

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN RESSOURCES RENOUVELABLES

PAR

CHARLES GAUTHIER

Bachelier ès Sciences (Chimie)

**GLYCOSIDATION DE TRITERPÈNES PENTACYCLIQUES DE TYPE LUPANE
ET ÉVALUATION *IN VITRO* DE LEUR POTENTIEL ANTICANCÉREUX**

JANVIER 2006



Mise en garde/Advice

Afin de rendre accessible au plus grand nombre le résultat des travaux de recherche menés par ses étudiants gradués et dans l'esprit des règles qui régissent le dépôt et la diffusion des mémoires et thèses produits dans cette Institution, **l'Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** est fière de rendre accessible une version complète et gratuite de cette œuvre.

Motivated by a desire to make the results of its graduate students' research accessible to all, and in accordance with the rules governing the acceptance and diffusion of dissertations and theses in this Institution, the **Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** is proud to make a complete version of this work available at no cost to the reader.

L'auteur conserve néanmoins la propriété du droit d'auteur qui protège ce mémoire ou cette thèse. Ni le mémoire ou la thèse ni des extraits substantiels de ceux-ci ne peuvent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

The author retains ownership of the copyright of this dissertation or thesis. Neither the dissertation or thesis, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

À mon père,

RÉSUMÉ

Les triterpènes pentacycliques de type lupane (lupéol, bétulinol et acide bétulinique) font l'objet de plusieurs études concernant leurs propriétés médicinales variées. L'acide bétulinique, molécule la plus étudiée de cette série, possède une activité anticancéreuse *in vitro* sur un large éventail de tumeurs. Cette action chimiothérapeutique a également été démontrée sur un modèle de souris porteuses de tumeurs murines. Contrairement aux agents anti-tumoraux connus, l'acide bétulinique est peu toxique et possède une sélectivité vis-à-vis des mélanomes. Toutefois, sa faible hydrosolubilité est un obstacle majeur pour le développement des études de phase préclinique.

Pour améliorer l'hydrosolubilité de l'acide bétulinique et de ses dérivés, une série de glycosides triterpéniques ont été synthétisés. Leur solubilité relative dans divers solvants a été déterminée et leur activité cytotoxique a été évaluée *in vitro* sur cellules cancéreuses. La fonction anomérique des sucres benzoylés D-glucose, L-rhamnose et D-arabinose a été déprotégée préférentiellement et activée par les trichloroacétimides (59-69%). Ensuite, les réactions de glycosidation et de déprotection subséquentes ont permis l'obtention de 15 monodesmosides triterpéniques (52-90%, 2 étapes; 41-50%, 3 étapes) dont certains n'ont jamais été répertoriés dans la littérature.

Le bétulinol a exercé la plus forte activité anticancéreuse des triterpènes testés ($IC_{50} = 4,5-10,3 \mu M$), mais l'ajout d'une section D-glucose en position 3 ou 28 a entraîné une perte totale d'activité. En revanche, la β -D-glucosidation du lupéol ($IC_{50} > 100 \mu M$) a bonifié significativement l'activité cytotoxique ($IC_{50} = 14-15,0 \mu M$). Par ailleurs, les β -D-glucoside et α -D-arabinoside de bétulinate de méthyle ont montré une forte activité anticancéreuse dépassant celle de la molécule initiale ($IC_{50} = 3,93-8,4 \mu M$ et $13,3-18 \mu M$ respectivement). La glycosidation de l'acide bétulinique a entraîné des gains au niveau de la cytotoxicité et de la sélectivité vis-à-vis des cellules cancéreuses. En effet, l'acide 3-O- α -L-rhamnopyranoside bétulinique a démontré la plus forte activité anticancéreuse des molécules testées ($IC_{50} = 2,6-3,9 \mu M$) en plus d'une sélectivité jusqu'à 12 fois supérieure comparativement aux cellules saines du fibroblaste humain ($IC_{50} = 31 \mu M$).

Mots clés : Bouleau, triterpène, acide bétulinique, bétulinol, lupéol, glycoside, hydrosolubilité, cancer, cytotoxicité.

