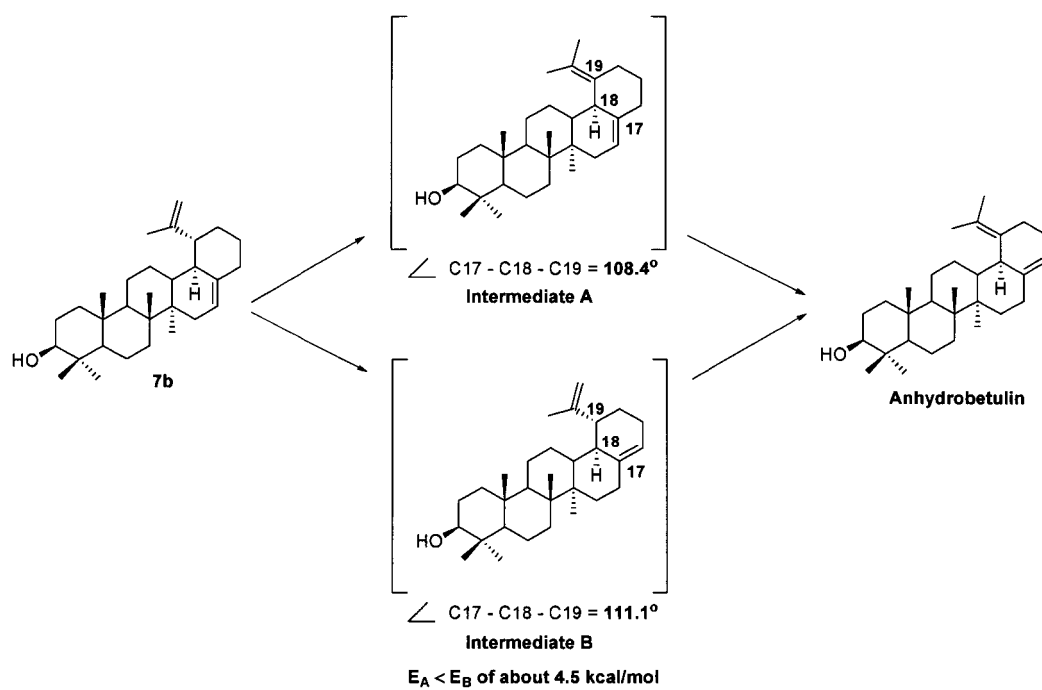


Figure 4-2. Mechanism of ring E expansion.

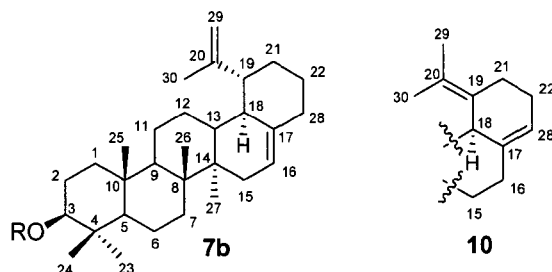


Scheme 4-1. Synthesis of saponins from **6b** and **7b**.

Reagents and conditions: a) NaOH 0.25 M, MeOH, THF, H₂O, rt, 2 h, b) trichloroacetimidate activated carbohydrate (1.5 eq.), TMSOTf (0.05 eq.), 4Å MS, DCM, rt, 1.5 h.

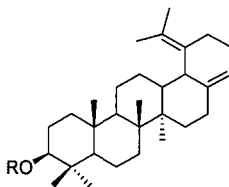


Scheme 4-2. C-18 angle and ΔE (kcal/mol) of two hypothetical intermediates for the acid-catalysed isomerisation of **7b**.

Table 4-1. ^1H and ^{13}C NMR chemical shift (in ppm)^a of ring D and E of **10**, **10**^b and **7b**.

	10^b		7b		10^c		10^d	
Position	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
15	2.09/1.54	32.1	2.14/1.58	32.2	1.56/1.40	35.2	1.56/1.39	35.2
16	5.48	120.6	5.49	120.6	2.23/2.10	33.0	2.21/2.11	33.0
17	-	139.5	-	139.6	-	143.8	-	143.8
18	1.54	45.0	1.55	45.0	3.04	43.0	3.03	43.0
19	1.89	56.5	1.92	56.5	-	131.5	-	131.5
20	-	150.7	-	150.8	-	123.6	-	123.4
21	1.52	34.1	1.53 (2x)	34.1	2.62/1.99	24.7	2.60/1.96	24.7
22	1.73/1.33	28.5	1.74/1.36	28.6	2.05 (2x)	28.0	2.04 (2x)	28.0
28	2.22/1.90	37.3	2.23/1.91	37.3	5.46	118.2	5.45	118.2

R = α -D-mannopyranose.^a All values were obtained in Pyr-*d*₅.^b **10**^b represents 3 β -O- α -D-mannopyranoside of **7b** observed in the NMR analysis of the mixture obtained after glycosilation of **7b** with 2,3,4,5-tetra-O-benzoyl- α , β -D-mannopyranose trichloroacetimidate.^c These values are those of **10** in the same mixture obtained as above.^d These values are those of **10** obtained as a single product.

Table 4-2. In vitro cytotoxicity of anhydrobetulin saponins **8-11**.

Compound	R	Cell line IC ₅₀ (μM ± SD) ^a		
		A-549 ^b	DLD-1 ^c	WS1 ^d
6b	-	>100	>100	>100
7b	-	>100	>100	>100
8	Ara	26.6 ± 1.1	48.5 ± 2.2	25.8 ± 1.0
9	Glc	23.5 ± 1.4	26.5 ± 2.8	28.4 ± 1.4
10	Man	23.5 ± 2.8	25.7 ± 5.1	22.0 ± 3.6
11	Rha	>100	>100	>100
5	-	>100	>100	>100
betulin	-	3.80 ± 0.09 ^e	6.6 ± 0.3 ^e	3.58 ± 0.07 ^e
betulinic acid	-	10.3 ± 0.4 ^e	15.0 ± 0.3 ^e	12 ± 1 ^e

Ara, α-D-arabinopyranose; Glc, β-D-glucopyranose; Man, α-D-mannopyranose; Rha, α-L-rhamnopyranose.

^a Data represent mean values ± standard deviation for three independent experiments made in triplicate.

^b Human lung carcinoma.

^c Human colorectal adenocarcinoma.

^d Human normal skin fibroblasts.

^e Results previously reported (ref. 1).

CHAPITRE 5

SYNTHÈSE ET ÉTUDE CYTOTOXIQUE DE (*R*)-D-GLYCÉRATES DE TYPE LUPANE COMME NOUVELLE CLASSE DE DROGUES TRITERPÉNIQUES

Résumé

Une nouvelle classe de dérivés triterpéniques a été élaborée en greffant une section glycérol à l'acide bétulinique et au bétulinol via une fonction ester afin d'obtenir de nouveaux agents cytotoxiques. Cette approche pourrait permettre de préparer des dérivés plus hydrophiles et avec une plus forte activité cytotoxique que les composés triterpéniques de départ. De plus, ceci permettrait de comparer l'effet cytotoxique sur l'incorporation d'une unité glycérol au lieu d'une unité sucre chez les glycosides. Ainsi, la synthèse de ces nouveaux dérivés de type (*R*)-D-glycérates et l'évaluation cytotoxique de ces derniers furent entreprises. Cette modification structurale s'effectue avec de bons rendements et est plus simple à mettre en œuvre que la glycosilation. Ceci nous a permis de développer une série de (*R*)-D-glycérates triterpéniques de type lupane pour améliorer l'hydrosolubilité et la cytotoxicité de l'acide bétulinique et du bétulinol. Dix dérivés (*R*)-D-glycérates ont été synthétisés et une étude de structure-activité de leurs propriétés cytotoxiques a été effectuée sur des lignées cellulaires humaines cancéreuses (A-549 et DLD-1) et saine (WS1). Les résultats montrent que certains dérivés ont une activité cytotoxique comparable

à l'acide bétulinique et, à une moindre mesure, proche de celle du bétulinol. Cependant, aucune sélectivité n'a été observée envers les lignées cellulaires cancéreuses.

Bioorg. Med. Chem. (article préliminaire)

**Synthesis and cytotoxic study of lupane-type (*R*)-D-glycerates as a novel class of
triterpenic drugs**

Dominic Thibeault, Jimmy Bouchard, Jean Legault, Louis Gagné and André Pichette*

Laboratoire d'Analyse et de Séparation des Essences Végétales (LASEVE)

Département des Sciences Fondamentales

Université du Québec à Chicoutimi, 555 boul. de l'Université

Chicoutimi, Québec, Canada, G7H 2B1

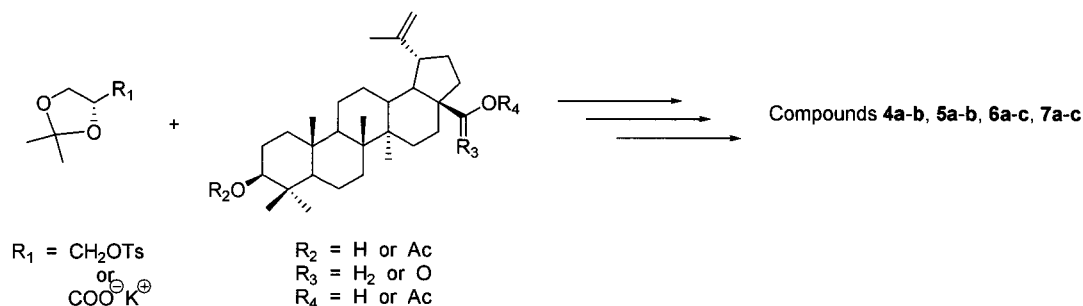
Keywords: Betulin; Cytotoxicity; Glycerates; Glycerol; Lupane; Synthesis; Triterpenes

*Corresponding author. Tel: +1 418 545 5011; Fax: +1 418 545 5012; e-mail:
andre_pichette@uqac.ca

Graphical abstract

Synthesis and cytotoxic study of lupane-type (*R*)-D-glycerates as a novel class of triterpenic drugs

Dominic Thibeault, Jimmy Bouchard, Jean Legault, Louis Gagné and André Pichette*



A new class of triterpenic derivatives was synthesized from glycerol and lupane-type triterpenes. Ten (*R*)-D-glycerates from betulinic acid (**1a**) and betulin (**1b**) were synthesized to evaluate their anticancerous potential on A-549 and DLD-1 human cell lines. Cytotoxic results show that these compounds are as efficient as betulinic acid and, to a lesser extend, close to betulin.

Abstract

A new class of triterpenic derivatives was performed by incorporation of a glycerol unit to betulinic acid and betulin with an ester function in the aim to obtain new cytotoxic agents. This approach could permit the preparation of more hydrophilic agents with stronger cytotoxic activity than starting triterpenic compounds. Moreover, it could permit to compare cytotoxic effect on the incorporation of a glycerol unit rather than a carbohydrate unit in glycosides. Hence, the synthesis of these new derivatives of (*R*)-D-glycerates types and cytotoxic evaluation of these compounds was undertaken. This structural modification occurs with good yields and is much simple to perform than glycosilation. This has allowed us to develop a serie of lupane-type triterpenic (*R*)-D-glycerates to improve hydrosolubility and cytotoxicity of betulinic acid and betulin. Ten (*R*)-D-glycerates were synthesized and a structure-activity relationship of their cytotoxic properties was performed on human cancerous (A-549 and DLD-1) and healthy (WS1) cell lines. Results show that some derivatives have cytotoxic activity comparable to betulinic acid and, to a lesser extend, close to betulin. However, no selectivity was observed against cancerous cell lines.

1. Introduction

Cancer is one of the most active therapeutic areas and the discovery of new and efficient drugs remains a major challenge to overcome illness and fatalities. Natural products represent a rich source of biologically active compounds and are an example of molecular diversity, with recognized potential in drug discovery and development. Recently, our research group has synthesized many glycosides from bioactive lupane and germanicane-type triterpenes to investigate the development of efficient anticancerous agents¹⁻³ in the aim to improve pharmacological and cytotoxic properties⁴ of these few hydrosoluble triterpenes.^{5,6} Even if glycosilation is a useful and efficient tool for this purpose, it is quite possible that no cytotoxicity of these compounds will be observed if aglycons do not show any cytotoxicity,⁷ results that were observed in our study.^{2,3} Furthermore, glycosilation of an anticancerous compound will not necessarily lead to a better therapeutical agent. In fact, our previous results revealed that many saponins did not show any cytotoxicity on studied cancerous cell lines compared to their aglycons. On more than thirdly triterpenic glycosides,^{1,3} few were efficient to inhibit cellular proliferation. Moreover, they were not selective toward healthy cells. Except 3 β -*O*- α -L-rhamnopyranoside of betulinic acid and 3 β -*O*- α -D-arabinopyranoside of betulinic acid, very few saponins shown a IC₅₀ below 10 μ M (the two last ones with 3 β -*O*- β -D-xylopyranoside of betulin) on studied cell lines.²

With these results, incorporation of another polar function was investigated to improve hydrosolubility of selected triterpenes illustrated on scheme 1 (betulinic acid (**1a**), 3-acetylbetulinic acid (**1b**), betulin (**2a**), betulin 3-acetate (**2b**) and betulin 28-acetate (**2c**)), and to develop a new class of efficient therapeutical agents in cancer treatment. In analogy to glycosides, incorporation of glycerol, a very simple and common molecule of relatively high polarity, was attempted with an ester function on lupane triterpenes to substitute carbohydrates. Interestingly, few terpenoid acylglycerol derivatives are encountered in nature. However, many species of marine dorid nudibranchs are known for their expression of diterpenoid acylglycerols.^{8,9} These compounds are reported as ichthyotoxics and feeding-deterrents and are believed to be involved in the defensive mechanism of these animals.⁹ The use of glycerol unit seems also very interesting to achieve our goal since glyoxal, a naturally occurring α -oxoaldehyde metabolite, is greatly produced by the Fenton-induced degradation of glycerol compared to several carbohydrates and related compounds.¹⁰ Glyoxal seems able to induce apoptosis and cell growth arrest¹¹ due to its irreversible binding potential with nucleic acids¹² and proteins.^{13,14} Thus, the incorporation of glycerol as precursor of a cytotoxic metabolite by an ester function on betulinic acid (**1a**) and betulin (**2a**), two lupane-type triterpenes well known for various anticancerous effects, could act on two fronts in development of these triterpenes-glycerol derivatives as anticancerous agents.

Integration of glycerol to triterpenes with an ester function was investigated due to a more easy and rapid access to desired compounds. The abundance and low cost of D-

mannitol, the starting material mainly used to synthesize (*R*)-D-glyceraldehyde¹⁵⁻¹⁷ or (*R*)-D-glycerate potassium salt¹⁸ compared to 5,6-*O*-isopropylidene-L-gulonono-1,4-lactone leading to the (*S*)-L-glyceraldehyde,¹⁹ prompted us to choose the *R* stereochemistry for these glycerate derivatives. To the best of our knowledge, no glycerol-based derivatives of betulinic acid (**1a**) or betulin (**2a**) were reported in the literature. Hence, we report the synthesis, characterisation and cytotoxic evaluation of these new compounds (**4a-b**, **5a-b**, **6a-c** and **7a-c**) on A-549 (lung carcinoma), DLD-1 (colorectal adenocarcinoma) and WS1 (normal skin fibroblasts) human cell lines.

2. Results and discussion

2.1. Chemistry

Targeted betulinate esters **4a-b** (scheme 5-1) needed the preparation of the tosylated (*R*)-2,3-*O*-isopropylidene-D-glycerol (**3**) which was achieved in 89% yield with tosyl chloride and (*R*)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-methanol. Then, the coupling reactions of **1a** or **1b** with **3** were performed in acetonitrile using DBU as base and resulted in moderate yield (both 46% for **4a** and **4b**) due to incomplete reactions. Finally, hydrolysis of the isopropylidene moiety of **4a-b** were performed in the usual conditions and (*R*)-D-glycerates **5a-b** were obtained in good yields (74% and 87%, respectively).

Targeted betulin (*R*)-D-glycerate esters **6a-c** needed the preparation of the (*R*)-2,3-*O*-isopropylidene-D-glyceryl chloride. Hence, D-mannitol was used as the starting material for the synthesis of this acyl chloride. Following procedure of Earle M. J. et al.,¹⁸ protection of D-mannitol with 2,2-dimethoxypropane was performed and followed by oxidative cleavage with NaIO₄. Since (*R*)-2,3-*O*-isopropylidene-D-glyceraldehyde tends to polymerise rapidly,¹⁷ the resulting crude oil was immediately oxidized with aqueous KMnO₄/KOH affording (*R*)-2,3-*O*-isopropylidene-D-glycerate potassium salt as a white solid with 61% yield from D-mannitol. The chloration of (*R*)-2,3-*O*-isopropylidene-D-glycerate potassium salt with oxalyl chloride was performed just prior its use because of its air- and moisture sensitivity. The refluxing of this acyl chloride with **2a-c** and DMAP in

dry pyridine under anhydrous conditions permitted the synthesis of **6a-c** (scheme 5-1) with good yields (76-85%) except **6a** with 11% yield. Hydrolysis of isopropylidene protective group was performed as usual to give **7a-c** in moderate yields (27-44%). Partial deprotection of acetates, degradations and incomplete reactions are responsible of these low yields. Nevertheless, all (*R*)-D-glycerates were obtained and anticancerous evaluation was undertaken.

2.2. Cytotoxic activity

(*R*)-D-Glycerates were evaluated on two human cancerous (A-549 and DLD-1) and one healthy (WS1) cell lines with betulinic acid (**1a**) and betulin (**2a**) as positive control. In general, active compounds show bioactivity values which are comparable to those of **1a** and **2a** (table 5-1). No selectivity was observed in regard to WS1 cell line. The presence of an acetate on the C-3 alcohol of betulinic acid (**1b**) has few effect on anticancerous activity with IC₅₀ of 18-20 µM on A-549 and DLD-1 and improve selectivity toward cancerous cell with IC₅₀ of 57 µM on WS1. The same modification on the C-3 alcohol of betulin (**2b**) inhibith bioactivity and considerably reduce the cytotoxicity when an acetate is at the C-28 alcohol (compound **2c**). While these modifications have significant influence on anticancerous activity, the principal observation of this study is that all compounds which do not have a free alcohol function do not exhibit any cytotoxicity. All compounds with isopropylidene protective group are not cytotoxic except **4a** since there is a presence of the C-3 alcohol, but IC₅₀ values are medium to poor with 30, 96 and 43 µM for A-549, DLD-1

and WS1, respectively. It is clear that absence of the isopropylidene protective group is essential to a good anticancerous activity. Another interesting observation is that the presence of glycerate unit on betulin 3-acetate and betulin 28-acetate (**7b** and **7c**) greatly enhance cytotoxicity compared to same compounds without this glycerate unit (**2b** and **2c**). Curiously, compound **7a** with two (*R*)-glycerate moieties is less cytotoxic (31, 39 and 40 μ M on A-549, DLD-1 and WS1, respectively) than **5a**, **5b**, **7b** or **7c**, which are molecules of lesser polarity with only one glycerate moiety. This observation is in accordance with previous results of our research group about 3β -*O*-lupane glycosides with disaccharide units.³ In fact, these very polar saponins were non-cytotoxic. It is possible that drugs of the lupane-type structure with high polarity have negative effect on the cytotoxicity. However, the polarity of these (*R*)-*D*-glycerates was sufficient enough to make them much more soluble in polar solvents than betulinic acid and betulin without inducing an important loss of bioactivity. Finally, glycerylation has proved to be much succesful in obtention of cytotoxic triterpenic compounds than many examples of glycosilation.^{2,3}

3. Conclusion

Incorporation of a (*R*)-glycerate polar group rather than carbohydrate on some triterpenes afforded new and efficient cytotoxic agents. Coupling reactions gave good yields but deprotection of isopropylidene moiety should be improved with much efficient reaction conditions. With this amelioration, global yields for (*R*)-D-glycerates synthesis will be better than glycosilation process. The increase of triterpene's solubility in polar solvents was achieved successfully and (*R*)-D-glycerates are even more soluble than some germanicane saponins. Good values of IC₅₀ (15.5 to 23 μ M) were obtained for compounds **5a-b** and **7b-c** on A-549 and DLD-1 but no selectivity was observed in regard to the healthy WS1 cell line. However, these compounds are more cytotoxic than many saponins of the lupane and germanicane-type triterpenes previously reported. Compound **7a** showed moderate antitumoral activity, presumably due to its higher polarity (two (*R*)-glycerate groups) as previously discussed. In opposite to good IC₅₀ described above, compounds without a free alcohol function did not show any cytotoxicity. However, bioactive compounds are in the same range than betulinic acid (**1a**) and, to a lesser extent, close to betulin (**2a**). Hydrosolubility of triterpenes used was improved and cytotoxicity was generally maintained or increased. Hence, these triterpene-based derivatives could be promising therapeutic agents.