REMERCIEMENTS

Je remercie, tout d'abord, le professeur André Pichette, mon directeur de maîtrise, pour m'avoir fait découvrir le merveilleux monde de la chimie organique des produits naturels. Ses idées ingénieuses et actuelles dans ce domaine m'ont permis de réaliser un projet très enrichissant et à la fine pointe des avancées scientifiques et technologiques.

Je remercie le professeur Jean Legault, mon co-directeur, qui a rendu possible un projet de recherche en *chimie médicinale* par la mise en place de tests de bioactivité dans son laboratoire. Ses assistants de recherche m'ont été d'une aide précieuse, plus particulièrement Maxime Lebrun qui a réalisé les analyses concernant l'activité anticancéreuse des composés à l'étude.

Au niveau du laboratoire, je remercie Serge Lavoie, assistant de recherche du professeur Pichette, pour les nombreux conseils qu'il m'a donnés lors de mes débuts dans le domaine de la chimie organique. Ses explications détaillées concernant, par exemple, l'utilisation du spectromètre de résonance magnétique nucléaire m'ont permis de réaliser judicieusement mes analyses.

Je remercie spécialement Philippe Dufour, finissant au baccalauréat en chimie, pour l'apport considérable aux travaux de laboratoire. Que ce soit pour l'extraction massive des composés à partir des matrices végétales ou pour les chromatographies éclairées successives ainsi que par sa ferveur et sa présence au travail, il a permis l'avancement rapide du projet.

Je remercie également Jimmy Bouchard, chercheur post-doctoral au LASEVE, pour ses judicieux conseils en tant que chimiste organicien ainsi que pour sa contribution à la synthèse de l'acide bétulinique et des dérivés du glucose.

Je remercie André Barrette, ancien technicien de laboratoire à l'UQAC et souffleur de verre, pour la verrerie rescapée, Hélène Gagnon du laboratoire LASEVE pour la disponibilité du GC-MS, Dr. Bernd Keller de Queen's University à Kingston en Ontario pour les analyses HRMS et Dr. Francine Bélanger-Gariépy du département de chimie de l'Université de Montréal pour l'analyse élémentaire des échantillons.

Certains organismes subventionnaires ont contribué au développement et au financement du projet: c'est le cas du FQRNT (Fondation Québécoise de la Recherche sur la Nature et les Technologies), la Fondation Gaston L. Tremblay ainsi que la Scierie Thomas-Louis Tremblay Inc. de Sainte-Monique-de-Honfleur. Je tiens à les remercier.

Je remercie mon ami Karl Lalancette pour les nombreuses soirées passées à discuter de la chimie et de la science en général ainsi que mon ami Dominic Dufour avec qui j'ai vécu de très bons moments en France durant mon stage à l'Université de Poitiers.

Enfin, je tiens à remercier d'une manière spéciale ma compagne, Marianne Piochon et mes parents, Jocelyne Boivin et Gaston Gauthier. Durant la dernière année, ils m'ont donné le courage et la force nécessaire à l'aboutissement de ce projet de recherche.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé_____	iii
Remerciements_____	iv
Table des matières_____	vi
Liste des figures_____	viii
Liste des tableaux_____	x
Liste des annexes_____	xi
CHAPITRE I. INTRODUCTION_____	1
CHAPITRE II. TRITERPÈNES PENTACYCLIQUES_____	7
2.1. Considérations générales_____	7
2.2. Activités biologiques des triterpènes de type lupane_____	9
2.2.1. Lupéol (1)_____	9
2.2.2. Bétulinol (2)_____	11
2.2.3. Acide bétulinique (3)_____	13
2.3. Dérivés anticancéreux et relations structure-activité_____	18
CHAPITRE III. SAPONINES TRITERPÉNIQUES_____	21
3.1. Considérations générales_____	21
3.1.1. Les glycosides naturels_____	21
3.1.2. Les saponines_____	23
3.2. Propriétés biologiques des saponines triterpéniques_____	25
3.3. Isolation de glycosides triterpéniques_____	27
3.4. Synthèse de glycosides triterpéniques_____	29
3.5. Trichloroacétimides_____	32

CHAPITRE IV. ARTICLE: <i>JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY</i>	34
CHAPITRE V. ÉTAT D'AVANCEMENT DU PROJET	73
5.1. Chimie	73
5.2. Biologie	77
CHAPITRE VI. CONCLUSION	80
6.1. Conclusions générales	80
6.2. Perspectives futures	83
Bibliographie	86

LISTE DES FIGURES

Figure 1. <i>Betula papyrifera</i> Marsh. et <i>Betula alleghaniensis</i> Britton	2
Figure 2. Triterpènes et monosaccharides utilisés pour la glycosidation	3
Figure 3. Structure moléculaire et numérotation des triterpènes et glycosides	6
Figure 4. Schéma biosynthétique de certaines familles de triterpènes	8
Figure 5. Structure tridimensionnelle du lupéol (1)	9
Figure 6. Structure tridimensionnelle du bétulinol (2)	11
Figure 7. Voies de synthèse de l'acide bétulinique (3) à partir du bétulinol (2)	12
Figure 8. Structure tridimensionnelle de l'acide bétulinique (3)	13
Figure 9. Dérivés triterpéniques antiviraux spécifiques au VIH-1	14
Figure 10. Activité antimélanome <i>in vivo</i> de l'acide bétulinique (3)	16
Figure 11. Dérivés anticancéreux de l'acide bétulinique (3) (MEL-2)	19
Figure 12. Dérivés d'acide bétulinique (3) obtenus par microbiotransformation	20
Figure 13. Saponine à génine stéroïdique: Ginsenoside M1 (37)	24
Figure 14. Saponine anticancéreuse OSW-1 (38)	26
Figure 15. Saponines triterpéniques de type lupane isolées	28

Figure 16. Saponines triterpéniques de type lupane synthétisées	30
Figure 17. 28-O- β -D-Glucopyranoside d'acide bétulinique (51)	31
Figure 18. Addition de CCl ₃ CN sur la position anomérique d'un sucre	33
Figure 19. CCM de la réaction de glucosidation du lupéol (1) (révélée au CAM)	75
Figure 20. Cytotoxicité des triterpènes et glycosides (Test RTT, IC ₅₀ μ M en Y)	78
Figure 21. Cytotoxicité des triterpènes et glycosides (Test Hoechst, IC ₅₀ μ M en Y)	79

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Cytotoxicité <i>in vitro</i> de l'acide bétulinique (3) sélective au mélanome_____	15
Tableau 2. Profil cytotoxique de l'acide bétulinique (3)_____	17
Tableau 3. Exemples de glycosides naturels bioactifs_____	22
Tableau 4. Rendements d'extraction du lupéol (1)_____	73
Tableau 5. Rendements de synthèse des dérivés sucrés_____	74
Tableau 6. Solubilité relative des glycosides triterpéniques_____	76
Tableau 7. Résultats de la quantification de l'ADN cellulaire par le test Hoechst_____	77

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1. Liste des abréviations_____	95
Annexe 2. Structures moléculaires des glycosides triterpéniques_____	97
Annexe 3. Schémas réactionnels_____	101
Annexe 4. Mécanismes réactionnels_____	107
Annexe 5. Spectres RMN_____	110

CHAPITRE I

INTRODUCTION

L'homme sait, depuis fort longtemps, que la nature est porteuse d'une richesse médicinale. Les peuples ancestraux d'Amérique du Nord ont tiré profit des propriétés biologiques des extraits végétaux de la forêt boréale pour soigner et prévenir les pathologies courantes [Marles *et al.*, 2000]. C'est ainsi que le peuple des Premières Nations utilisaient, par exemple, les décoctions d'écorces de bouleau afin de traiter les infections ou soigner les douleurs rhumatismales [Marles *et al.*, 2000]. De nos jours, la communauté scientifique s'intéresse activement à l'énorme potentiel pharmaceutique contenu dans la pharmacopée des forêts amazoniennes et africaines [Bruneton, 1999]. Toutefois, peu de recherches intensives ont été menées concernant l'activité biologique potentielle des espèces de la forêt boréale. Or, en 1971, le paclitaxel, un composé organique naturel isolé des écorces de l'if du Pacifique (*Taxus brevifolia* Nutt.), a été identifié comme agent anti-tumoral à des concentrations de l'ordre du nanomolaire [Wani *et al.*, 1971]. Cette molécule a également été isolée par des chercheurs québécois dans les écorces de l'if du Canada (*Taxus canadensis* Marsh.), un petit conifère de la forêt boréale [Jean, 1992]. Le taxol ou plus précisément le paclitaxel est actuellement l'un des agents thérapeutiques les plus utilisés en chimiothérapie anticancéreuse pour le traitement du cancer du sein, des poumons et des ovaires [Cragg *et al.*, 2005] avec des ventes s'élevant à plus de deux milliards de dollars américains en 2000.