We are presently pursuing the preparation of other derivatives to enhance the hydrophilicity and cytotoxicity of these few hydrosoluble triterpenes. Compounds such as

(*S*)-L-glycerates series and ether-linked series will be an interesting avenue to compare and enhance therapeutical properties of these new glycerol derivatives from lupane-type triterpenes.

4. Experimental

4.1. Chemicals

Chemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich Co. Canada or Alfa Aesar Co. and were used as received. The usual solvents were obtained from VWR International Co. and were used as received. Dichloromethane (DCM) was distilled from anhydrous CaH_2 under an argon atmosphere. Tetrahydrofuran (THF) was distilled from sodium/benzophenone ketyl under an argon atmosphere. All anhydrous and air sensitive reactions were performed in oven-dried glassware under positive argon pressure. Analytical thin-layer chromatography was performed with silica gel 60 F₂₅₄, 0.25 mm pre-coated TLC plates (Silicycle, Quebec, Canada). Aliphatic compounds were visualised using aqueous sulphuric acid solution of ammonium heptamolybdate tetrahydrate (10 g/100 mL H_2SO_4 + 900 mL H_2O) and aromatic compounds were visualised using 254 nm and/or 365 nm UV wavelength. Flash column chromatographies were performed on 230-400 mesh silica gel R12030B (Silicycle, Quebec, Canada). Infrared spectra (IR) were recorded with a Perkin-Elmer Spectrum One FT-IR spectrophotometer (Shelton, Connecticut, USA) on a NaCl window from a thin film of the analyzed compounds and only significant absorption bands were reported in cm^{-1} . Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a Bruker Avance spectrometer at 400 MHz (^1H) and 100 MHz (^{13}C), equipped with a 5 mm QNP probe. Elucidations of chemical structures were based on ^1H , ^{13}C , COSY, HMBC, HSQC and DEPT-135 NMR experiments. Signals are

reported as m (multiplet), s (singlet), d (doublet), dd (doublet of doublet), br s (broad singlet) and coupling constants are reported in hertz (Hz). The chemical shifts are reported in ppm (δ) relative to residual solvent peak. The labile OH NMR signals sometime appearing were not listed. Optical rotations were obtained using sodium D line at ambient temperature on a Autopol[®] IV automatic polarimeter. High-resolution mass spectra (HRMS) were obtained at the Department of Chemistry, Queen's University, Ontario, Canada. Betulinic acid (**1a**), 3-acetylbetulinic acid (**1b**), betulin 3-acetate (**2b**) and betulin 28-acetate (**2c**) were previously synthesized by our research group.^{1,2} Betulin (**2a**) was isolated from barks of *Betula papyrifera* March.² (*R*)-2,3-*O*-Isopropylidene-D-glycerate potassium salt was prepared as reported in literature from D-mannitol.¹⁸

4.2. (*R*)-(-)-2,2-Dimethyl-1,3-dioxan-4-ylmethyl *p*-toluenesulfonate (**3**)

In a flame-dried glassware under argon, 2.00 g of (*R*)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-methanol (15.1 mmol) was dissolved in 15 mL of anhydrous CH₂Cl₂ with 2.73 mL (19.7 mmol) of triethylamine under argon at 0 °C. Then, 3.17 g (16.6 mmol) of tosyl chloride was added and the mixture was refluxed overnight. Then, the mixture was diluted with HCl 5%, extracted three times with CH₂Cl₂ and the combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography with EtOAc/hexanes (15:85 to 20:80) as eluent to afford 3.87 g (89% yield) of **3** as a clear oil. $[\alpha]_D^{20} +0.3^\circ$ (*c* 1.96, CHCl₃); IR: 2988, 1598, 1361, 1258, 1213, 1190, 1177, 1096, 1054, 978, 828, 815, 789, 667, 555. ¹H NMR (CDCl₃): 7.78 (d,

2H, $J = 8.4$ Hz, aromatic); 7.34 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, aromatic), 4.26 (m, 1H, CH-O-C), 4.02 (m, 1H, CH₂-O-C), 3.98 (m, 2H, 2x CH₂-O-S), 3.74 (m, 1H, CH₂-O-C), 2.43 (s, 3H), 1.32 (s, 3H), 1.29 (s, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃): 145.2, 132.7, 130.0 (2x), 128.1 (2x), 110.1, 73.0, 69.6, 66.2, 26.7, 25.2, 21.7; HRMS m/z 309.0782 [M + Na]⁺, (calcd for C₁₃H₁₈O₅SNa, 309.0767).

4.3. (*R*)-2,3-Isopropylidene-D-glyceryl betulinate (**4a**)

In a flame-dried glassware under argon, 175 mg of betulinic acid (**1a**) (0.38 mmol) was dissolved in 9 mL of acetonitrile with 137 μ L (0.49 mmol) of **3**, 63 μ L (0.42 mmol) of DBU and the solution was refluxed overnight. Then, the mixture was diluted with water, extracted three times with CH₂Cl₂ and the combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography with EtOAc/hexanes (10:90 to 20:80) as eluent to afford 87 mg (40% yield) of **4a** as a white solid. $[\alpha]_D^{20} +4.8^\circ$ (c 0.68, CHCl₃); IR: 3504, 2942, 2869, 1726, 1642, 1453, 1372, 1318, 1216, 1154, 1131, 1045, 982, 885, 845, 755. ¹H NMR (CDCl₃): 4.72 (br s, 1H, H-29), 4.59 (br s, 1H, H-29), 4.30 (m, 1H, H-1'), 4.20 (m, 1H, H-2'), 4.07 (m, 2H, H-1' and H-3'), 3.76 (dd, 1H, $J = 8.3$ Hz, $J = 6.0$ Hz, H-3'), 3.17 (m, 1H, H-3), 3.02 (m, 1H, H-19), 0.60-2.30 (24H), 1.67 (s, 3H), 1.43 (s, 3H), 1.36 (s, 3H), 0.95 (s, 6H), 0.90 (s, 3H), 0.81 (s, 3H), 0.75 (s, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃): 175.9, 150.6, 109.8 (2x), 79.1, 73.8, 66.6, 64.0, 56.8, 55.5, 50.7, 49.5, 47.0, 42.5, 40.8, 39.0, 38.9, 38.4, 37.3, 37.1,

34.5, 32.2, 30.7, 29.8, 28.1, 27.5, 26.9, 25.7, 25.5, 21.0, 19.5, 18.4, 16.3, 16.1, 15.5, 14.9; HRMS m/z 593.4172 $[M + Na]^+$, (calcd for $C_{36}H_{58}O_5Na$, 593.4181).

4.4. (*R*)-2,3-Isopropylidene-D-glyceryl-3-acetylbetulinate (**4b**)

This compound was prepared from **1b** (100 mg, 0.20 mmol) dissolved in 5 mL of acetonitrile with **3** (71 μ L, 0.30 mmol) and DBU (33 μ L, 0.22 mmol) as described for **4a**. The crude product was purified by flash chromatography with EtOAc/hexanes (5:95 to 10:90) as eluent to afford 57 mg (46% yield) of **4b** as a white solid. $[\alpha]_D^{20} +16.7^\circ$ (c 0.46, $CHCl_3$); IR: 2946, 2872, 1731, 1642, 1454, 1370, 1246, 1220, 1153, 1130, 1029, 979, 885, 846, 757. 1H NMR ($CDCl_3$): 4.73 (br s, 1H, H-29), 4.60 (br s, 1H, H-29), 4.46 (m, 1H, H-3), 4.31 (m, 1H, H-1'), 4.20 (m, 1H, H-2'), 4.07 (m, 2H, H-1' and H-3'), 3.76 (dd, 1H, $J = 8.4$ Hz, $J = 6.0$ Hz, H-3'), 2.99 (m, 1H, H-19), 0.70-2.30 (24H), 2.04 (s, 3H), 1.68 (s, 3H), 1.44 (s, 3H), 1.36 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.91 (s, 3H), 0.83 (s, 6H), 0.82 (s, 3H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$): 175.9, 171.2, 150.6, 109.9, 109.8, 81.1, 73.8, 66.7, 64.0, 56.8, 55.6, 50.6, 49.6, 47.1, 42.6, 40.9, 38.6, 38.4, 38.0, 37.3, 37.1, 34.4, 32.2, 30.7, 29.8, 28.1, 26.9, 25.6, 25.5, 23.9, 21.5, 21.0, 19.5, 18.3, 16.6, 16.4, 16.2, 14.8; HRMS m/z 635.4284 $[M + Na]^+$, (calcd for $C_{38}H_{60}O_6Na$, 635.4287).

4.5. (*R*)-D-Glyceryl betulinate (**5a**)

Fifty milligrams of **4a** (0.09 mmol) was dissolved in THF/MeOH/H₂O (7/2/2 mL) at room temperature and 2 mL of HCl 25% was added and stirred overnight. The solution was neutralized with saturated NaHCO₃ at pH ~ 6, extracted three times with CH₂Cl₂, and combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography with EtOAc/hexanes (30:70 to 60:40) as eluent to afford 43 mg (92% yield) of **5a** as a white solid. $[\alpha]_D^{20} +5.7^\circ$ (*c* 0.72, CHCl₃); IR: 3362, 2941, 2868, 1724, 1638, 1453, 1377, 1220, 1155, 1044, 983, 880, 757. ¹H NMR (acetone-*d*₆): 4.73 (br s, 1H, H-29), 4.59 (br s, 1H, H-29), 4.13 (m, 2H, 2x H-1'), 3.85 (m, 1H, H-2'), 3.58 (m, 2H, 2x H-3'), 3.12 (dd, 1H, *J* = 10.9 Hz, *J* = 5.3 Hz, H-3), 3.05 (m, 1H, H-19), 0.70-2.40 (24H), 1.70 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.85 (s, 3H), 0.75 (s, 3H); ¹³C NMR (acetone-*d*₆): 176.4, 151.6, 110.1, 78.6, 70.9, 65.8, 64.2, 57.4, 56.3, 51.5, 50.2, 48.0, 43.2, 41.6, 39.6 (2x), 39.1, 38.0, 37.5, 35.2, 32.7, 31.3, 30.5, 28.5, 28.1, 26.4, 21.7, 19.5, 19.1, 16.6, 16.5, 16.1, 15.0; HRMS *m/z* 553.3873 [M + Na]⁺, (calcd for C₃₃H₅₄O₅Na, 553.3868).

4.6. (*R*)-D-Glyceryl-3-acetylbetulinate (**5b**)

This compound was prepared from **4b** (37 mg, 0.06 mmol) dissolved in THF/MeOH/H₂O (6/2/2 mL) with 2 mL of HCl 25% as described for **5a**. The crude product was purified by flash chromatography with EtOAc/hexanes (20:80 to 40:60) as

reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography with 7.5% → 12.5% EtOAc/hexanes as eluent to afford 61 mg (11% yield) of **6a** as a white solid. $[\alpha]_D^{20} +17.6^\circ$ (*c* 0.50, CHCl₃); IR: 2943, 2873, 1756, 1728, 1641, 1455, 1372, 1262, 1198, 1151, 1105, 1070, 1009, 883, 842, 756. ¹H NMR (CDCl₃): 4.67 (br s, 1H, H-29), 4.57 (m, 4H, H-3, H-29, 2x H-2'), 4.41 (d, 1H, *J* = 10.8 Hz, H-28), 4.24 (m, 2H, 2x H-3'), 4.06 (m, 2H, 2x H-3'), 3.88 (d, 1H, *J* = 10.8 Hz, H-28), 2.42 (m, 1H, H-19), 0.70-2.10 (24H), 1.66 (s, 3H), 1.49 (s, 6H), 1.39 (s, 6H), 1.01 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.83 (s, 9H); ¹³C NMR (CDCl₃): 171.8, 171.2, 150.0, 111.5, 111.4, 110.1, 82.2, 74.4, 74.3, 67.5 (2x), 63.8, 55.4, 50.3, 48.9, 47.8, 46.7, 42.8, 41.0, 38.4, 38.1, 37.7, 37.2, 34.6, 34.2, 29.8, 29.6, 28.0, 27.1, 26.1, 26.0, 25.7, 25.7, 25.2, 23.8, 20.9, 19.2, 18.2, 16.6, 16.3, 16.1, 14.9; HRMS *m/z* 721.4634 [*M* + Na]⁺, (calcd for C₄₂H₆₈O₇Na, 721.4655).

4.8. Betulin 3-acetate-28-(*R*)-[2,3-isopropylidene]-D-glycerate (**6b**)

This compound was prepared from **2b** (200 mg, 0.41 mmol), (*R*)-2,3-isopropylidene-D-glycerate potassium salt (250 mg, 1.35 mmol) and oxalyl chloride (177 μL, 2.03 mmol) in the same manner as **6a**. The crude product was purified by flash chromatography with EtOAc/hexanes (5:95 to 10:90) as eluent to afford 215 mg (85% yield) of **6b** as a white solid. $[\alpha]_D^{20} +18.2^\circ$ (*c* 1.32, CHCl₃); IR: 2946, 2873, 1757, 1732, 1642, 1456, 1372, 1247, 1198, 1150, 1105, 1071, 1018, 980, 884, 842, 756. ¹H NMR (CDCl₃): 4.67 (br s, 1H, H-29), 4.58 (m, 2H, H-29, H-2'), 4.43 (m, 2H, H-3, H-28), 4.24 (m, 1H, H-3'), 4.07 (m, 1H, H-3'), 3.88 (d, 1H, *J* = 11.0 Hz, H-28), 2.41 (m, 1H, H-19),

0.70-2.10 (24H), 2.03 (s, 3H), 1.66 (s, 3H), 1.49 (s, 3H), 1.39 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.83 (s, 6H), 0.82 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3): 171.8, 171.1, 150.0, 111.5, 110.1, 81.0, 74.3, 67.5, 63.8, 55.5, 50.4, 48.9, 47.8, 46.7, 42.8, 41.0, 38.5, 37.9, 37.7, 37.2, 34.6, 34.2, 29.8, 29.6, 28.1, 27.1, 26.0, 25.7, 25.2, 23.8, 21.4, 20.9, 19.2, 18.3, 16.6, 16.3, 16.1, 14.9; HRMS m/z 635.4275 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, (calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{60}\text{O}_6\text{Na}$, 635.4287).

4.9. Betulin 28-acetate-3-(*R*)-[2,3-isopropylidene]-D-glycerate (**6c**)

This compound was prepared from **2c** (200 mg, 0.41 mmol), (*R*)-2,3-isopropylidene-D-glycerate potassium salt (250 mg, 1.35 mmol) and oxalyl chloride (177 μL , 2.03 mmol) in the same manner as **6a**. The crude product was purified by flash chromatography with EtOAc/hexanes (5:95 to 10:90) as eluent to afford 191 mg (76% yield) of **6c** as a white solid. $[\alpha]_D^{20} +21.5^\circ$ (c 1.28, CHCl_3); IR: 2946, 2873, 1739, 1642, 1456, 1372, 1234, 1150, 1105, 1071, 1033, 1009, 982, 884, 842, 756. ^1H NMR (CDCl_3): 4.67 (br s, 1H, H-29), 4.57 (m, 3H, H-3, H-29, H-2'), 4.24 (m, 2H, H-28, H-3'), 4.04 (m, 1H, H-3'), 3.83 (d, 1H, $J = 11.0$ Hz, H-28), 2.43 (m, 1H, H-19), 0.70-2.10 (24H), 2.06 (s, 3H), 1.66 (s, 3H), 1.49 (s, 3H), 1.39 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.83 (s, 9H); ^{13}C NMR (CDCl_3): 171.8, 171.2, 150.2, 111.4, 110.0, 82.2, 74.4, 67.5, 62.9, 55.4, 50.4, 48.9, 47.8, 46.4, 42.8, 41.0, 38.4, 38.1, 37.7, 37.2, 34.7, 34.2, 29.8, 29.7, 28.1, 27.2, 26.1, 25.7, 25.2, 23.9, 21.2, 20.9, 19.2, 18.2, 16.6, 16.3, 16.1, 14.8; HRMS m/z 635.4280 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, (calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{60}\text{O}_6\text{Na}$, 635.4287).

4.10. Betulin 3,28-di-(R)-D-glycerate (7a)

Forty-five milligrams of **6a** (0.07 mmol) was dissolved in THF/MeOH/H₂O (7/2/2 mL) at room temperature and 2 mL of HCl 25% was added and stirred overnight. The solution was neutralized with saturated NaHCO₃ at pH ~ 6, extracted three times with CH₂Cl₂, and combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography with EtOAc/hexanes (30:70 to 60:40) as eluent to afford 11 mg (27% yield) of **7a** as a white solid. $[\alpha]_D^{20} +25.9^\circ$ (*c* 2.04, CHCl₃); IR: 3431, 2946, 2873, 1736, 1641, 1456, 1391, 1375, 1267, 1219, 1118, 1067, 1009, 975, 884, 756. ¹H NMR (CHCl₃): 4.69 (br s, 1H, H-29), 4.59 (m, 2H, H-3, H-29), 4.39 (d, 1H, *J* = 11.2 Hz, H-28), 4.28 (m, 1H, H-2'), 4.25 (m, 1H, H-2'), 4.07 (d, 1H, *J* = 11.2 Hz, H-28), 3.90 (m, 1H, H-3'), 3.88 (m, 1H, H-3'), 3.85 (m, 1H, H-3'), 3.82 (m, 1H, H-3'), 2.43 (m, 1H, H-19), 2.20-0.70 (24H), 1.68 (s, 3H), 1.03 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 0.87 (s, 3H), 0.85 (s, 6H); ¹³C NMR (CDCl₃): 173.6, 173.1, 150.0, 110.2, 83.6, 71.7, 71.5, 64.7, 64.3, 64.3, 55.5, 50.4, 48.9, 47.8, 46.7, 42.9, 41.0, 38.4, 38.0, 37.8, 37.2, 34.5, 34.2, 29.8, 29.6, 28.1, 27.1, 25.2, 23.8, 20.9, 19.3, 18.3, 16.6, 16.3, 16.2, 14.9; HRMS *m/z* 641.4050 [*M* + Na]⁺, (calcd for C₃₆H₅₈O₈Na, 641.4024).

4.11. Betulin 3-acetate-28-(R)-D-glycerate (7b)

This compound was prepared from **6b** (155 mg, 0.25 mmol) dissolved in THF/MeOH/H₂O (14/4/4 mL) with 4 mL of HCl 25% as described for **7a**. The crude

product was purified by flash chromatography with EtOAc/hexanes (10:90 to 25:75) as eluent to afford 56 mg (39% yield) of **7b** as a white solid. $[\alpha]_D^{20} +25.5^\circ$ (*c* 0.62, CHCl₃); IR: 3442, 2945, 2872, 1733, 1642, 1455, 1391, 1371, 1246, 1216, 1116, 1067, 1029, 1017, 979, 883, 755. ¹H NMR (CHCl₃): 4.68 (br s, 1H, H-29), 4.59 (br s, 1H, H-29), 4.45 (m, 1H, H-3), 4.38 (d, 1H, *J* = 10.8 Hz, H-28), 4.28 (m, 1H, H-2'), 4.07 (d, 1H, *J* = 11.2 Hz, H-28), 3.91 (m, 1H, H-3'), 3.84 (m, 1H, H-3'), 2.42 (m, 1H, H-19), 2.30-0.70 (24H), 2.04 (s, 3H), 1.67 (s, 3H), 1.02 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.84 (s, 3H), 0.83 (s, 3H), 0.82 (s, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃): 173.6, 171.2, 150.0, 110.2, 81.0, 71.7, 64.7, 64.2, 55.5, 50.4, 48.9, 47.8, 46.7, 42.8, 41.0, 38.5, 37.9, 37.8, 37.2, 34.5, 34.2, 29.8, 29.6, 28.1, 27.1, 25.3, 23.8, 21.5, 20.9, 19.3, 18.3, 16.6, 16.3, 16.1, 14.9; HRMS *m/z* 595.3946 [M + Na]⁺, (calcd for C₃₅H₅₆O₆Na, 595.3974).

4.12. Betulin 28-acetate-3-(*R*)-D-glycerate (**7c**)

This compound was prepared from **6c** (147 mg, 0.24 mmol) dissolved in THF/MeOH/H₂O (14/4/4 mL) with 4 mL of HCl 25% as described for **7a**. The crude product was purified by flash chromatography with EtOAc/hexanes (10:90 to 25:75) as eluent to afford 60 mg (44% yield) of **7c** as a white solid. $[\alpha]_D^{20} +27.3^\circ$ (*c* 0.62, CHCl₃); IR: 3447, 2945, 2872, 1738, 1641, 1456, 1389, 1365, 1233, 1117, 1066, 1033, 1009, 976, 883, 756. ¹H NMR (CHCl₃): 4.67 (br s, 1H, H-29), 4.57 (m, 2H, H-29, H-3), 4.24 (m, 2H, H-28, H-2'), 3.86 (m, 1H, H-3'), 3.83 (d, 1H, *J* = 11.2 Hz, H-28), 3.80 (m, 1H, H-3'), 2.42 (m, 1H, H-19), 2.30-0.70 (24H), 2.06 (s, 3H), 1.67 (s, 3H), 1.02 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.85 (s,

3H), 0.84 (s, 6H); ^{13}C NMR (CDCl_3): 173.0, 171.8, 150.2, 110.0, 83.6, 71.5, 64.3, 62.9, 55.4, 50.4, 48.9, 47.8, 46.4, 42.8, 41.0, 38.4, 38.0, 37.6, 37.2, 34.7, 34.2, 29.8, 29.7, 28.1, 27.2, 25.2, 23.8, 21.2, 20.9, 19.2, 18.2, 16.6, 16.2, 16.1, 14.8; HRMS m/z 595.4000 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, (calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{56}\text{O}_6 \text{Na}$, 595.3974).

4.13. Cell lines and culture conditions

Human lung carcinoma (A-549), human colon adenocarcinoma (DLD-1) and human normal fibroblasts (WS1) cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). All cell lines were cultured in minimum essential medium containing Earle's salts and L-glutamine (Mediatech Cellgrow, VA), to which were added 10% foetal bovine serum (Hyclone), vitamins (1x), penicillin (100 IU/mL), streptomycin (100 $\mu\text{g/mL}$), essential amino acids (1x) and sodium pyruvate (1x) (Mediatech Cellgrow, VA). Cells were kept at 37 °C in a humidified environment containing 5% CO_2 .

4.14. Cytotoxicity assay

Exponentially growing cells were plated in 96-well microplates (Costar, Corning Inc.) at a density of 5×10^3 cells per well in 100 μL of culture medium and were allowed to adhere for 16 h before treatment. Increasing concentrations of each compound in DMSO (Sigma-Aldrich) were then added (100 μL per well) and the cells were incubated for 48 h. The final concentration of DMSO in the culture medium was maintained at 0.5% (v/v) in

avoid solvent toxicity. Cytotoxicity was assessed using resazurine²⁰ on an automated 96-well Fluoroskan Ascent F1TM plate reader (Labsystems) using excitation and emission wavelengths of 530 and 590 nm, respectively. Fluorescence was proportional to the cellular metabolic activity in each well. Survival percentage was defined as the fluorescence in experimental wells compared to that in control wells after subtraction of blank values. Each experiment was carried out three times in triplicate. IC₅₀ results were expressed as means \pm standard deviation.

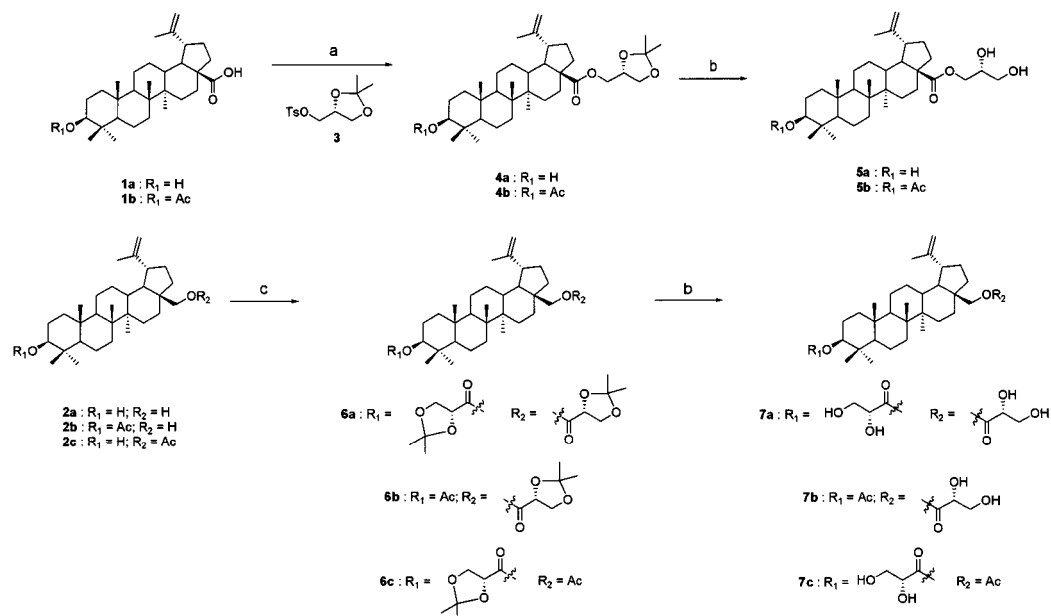
Acknowledgments

This work was supported by grants from le Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (fonds forestier 02) and by the Chaire de recherche sur les agents anticancéreux d'origine naturelle of Université du Québec à Chicoutimi.

References and notes

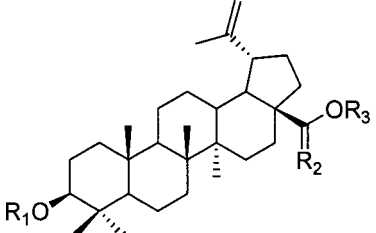
1. Gauthier, C.; Legault, J.; Lebrun, M.; Dufour, P.; Pichette, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6713-6725.
2. Thibeault, D.; Gauthier, C.; Legault, J.; Bouchard, J.; Dufour, P.; Pichette, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6144-6157.
3. Author's results not published.
4. Křen, V.; Martinková, L. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 1303-1328.
5. Mahato, S. B.; Sen, S. *Phytochemistry*, **1997**, *44*, 1185-1236.
6. Udeani, G. O.; Zhao, G. M.; Geun Shin, Y.; Cooke, B. P.; Graham, J.; Beecher, C. W.; Kinghorn, A. D.; Pezzuto, J. M. *Biopharm. Drug. Dispos.* **1999**, *20*, 379-383.
7. Anisimov, M. M.; Shentsova, E. B.; Shcheglov, V. V.; Strigina, L. I.; Uvarova, N. I.; Levina, E. V.; Oshitok, G. I.; Elyakov, G. B. *Toxicon*, **1978**, *16*, 31-36.
8. Faulkner, D. J. *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 1-48.
9. Gavagnin, M.; Carbone, M.; Mollo, E.; Cimino, G. *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 5579-5583 and cited references therein.
10. Manini, P.; La Pietra, P.; Panzella, L.; Napolitano, A.; d'Ischia, M. *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 1828-1833.
11. Kasper, M.; Roehlecke, C.; Witt, M.; Fehrenbach, H.; Hofer, A.; Miyata, T.; Weigert, C.; Funk, R. H. W.; Schleicher, E. D. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2000**, *23*, 485-491.

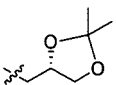
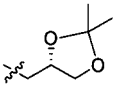
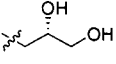
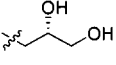
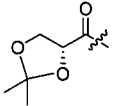
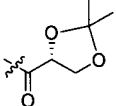
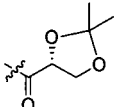
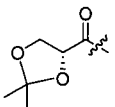
12. Murata-Kamiya, N.; Kamiya, H.; Kaji, H.; Kasai, H. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 1897-1902.
13. Sady, C.; Jiang, C. L.; Chellan, P.; Madhun, Z.; Duve, Y.; Glomb, M. A.; Nagaraj, R. H. *Biochim. Biophys. Acta*, **2000**, *1481*, 255-264.
14. Niwa, H.; Takeda, A.; Wakai, M.; Miyata, T.; Yasuda, Y.; Mitsuma, T.; Kurokawa, K.; Sobue, G.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *248*, 93-97.
15. Tanaka, A.; Yamashita, K. *Agric. Biol. Chem.* **1980**, *44*, 199-202.
16. Schmid, C. R.; Bryant, J. D.; Dowlatzadah, M.; Phillips, J. L.; Prather, D. E.; Schantz, R. D.; Sear, N. L.; Vianco, C. S. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4056-4058.
17. Schmid, C. R.; Bryant, J. D. *Org. Syn. Coll. Vol. 9*, **1998**, 450-453.
18. Earle, M. J.; Abdur-Rashid, A.; Priestley, N. D. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5697-5700.
19. Hubschwerlen, C.; Specklin, J.-L.; Higelin, J. *Org. Syn. Coll. Vol. 9*, **1998**, 454-456.
20. O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5421-5426.

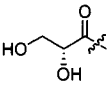
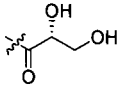
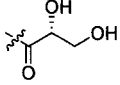
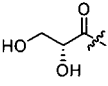


Scheme 5-1. Syntheses of (*R*)-D-glycerates.

Reagents and conditions: a) Compound **3** (1.5 eq.), DBU (1.1 eq.), CH_2Cl_2 , reflux, overnight; b) HCl 25%, MeOH:THF:H₂O, rt, overnight; c) (*R*)-2,3-isopropylidene-D-glycerol chloride (1.5 eq.), DMAP (1 eq.), pyridine, 95 °C, 2 h.

Table 5-1. In vitro cytotoxicity of (*R*)-*D*-glycerates.


Compound	R ¹	R ²	R ³	Cell line IC ₅₀ (μM ± SD) ^a		
				A-549 ^b	DLD-1 ^c	WS1 ^d
1a	H	O	H	10.3 ± 0.4 ^e	15.0 ± 0.3 ^e	12 ± 1 ^e
1b	Ac	O	H	18 ± 2 ^e	20 ± 2 ^e	57 ± 6 ^e
2a	H	H ₂	H	3.80 ± 0.09 ^e	6.6 ± 0.3 ^e	3.58 ± 0.07 ^e
2b	Ac	H ₂	H	>200 ^e	>200 ^e	>200 ^e
2c	H	H ₂	Ac	75 ± 7 ^e	56 ± 4 ^e	44 ± 2 ^e
4a	H	O		30 ± 4	96 ± 6	43 ± 4
4b	Ac	O		>100	>100	>100
5a	H	O		16 ± 1	23 ± 1	13.7 ± 0.4
5b	Ac	O		16.5 ± 0.9	18 ± 3	15 ± 2
6a		H ₂		>100	>100	>100
6b	Ac	H ₂		>200	>200	>200
6c		H ₂	Ac	>200	>200	>200

7a		H ₂		31 ± 3	39 ± 2	40 ± 2
7b	Ac	H ₂		16.3 ± 0.7	16 ± 1	16.4 ± 1.0
7c		H ₂	Ac	15.5 ± 0.9	16 ± 1	15 ± 2

Ac, acetate.

^a Data represent mean values ± standard deviation for three independent experiments made in triplicate.

^b Human lung carcinoma.

^c Human colorectal adenocarcinoma.

^d Human normal skin fibroblasts.

^e Results previously reported (ref. 2).

CHAPITRE 6

UNE APPROCHE EFFICACE POUR ACCÉDER AUX GERMANICANES À PARTIR DU BÉTULINOL

Résumé

Un nouvel accès hémisynthétique aux triterpènes de type germanicane a été développé à partir du bétulinol, un triterpène naturel de la famille du lupane. Le réarrangement de Wagner-Meerwein de l'acide bétulinique acétylé a permis de former le cycle E typique des germanicanes et une fonction lactone. Plusieurs dérivés de germanicanes peuvent être obtenus à partir de l'ouverture de la lactone comme le 19 β -machaérocérol et l'acide 19 β -machaérocérique. La cytotoxicité de quelques composés a été évaluée contre deux lignées cellulaires cancéreuses.

Tetrahedron Lett. **2007**, 48, 8416-8419

Useful approach to access germanicanes from betulin

Thibeault, D.; Legault, J.; Bouchard, J.; Pichette, A.*

Laboratoire d'Analyse et de Séparation des Essences Végétales (LASEVE)

Département des Sciences Fondamentales

Université du Québec à Chicoutimi, 555 boul. de l'Université

Chicoutimi, Québec, Canada, G7H 2B1

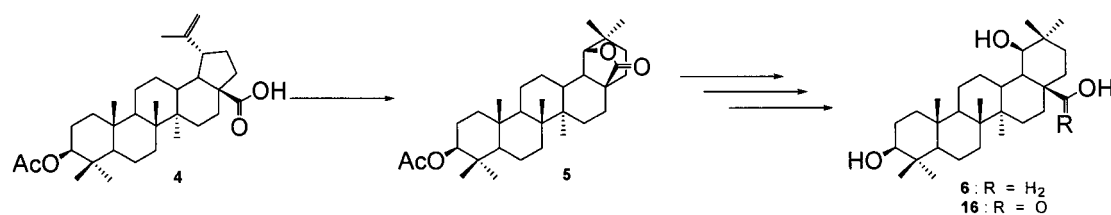
Keywords: Triterpenes; Germanicanes; Lupanes; Synthesis;

*Corresponding author. Tel: +1 418 545 5011; Fax: +1 418 545 5012, e-mail:
andre_pichette@uqac.ca

Graphical abstract

Useful approach to access germanicanes from betulin

Thibeault, D.; Legault, J.; Bouchard, J.; Pichette, A.*



A useful access to germanicane-type triterpenes was achieved from betulin, a natural triterpene of the lupane family. The cytotoxicity of some compounds was evaluated against cancerous cell lines.

Abstract

A new hemisynthetic access to germanicane-type triterpenes was achieved from betulin, a natural triterpene of the lupane family. The Wagner-Meerwein rearrangement of acetylated betulinic acid allowed to form the typical cycle E of germanicanes and a lactone function. Several germanicane derivatives can be obtained via the lactone ring-opening such as 19 β -machaeroceryl and 19 β -machaeroceric acid. The cytotoxicity of some compounds was evaluated against two cancerous cell lines.

1. Introduction

Germanicanes such as machaeroceric acid (**1**) and 19 β -machaeroceryl (**6**) are pentacyclic triterpenes related to the oleanane family. The stereochemistry of the hydrogen located at position 18 differentiates those two families (hydrogen atom on C-18 is in the α configuration for the germanicanes). Germanicanes other than allobetulin (**2**)¹⁻² and 28-oxoallobetulin (**3**)³⁻⁴ have been rarely reported in the literature.⁵⁻¹¹ Machaeroceric acid (**1**) was isolated from a hydrolysed methanol extract of *Machaerocereus eruca*⁵⁻⁶ and 18 α -oleanane was isolated from leaves of *Bryophyllum Pinnatum*.⁷ Some germanicanes were used to develop the reductive cleavage conditions for hindered lactones.⁸ Several germanicanes were prepared via the epimerisation in alkaline condition of H-18 in natural triterpenes (oleanolic acid, hederagenin, glycyrrhetic acid)⁹. Germanicane derivatives obtained showed an interesting anticarcinogenic activity⁹. Other germanicane compounds were obtained by derivation of a dehydrogenated lupane oxide.⁴ Some derivatives of 28-oxoallobetulin and allobetulin prepared by our group showed a moderate cytotoxicity against tumor cell lines.¹⁰ Finally, germanicanes are often found in sediments and crude oils.¹¹

During our research on the anticancer properties of lupane and germanicane derivatives, we reported the preparation of allobetulin (**2**)² and 28-oxoallobetulin (**3**)¹⁰ from betulin and betulinic acid, triterpenes of the lupane family. The preparation of some germanicane derivatives is possible via the lactone opening of 28-oxoallobetulin. In this

paper, we report the study of a useful access to germanicanes from betulin. A cytotoxic evaluation of some derivatives was performed on human cancerous cell lines (A-549 and DLD-1).

2. Results and discussion

2.1 Chemistry

A previous report by our research group¹⁰ describes the easy and efficient synthesis of 3-acetylbetulinic acid (**4**) from betulin, a natural compound available in large quantities from the outer barks of *Betula papyrifera* March. The overall yield of the reaction sequence was of 67%. The Wagner-Meerwein rearrangement with a FeCl₃/SiO₂ mixture¹⁰ in refluxing CH₂Cl₂ was applied to the derivative **4**. Lactone ring-opening¹²⁻¹³ and acetate deprotection of **5** were carried out with LiAlH₄ in refluxed THF to obtain the 19 β -machaeroceryl (**6**)^{8,14} in good yield (72% from **4**, scheme 6-1).

At this point, we aimed to selectively oxidize the C-28 alcohol by a protection-deprotection strategy. Tritylation of the C-28 alcohol of compound **6** was thus performed but the instability of the trityl derivative was important enough to justify the use of acetate, even if the yield of acetylation (64%) was lower than that of tritylation (86%). However, the diacetate compound **8** recovered (15%) can be reused by hydrolysing the acetates to obtain compound **6**. It is interesting to note that at this step, no acetylated compound was observed on the C-19 alcohol, confirming the more important steric hindrance of this position compared to the C-3 alcohol. Taking advantage of these different chemical environments, pivaloate was used as a protective group of C-3 alcohol on compound **7**, with a 96% yield of pivaloate **9**. As was the case with acetylation, no pivaloate ester was

observed at position C-19. Compound **9** was then hydrolysed to obtain diol **10** in quantitative yield and further oxidation with TPAP/NMO led to lactone **11** (scheme 6-2) instead of the anticipated compound **14** (scheme 6-3). Since the presence of a secondary alcohol at C-19 induced lactonisation during oxidation of **10**, the formation of the ketone **12** from **9** followed by hydrolysis of acetate was considered to avoid lactonisation. Overnight oxidation of **9** with PCC in CH₂Cl₂ resulted in the ketone **12** with a 81% yield. The great steric hindrance of this position was reflected again since oxidation was quite slow. Hydrolysis of the acetate in quantitative yield permitted the obtention of **13** and another oxidation with PCC led to the aldehyde **14** in a 86% yield. Carboxylic acid was successfully obtained by a modified procedure of Clive and co-workers,¹⁵ using pyridine as a co-solvent to improve solubility of **15** and the kinetic of oxidation. At this point, reduction of the ketone was attempted with several hydride reductor agents (LiAlH₄, NaBH₄, K-Selectride®, Me₄NBH(OAc)₃). The β-product (on C-19) was obtained with only traces of the α-product. Reduction and deprotection of compound **15** with LiAlH₄ in THF at 0 °C resulted in 19β-machaeroceric acid (**16**)¹⁶ in an excellent yield (97% from **14**). It is interesting to mention that we tried to prepare compound **16** from compound **5** by using several hydrolysis conditions without success.

2.2 Cytotoxic activity

The cytotoxicity of compounds **6**, **7**, **8**, **10** and **16** was tested against human lung carcinoma (A-549) and colorectal adenocarcinoma (DLD-1) human cell lines as described

by O'Brien et al.¹⁷ Betulinic acid, etoposide and 5-fluouracil (5-FU) were used as positive controls. The results presented in table 6-1 show that compound **6** possesses the highest cytotoxic activity with concentrations inhibiting fifty percent of cell growth (IC_{50}) of $14 \pm 3 \mu M$ for A-549 and $18 \pm 4 \mu M$ for DLD-1. These results are comparable to those of the betulinic acid and 5-fluouracil. In comparison with compound **6**, the modifications of hydroxyl at position R^1 (compounds **8**, **10**) and functional group at position R^2 (compounds **7**, **8**, **16**) reduce or inhibit the cytotoxic activity (table 6-1).

3. Conclusion

In conclusion, a new hemisynthetic access to germanicane-type triterpenes from betulinic acid has been developed. This approach allowed to obtain some germanicane derivatives. The evaluation of the cytotoxic activity of some of the synthesized compounds shows that derivative **6** is the most active against the two cancer cell lines tested.

4. Experimental

4.1 Chemicals

Chemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich Co. Canada or Alfa Aesar Co. and were used as received. The usual solvents were obtained from VWR International Co. and were used as received. Dichloromethane (DCM) was distilled from anhydrous CaH_2 under argon atmosphere. Tetrahydrofuran (THF) was distilled from sodium/benzophenone ketyl under argon atmosphere. All anhydrous and air sensitive reactions were performed in oven-dried glassware under positive argon pressure. Analytical thin-layer chromatography was performed with silica gel 60 F₂₅₄, 0.25 mm pre-coated TLC plates (Silicycle, Quebec, Canada). Aliphatic compounds were visualised using aqueous sulphuric acid solution of ammonium heptamolybdate tetrahydrate (10 g/100 mL H_2SO_4 + 900 mL H_2O). Flash column chromatographies were performed on 230-400 mesh silica gel R12030B (Silicycle, Quebec, QC, Canada). Infrared spectra (IR) were recorded with a Perkin-Elmer Spectrum One FT-IR spectrophotometer (Shelton, Connecticut, USA) on a NaCl window from a thin film of the analyzed compounds and only significant absorption bands were reported in cm^{-1} . Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a Bruker Avance spectrometer at 400 MHz (^1H) and 100 MHz (^{13}C), equipped with a 5 mm QNP probe. Elucidations of chemical structures were based on ^1H , ^{13}C , COSY, NOESY, HMBC, HSQC and DEPT-135 experiments. Signals are reported as m (multiplet), s (singlet), d (doublet), dd (doublet of doublet), br s (broad

singlet) and coupling constants are reported in hertz (Hz). The chemical shifts are reported in ppm (δ) relative to residual solvent peak. The labile OH NMR signals sometime appearing were not listed. Optical rotations were obtained in 10% MeOH/CHCl₃ (v/v) using sodium D line at ambient temperature on a Jasco DIP360 digital polarimeter. High-resolution mass spectra (HRMS) were obtained at the Department of Chemistry, Queen's University, Ontario, Canada. Betulinic acid was previously synthesized in our laboratory.¹⁰ Compound **15** was not characterized.