Dernièrement, deux espèces de feuillus, le bouleau blanc et le bouleau jaune, couramment rencontrés dans la forêt boréale québécoise ont attiré l'attention des chercheurs dans le domaine de la chimie des produits naturels (Fig. 1). Le bouleau blanc (*Betula papyrifera* Marsh.) communément appelé le bouleau à papier est principalement utilisé par l'industrie du sciage. Ne constituant pas de forêts pures permanentes, sa longévité maximum est de 150 à 200 ans [Marie-Victorin, 2002]. Pour sa part, le bouleau jaune (*Betula alleghaniensis* Britton), emblème du Québec, est l'un des plus grands arbres de la forêt laurentienne. Il peut atteindre jusqu'à 33 mètres de hauteur à maturité. Son écorce possède une odeur aromatique qui lui est propre [Marie-Victorin, 2002].



Figure 1. *Betula papyrifera* Marsh. et *Betula alleghaniensis* Britton

L'écorce externe de ces arbres contient certains produits naturels de la famille des triterpènes pentacycliques de type lupane [O'Connel *et al.*, 1988] ayant démontré des activités biologiques très diversifiées (bactéricide, antivirale, anti-inflammatoire, cytotoxique, antitumoral). En effet, le lupéol (1), le bétulinol (2) et l'acide bétulinique (3)

(Fig. 2) font l'objet d'études de la part de plusieurs laboratoires de recherche [Patočka *et al.*, 2003]. En plus de son activité antivirale relative au virus d'immunodéficience humaine (VIH) de type I [Fujioka *et al.*, 1994], l'acide bétulinique (3) est le composé le plus intéressant de cette série en raison de sa cytotoxicité sélective envers les mélanomes humains [Pisha *et al.*, 1995]. Remarquablement, l'acide bétulinique (3) n'a pas démontré de toxicité sur modèle murin et ce, même à des doses supérieures à 500 mg/kg de poids corporel [Pisha *et al.*, 1995]. Ces résultats prometteurs ont amené *The National Cancer Institute* (NCI) à placer l'acide bétulinique sur son programme de développement rapide: *Rapid Access to Intervention Development* (RAID).¹

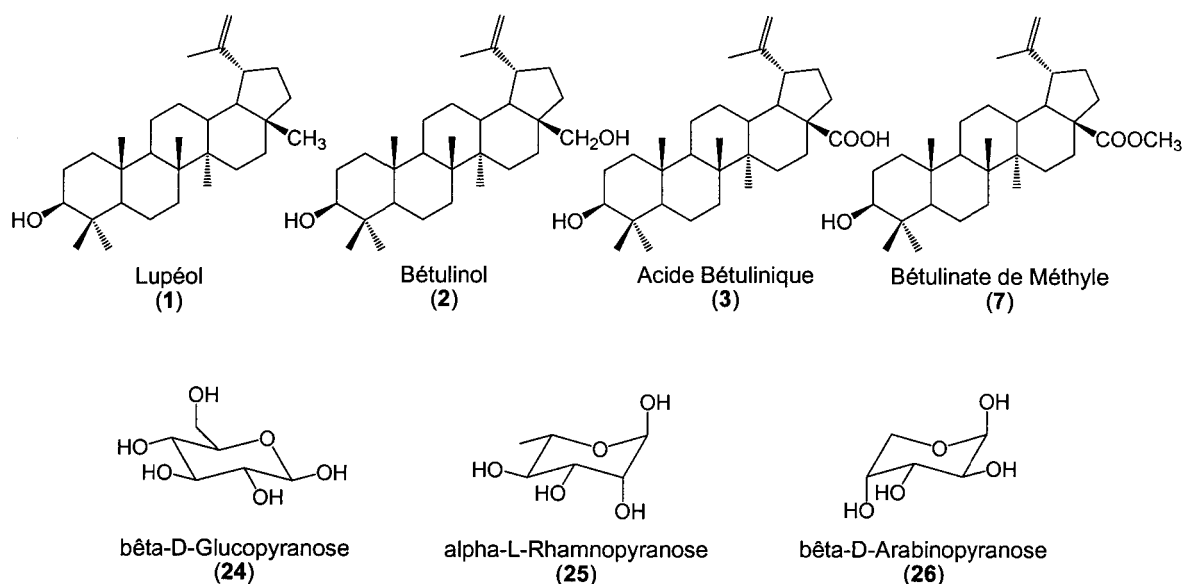


Figure 2. Triterpènes et monosaccharides utilisés pour la glycosidation

Un des problèmes majeurs au développement préclinique de l'acide bétulinique (3) réside dans sa faible hydrosolubilité. Ce manque de solubilité en phase aqueuse et, par le fait même, dans le sérum sanguin, complique son mode d'administration et son absorption

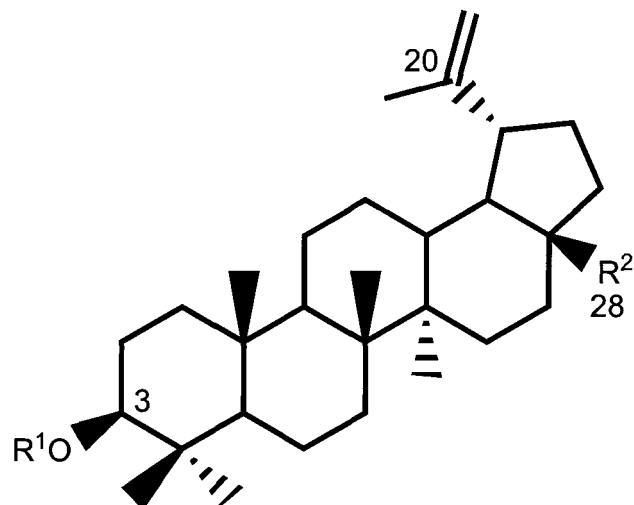
¹ http://dtp.nci.nih.gov/docs/raid/raid_index.html

dans l'organisme [Udeani *et al.*, 1999]. Pour contrer ce problème et dans le but de trouver de nouveaux agents thérapeutiques prometteurs, nombre de chercheurs se sont penchés sur la synthèse de dérivés plus hydrosolubles de l'acide bétulinique (**3**) tels que des dérivés peptidiques et oxygénés ainsi que des esters et oximes [Cichewicz *et al.*, 2004]. Ces études sont nécessaires afin d'établir les relations entre la structure moléculaire et l'activité cytotoxique de l'acide bétulinique (**3**) et des triterpènes dérivés (relations structure-activité). C'est donc dans cette optique que notre groupe de recherche s'est tourné vers la synthèse de glycosides des triterpènes de type lupane. En effet, bien que de nombreux triterpènes soient retrouvés sous une forme glycosidée dans la nature [Křen *et al.*, 2001], très peu de travaux ont rapporté la synthèse organique de ce type de molécules.

Ce projet de recherche rapporte la synthèse de plusieurs monodesmosides (glycosides porteurs d'une seule section sucre) de D-glucose (**24**), L-rhamnose (**25**) et D-arabinose (**26**) sur la fonction hydroxyle en position C-3 pour le lupéol (**1**), le bétulinol (**2**), l'acide bétulinique (**3**) et le bétulinate de méthyle (**7**) (Fig. 2). Les glycosides de bétulinol (**2**) sur la fonction hydroxyle en position C-28 ont également été synthétisés. Tous les composés ont été caractérisés à l'aide des techniques usuelles de chimie organique (point de fusion, indice de rotation, spectroscopie de résonance magnétique nucléaire, spectroscopie de masse haute résolution). L'activité anticancéreuse a été évaluée *in vitro* à l'aide du test de réduction à la résazurine [O'Brien *et al.*, 2000] et du test Hoechst [Rago *et al.*, 1990] sur deux lignées cellulaires cancéreuses humaines, un carcinome du poumon (A-549) et un adénocarcinome du colon (DLD-1), ainsi que sur un mélanome murin (B16-F1). De plus, la cytotoxicité vis-à-vis des fibroblastes humains normaux (WS-1) a également été évaluée afin de déterminer la sélectivité des composés testés.