4.2 19 β -machaeroceryl (6)

5.82 g of betulinic acid-3-acetate (**4**) (11.67 mmol) was stirred under reflux in 125 mL of CH₂Cl₂ with a mixture of FeCl₃/SiO₂ (1/4) ground on a mortar (5.67 g/22.70 g, 35.01 mmol of FeCl₃) for 3 hours. The mixture was then cooled to room temperature and filtered on celite, washed with 1% MeOH in CH₂Cl₂ and evaporated under reduced pressure. The crude product was dissolved in THF (50 mL) under an argon atmosphere and 2.22 g of LiAlH₄ (58.35 mmol) was slowly added. The mixture was stirred under reflux for 90 minutes, cooled to room temperature and excess of LiAlH₄ was slowly neutralized with MeOH, followed by water. The mixture was filtered, rinsed with 5% MeOH in CH₂Cl₂ and the filtrate was evaporated under reduced pressure. The product was purified by flash chromatography on silica gel with MeOH/CH₂Cl₂ (1:99 to 4:96) as eluent to afford 3.80 g (72% yield) of compound **6** as a white solid. See reference 14 for detailed characterization.

4.3 19 β -Machaeroceryl 28-acetate (7) and 19 β -machaeroceryl 3,28-diacetate (8)

908 mg of compound **6** (1.97 mmol), 292 μ L of Ac₂O (2.96 mmol) and 24 mg of DMAP (0.2 mmol) were dissolved in 20 mL of pyridine at room temperature and stirred 2 hours. The solution was diluted in 25 mL of CH₂Cl₂ and 25 mL of distilled water. The pyridine was neutralised with H₂SO₄ 6.2 M (25 mL) at 0 °C and extracted with CH₂Cl₂ three times. The combined organic layers were washed with saturated NaHCO₃ until pH \approx 7. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel with EtOAc/Hexanes (10:90 to 20:80) as eluent to afford 634 mg (64% yield) of compound **7** and 161 mg (15% yield) of compound **8** as white solids. Compound **7**: $[\alpha]_D^{20}$ +21.4° (*c* 0.35); IR: 3476, 2941, 2867, 1719, 1460, 1388, 1364, 1262, 1247, 1115, 1029, 973, 908, 733; ¹H NMR (CDCl₃): 4.61 (d, 1H, *J* = 11.8 Hz, H-28), 4.26 (d, 1H, *J* = 11.8 Hz, H-28), 3.30 (br s, 1H, H-19 α), 3.18 (dd, 1H, *J* = 11.2 Hz, *J* = 5.0 Hz, H-3), 2.03 (s, 3H), 2.00-0.60 (24H), 1.04 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.93 (s, 6H), 0.89 (s, 3H), 0.83 (s, 3H), 0.75 (s, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃): 171.50, 79.10, 74.66, 62.71, 55.49, 50.28, 42.70, 42.15, 41.13, 39.00, 38.86, 37.24, 37.11, 35.37, 33.96, 32.67, 31.71, 31.47, 29.52, 28.11, 27.93, 27.49, 26.49, 25.78, 24.71, 21.24, 20.93, 18.40, 16.24, 16.01, 15.49, 14.84; HRMS *m/z* 525.3905 [*M* + Na]⁺, (calcd for C₃₂H₅₄O₄Na, 525.3920). Compound **8**: $[\alpha]_D^{20}$ +24.6° (*c* 0.56); IR: 3528, 2944, 2869, 1733, 1722, 1460, 1388, 1365, 1246, 1115, 1028, 978, 907, 733; ¹H NMR (CDCl₃): 4.60 (d, 1H, *J* = 11.8 Hz, H-28), 4.47 (m, H-3), 4.27 (d, 1H, *J* = 11.9 Hz, H-28), 3.31 (br s, 1H, H-19 α), 2.04 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.00-0.60 (24H), 1.05 (s, 3H), 0.94 (s,

6H), 0.90 (s, 3H), 0.86 (s, 3H), 0.84 (s, 6H); ^{13}C NMR (CDCl_3): 171.49, 171.20, 81.09, 74.70, 62.71, 55.60, 50.22, 42.69, 42.18, 41.17, 38.56, 37.93, 37.17, 37.13, 35.38, 33.92, 32.69, 31.72, 31.48, 29.54, 28.07, 27.93, 26.50, 25.78, 24.70, 23.81, 21.48, 21.26, 20.96, 18.30, 16.63, 16.33, 16.04, 14.82; HRMS m/z 567.4049 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, (calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{56}\text{O}_5\text{Na}$, 567.4025).

4.4 19 β -Machaeroceryl 28-acetate-3-pivaloate (9)

3.80 g (7.56 mmol) of acetate **7**, 2.79 mL of pivaloyl chloride (22.67 mmol) and 9.20 mg of DMAP (0.76 mmol) were dissolved in 40 mL of pyridine and stirred at 80 °C overnight. The mixture was then cooled to room temperature, diluted in 50 mL of CH_2Cl_2 and 50 mL of distilled water. The pyridine was neutralized with H_2SO_4 6.2 M (50 mL) at 0 °C and then extracted with CH_2Cl_2 (50 mL) three times. The combined organic layers were washed with saturated NaHCO_3 until $\text{pH} \approx 7$. The organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel using $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (0:100 to 2:98) as eluent to afford 4.28 g of compound **9** (96% yield) as a white solid. $[\alpha]_D^{20} +26.0^\circ$ (c 0.53); IR: 3548, 2949, 2871, 1724, 1480, 1460, 1389, 1364, 1284, 1240, 1171, 1115, 1031, 976, 893, 739, 704; ^1H NMR (CDCl_3): 4.59 (d, 1H, $J = 11.8$ Hz, H-28), 4.40 (m, 1H, H-3), 4.27 (d, 1H, $J = 11.9$ Hz, H-28), 3.30 (br s, 1H, H-19), 2.10-0.70 (24H), 2.01 (s, 3H), 1.17 (s, 12H), 1.03 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.88 (s, 3H), 0.85 (s, 3H), 0.84 (s, 3H), 0.82 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3): 178.28, 171.50, 80.45, 74.58, 62.70, 55.52, 50.14, 42.64, 42.12, 41.11, 39.08,

38.08, 37.13, 37.08, 35.33, 33.85, 32.61, 31.66, 31.43, 29.49, 28.05, 27.92, 27.39, 27.30 (3x), 26.45, 25.75, 24.63, 23.53, 21.20, 20.89, 18.21, 16.67, 16.24, 15.97, 14.80; HRMS m/z 609.4470 $[M + Na]^+$, (calcd for $C_{37}H_{62}O_5Na$, 609.4495).

4.5 19 β -Machaeroceryl 3-pivaloate (**10**)

150 mg of compound **9** was dissolved in a NaOH 0.25 N solution of MeOH/THF/H₂O (0.05M) and stirred at room temperature for 3 h. The mixture was diluted in CH₂Cl₂ and washed with HCl 10% and brine. The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The diol **10** obtained in quantitative yields was used for the next synthetic step without further purification. $[\alpha]_D^{20}$ +35.3° (*c* 0.56); IR: 3121, 2943, 2870, 1722, 1455, 1389, 1361, 1284, 1171, 1029, 975, 892, 756; ¹H NMR (CDCl₃): 4.33 (m, 1H, H-3), 4.01 (d, 1H, *J* = 11.5 Hz, H-28), 3.21 (d, 1H, *J* = 11.6 Hz, H-28), 3.17 (br s, 1H, H-19), 2.00-0.70 (24H), 1.11 (s, 9H), 0.95 (s, 3H), 0.87 (s, 3H), 0.84 (s, 3H), 0.82 (s, 3H), 0.79 (s, 3H), 0.78 (s, 3H), 0.75 (s, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃): 178.77, 80.71, 73.81, 65.37, 55.38, 49.93, 42.37, 41.73, 41.04, 39.04, 38.25, 37.98, 37.55, 37.02, 35.35, 35.24, 34.54, 33.78, 32.49, 31.10, 28.10, 27.89, 27.09 (3x), 26.70, 25.82, 24.15, 23.41, 20.75, 18.08, 16.50, 16.03, 15.72, 14.57; HRMS m/z 567.4414 $[M + Na]^+$, (calcd for $C_{35}H_{60}O_4Na$, 567.4389).

4.6 28-Oxoallobetulin 3-pivaloate (**11**)

100 mg of diol **10** (0.18 mmol) was dissolved in 5 mL of anhydrous CH₂Cl₂ at room temperature under argon atmosphere with 4Å molecular sieves. Then, 32 mg of NMO (0.28 mmol) and 3.2 mg (9.18 μmol) of TPAP was added to the solution and stirred overnight. Thereafter, the mixture was filtered on celite, rinsed with CH₂Cl₂ and evaporated under reduced pressure. The product was purified by flash chromatography on silica gel using MeOH/CH₂Cl₂ (0:100 to 1:99) to afford lactone **11** in quantitative yields as a white solid. $[\alpha]_D^{20} +50.7^\circ$ (*c* 0.70); IR: 2945, 2926, 2867, 1760, 1720, 1444, 1389, 1287, 1175, 1069, 1016, 965, 922, 770; ¹H NMR (CDCl₃): 4.42 (m, 1H, H-3), 3.94 (s, 1H, H-19), 2.00-0.70 (24H), 1.19 (s, 3H), 1.02 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.91 (s, 3H), 0.87 (s, 3H), 0.86 (s, 3H), 0.85 (s, 3H), 0.84 (s, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃): 180.03, 178.36, 86.16, 80.38, 55.73, 51.30, 46.87, 46.26, 40.74, 40.09, 39.16, 38.69, 38.18, 37.36, 36.17, 33.81, 33.70, 32.48, 32.10, 28.90, 28.08, 28.04, 27.37 (3x), 26.65, 25.70, 24.11, 23.61, 21.06, 18.17, 16.72 (2x), 15.68, 13.82; HRMS *m/z* 563.4087 [M + Na]⁺, (calcd for C₃₅H₅₆O₄Na, 563.4076).

4.7 Machaerocer-19-one 28-acetate-3-pivaloate (**12**)

4.28 g of alcohol **9** (7.29 mmol) and 7.86 g of PCC (36.47 mmol) were dissolved in 40 mL of CH₂Cl₂ at room temperature and stirred overnight. The solution was directly purified by flash chromatography on silica gel using MeOH/CH₂Cl₂ (0:100 to 1:99) as eluent to afford 3.45 g (81% yield) of ketone **12** as a white solid. $[\alpha]_D^{20} +39.6^\circ$ (*c* 0.50); IR:

2943, 2869, 1725, 1479, 1460, 1389, 1364, 1284, 1238, 1168, 1030, 976, 756; ^1H NMR (CDCl_3): 4.40 (m, 1H, H-3), 4.14 (d, 1H, $J = 11.9$ Hz, H-28), 3.58 (d, 1H, $J = 11.8$ Hz, H-28), 2.69 (d, 1H, $J = 11.4$ Hz, H-18), 2.10-0.60 (23H), 2.00 (s, 3H), 1.17 (s, 12H), 1.01 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.85 (s, 3H), 0.83 (s, 3H), 0.81 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3): 215.20, 178.22, 170.85, 80.36, 60.82, 55.61, 51.84, 50.79, 45.77, 44.08, 41.28, 41.01, 39.08, 38.43, 38.11, 37.57, 37.21, 33.62, 32.25, 31.64, 30.14, 28.03, 27.31 (3x), 26.10, 25.47, 25.43, 25.31, 23.56, 20.97, 20.81, 18.20, 16.65, 16.35, 15.88, 15.35; HRMS m/z 585.4500 $[\text{M} + \text{H}]^+$, (calcd for $\text{C}_{37}\text{H}_{61}\text{O}_5$, 585.4519).

4.8 Machaerocer-19-one 3-pivaloate (**13**)

3.45 g of ketone **12** was dissolved in a mixture of MeOH/THF/ H_2O (40/80/40 mL), basified at 0.25 N with NaOH and stirred overnight. The mixture was acidified with HCl 10% and extracted with portions of CH_2Cl_2 (100 mL) three times. Combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated under reduced pressure. Alcohol **13** obtained in quantitative yields was used for the next synthetic step without further purification. $[\alpha]_D^{20} +50.1^\circ$ (c 0.30); IR: 3543, 2942, 2871, 1718, 1696, 1480, 1461, 1391, 1364, 1287, 1170, 1035, 977, 893, 770, 739; ^1H NMR (CDCl_3): 4.40 (m, 1H, H-3), 3.60 (d, 1H, $J = 11.5$ Hz, H-28), 3.13 (d, 1H, $J = 11.5$ Hz, H-28), 2.68 (d, 1H, $J = 11.4$ Hz, H-18), 2.10-0.60 (23H), 1.17 (s, 12H), 0.98 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.85 (s, 3H), 0.84 (s, 3H), 0.81 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3): 216.26, 178.29, 80.41, 58.69, 55.59, 52.18, 50.83, 45.80, 45.15, 41.31, 41.03, 39.10, 38.42, 38.12, 37.75, 37.22, 33.66, 31.63, 31.54, 29.31,

28.03, 27.32 (3x), 26.05, 25.57, 25.55, 25.40, 23.56, 20.88, 18.21, 16.65, 16.38, 15.82, 15.34; HRMS m/z 543.4394 $[M + H]^+$, (calcd for $C_{35}H_{59}O_4$, 543.4413).

4.9 Machaerocer-19-one 3-pivaloate aldehyde (**14**)

3.20 g (5.90 mmol) of compound **13** was dissolved in 60 mL of CH_2Cl_2 and stirred 3 hours at room temperature with 2.54 g (11.80 mmol) of PCC. The solution was directly purified by flash chromatography on silica gel using pure CH_2Cl_2 as eluent to afford 2.73 g (86% yield) of aldehyde **14** as a white solid. $[\alpha]_D^{20} +55.9^\circ$ (c 0.88); IR: 2927, 2859, 1720, 1442, 1369, 1287, 1175, 979, 769; 1H NMR ($CDCl_3$): 9.45 (s, 1H, H-28), 4.39 (m, 1H, H-3), 2.63 (d, 1H, $J = 11.1$ Hz, H-18), 2.00-0.70 (23H), 1.17 (s, 12H), 0.98 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.91 (s, 3H), 0.85 (s, 3H), 0.83 (s, 3H), 0.80 (s, 3H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$): 213.56, 206.26, 178.23, 80.33, 56.10, 55.60, 50.93, 49.52, 45.79, 41.09, 41.03, 39.08, 38.45, 38.10, 37.66, 37.21, 33.70, 33.54, 31.87, 30.71, 28.01, 27.86, 27.31 (3x), 25.54, 25.46, 25.44, 23.54, 20.84, 18.17, 16.63, 16.42, 15.70, 15.28; HRMS 563.4053 m/z $[M + Na]^+$, (calcd for $C_{35}H_{56}O_4Na$, 563.4076).

4.10 19 β -Machaeroceric acid (**16**)

2.73 g of compound **14** (5.05 mmol) was dissolved in 110 mL of THF and 30 mL of pyridine. The solution was stirred and cooled with an iced-bath. Then, 80 mL of freshly prepared solution of aqueous $NaH_2PO_4/NaClO_2$ (6.83 g/6.83 g in 80 mL of distilled water)

was slowly added to the solution and the mixture was stirred 30 minutes at this temperature. After, the mixture was poured into 100 mL of saturated NH_4Cl and extracted three times with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated under reduced pressure. Thereafter, the crude compound was redissolved in 120 mL of anhydrous THF in an iced-bath under an argon atmosphere and 479 mg (12.62 mmol) of LiAlH_4 was slowly added. The mixture was stirred for 30 minutes at 0 °C and excess of LiAlH_4 was slowly neutralized with MeOH, followed by water. The mixture was filtered, rinsed with 5% MeOH in CH_2Cl_2 and the filtrate was evaporated under reduced pressure. The product was purified by flash chromatography on silica gel with MeOH/ CH_2Cl_2 (3:97 to 8:92) as eluent to afford 2.34 g (97% yield) of compound **16** as a white solid. See reference 16 for detailed characterization.

4.11 Cell lines and culture conditions

Human lung carcinoma (A-549), human colon adenocarcinoma (DLD-1) and human normal fibroblasts (WS1) cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). All cell lines were cultured in minimum essential medium containing Earle's salts and L-glutamine (Mediatech Cellgrow, VA), to which were added 10% foetal bovine serum (Hyclone), vitamins (1x), penicillin (100 IU/mL), streptomycin (100 µg/mL), essential amino acids (1x) and sodium pyruvate (1x) (Mediatech Cellgrow, VA). Cells were kept at 37 °C in a humidified environment containing 5% CO_2 .

4.12 Cytotoxicity assay

Exponentially growing cells were plated in 96-well microplates (Costar, Corning Inc.) at a density of 5×10^3 cells per well in 100 μL of culture medium and were allowed to adhere for 16 h before treatment. Increasing concentrations of each compound in DMSO (Sigma-Aldrich) were then added (100 μL per well) and the cells were incubated for 48 h. The final concentration of DMSO in the culture medium was maintained at 0.5% (v/v) to avoid solvent toxicity. Cytotoxicity was assessed using resazurine¹⁷ on an automated 96-well Fluoroskan Ascent F1TM plate reader (Labsystems) using excitation and emission wavelengths of 530 and 590 nm, respectively. Fluorescence was proportional to the cellular metabolic activity in each well. Survival percentage was defined as the fluorescence in experimental wells compared to that in control wells after subtraction of blank values. Each experiment was carried out three times in triplicate. IC_{50} results were expressed as means \pm standard deviation.

Acknowledgments

This work was supported by grants from le Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (fonds forestier 02) and by the Chaire de recherche sur les agents anticancéreux d'origine naturelle of Université du Québec à Chicoutimi. We thank Serge Lavoie, Charles Gauthier, Maxime Lebrun and Catherine Dussault for their suggestions and technical help.

References and notes

1. Klinot, J.; Budesinsky, M.; Svetly, J. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1990**, *55*, 766-781 and cited references therein.
2. Lavoie, S., Pichette, A., Garneau, F.-X., Girard, M., Gaudet, D. *Synth. Commun.* **2001**, *31*, 1565-1571.
3. Achari, B.; Pakrashi, S. C. *Tetrahedron*, **1976**, *32*, 741-744.
4. Vystrcil, A.; Blecha, Z. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1970**, *35*, 3309-3319 and cited references therein.
5. Ye, Y.; Kinoshita, K.; Koyama, K.; Takahashi, K.; Kondo, N.; Yuasa, H. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 456-460.
6. Kinoshita, K.; Ye, Y.; Yama, T.; Takizawa, T.; Koyama, K.; Takahashi, K. *Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen*, **1998**, *40*, 359-364.
7. Siddiqui, S.; Faizi, S.; Siddiqui, B. S.; Sultana, N. *Phytochemistry*, **1989**, *28*, 2433-2438.
8. Pradhan, B. P.; Chakraborty, D. K.; Roy, A. *Indian J. Chem.* **1993**, *32B*, 721-725.
9. Nishino, H.; Nishino, A.; Takayasu, J.; Hasegawa, T.; Iwashima, A.; Hirabayashi, K. *Cancer Res.* **1988**, *48*, 5210-5215.
10. Thibeault, D.; Gauthier, C.; Legault, J.; Bouchard, J.; Dufour, P.; Pichette, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6144-6157.
11. Trendel, J. M.; Graff, R.; Albrecht, P. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 2959-2962.

12. Djerassi, C.; Farkas, E.; Lemin, A. J.; Collins, J. C.; Walls, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 2969-2973.
13. Chopra, C. S.; Cole, A. R. H.; Theiberg, K. J. L., White, D. E.; Arthur, H. R. *Tetrahedron*, **1965**, *21*, 1529-1536.
14. Compound **6**: $[\alpha]_D^{20} +33.2^\circ$ (*c* 0.29, 10% MeOH in CHCl₃); IR (NaCl film): 3246, 2935, 2867, 1448, 1387, 1092, 1026, 985, 756; ¹H NMR (CDCl₃): 4.14 (d, *J* = 11.6 Hz, H-28), 3.43 (d, *J* = 11.7 Hz, H-28), 3.34 (br s, H-19α), 3.20 (dd, *J* = 11.1 Hz, 5.1 Hz, H-3), 2.10-0.60 (24H), 1.04 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.95 (s, 6H), 0.92 (s, 3H), 0.84 (s, 3H), 0.76 (s, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃): 79.14, 74.81, 64.98, 55.48, 50.24, 42.50, 42.06, 41.21, 39.02, 38.87, 37.90, 37.27, 35.40, 34.79, 34.04, 33.81, 32.64, 30.95, 29.86, 28.13, 27.51, 26.84, 25.98, 24.55, 20.95, 18.42, 16.25, 16.04, 15.52, 14.77; HRMS *m/z* 459.3816 [M - H]⁺, (calcd for C₃₀H₅₁O₃, 459.3838).
15. Clive, D. L. J.; Wickens, P. L.; da Silva, G. V. J.; *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5532-5536.
16. Compound **16**: $[\alpha]_D^{20} +29.9^\circ$ (*c* 0.76, 10% MeOH in CHCl₃); IR (NaCl film): 3301, 2938, 2867, 1680, 1444, 1386, 1317, 1212, 1135, 1113, 1030, 972, 828, 777; ¹H NMR (Pyr-*d*₅): 3.53 (br s, 1H, H-19), 3.47 (m, 1H, H-3), 2.56 (m, 1H, H-13), 2.43 (m, 1H, H-16), 2.30 (m, 1H, H-12), 2.15 (m, 1H, H-7), 2.00-0.70 (20H), 1.25 (s, 6H), 1.09 (s, 3H), 1.03 (s, 6H), 0.99 (s, 3H), 0.80 (s, 3H); ¹³C NMR (Pyr-*d*₅): 183.06, 78.45, 73.73, 56.30, 51.09, 50.78, 42.76, 42.70, 41.60, 39.90, 39.56, 37.81, 36.81, 36.54, 36.08, 34.96, 34.83, 31.51, 30.01, 29.43, 29.06, 28.69, 26.12, 24.93,

21.61, 19.12, 16.77, 16.73, 16.49, 15.50; HRMS m/z 475.3810 $[M - H]^-$, (calcd for $C_{30}H_{51}O_4$, 475.3787).

17. O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. *Eur. J. Biochem.* **2000**, 267, 5421-5426.

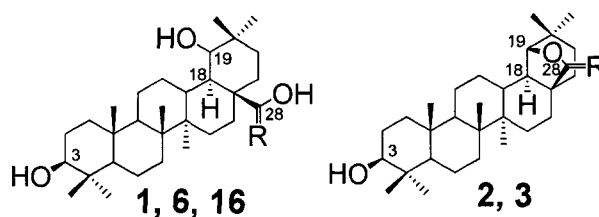


Figure 6-1. Structure of some germanicanes

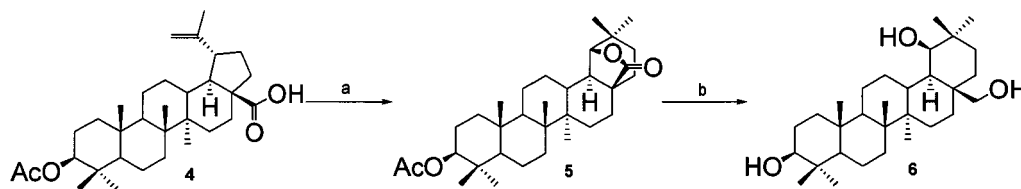
Machaeroceric acid **1** : $19\alpha\text{-OH}$, $R = \text{O}$

19β -Machaeroceryl **6** : $19\beta\text{-OH}$, $R = \text{H}_2$

19β -Machaeroceric acid **16** : $19\beta\text{-OH}$, $R = \text{O}$

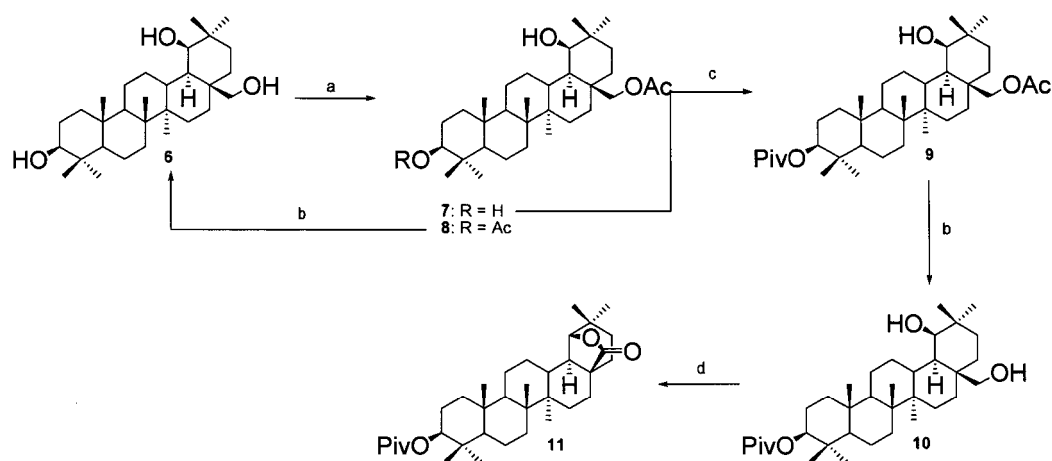
Allobetulin **2** : $R = \text{H}_2$

28-Oxoallobetulin **3** : $R = \text{O}$



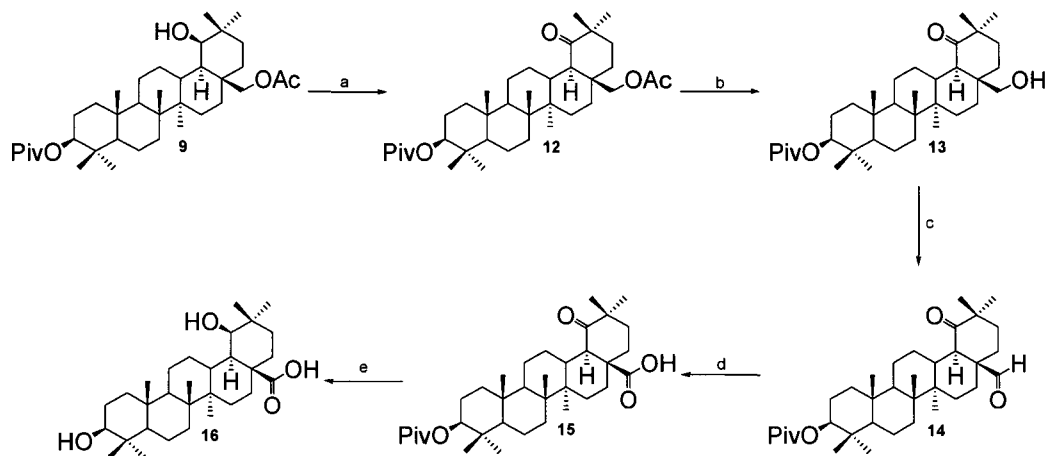
Scheme 6-1. Synthesis of compound 6.

Reagents and conditions: a) $\text{FeCl}_3/\text{SiO}_2$, CH_2Cl_2 , reflux, 3 h; b) LiAlH_4 (5 eq.), THF, reflux, 1 h; 72% yield from 4.



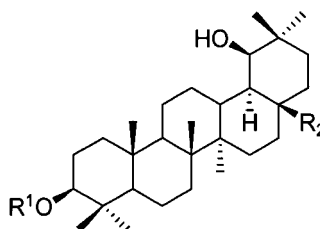
Scheme 6-2. Synthesis of compound 11.

Reagents and conditions: a) Ac_2O (1.5 eq.), pyridine, DMAP (0.1 eq.), rt, 2 h, 64%; b) NaOH 0.25M, $\text{MeOH}:\text{THF}:\text{H}_2\text{O}$, rt, overnight, quantitative; c) pivaloyl chloride (3 eq.), pyridine, DMAP (0.1 eq.), 80°C , overnight, 96% yield; d) TPAP (0.05 eq.), NMO (1.5 eq.), 4Å MS, rt, quantitative.



Scheme 6-3. Synthesis of compound **16**.

Reagents and conditions: a) PCC (5 eq.), CH_2Cl_2 , rt, overnight, 81% yield; b) NaOH 0.25M, MeOH:THF:H₂O, rt, overnight, quantitative; c) PCC (2 eq.), CH_2Cl_2 , rt, 90 min, 86% yield; d) $\text{NaClO}_2/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, THF, pyridine, H₂O, 0 °C to rt, 3 h; e) LiAlH_4 (2.5 eq.), THF, 0 °C, 30 min, 97% yield from **14**.

Table 6-1. In vitro cytotoxicity of studied compounds.

Compound	R ¹	R ²	Cell line IC ₅₀ (μM ± SD) ^a	
			A-549 ^b	DLD-1 ^c
6	H	CH ₂ OH	14.4 ± 3.1	18.0 ± 3.6
7	H	CH ₂ OAc	32 ± 7	44 ± 19
8	Ac	CH ₂ OAc	50 ± 1	> 100
10	Piv	CH ₂ OH	> 100	> 100
16	H	CO ₂ H	91 ± 3	96 ± 3
Betulinic acid	-	-	10.3 ± 0.4	15.0 ± 0.3
Etoposide	-	-	1.0 ± 0.3	2.4 ± 0.8
5-FU	-	-	24 ± 10	17 ± 3

Ac, acetate; Piv, pivaloate.

^a Data represent mean values ± standard deviation for three independent experiments made in triplicate.

^b Human lung carcinoma.

^c Human colorectal adenocarcinoma.

CHAPITRE 7

SYNTHÈSE TOTALE DE L' α -HUMULÈNE ET DE DÉRIVÉS OXYGÉNÉS

1. Origines du projet

On estime que près de 50 % des médicaments utilisés actuellement dans la pharmacopée moderne sont d'origine naturelle alors que moins de 10 % de la biodiversité végétale mondiale a été étudiée pour identifier des activités biologiques.¹ Bien que l'identification de nouveaux agents bioactifs s'avère un défi important dans le domaine pharmaceutique et représente un long processus de recherche, l'étude des produits naturels offre encore aujourd'hui un très grand potentiel d'innovation dans le domaine médical.

Il y a quelques années, le laboratoire LASEVE a démontré que l'huile essentielle du sapin baumier (*Abies balsamea*) possédait une activité cytotoxique sur plusieurs lignées de cellules cancéreuses humaines telles que les cancers du sein, de la prostate, du poumon, du côlon, de l'ovaire et de la peau.^{2,3} Cette huile est particulièrement intéressante car elle affecte davantage les cellules cancéreuses que les cellules saines, démontrant ainsi une certaine sélectivité. De plus, cette huile est bien tolérée par la souris.² Plusieurs travaux de recherche ont été effectués dans le but d'identifier la (les) molécule(s) responsable(s) de l'activité antitumorale de cette huile. L' α -humulène (figure 7-1), un composé sesquiterpénique relativement simple souvent présent dans diverses huiles essentielles, a

été identifié comme responsable de cette activité.⁴ Ces travaux de recherche ont également permis d'élucider, en partie, le mécanisme d'action de ce composé. En effet, l' α -humulène induit une baisse de la concentration cellulaire en glutathion, une molécule qui est, entre autres, impliquée dans le mécanisme de détoxification de composés lipophiles. Cette baisse en glutathion entraîne la production d'espèces oxygénées réactives comme le radical superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Une production excessive de ce type d'agents oxygénés peut causer des dommages aux protéines, à l'ADN et induire la mort cellulaire.

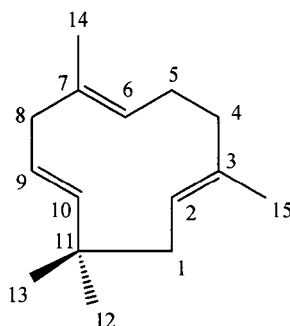


Figure 7-1. Structure et numérotation des carbones de l' α -humulène.

La poursuite du développement préclinique de l' α -humulène nécessite encore plusieurs étapes comme l'évaluation de l'efficacité du produit sur des modèles animaux, l'élucidation complète de son mécanisme d'action et l'évaluation de l'efficacité d'analogues. Il n'est pas rare d'observer qu'un produit initialement identifié pour une activité biologique donnée ne possède pas les caractéristiques structurales pour satisfaire entièrement les critères biopharmaceutiques conventionnels (niveau de bioactivité, sélectivité, absorption, biodistribution, etc.). Les études *in vitro* effectuées jusqu'à présent

ont permis d'observer un problème d'hydrosolubilité chez l' α -humulène, problème qui est directement relié à sa faible polarité et qui pourrait compromettre son éventuel développement biopharmaceutique. Jusqu'à maintenant, les travaux de recherches effectués sur l' α -humulène se limitent essentiellement à l'identification de la molécule, à des études conformationnelles sur sa structure⁵ et à l'élucidation partielle de son mécanisme d'action.⁴ Des activités anticancéreuses^{6,7} et anticarcinogéniques⁸ ont été rapportées pour des dérivés polaires de l' α -humulène. Les époxydes d' α -humulène sont probablement les dérivés oxygénés les plus connus et les plus nombreux de ce sesquiterpène. Plusieurs époxydes de cette molécule sont rapportés pour leurs présences et leurs implications dans l'industrie du brassage puisque le houblon employé comme aromate et agent anti-oxydant dans la fabrication de la bière est une source végétale riche en α -humulène et ses dérivés.⁹ D'ailleurs, la baisse de concentration en α -humulène et l'augmentation de celle en époxydes d' α -humulène lors de l'entreposage du houblon semblent refléter l'effet anti-oxydant de cette matrice. Toutefois, en dehors de l'implication de ces molécules au niveau du brassage, ces époxydes ne semblent guère avoir été étudiés à l'exception d'études de stabilités¹⁰ et d'analyses conformationnelles.¹¹⁻¹⁶ En considérant le faible niveau de connaissances relatives aux époxydes d' α -humulène, notre groupe de recherche a entrepris d'étudier le potentiel biopharmaceutique de ces dérivés.

Divers dérivés oxygénés de l' α -humulène tels que des époxydes et des alcools ont été synthétisés dans notre laboratoire en profitant de la présence de fonctions oléfiniques

sur le macrocycle du sesquiterpène. Il y a cependant un problème évident de régiosélectivité lors de ces réactions étant donné la présence de trois fonctions alcènes sur l' α -humulène. Nous savons néanmoins qu'un des trois sites d'insaturation de l' α -humulène est plus réactif que les deux autres, c'est-à-dire l'alcène C6-C7 (figure 7-1).⁵ D'ailleurs, une monoépoxydation de l' α -humulène se produit majoritairement à cette position. Ceci est dû à une tension de cycle sur cette fonction oléfinique qui est supérieure à l'alcène C2-C3. L'alcène C9-C10 est, bien sur, la moins réactive compte tenu de son degré de substitution inférieur. Bien que ceci peut éventuellement jouer en notre avantage dans le but de synthétiser certains dérivés, des réactions régiosélectives avec de bons rendements seront pour le moins difficile à achever, particulièrement sur les oléfines moins réactives.

2. Deux approches pour la préparation de dérivés de l' α -humulène

2.1. Synthèse totale à partir du géraniol

À la section précédente, les problèmes de synthèse régiosélective sur le squelette sesquiterpénique ont été pris en considération. Face à cette problématique, l'approche permettant une versatilité dans la conception des composés visés et désirés, ainsi qu'une diversité moléculaire précise et non aléatoire, réside en la synthèse totale de dérivés oxygénés de l' α -humulène. Il est intéressant de mentionner que plusieurs articles¹⁷⁻²⁴ font mention de la synthèse totale de l' α -humulène. Il va de soi que les méthodes divergent et ne se ressemblent pas toutes, ce qui laisse une marge de manœuvre appréciable dans les

possibilités de dérivés pouvant être produits par synthèse. Malheureusement, la plupart des synthèses rapportées remontent aux années 1960 à 1980 et présentent peu de détails expérimentaux.

Au meilleur de nos connaissances, récemment en 2002, Corey *et al.*²⁴ rapportait la dernière synthèse totale de l' α -humulène. Cet article présentait une procédure expérimentale détaillée qui, selon les auteurs, était considérée comme l'approche de synthèse la plus efficace à ce jour pour achever la synthèse totale de l' α -humulène. Bien que cette approche de synthèse présente de nombreux avantages par rapport aux précédentes, elle est longue, coûteuse et ne permettrait pas de générer de grandes quantités de produits.

Le plan synthétique de Corey illustré à la figure 7-2 implique un intermédiaire clé doté d'un groupement méthylcarbonate et d'un énoïl silylé permettant une macrocyclisation catalysée au palladium conduisant subséquemment à l' α -humulène. L'intermédiaire en question a préalablement subi l'ajout de deux sections soit : 1) le groupement méthylcarbonate et 2) cinq carbones en remplacement à la fonction alcool qui était originellement celle du géraniol.

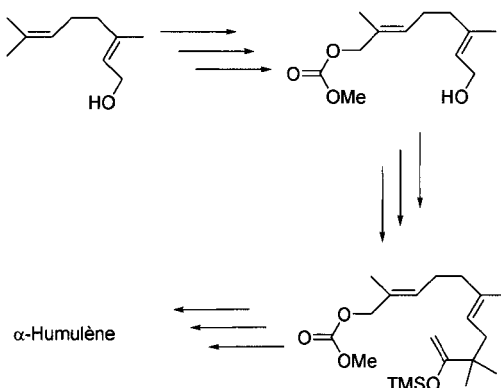


Figure 7-2. Résumé du plan synthétique de Corey.

2.2. Préparation de dérivés à partir de l' α -humulène

Une deuxième méthode a également été envisagée pour préparer des dérivés oxygénés de l' α -humulène. Il a été mentionné auparavant que l' α -humulène était constitué de trois sites réactionnels similaires et qu'il était difficile d'obtenir une régiosélectivité. Ce problème pourrait être tourné en notre avantage dans le cadre d'une étude rapide afin de sélectionner les composés les plus intéressants à étudier. Par exemple, si l'on désire investiguer les époxydes de l' α -humulène pour leur potentiel anticancéreux, il serait nettement plus rapide d'effectuer des époxydations sous des conditions bien définies, fractionner les monoépoxydes, les diépoxydes, les triépoxydes et évaluer le potentiel thérapeutique de ces derniers. La fraction d'époxydes la plus intéressante pourrait par la suite être fractionnée à nouveau, soit par chromatographie sur colonne ou par HPLC, selon la difficulté de la séparation. Par la suite, chaque époxyde serait caractérisé et renvoyé séparément aux tests anticancéreux pour cibler le ou les produits responsables de l'activité

antitumorale. Malgré la génération simultanée de plusieurs molécules structuralement très similaires, cette approche pourrait permettre d'évaluer rapidement le potentiel de ces dérivés contrairement à l'approche de la synthèse totale.

3. Synthèse de l' α -humulène à partir du géraniol

3.1. Synthèse de l' α -humulène à partir du géraniol avec le groupe protecteur TBDMS

Initialement, la fonction alcool du géraniol (**1**) a été protégée par un groupement TBDMS. Ainsi, le géraniol dans le DMF en présence d'imidazole et de TBDMSCl à température ambiante toute la nuit a permis d'obtenir le géranyl-TBDMS (**2**) avec un excellent rendement de 92 %. La deuxième étape de synthèse prévoyait la formation d'un alcool allylique en position 8 (figure 7-3) avec le couple SeO_2/TBHP . Un faible rendement de 17 % d'alcool allylique **3** a été obtenu (meilleur rendement de plusieurs essais) pour cette réaction bien que les conditions réactionnelles mises en place étaient identiques à celles rapportées par Corey. Étonnamment, l'article de Corey rapporte un rendement de 48 %. Il est intéressant de souligner que l'alcool allylique en position 4 (composé **4**) a également été formé lors de cette réaction (rendement $\approx 10\%$).

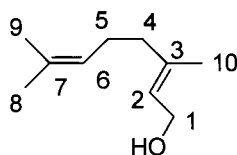


Figure 7-3. Structure et numérotation du géraniol.

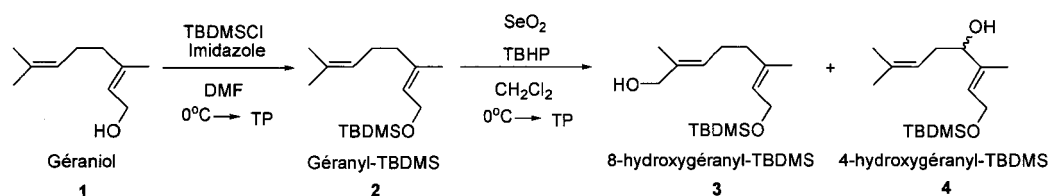


Figure 7-4. Voie de synthèse avec le groupe protecteur TBDMS.

Plusieurs facteurs expérimentaux pouvaient avoir une incidence sur le rendement de cette réaction (température, temps de réaction, ordre d'ajout des réactifs, trace d'eau, etc). L'impact de la présence d'eau a été évalué. Des réactions ont été mises à l'essai dans le TBHP aqueux et le TBHP anhydre dans le CH₂Cl₂. L'utilisation de ces différentes conditions n'a pas permis d'améliorer le rendement de cette réaction.