Ce mémoire de maîtrise est subdivisé en six chapitres. Le présent chapitre décrit sommairement le projet, les chapitres II et III dressent d'une manière succincte une partie de la revue de littérature scientifique des dernières années concernant l'isolation, la synthèse de dérivés, l'activité biologique et les relations de structure-activité pour les triterpènes et les saponines triterpéniques de type lupane. Le chapitre III traite également de la méthode d'activation par les trichloroacétimides adoptée pour la synthèse des glycosides. Le chapitre IV, section principale du mémoire, contient l'article scientifique rédigé à la suite des résultats obtenus lors du projet de maîtrise. Cet article sera soumis prochainement au *Journal of Medicinal Chemistry* de la société américaine de chimie (ACS). Il contient, entre autres, la procédure expérimentale détaillée, les résultats ainsi que la discussion concernant la synthèse organique et l'évaluation de l'activité anticancéreuse *in vitro* des dérivés ciblés. Le chapitre V établit l'état d'avancement du projet de recherche et présente les résultats chimiques et biologiques intéressants qui n'ont pu faire l'objet de la publication. Finalement, le chapitre VI traite des principales conclusions tirées à la suite de l'analyse des résultats et discute de quelques perspectives futures intéressantes.

Pour éviter toutes confusions, la numérotation des molécules synthétisées (triterpènes et glycosides) est la même que dans l'article scientifique (Fig. 3). Par ailleurs, les autres composés sont numérotés à la suite par ordre d'apparition dans le texte.



Composé	R ¹	R ²
1	H	CH ₃
2	H	CH ₂ OH
3	H	COOH
4	Ac	CH ₂ OAc
5	H	CH ₂ OAc
6	Ac	CH ₂ OH
7	H	COOCH ₃
8	H	COOAlI
9	Glu	CH ₃
10	Rha	CH ₃
11	Ara	CH ₃
12	Glu	CH ₂ OH
13	Rha	CH ₂ OH
14	Ara	CH ₂ OH
15	H	CH ₂ O-Glu
16	H	CH ₂ O-Rha
17	H	CH ₂ O-Ara
18	Glu	COOCH ₃
19	Rha	COOCH ₃
20	Ara	COOCH ₃
21	Glu	COOH
22	Rha	COOH
23	Ara	COOH

Figure 3. Structure moléculaire et numérotation des triterpènes et glycosides

CHAPITRE II

TRITERPÈNES PENTACYCLIQUES

2.1. Considérations générales

Les triterpènes sont une classe de métabolites secondaires composés de 30 carbones. Au niveau biosynthétique, les 200 différents squelettes connus jusqu'à ce jour et isolés de sources naturelles proviennent de la cyclisation du 3S-2,3-époxydo-2,3-dihydro-squalène (**27**) et quelquefois du squalène lui-même. Ces molécules sont presque toujours hydroxylées en position 3 étant donné l'ouverture de l'époxyde lors de la cyclisation. La figure 4 présente certains types de triterpènes pentacycliques souvent rencontrés dans la littérature [Xu *et al.*, 2004]. L'origine biosynthétique de ces triterpènes a été démontrée à l'aide d'expériences utilisant des groupements acétates doublement marqués au ^{13}C ou par des réactions biomimétiques *in vitro* en milieu acide. Les modifications supplémentaires sur le squelette sont assez limitées. En effet, les hydroxylations, oléfinations, méthylations et lactonisations sont les réactions enzymatiques les plus courantes [Bruneton, 1999].

Les nombreuses activités biologiques des triterpènes en font un groupe de produits naturels de première importance. Ils sont fréquemment rencontrés dans la nature sous une forme glycosidée dite saponine et responsables d'une multitude d'activités thérapeutiques et biologiques (cytostatique, antivirale Abd ellatif_Gountit@uqac.ca, insecticide, anti-inflammatoire, molluscicide, analgésique) [Bruneton, 1999].