3.2. Synthèse de l' α -humulène à partir du géraniol avec le groupe protecteur acétate

Un article de Fairlamb et al.²⁵ rapporte que la nature du groupement protecteur influence le rendement de la formation d'un alcool allylique en position 8 du géraniol. En fait, cet article démontre qu'un groupement protecteur de type ester a un impact positif sur le rendement dans ce cas particulier. Cette information nous a amené à tenter l'utilisation de l'acétate d'éthyle comme solvant pour l'oxydation du géranyl-TBDMS (2). Ces nouvelles conditions réactionnelles ont permis d'obtenir l'alcool **8** avec plus de sélectivité. Ces résultats et l'article de Fairlamb nous incitèrent à utiliser un acétate comme groupement protecteur du géraniol. Ainsi, dans les conditions standards d'acétylation dans la pyridine en présence d'anhydride acétique et de DMAP, le géranyl-acétate (**5**) a été

obtenu avec un excellent rendement de 97 %. La figure 7-4 illustre cette séquence synthétique. L'étape suivante consistait en la formation de l'alcool allylique en position 8. Puisque le changement de solvant avait été bénéfique lors de cette réaction avec le géranyl-TBDMS (**2**), une comparaison d'efficacité entre l'acétate d'éthyle et le CH_2Cl_2 a été effectuée pour déterminer le meilleur solvant mais aussi pour comparer le véritable impact de ce dernier dans la réaction (tableau 7-1).

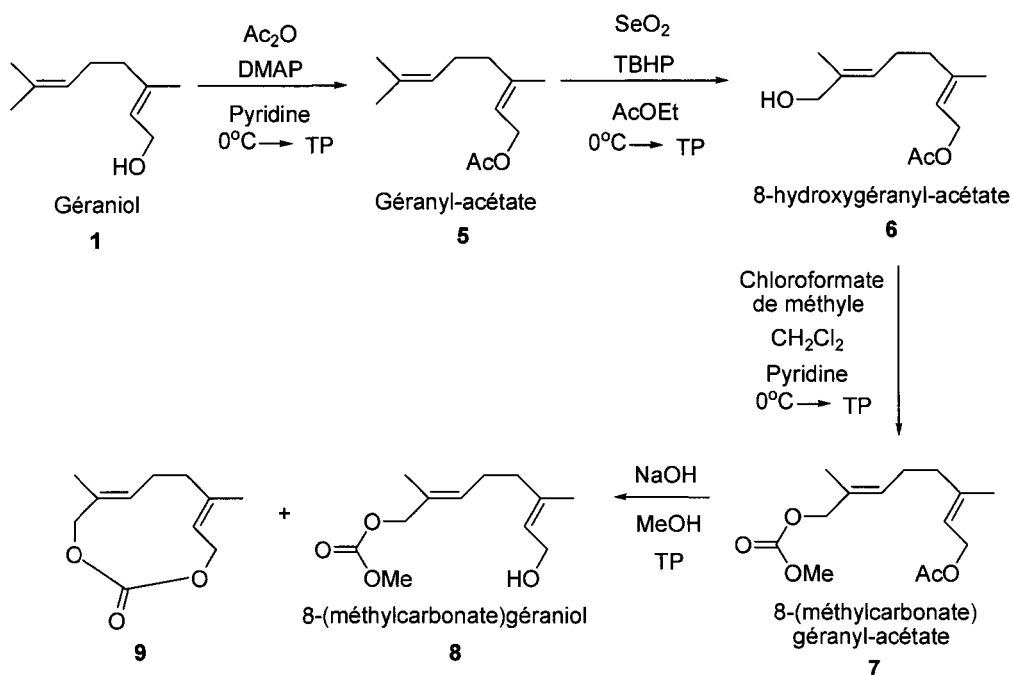


Figure 7-5. Voie de synthèse avec le groupe protecteur acétate.

Tableau 7-1. Conditions réactionnelles mises à l'essai pour la formation de l'alcool allylique en position 8.

Conditions réactionnelles			Rendements (%)	
Solvants	Température	Temps de réaction	Alcool 6	Géranyl-acétate 5
CH ₂ Cl ₂	0°C ^a	> 12h	46	5
	0°C→T.P. ^a	<i>c</i>	30	< 2
	T.P. ^a	> 12h	35	< 2
	0°C ^b	> 12h	45	10
	0°C→T.P. ^b	<i>c</i>	42	< 2
	T.P. ^b	> 12h	36	< 2
AcOEt	0°C^a	> 12h	40	41
	0°C→T.P. ^a	<i>c</i>	50	12
	T.P. ^a	> 12h	32	< 2
	0°C ^b	> 12h	41	43
	0°C→T.P. ^b	<i>c</i>	49	5
	T.P. ^b	> 12h	42	8

T.P. : Température ambiante.

- a) les conditions standard sont l'ajout des réactifs dans le solvant aux températures indiquées et après 30 minutes, le substrat est ajouté.
- b) Une solution des réactifs est ajoutée goutte à goutte très lentement au substrat en solution aux températures indiquées.
- c) La réaction est laissée toute la journée à 0°C et à la fin de la journée on laisse la réaction se réchauffer jusqu'à la température pièce toute la nuit.

Le tableau 7-1 indique que les conditions optimales furent déterminées comme étant la réaction dans l'acétate d'éthyle et que celle-ci fonctionne mieux à 0 °C sur une période de plus de 12 heures (ligne en caractères gras). Dans ces conditions, un rendement de 40 % en alcool allylique **6** est obtenu et 41 % du produit de départ peut être récupéré. L'ajout des réactifs goutte à goutte au substrat en solution ne permet pas d'augmenter significativement les rendements. D'autres solvants ont été mis à l'essai (tableau 7-2) et les

résultats démontrent que l'acétate d'éthyle procure une fois de plus les meilleurs rendements en permettant de récupérer une quantité importante de produit de départ.

Tableau 7-2. Rendements d'oxydation dans divers solvants pour la formation de l'alcool allylique en position 8.

	CH ₂ Cl ₂	AcOEt	Toluène	DMSO	Acétone	Acétonitrile	AcOMe
Géranyl-acétate (%)	5	41	50	70	19	2	23
8-Hydroxygéranyl-acétate (%)	46	40	33	18	46	56	46
Rendements en fonction du produit de départ recueilli (%)	48	68	67	59	56	57	60

Avec des quantités plus appréciables de 8-hydroxygéranyl-acétate (**6**), l'étape suivante consistait à introduire un groupement méthylcarbonate sur l'alcool allylique nouvellement formé en position 8 (composé **7**). Un rendement acceptable de 67 % a été obtenu à l'aide du méthylchloroformate et la pyridine dans le CH₂Cl₂, mais une optimisation de ce rendement est tout à fait envisageable. En effet, cette réaction n'a pas été effectuée à plusieurs reprises et probablement pas dans des conditions idéales, c'est-à-dire avec des solvants anhydres et sous atmosphère d'argon.

À la suite de cette réaction, un deuxième problème d'importance est survenu. Alors que le changement de groupement protecteur a amélioré le rendement pour la formation de l'alcool allylique, un problème de chimiosélectivité s'est présenté à l'étape qui suivait

l'installation du groupement méthylcarbonate. Puisque les fonctions méthylcarbonate et acétate sont très similaires, des réactivités semblables sont observées en milieu basique.²⁶ Néanmoins, le groupement méthylcarbonate étant plus riche en électron que le groupement acétate, sa réactivité face à un nucléophile donné est plus faible que celle de l'acétate. Ainsi, sous conditions basiques bien contrôlées, il est possible d'effectuer l'hydrolyse de l'acétate sans affecter le groupement méthylcarbonate. Le 8-(méthylcarbonate)géraniol (**8**) a été obtenu par hydrolyse sélective de la fonction acétate du composé **7** avec un rendement de 73 %. Le géraniol cyclisé (composé **9**) sous forme de carbonate a été isolé comme sous-produit de cette réaction ainsi que le produit de double hydrolyse.

3.3. Voie de synthèse avec le groupe protecteur trichloroacétate

L'utilisation du groupement trichloroacétate pour la protection de l'alcool du géraniol a été également mise à l'essai afin de contourner les problèmes de synthèse observés avec les approches précédentes (figure 7-6). Ainsi, le géraniol en présence du chlorure de trichloroacétyle avec le DMAP dans la pyridine a permis la formation du géranyl-trichloroacétate (**10**) avec un très bon rendement de 84 %. Il est important de préciser que le produit **10** est extrait du milieu réactionnel avec le CH_2Cl_2 après neutralisation de la pyridine avec H_2SO_4 . Cette phase organique doit être amenée à pH neutre par un lavage avec une solution de NaHCO_3 pour éviter une dégradation du produit. Une filtration sur gel de silice avec hexanes comme éluant a permis d'obtenir l'ester **10** produit recherché.

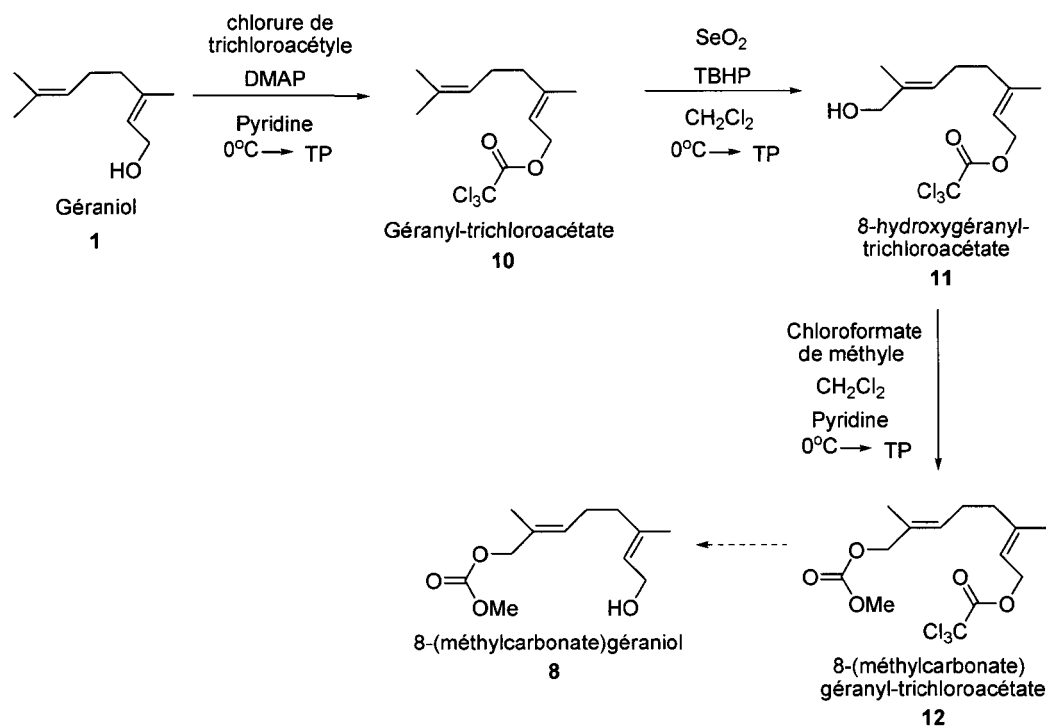


Figure 7-6. Voie de synthèse avec le groupe protecteur trichloroacétate.

La prochaine étape de la séquence envisagée consistait en la formation de l'alcool allylique **11**. Les différentes conditions décrites pour cette réaction à la section 3.2 avec le CH_2Cl_2 et l'acétate d'éthyle, ont été vérifiées pour obtenir les meilleurs résultats. Ces derniers indiquent que le CH_2Cl_2 fut le solvant le plus efficace pour cette réaction (contrairement à ce qui était anticipé) permettant ainsi la formation du 8-hydroxygéranyl-trichloroacétate (**11**) avec un rendement de 45 % et une récupération de 19 % du produit de

départ. À titre comparatif, 27 % du composé **11** a été obtenu avec une récupération de 48 % du produit de départ dans l'acétate d'éthyle.

L'introduction du groupement méthylcarbonate sur le composé **11** a été effectuée quantitativement (avec 96 % de rendement) pour obtenir le composé **12**. L'utilisation de conditions rigoureusement anhydres semble avoir un impact positif sur le rendement de cette réaction. Faute de temps, les travaux visant la synthèse de l' α -humulène en utilisant des dérivés protégés avec un trichloroacétate ont été arrêtés.

3.4. Travaux visant la synthèse d'un époxyde d' α -humulène

La synthèse d'un dérivé époxydé de l' α -humulène a été entreprise à partir du géraniol en utilisant l'approche développée par Corey. Le dérivé ciblé dans le cadre de ces travaux était le (*R,R*)-2,3-époxy- α -humulène (figure 7-7). Initialement, le géraniol a été oxydé dans les conditions d'époxydations asymétriques de Sharpless^{27,28} afin d'obtenir le (*R,R*)-2,3-époxygéraniol (**13**) avec un rendement de 95 %. Il est important de souligner que des conditions rigoureusement anhydres et un bon contrôle de la température de réaction doivent être appliqués afin d'obtenir un bon rendement et une bonne pureté énantiomérique.

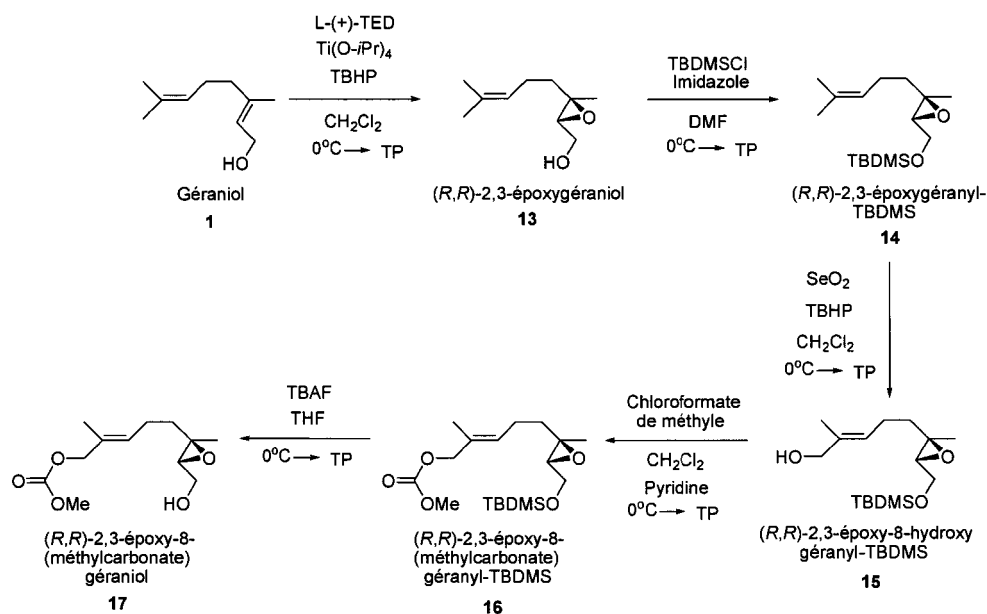


Figure 7-7. Voie de synthèse avec l'époxyde de géraniol.

Puisque ce volet a été amorcé au tout début du projet de synthèse de l' α -humulène, le groupe protecteur TBDMS a été employé. Cette protection a été effectuée dans les conditions décrites pour le géraniol. Ainsi, un rendement de 94 % pour le (R,R)-2,3-époxygéranyl-TBDMS (**14**) a été obtenu avec cette réaction de protection. Le composé **14** a été oxydé afin d'obtenir l'alcool allylique correspondant. Des essais effectués dans le CH_2Cl_2 et l'acétate d'éthyle en utilisant des conditions réactionnelles tel que décrites précédemment semblent indiquer que le CH_2Cl_2 permet d'obtenir le produit désiré avec un rendement légèrement supérieur à celui obtenu dans l'acétate d'éthyle. Cependant, ces essais indiquent également que la réaction réalisée dans le CH_2Cl_2 génère davantage de sous-produits. Par la suite, l'alcool **15** a été fonctionnalisé avec le méthylcarbonate afin

d'obtenir le composé **16** avec un rendement de 81 %. Le retrait du groupement TBDMS a été effectué avec le TBAF dans le THF anhydre. Ces conditions ont permis d'obtenir le (*R,R*)-2,3-époxy-8-(méthylcarbonate)géraniol (**17**) avec un rendement de 82 %. La synthèse d'un dérivé époxydé de l' α -humulène à partir du géraniol a été abandonnée à ce niveau d'avancement par manque de temps.

4. Conclusion

Ce projet s'est avéré plus compliqué que prévu alors qu'il s'agissait de la reproduction d'une synthèse déjà publiée. Toutefois, les travaux effectués permettent de croire que la synthèse d'un époxyde d' α -humulène par l'approche employée est encore faisable. La synthèse de l'alcool allylique fut le problème majeur rencontré, mais les conditions développées ont permis d'obtenir le produit désiré avec des rendements acceptables. Le choix du solvant a été un élément important dans l'efficacité de cette réaction. Les intermédiaires **8** et **17**, deux composés nécessaires pour mener à terme la synthèse de l' α -humulène et d'un époxyde d' α -humulène, ont été obtenus avec succès. La voie synthétique avec le groupe protecteur trichloroacétate est sûrement la plus prometteuse pour mener à l' α -humulène. Malheureusement, les problèmes survenus ayant consommé beaucoup de temps n'ont pas permis de pousser les travaux plus loin.

5. Partie expérimentale

Les produits chimiques ont été achetés chez Sigma-Aldrich Co. Canada ou Alfa Aesar Co. et ont été utilisés tel que reçus. Les solvants usuels ont été obtenus de VWR International Co. et ont été utilisés tel que reçus. Le dichlorométhane (CH_2Cl_2) a été distillé avec du CaH_2 sous atmosphère d'argon. Le THF a été distillé avec du sodium/benzophénone sous atmosphère d'argon. Toutes les réactions anhydres et sensibles à l'air ont été faites dans un montage chauffé à la flamme et gardé sous pression positive d'argon. Les chromatographies analytiques sur couche mince (CCM) ont été faites avec des plaques enduites de gel de silice 60 F₂₅₄, 0.25 mm (Silicycle, Québec, Canada). Les composés ont été révélés en utilisant une solution d'acide sulfurique avec de l'heptamolybdate d'ammonium tétrahydrate (10 g/100 mL de H_2SO_4 + 900 mL de H_2O) ou avec une lumière UV à une longueur d'onde de 254 nm et/ou 365 nm. Les chromatographies «flash» ont été faites avec du gel de silice 230-400 mesh R12030B (Silicycle, Québec, Canada). Les spectres infrarouge (IR) ont été faits avec un spectrophotomètre Perkin-Elmer Spectrum One FT-IR (Shelton, Connecticut, USA) avec un mince film du produit analysé sur une pastille de NaCl et seulement les bandes d'absorptions significatives sont rapportées en cm^{-1} . Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été obtenus avec un spectromètre Bruker Avance à 400 MHz (^1H) et 100 MHz (^{13}C), équipé d'une sonde QNP 5 mm. L'élucidation des structures chimiques est basée sur les expériences RMN ^1H , ^{13}C , COSY, HMBC, HSQC et DEPT-135. Les signaux sont rapportés sous la forme de m (multiplet), s (singlet), d (doublet), t (triplet), br s (broad

singlet) et les constantes de couplage sont rapportées en hertz (Hz). Les déplacements chimiques sont rapportés en ppm (δ) en référence au pic de solvant résiduel. Les signaux RMN des fonctions OH labiles apparaissant parfois n'ont pas été listés. Les masses moléculaires des composés synthétisés n'ont pas été mesurées à haute résolution et donc, ne sont pas rapportées ici.

5.1. Géranyl-TBDMS (2)

À une solution de géraniol (10,0 g, 64,8 mmol) et d'imidazole (8,83 g, 130 mmol) dans 100 mL de DMF à 0 °C est ajouté le TBDMSCl (10,8 g, 71,3 mmol). Le milieu réactionnel résultant est agité à 0 °C pendant une heure puis ramené à la température ambiante pour la nuit (> 12 h). Par la suite, la solution est diluée dans le CH₂Cl₂ (100 mL) et une solution aqueuse saturée de NH₄Cl (100 mL). Le mélange est extrait et la phase organique est lavée avec de l'eau (5 x 50 mL), séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée sous pression réduite pour donner une huile jaune qui est purifiée par chromatographie «flash» sur gel de silice avec EtOAc:hexanes (5:95) comme éluant pour donner 16 g de géranyl-TBDMS (2) (92 % de rendement) sous la forme d'une huile légèrement jaunâtre. IR: 2956, 2928, 2857, 1670, 1472, 1462, 1380, 1254, 1105, 1066, 835, 775. RMN ¹H (CDCl₃): 5,30 (m, 1H), 5,09 (m, 1H), 4,19 (d, 2H, *J* = 6,3 Hz), 2,09 (m, 2H), 2,00 (m, 2H), 1,68 (s, 3H), 1,62 (s, 3H), 1,60 (s, 3H), 0,90 (s, 9H), 0,07 (s, 6H); RMN ¹³C (CDCl₃): 136,9, 131,6, 124,5, 124,2, 60,5, 39,7, 26,5, 26,1 (3x), 25,8, 18,5, 17,8, 16,4, -4,9 (2x).

5.2. 8-Hydroxygéranyl-TBDMS (3) et 4-hydroxygéranyl-TBDMS (4)

Le géranyl-TBDMS (2) (146 mg, 0.54 mmol) est dissous dans le CH_2Cl_2 (2 mL) et le TBHP 70% dans l'eau (0,28 mL, 1,09 mmol) ainsi que le SeO_2 (30 mg, 0,27 mmol) sont ajoutés à cette solution à 0 °C. Après 10 minutes, la réaction est ramenée à la température ambiante puis agitée pendant 4 heures. Par la suite, une solution aqueuse de NaHCO_3 (2 mL) est ajoutée au milieu réactionnel et le tout est extrait avec le CH_2Cl_2 (3 x 2 mL). Les phases organiques sont combinées, séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et évaporées sous pression réduite. Le produit brut est redissous dans le méthanol (5 mL) à 0 °C et le NaBH_4 (31 mg, 0,82 mmol) est ajouté doucement. Après 30 minutes, le milieu réactionnel est ramené à la température ambiante pour une période d'une heure. La réaction est neutralisée en ajoutant de l'eau et en acidifiant à pH ~ 6. La solution est par la suite extraite 3 fois avec du CH_2Cl_2 (3 x 5 mL) et les phases organiques sont combinées, séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et évaporées sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie «flash» sur gel de silice avec EtOAc:hexanes (10:90 à 15:85) comme éluant pour donner 26 mg de 8-hydroxygéranyl-TBDMS (3) (17 % de rendement) sous la forme d'une huile incolore et 15 mg de 4-hydroxygéranyl-TBDMS (4) (10 % de rendement) sous la forme d'une huile incolore. **8-Hydroxygéranyl-TBDMS (3)**; IR: 3360, 2955, 2929, 2857, 1670, 1471, 1463, 1384, 1361, 1254, 1110, 1066, 1006, 939, 836, 813, 776, 665. RMN ^1H (CDCl_3): 5,34 (m, 1H), 5,26 (m, 1H), 4,15 (d, 2H, $J = 6,4$ Hz), 3,91 (s, 2H), 2,10 (m, 2H), 2,00 (m, 2H), 1,61 (s, 3H), 1,58 (s, 3H), 0,86 (s, 9H), 0,03 (s, 6H); RMN ^{13}C (CDCl_3): 136,6, 135,0, 125,5, 124,6, 68,6, 60,3, 39,1, 26,0 (3x), 25,8, 18,4, 16,3, 13,7, -5,0 (2x). **4-Hydroxygéranyl-**

TBDMS (4); IR: 3355, 2929, 2857, 1671, 1472, 1463, 1385, 1361, 1254, 1197, 1064, 939, 835, 775, 666. RMN ^1H (CDCl_3): 5,55 (t, 1H, $J = 6,0$ Hz), 5,09 (m, 1H), 4,24 (d, 2H, $J = 6,0$ Hz), 4,00 (t, 1H, $J = 6,5$ Hz), 2,25 (m, 2H), 1,72 (s, 3H), 1,64 (m, 2H), 1,63 (br s, 6H), 0,90 (s, 9H), 0,07 (s, 6H); RMN ^{13}C (CDCl_3): 138,0, 135,1, 126,1, 118,0, 76,8, 60,2, 34,1, 26,1 (3x), 26,1, 18,6, 18,2, 12,2, -5,0 (2x).

5.3. Géranyl-acétate (5)

À une solution de géraniol (30,0 g, 194,5 mmol) dans 100 mL de pyridine à 0 °C est ajouté le Ac_2O (99,3 g, 972,5 mmol), le DMAP (2,38 g, 19,5 mmol) et la solution est agitée pendant 15 minutes à 0°C et 1 heure à la température ambiante. Cette solution est diluée dans de l'acétate d'éthyle (100 mL) et la phase organique est lavée avec du H_2SO_4 10 % dans l'eau jusqu'à neutralisation complète de la pyridine et lavée ensuite avec une solution saturée de NaHCO_3 jusqu'à neutralisation complète de l'acide. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et évaporée sous pression réduite pour donner une huile jaune qui est purifiée par chromatographie «flash» sur gel de silice avec EtOAc:hexanes (5:95) comme éluant pour donner 40,05 g de géranyl-acétate (**5**) (97 % de rendement) sous la forme d'une huile légèrement jaunâtre. IR: 2968, 2924, 1741, 1670, 1444, 1365, 1231, 1023, 954. RMN ^1H (CDCl_3): 5,32 (m, 1H), 5,06 (m, 1H), 4,56 (d, 2H, $J = 7,1$ Hz), 2,06 (m, 4H), 2,03 (s, 3H), 1,68 (s, 3H), 1,66 (s, 3H), 1,58 (s, 3H); RMN ^{13}C (CDCl_3): 171,3, 142,4, 132,0, 123,8, 118,3, 61,5, 39,6, 26,4, 25,8, 21,2, 17,8, 16,6.

5.4. 8-Hydroxygéranyl-acétate (6)

Le TBHP (70% dans l'eau) (1,31 mL, 5,10 mmol) et le SeO_2 (0,14 g, 1,28 mmol) sont agités 30 minutes à 4 °C dans 5 mL d'acétate d'éthyle. Par la suite, le géranyl-acétate (**5**) (0,50 g, 2,55 mmol) est ajouté et le milieu réactionnel est agité toute la nuit à 4 °C. Ensuite, la solution est diluée dans l'acétate d'éthyle et lavée avec une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 , séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et évaporée sous pression réduite. Le produit brut est alors dissous dans 5 mL de MeOH à 0 °C et le NaBH_4 (0,66 g, 2,55 mmol) est ajouté lentement. La solution est agitée à 0 °C pendant 45 minutes et le tout est lentement neutralisé avec de l'eau (5 mL). La solution est acidifiée à pH ~ 6 avec HCl 1N, extraite avec du CH_2Cl_2 (3 x 5 mL) et les phases organiques sont combinées, séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et évaporées sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie «flash» sur gel de silice avec EtOAc:hexanes (5:95 à 25:75) comme éluant pour donner 0,21 g (41 % de rendement) du produit de départ **5** et 0,22 g (40 % de rendement, 68 % basé sur le produit de départ recueilli) de 8-hydroxygéranyl-acétate (**6**) sous la forme d'une huile légèrement jaunâtre. IR: 3426, 2922, 1738, 1443, 1366, 1233, 1021, 953. RMN ^1H (CDCl_3): 5,37 (m, 1H), 5,34 (m, 1H), 4,59 (d, 2H, $J = 6,8$ Hz), 4,00 (s, 2H), 2,18 (m, 2H), 2,09 (m, 2H), 2,06 (s, 3H), 1,71 (s, 3H), 1,67 (s, 3H); RMN ^{13}C (CDCl_3): 171,4, 141,9, 135,4, 125,3, 118,7, 68,9, 61,5, 39,2, 25,7, 21,2, 16,5, 13,8.

5.5. 8-(Méthylcarbonate)géranyl-acétate (7)

Le 8-hydroxygéranyl-acétate (6) (250 mg, 2,36 mmol) est dissous dans le CH_2Cl_2 (5 mL) à 0 °C. Ensuite, le chloroformate de méthyle (0,23 mL, 2,94 mmol) et la pyridine (0,27 mL, 3,30 mmol) sont ajoutés au milieu. La solution est agitée durant 10 minutes et la température du milieu réactionnel est ramenée à celle ambiante pour toute la nuit. Par la suite, le mélange est lavé avec une solution aqueuse saturée de NH_4Cl (4 x 5 mL) et la phase organique est séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et évaporée sous pression réduite. Le produit brut résultant est purifié par chromatographie «flash» sur gel de silice avec EtOAc:hexanes (15:85 à 20:80) comme éluant pour donner 0,43 g (67 % de rendement) de 8-(méthylcarbonate)géranyl-acétate (7) sous la forme d'une huile légèrement jaunâtre. IR: 2955, 1746, 1443, 1367, 1271, 1233, 1023, 946, 792. RMN ^1H (CDCl_3): 5,42 (t, 1H, $J = 7,2$ Hz), 5,28 (t, 1H, $J = 7,2$ Hz), 4,52 (d, 2H, $J = 7,1$ Hz), 4,45 (s, 2H), 3,72 (s, 3H), 2,12 (m, 2H), 2,01 (m, 2H), 1,99 (s, 3H), 1,65 (s, 3H), 1,61 (s, 3H); RMN ^{13}C (CDCl_3): 171,0, 155,7, 141,5, 130,0, 129,6, 118,8, 73,6, 61,2, 54,7, 38,7, 25,9, 21,0, 16,4, 13,8.

5.6. 8-(Méthylcarbonate)géraniol (8) et 1,8-carbonate de géraniol (9)

Le 8-(méthylcarbonate)géranyl-acétate (8) (0,20 g, 0,74 mmol) est dissous à la température ambiante dans une solution de méthanol basifiée à pH 8 (5 mL) avec du NaOH. Après 4h, la solution est diluée avec de l'eau, acidifiée à pH ~ 6 et extraite au CH_2Cl_2 (3 x 10 mL). Les phases organiques sont combinées, séchées sur Na_2SO_4 , filtrées

et évaporées sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie «flash» sur gel de silice avec EtOAc:hexanes (15:85 à 25:75) comme éluant pour donner 0,12 g (73 % de rendement) de 8-(méthylcarbonate)géraniol (**8**) et un sous-produit étant le 1,8-cyclocarbonate de péraniol (**9**) sous formes d'huiles incolores. **8-(Méthylcarbonate)géraniol (8)**: IR: 3367, 2922, 1748, 1670, 1443, 1375, 1272, 1093, 1000, 941, 792. RMN ^1H (CDCl_3): 5,47 (t, 1H, $J = 6,8$ Hz), 5,39 (t, 1H, $J = 7,0$ Hz), 4,50 (s, 2H), 4,14 (d, 2H, $J = 6,9$ Hz), 3,78 (s, 3H), 2,18 (m, 2H), 2,07 (m, 2H), 1,66 (s, 6H); RMN ^{13}C (CDCl_3): 155,9, 139,0, 130,0 (2x), 124,1, 73,9, 59,5 54,9, 38,9, 26,0, 16,3, 14,0. **1,8-Cylcocarbonate de péraniol (9)**: IR: 2932, 1742, 1446, 1377, 1254, 1018, 952, 874, 791. RMN ^1H (CDCl_3): 5,47 (m, 1H), 5,34 (m, 1H), 4,58 (d, 2H, $J = 7,1$ Hz), 4,50 (s, 2H), 2,18 (m, 2H), 2,09 (m, 2H), 1,70 (s, 3H), 1,68 (s, 3H); RMN ^{13}C (CDCl_3): 155,3, 141,7, 130,2, 129,7, 118,8, 73,6, 64,1, 38,9, 26,1, 16,6, 14,4.

5.7. Péranyl-trichloroacétate (**10**)

Le péraniol (10,0 g, 64,8 mmol) est dissous dans la pyridine (100 mL) à 0 °C et le DMAP (794 mg, 6,48 mmol) et le chlorure de trichloroacétyle (8 mL, 71,3 mmol) sont par la suite ajoutés. Après 10 minutes, la température est remontée à celle ambiante et on laisse réagir pour une heure. Par la suite, on neutralise le milieu réactionnel en ajoutant de la glace (~ 100 mL), du CH_2Cl_2 à 0°C (100 mL) et du H_2SO_4 6,2 M à 0 °C (110 mL). La solution résultante est extraite avec du CH_2Cl_2 (3 x 100 mL). Les phases organiques sont combinées et lavées avec une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 . La phase organique est

séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le produit brut est dissous dans un minimum d'hexanes, filtré sur silice, rincé abondamment avec de l'hexanes (1 L) et le solvant du filtrat est évaporé sous pression réduite pour donner 16,3 g (84 % de rendement) de géranyl-trichloroacétate (**10**) sous la forme d'une huile incolore. IR: 2968, 2917, 2856, 1765, 1667, 1447, 1377, 1228, 1109, 957, 928, 894, 827, 749, 682. RMN ¹H (CDCl₃): 5,42 (m, 1H), 5,06 (m, 1H), 4,86 (d, 2H, *J* = 7,2 Hz), 2,10 (m, 4H), 1,76 (s, 3H), 1,67 (s, 3H), 1,60 (s, 3H); RMN ¹³C (CDCl₃): 162,1, 145,7, 132,2, 123,5, 116,3, 90,2, 66,2, 39,7, 26,2, 25,8, 17,9, 16,8.

5.8. 8-Hydroxygéranyl-trichloroacétate (**11**)

Le TBHP (70% dans l'eau) (0,48 mL, 3,34 mmol) et le SeO₂ (93 mg, 0,83 mmol) sont mis en solution à 4 °C dans 10 mL de CH₂Cl₂. Après 30 minutes d'agitation, le géranyl-trichloroacétate (**10**) (0,50 g, 1,69 mmol) est ajouté et le tout est agité toute la nuit à 4 °C. La solution est ensuite purifiée par chromatographie «flash» sur gel de silice avec EtOAc:hexanes (5:95 à 25:75) comme éluant pour donner 0,09 g (19% de rendement) de produit de départ (**10**) et 0,24 g (45% de rendement) de 8-hydroxygéranyl-trichloroacétate (**11**) sous la forme d'une huile légèrement jaunâtre. IR: 3368, 2919, 2857, 1763, 1665, 1448, 1385, 1228, 956, 893, 827, 681. RMN ¹H (CDCl₃): 5,42, (m, 1H), 5,35 (m, 1H), 4,86 (d, 2H, *J* = 7,2 Hz), 3,99 (s, 2H), 2,19 (m, 2H), 2,12 (m, 2H), 1,92 (s, 1H), 1,77 (s, 3H), 1,66 (s, 3H); RMN ¹³C (CDCl₃): 162,1, 145,2, 135,5, 125,1, 116,6, 90,2, 69,0, 66,2, 39,2, 25,7, 16,8, 13,9.

5.9. 8-(Méthylcarbonate)géranyl-trichloroacétate (**12**)

Le 8-hydroxygéranyl-trichloroacétate (**11**) (14,20 g, 44,99 mmol) est dissous dans le CH₂Cl₂ anhydre (280 mL) sous atmosphère d'argon à 0°C. Ensuite, le chloroformate de méthyle (4,3 mL, 56,24 mmol) et la pyridine (5.1 mL, 62,99 mmol) sont ajoutés au milieu. La solution est agitée durant 10 minutes, la température est remontée à celle ambiante et on laisse réagir toute la nuit. Par la suite, le mélange est lavé avec une solution aqueuse saturée de NH₄Cl (4 x 100 mL) et la phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le produit brut résultant est purifié par chromatographie «flash» sur gel de silice avec EtOAc:hexanes (5:95 à 15:85) comme éluant pour donner 20,01 g (96% de rendement) de 8-(méthylcarbonate)géranyl-trichloroacétate (**12**) sous la forme d'une huile incolore. IR: 2955, 2857, 1762, 1750, 1669, 1443, 1374, 1272, 1231, 951, 894, 827, 792, 682. RMN ¹H (CDCl₃): 5,47-5,39 (m, 2H), 4,85 (d, 2H, *J* = 7,3 Hz), 4,50 (s, 2H), 3,77 (s, 3H), 2,19 (m, 2H), 2,12 (m, 2H), 1,76 (s, 3H), 1,67 (s, 3H); RMN ¹³C (CDCl₃): 162,1, 155,9, 145,0, 130,3, 129,4, 116,7, 90,2, 73,7, 66,1, 54,9, 38,9, 25,9, 16,8, 14,0.

5.10. (*R,R*)-2,3-Époxygéraniol (**13**)

Cinq millilitres de CH₂Cl₂ anhydre et 5 grammes de tamis moléculaire sont placés dans un ballon à 0 °C sous atmosphère d'argon. Le L-(+)-tartrate de diéthyle (83 µL, 0,49 mmol) et le Ti(O-*i*Pr)₄ (95 µL, 0,32 mmol) sont ajoutés et la température est abaissée à -20

°C. À ce moment, le TBHP (2,29 mL d'une solution 4,25 M dans le CH_2Cl_2 , soit 9,73 mmol) est ajouté et le tout est agité 30 minutes à cette température. Par la suite, le géraniol (1,00 g, 6,48 mmol) est ajouté et le tout est agité pour 45 minutes. Après ce délai, la température est remontée à 0 °C et 3 mL d'eau est ajouté. La solution est agitée pour une autre période de 30 à 60 minutes en laissant remonter la température de la réaction à celle ambiante. Ensuite, le L-(+)-tartrate de diéthyle est hydrolysé avec une solution aqueuse salée de NaOH 30% (0.60 mL d'une solution contenant 5 grammes de NaCl et 30 grammes de NaOH dans 90 mL d'eau) durant 10-20 minutes. La solution est extraite avec du CH_2Cl_2 (3 x 10 mL) et les phases organiques sont combinées, séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et évaporées sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie «flash» sur gel de silice avec EtOAc:hexanes (15:85 à 25:75) comme éluant pour donner 1,05 g (95% de rendement) de (*R,R*)-2,3-époxygéraniol (**13**) sous la forme d'une huile incolore. IR: 3419, 2968, 2927, 1451, 1384, 1257, 1095, 1033, 864. RMN ^1H (CDCl_3): 5,04 (t, 1H, J = 7,1 Hz), 3,78 (m, 1H), 3,62 (m, 1H), 2,95 (m, 1H), 2,04 (m, 2H), 1,64 (s, 3H), 1,63 (m, 1H), 1,56 (s, 3H), 1,44 (m, 1H), 1,25 (s, 3H); RMN ^{13}C (CDCl_3): 132,2, 123,4, 63,3, 61,5, 61,3, 38,6, 25,7, 23,7, 17,7, 16,8.

5.11. (*R,R*)-2,3-Époxygéranyl-TBDMS (**14**)

Le TBDMSCl (974 mg, 6,46 mmol) est ajouté à une solution de (*R,R*)-2,3-époxygéraniol (**13**) (1,00 g, 5,87 mmol) et d'imidazole (800 mg, 11,8 mmol) dans le DMF (8 mL) à 0 °C et le TBDMSCl est ajouté (974 mg, 6,46 mmol). Le milieu réactionnel

résultant est agité à 0 °C pendant une heure, ramené à la température ambiante et laissé pour réagir toute la nuit. Par la suite, la solution est diluée dans le CH₂Cl₂ (10 mL) et une solution aqueuse saturée de NH₄Cl (10 mL). Le mélange est extrait et la phase organique est lavée avec de l'eau (5 x 5 mL), séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée sous pression réduite pour donner une huile jaune brute qui est purifiée par chromatographie «flash» sur gel de silice avec EtOAc:hexanes (5:95) comme éluant pour donner 1,57 g de (*R,R*)-2,3-époxygéranyl-TBDMS (**14**) (94% de rendement) sous la forme d'une huile légèrement jaunâtre. IR: 2929, 2858, 1472, 1383, 1361, 1255, 1127, 1087, 1006, 837, 777, 666. RMN ¹H (CDCl₃): 5,08 (t, 1H, *J* = 7,1 Hz), 3,72 (m, 2H), 2,89 (t, 1H, *J* = 5,3 Hz), 2,06 (m, 1H), 1,67 (s, 3H), 1,64 (m, 1H), 1,59 (s, 3H), 1,46 (m, 1H), 1,25 (s, 3H), 0,90 (s, 9H), 0,08 (s, 3H), 0,07 (s, 3H); RMN ¹³C (CDCl₃): 132,1, 123,6, 63,3, 62,4, 60,6, 38,7, 26,0 (3x), 25,8, 23,9, 18,4, 17,8, 16,9, -5,1, -5,2.

5.12. (*R,R*)-2,3-Époxy-8-hydroxygéranyl-TBDMS (**15**)

Le TBHP (70% dans l'eau) (0,5 mL, 3,51 mmol) et le SeO₂ (97 mg, 0,88 mmol) sont agités 30 minutes à 4 °C dans 5 mL de CH₂Cl₂. Par la suite, le (*R,R*)-2,3-époxygéranyl-TBDMS (**14**) (500 mg, 1,76 mmol) est ajouté et la réaction est agitée toute la nuit à 4 °C. Ensuite, la solution est diluée dans le CH₂Cl₂ et lavée avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃, séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le produit brut est dissous dans 5 mL de MeOH à 0 °C et le NaBH₄ (66 mg, 1,76 mmol) est ajouté lentement. La solution est agitée à 0 °C pendant 45 minutes et le milieu

réactionnel est neutralisé avec de l'eau (5 mL) et dilué avec 10 mL de CH₂Cl₂. La phase aqueuse est acidifiée à pH ~ 6, extraite avec du CH₂Cl₂ (3 x 5 mL) et les phases organiques sont combinées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie «flash» sur gel de silice avec EtOAc:hexanes (5:95 à 25:75) comme éluant pour donner 80 mg (16% de rendement) de produit de départ **14** et 238 mg (45% de rendement) de (*R,R*)-2,3-époxy-8-hydroxygéranyl-TBDMS (**15**) sous la forme d'une huile légèrement jaunâtre. IR: 3435, 2930, 2858, 1472, 1463, 1385, 1361, 1255, 1127, 1086, 1007, 939, 838, 778, 666. RMN ¹H (CDCl₃): 5,36 (dd, 1H, *J* = 7,1 Hz, *J* = 6,0 Hz), 3,95 (s, 2H), 3,70 (d, 2H, *J* = 5,4 Hz), 2,87 (t, 1H, *J* = 5,4 Hz), 2,12 (m, 2H), 1,70 (m, 1H), 1,64 (s, 3H), 1,48 (m, 1H), 1,24 (s, 3H), 0,88 (s, 9H), 0,06 (s, 3H), 0,06 (s, 3H); RMN ¹³C (CDCl₃): 135,5, 124,8, 68,7, 63,2, 62,3, 60,5, 38,2, 26,0 (3x), 23,4, 18,4, 16,7, 13,7, -5,1, -5,3.