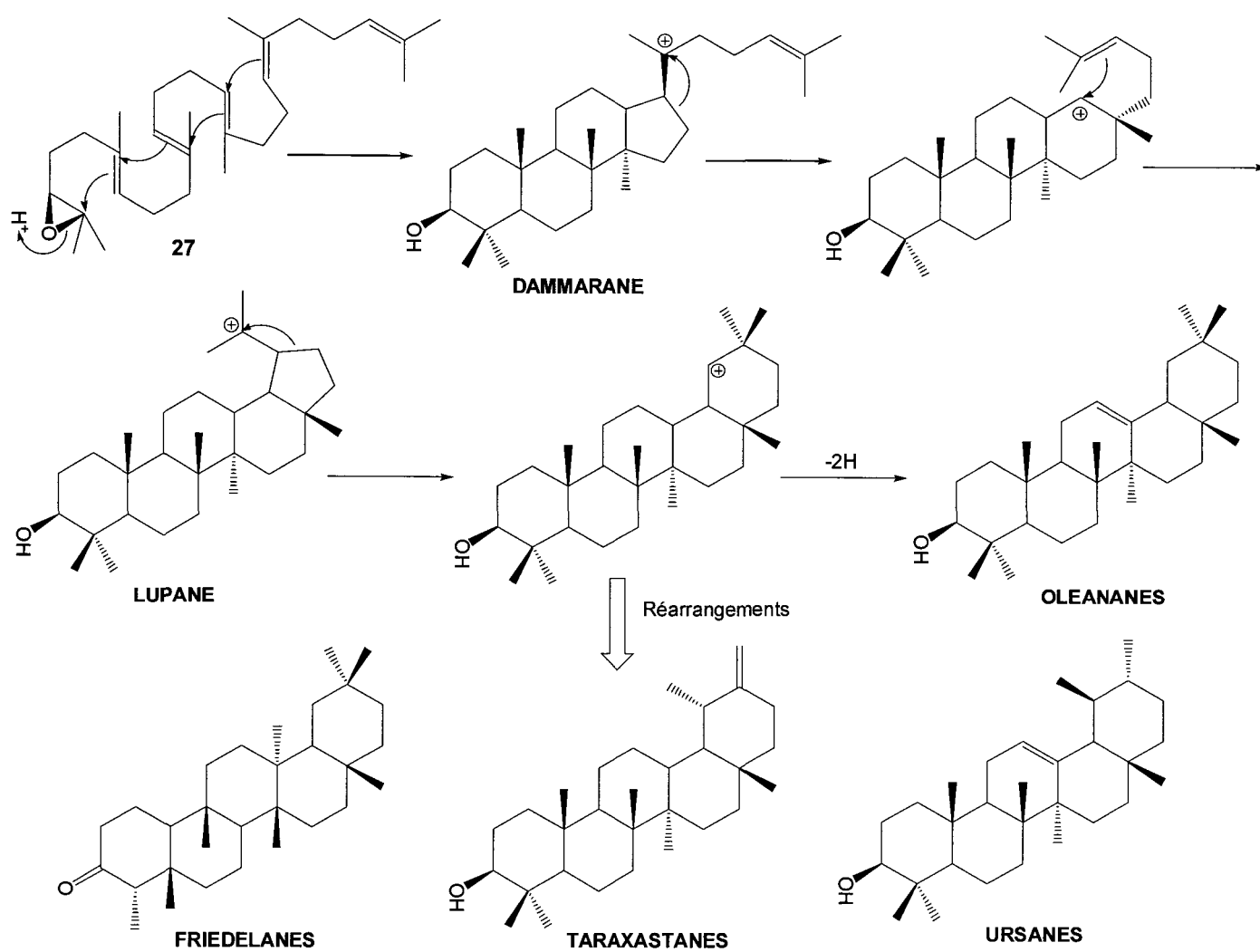


Figure 4. Schéma biosynthétique de certaines familles de triterpènes

2.2. Activités biologiques des triterpènes de type lupane

2.2.1. Lupéol

Le lupéol (1) ou lup-20(29)-en-3 β -ol (Fig. 5) est le triterpène de la famille du lupane le plus souvent retrouvé dans le règne végétal. Il a déjà été isolé des écorces externes du bouleau blanc [O'Connel *et al.*, 1988], mais c'est dans celles du bouleau jaune qu'il est le plus abondant (0,6-1,1%) [Habiyaemye *et al.*, 2002].