5.13. (*R,R*)-2,3-Époxy-8-(méthylcarbonate)géranyl-TBDMS (**16**)

Le (*R,R*)-2,3-époxy-8-hydroxygéranyl-TBDMS (**15**) (1,41 g, 4,71 mmol) est dissous dans le CH₂Cl₂ anhydre (10 mL) sous atmosphère d'argon à 0 °C. Ensuite, le chloroformate de méthyle (0,41 mL, 5,18 mmol) et la pyridine (0,54 mL, 6,59 mmol) sont ajoutés au milieu. La solution est agitée durant 10 minutes, la température de la réaction est remontée à celle ambiante. Après une nuit, le mélange est lavé avec une solution aqueuse saturée de NH₄Cl (4 x 10 mL) et la phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le produit brut résultant est purifié par chromatographie

«flash» sur gel de silice avec EtOAc:hexanes (15:85 à 20:80) comme éluant pour donner 1,36 g (81% de rendement) de (*R,R*)-2,3-époxy-8-(méthylcarbonate)génanyl-TBDMS (**16**) sous la forme d'une huile légèrement jaunâtre. IR: 2954, 2931, 2857, 1751, 1443, 1377, 1275, 1110, 1071, 942, 837, 779. RMN ^1H (CDCl_3): 5,50 (m, 1H), 4,50 (s, 2H), 3,77 (s, 3H), 2,30 (m, 1H), 2,20 (m, 1H), 1,93 (m, 1H), 1,76 (m, 1H), 1,69 (s, 3H), 1,50 (s, 3H), 0,90 (s, 9H), 0,09 (s, 6H); RMN ^{13}C (CDCl_3): 155,9, 130,4, 129,5, 76,0, 74,2, 73,7, 63,1, 54,8, 40,7, 26,0 (3x), 25,0, 22,7, 18,3, 13,9, -5,3 (2x).

5.14. (*R,R*)-2,3-Époxy-8-(méthylcarbonate)géraniol (**17**)

Le (*R,R*)-2,3-époxy-8-(méthylcarbonate)génanyl-TBDMS (**16**) (1,36 g, 3,79 mmol) est dissous dans le THF anhydre (20 mL) sous atmosphère d'argon à 0 °C. Par la suite une solution de TBAF 1,0 M dans le THF, (4,17 mL, 4,17 mmol) est ajoutée et le milieu réactionnel est agité 30 minutes. La température de la réaction est ramenée à celle de la pièce et le tout est agité pour 90 minutes supplémentaires. Après l'ajout d'une solution aqueuse saturée de NH_4Cl (20 mL), le milieu réactionnel résultant est extrait avec du CH_2Cl_2 (3 x 20 mL). Les phases organiques sont combinées, séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et évaporées sous pression réduite. Le produit brut résultant est purifié par chromatographie «flash» sur gel de silice avec EtOAc:hexanes (15:85 à 25:75) pour donner 0,76 g (82% de rendement) de (*R,R*)-2,3-époxy-8-(méthylcarbonate)géraniol (**17**) sous la forme d'une huile légèrement jaunâtre. IR: 3437, 2957, 1747, 1444, 1387, 1271, 1076, 1032, 939, 862, 792. RMN ^1H (CDCl_3): 5,43 (m, 1H), 4,46 (s, 2H), 3,75 (m, 1H), 3,73 (s,

3H), 3,63 (m, 1H), 2,91 (m, 1H), 2,11 (m, 2H), 1,71 (m, 1H), 1,63 (s, 3H), 1,46 (m, 1H), 1,25 (s, 3H); RMN ^{13}C (CDCl_3): 155,8, 130,2, 129,1, 73,5, 63,1, 61,3, 60,8, 54,8, 37,8, 23,4, 16,7, 13,8.

Références

1. Harvey, A., **Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products**, *Drug Discovery Today*, **2000**, 5, 294-300.
2. Thériault, P.-E. **Le sapin de Noël contre le cancer?**, La Terre de Chez Nous, 28 février **2002**, p.45.
3. Bergeron, E. **Les 10 découvertes de l'année 2001**, *Pharmacopée boréale*, Québec Science, février **2002**, pp. 26-27.
4. Legault, J.; Dahl, W.; Debiton, E.; Pichette, A.; Madelmont, J.-C. **A Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by α -humulene as possible mechanism of action**. *Planta Med.* **2003**, 69, 402-407.
5. Shirahama, H.; Osawa, E.; Matsumoto, T. **Conformational studies on humulene by means of empirical force field calculations. Role of stable conformers of humulene in biosynthetic and chemical reactions**, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 3208-3213.
6. Rauter, A. P.; Branco, I.; Bermejo, J.; Gonzalez, A. G.; Garcia-Gravalos, M. D.; Feliciano, A. S. **Bioactive humulene derivatives from *Asteriscus vogelii***, *Phytochemistry*, **2001**, 56, 167-171.
7. Murakami, A. Takahashi, M.; Jiwajinda, S.; Koshimizu, K.; Oshigashi, H. **Identification of zerumbone in *Zingiber zerumbet* smith as a potent inhibitor of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate Induced eppstein-barr virus activation**, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1999**, 63, 1811-1812.

8. Zheng, G.-Q.; Kenney, P. M.; Lam, L. K. T. **Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents**, *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 999-1003.
9. Lermusieau, G.; Collin, S. **Varietal discrimination of hop pellets. II. Comparison between fresh and aged samples**, *J. Am. Soc. Brewing Chem.* **2001**, *59*, 39-43.
10. Carman, R. M. **A stable rearrangement product of humulene-4,5-epoxide**, *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1441-1442.
11. Hayano, K.; Shirahama, H. **Transannular cyclization reaction of humulene 2,3-epoxide. Formation of a compound shaping TC conformer**, *Chem. Lett.* **1995**, 867-868.
12. Hayano, K.; Shinjo, T.; Mochizuki, K. **Isolation of new TC conformational humulene 2,3;6,7-diepoxyde**, *Heterocycles*, **1996**, *43*, 523-526.
13. Hayano, K.; Mochizuki, K. **First isolation and determination of three humulene triepoxides**, *Heterocycles*, **1997**, *45*, 1573-1578.
14. Hayano, K.; Ito, N.; Sato, M.; Takishima, M.; Mochizuki, K. **Epoxidation of four possible conformers of humulene 9,10-epoxide: First isolation of 2*R**,3*R**,6*S**,7*S**,9*S**,10*S**-humulene 2,3;6,7;9,10-triepoxide**, *Heterocycles*, **1998**, *48*, 1747-1752.
15. Hayano, K.; Mochizuki, K. **Conformation and configuration of humulene di- and triepoxides generated from four possible conformations of humulene 9,10-epoxide**, *Heterocycles*, **2000**, *53*, 1269-1283.

16. Hayano, K.; Mochizuki, K. **Monoepoxidation of humulene 2,3-epoxide to humulene 2,3;6,7-diepoxides. Observation of the rotation of the double bond plane by ¹H NMR spectral analysis and conformation**, *Heterocycles*, **2003**, *59*, 387-393.
17. Corey, E. J.; Wat, E. K. W. **Total synthesis of humulene**, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 2758-2759.
18. Vig, O. P.; Ram, B.; Singh, K.; Bari, A.; Bari, S. S. **Terpenoids : Part CXXV-A new synthesis of humulene (2,6,6,9-tetramethylcycloundeca-1,4,8-triene)**, *Indian J. Chem.* **1976**, *14B*, 855-857.
19. Kitagawa, Y.; Itoh, A.; Hashimoto, S.; Yamamoto, H.; Nozaki, H. **Total synthesis of humulene. A stereoselective approach**, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 3864-3867.
20. McMurry, J. E.; Matz, J. R. **Stereospecific synthesis of humulene by titanium-induced dicarbonyl coupling**, *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 2723-2724.
21. Takahashi, T.; Kitamura, K.; Tsuji, J. **Syntheses of new humulene derivatives; (2E, 6E, 9E)- and (2Z, 6E, 9E)-cycloundecatrienones, by intramolecular alkylation of protected cyanohydrin. A route to humulene**, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 4695-4698.
22. Miyaoura, N.; Suginome, H. **New stereo- and regiospecific synthesis of humulene by means of the palladium-catalyzed cyclisation of haloalkenylboranes**, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 761-764.

23. Corey, E. J.; Daigneault, S.; Dixon, B. R. **A biomimetic chemical synthesis of humulene from farnesol**, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 3675-3678.
24. Hu, T.; Corey, E. J. **Short syntheses of (\pm)- δ -araneosene and humulene utilizing a combination of four-component assembly and palladium-mediated cyclisation**, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2441-2443.
25. Fairlamb, I. J. S.; Dickinson, J. M.; Pegg, M. **Selenium dioxide *E*-methyl oxidation of suitably protected geranyl derivatives – synthesis of farnesyl mimics**, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2205-2208.
26. Greene, T. W.; Wuts, P. G. M.; **Protective groups in organic synthesis**, 3^e edition, John Wiley & Sons Inc, 1999, 779 pages.
27. Katsuki, T.; Sharpless, K. B. **The first practical method for asymmetric epoxidation**, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5974-5976.
28. Gao, Y.; Hanson, R. M.; Klunder, J. M.; Ko, S. Y.; Masamune, H.; Sharpless, K. B. **Catalytic asymmetric epoxidation and kinetic resolution: modified procedures including in situ derivatization**, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5765-5780.

CHAPITRE 8

CONCLUSION

8.1 Chapitres 2 et 3

Les chapitres 2 et 3 rapportent la synthèse de 32 glycosides triterpéniques du bétulinol, de l'acide bétulinique, de l'allobétulinol et du 28-oxoallobétulinol ainsi que l'évaluation anticancéreuse de ces composés sur des lignées cellulaires humaines cancéreuses (A-549 et DLD-1) et saine (WS1). Les objectifs de ces deux chapitres étaient d'accroître le caractère hydrophile de triterpènes bioactifs à l'aide de la glycosilation dans le but de générer de nouveaux composés anticancéreux. Globalement, les rendements de glycosilations sont très variables (19-89 %) mais fréquemment en bas de 50 %. Également, l'efficacité quelque peu aléatoire du processus d'activation des sucres et du couplage entre ces derniers et l'aglycone, affecte beaucoup les rendements. De plus, la purification des glycosides est parfois difficile (polarité élevée, co-élution, chélation de contaminants). À titre d'exemple, du palladium résiduel a déjà été décelé dans un glycoside d'acide bétulinique.

L'évaluation de l'activité anticancéreuse de ces glycosides a permis de dégager sommairement les éléments structuraux importants pour une meilleure activité biologique

soit : la présence du squelette du lupane contrairement à celui des germanicanes et la présence de monosaccharides plutôt que des disaccharides. Il faut toutefois noter que très peu de dérivés ont démontré une activité supérieure aux aglycones de départ et près de la moitié des molécules étudiées n'ont pas démontré de cytotoxicité. Le 3 β -O- α -D-mannopyranoside de bétulinol est le composé le plus efficace de cette série de saponines (IC₅₀ de 7,3 \pm 0,4, 10,1 \pm 0,5 et 5,1 \pm 0,6 sur les cellules humaines A-549, DLD-1 et WS1, respectivement) puisque le 3 β -O- α -L-rhamnopyranoside d'acide bétulinique et le 3 β -O- α -D-arabinopyranoside d'acide bétulinique avaient déjà été synthétisés auparavant. À l'exception de ces deux derniers composés, les glycosides de cette série ne sont pas sélectifs envers les cellules cancéreuses. Toutefois, l'augmentation du caractère hydrophile des aglycones a été atteint étant donné la nature polaire de la section sucre.

8.2 Chapitre 4

Les travaux du chapitre 4 rapportent la synthèse imprévue de 4 nouvelles molécules, soit 4 saponines de l'anhydrobétulinol, ainsi que l'évaluation anticancéreuse de ces composés sur des lignées cellulaires humaines cancéreuses (A-549 et DLD-1) et saine (WS1). L'objectif de ce volet de recherche était d'altérer la structure de triterpènes bioactifs afin d'en bonifier l'activité biologique ainsi que l'hydrosolubilité. Ces travaux ont mené à deux régioisomères alcéniques très peu polaires et peu rapportés dans la littérature. La glycosilation fut entreprise et les saponines obtenues avec de bons rendements (64-88 %) furent celles de l'anhydrobétulinol, peu importe le régioisomère oléfinique de

l'aglycone employé. L'isomérisation oléfinique acido-catalysée des aglycones était déjà connue mais les quatres saponines obtenues sont de nouvelles molécules. Bien que le 3 β -*O*- α -L-rhamnopyranoside d'anhydrobétulinol n'est pas cytotoxique dans cette étude, les 3 autres saponines ont démontrés des valeurs de IC₅₀ entre 23.5 \pm 2.8 et 48.5 \pm 2.2 μ M sur les cellules cancéreuses A-549 et DLD-1. Toutefois ces composés ne sont pas sélectifs envers les cellules cancéreuses.

8.3 Chapitre 5

L'efficacité discutable de l'approche des glycosides d'un point de vue synthétique et thérapeutique a ouvert la voie à un autre type de dérivés: les (*R*)-D-glycérates. Ce chapitre consiste en la synthèse d'une dizaine de (*R*)-D-glycérates du bétulinol et de l'acide bétulinique ainsi que l'évaluation anticancéreuse de ces composés sur des lignées cellulaires humaines cancéreuses (A-549 et DLD-1) et saine (WS1). Les objectifs de ce projet de recherche étaient : 1) accroître l'hydrosolubilité et la cytotoxicité des triterpènes de départ et 2) comparer l'efficacité synthétique et la cytotoxicité de cette classe de dérivés avec les glycosides obtenus précédemment.

Le nombre d'étapes nécessaire à la préparation de l'unité glycérate demeure le même comparativement à l'activation des sucres et la synthèse s'effectue aisément. Toutefois, le rendement global de la synthèse du chlorure d'acide (*R*)-D-2,3-isopropylidène glycérique comparé au rendement d'activation des sucres est un peu plus bas d'environ

10%. Les rendements de couplage de l'unité (*R*)-D-glycérate sont très bons, mais les conditions de clivage du groupement isopropylidène devront être améliorées pour contrer les faibles rendements de déprotection. À ce fait, des acides organiques ou des résines acides à pH contrôlé devraient être investigués plutôt que le HCl aqueux. Néanmoins, les (*R*)-D-glycérates obtenus (sous formes protégés ou non) se purifient et se solubilisent nettement mieux que les glycosides dans les solvants polaires, ce qui est une amélioration majeure dans le développement d'agents thérapeutiques.

Les valeurs de IC_{50} des composés cytotoxiques se situent entre 15.5 ± 0.9 et 39 ± 2 μ M sur les cellules cancéreuses mais la nette majorité d'entre elles se situent à ≈ 16 μ M ce qui est équivalent à l'acide bétulinique et proche du bétulinol. Cette étude a démontré qu'un alcool libre est nécessaire à la bioactivité et que le groupement isopropylidène était très nuisible à l'activité cytotoxique. Tout comme chez plusieurs glycosides investigués dans ce document, la haute polarité d'un (*R*)-D-glycérate de lupane semble être un paramètre nuisible à la bioactivité. La préservation de l'activité cytotoxique de l'acide bétulinique a été atteinte et ce, tout en améliorant considérablement son hydrophilicité.

8.4 Chapitre 6

Ce chapitre rapporte une nouvelle synthèse pour accéder à la famille des germanicanes à partir des lupanes. L'objectif de ce projet était bien axé sur un nouvel accès aux germanicanes mais aussi le développement de triterpènes plus hydrophiles et

anticancéreux que le bétulinol et l'acide bétulinique. Cette synthèse s'est inspirée de l'acide machaérocérique, un germanicane présent chez *Machaerocereus eruca*. La voie de synthèse développée s'est avérée efficace pour développer divers germanicanes, mais il fut impossible d'obtenir la configuration 19 α -OH de l'acide machaérocérique, ce qui aurait permis l'hémisynthèse de ce triterpène naturel. Quelques intermédiaires de synthèse ainsi que l'acide 19 β -machaérocérique ont été évalués pour leurs activités anticancéreuses. La molécule la plus cytotoxique est le 19 β -machaérocérol avec 14.4 ± 3.1 et 18.0 ± 3.6 μ M sur A-549 et DLD-1, alors qu'une altération de cette molécule diminue ou annule l'activité antitumorale.

8.5 Chapitre 7

L'un des objectifs secondaire de cette thèse était de préparer une série de dérivés époxydés de l' α -humulène à partir du géraniol selon la méthode de Corey. L'approche de la synthèse totale a été retenue puisqu'elle comporte l'avantage d'obtenir un époxyde précis. Malheureusement, plusieurs problèmes sont survenus dès les premières étapes de synthèse; de plus, le manque de temps n'a pas permis d'explorer davantage cette approche. Néanmoins, les solutions apportées sont suffisamment efficaces pour envisager une continuité de ce projet.

La synthèse totale n'était pas la bonne approche à entreprendre dès le départ de ce projet. Il aurait fallu utiliser l' α -humulène comme produit de départ et l'époxyder

directement, fractionner les divers époxydes et évaluer leur cytotoxicité. Au moment où un époxyde d'intérêt aurait été identifié, une synthèse de ce dernier aurait pu être envisagée. De plus, la méthode sélectionnée au chapitre 7 n'est pas assez versatile pour effectuer la synthèse de tous les époxydes de l' α -humulène car il est possible qu'un époxyde prometteur d'un point de vue thérapeutique soit difficilement accessible par cette synthèse de Corey. Des travaux supplémentaires seront essentiels afin d'obtenir des résultats prometteurs dans le traitement du cancer à partir de dérivés époxydés de l' α -humulène.

8.6 Recommandations et perspectives

L'accroissement de l'hydrosolubilité est un facteur important dans le développement d'agents bioactifs et des recherches supplémentaires doivent aller dans ce sens. La glycosilation s'est avérée efficace en ce sens mais peu fructueuse d'un point de vue thérapeutique, c'est ainsi que différentes approches pourraient être étudiées comme le greffage de fonctions sulfates, sulfamates, phosphates etc. La synthèse d'amines de triterpènes serait également très envisageable. Des résultats beaucoup plus prometteurs ont été obtenus avec la série (*R*)-glycérate mais la synthèse de la série (*S*)-glycérate devraient également être effectuée afin de comparer si le centre chiral de l'unité glycérate est important sur la bioactivité. De plus, le greffage de l'unité glycérol sous une forme éther a déjà été réussi et la conception d'une série de ces molécules serait une excellente approche pour explorer davantage l'activité de cette classe de composés. La synthèse de la série (*S*)-glycérate et des éthers de glycérol sera un pas de plus vers une meilleure

compréhension des nécessités structurales dans le développement de cette classe d'agent thérapeutique.

Le développement de nouvelles structures moléculaires est également un élément très important pour le développement de nouveaux agents anticancéreux. Le chapitre 4 démontre la génération fréquente et aisée d'insaturations lors de réactions chimiques avec les triterpènes de la famille du lupane. Ces composés hydrophobes ouvrent la voie vers un potentiel de diversité moléculaire impressionnant et un gain important en hydrophilicité grâce au clivage oxydatif tel que l'ozonolyse car une vaste gamme d'alcools, de cétones, d'aldéhydes et d'acides carboxyliques pourrait être obtenue par cette approche.

En combinant la diversité moléculaire et l'accroissement de la solubilité, de nouvelles molécules d'origine triterpéniques verraient le jour. Ceci permettrait une continuité dans la recherche sur le développement d'agents thérapeutiques d'origine naturelle. Les recherches qui ont été effectuées tout au long de mes travaux de doctorat ont eu comme but essentiel le développement d'agents anticancéreux à partir de terpènes, plus particulièrement, les triterpènes issus de la forêt boréale. Ces travaux et les articles qui en découlent, sont un reflet du potentiel presque sans limite dans le développement d'agents thérapeutiques provenant de molécules naturelles aisément accessibles dans nos forêts québécoises et dans les rebuts de l'industrie forestière. Puisque ce domaine de recherche est peu exploité, même au Canada, il est nécessaire de poursuivre ces investigations

compte tenu des faibles connaissances sur le sujet et du potentiel thérapeutique important pouvant découler de ces recherches.

Ces travaux ont permis d'accroître l'expertise du laboratoire LASEVE dans le domaine de la chimie médicinale des produits naturels. Ils pourront servir de guide et orienter les recherches vers le développement d'agents anticancéreux plus efficaces.