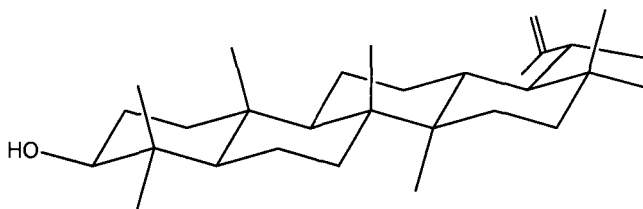


Figure 5. Structure tridimensionnelle du lupéol (1)

La toxicité du lupéol (1) chez l'animal est très faible. Une administration par voie orale à une dose de 2 g/kg de poids corporel n'a affecté en rien l'état de santé d'un groupe de rats et de souris, et après 96 heures, aucune mortalité n'a été enregistrée [Patočka, 2003].

Le lupéol (1) est reconnu principalement pour ses propriétés anti-inflammatoires. En effet, une forte activité anti-inflammatoire a été démontrée chez un groupe de souris affectées par l'arthrite. Dans cette expérience, l'effet observé était comparable à celle de l'acide acétylsalicylique à une dose de 100 mg/kg de poids corporel [Geetha *et al.*, 1998]. L'inflammation étant un procédé physiopathologique très complexe, le mécanisme d'action du lupéol (1) a aussi été examiné. Les résultats de la recherche ont montré que l'activité anti-inflammatoire est due à une action immunosuppressive, à l'inhibition des cellules

migrant au site d'inflammation et à la réduction de l'excrétion des facteurs pro-inflammatoires [Fernández *et al.*, 2001].

Le lupéol (**1**) a montré une activité antiangiogénique *in vitro* significative sur les cellules veineuses ombilicales humaines (HUVEC) à une dose comprise entre 30-50 µg/mL [You *et al.*, 2003]. Une molécule possède une activité antiangiogénique lorsqu'elle inhibe la formation de vaisseaux sanguins qui alimentent, par exemple, une tumeur.

Il existe des contradictions dans la littérature scientifique concernant la cytotoxicité du lupéol (**1**). Le groupe de Pezzuto a signalé une activité cytotoxique sur les cellules du mélanome humain ($ED_{50} = 17,6 \mu\text{M}$, SK-MEL-2) [Kim *et al.*, 1998] tandis que le groupe de You a rapporté que le lupéol (**1**) n'affectait pas la croissance des lignées cellulaires cancéreuses du mélanome humain (SK-MEL-2), du poumon humain (A-549) et du mélanome de souris (B16-F10), et ce, à la concentration maximale testée ($ED_{50} > 30 \mu\text{M}$) [You *et al.*, 2003]. Toutefois, une autre étude a identifié le lupéol (**1**) comme composé actif des feuilles de *Dendropanax cf. querceti*. Les résultats indiquent une activité anticancéreuse *in vitro* sur le carcinome hépatocellulaire humain (Hep-G2, $IC_{50} = 77 \mu\text{M}$) [Moriarity *et al.*, 1998]. Récemment, il a été démontré que le lupéol (**1**) pouvait induire l'apoptose des cellules leucémiques humaines (HL-60). Des changements morphologiques caractéristiques de l'apoptose ont été observés lorsque ces cellules étaient traitées avec le lupéol (**1**) [Aratanechemuge *et al.*, 2004].

2.2.2. Bétulinol

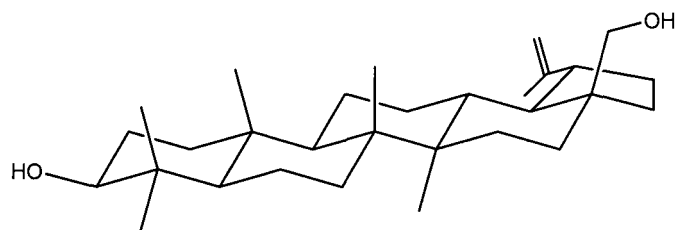


Figure 6. Structure tridimensionnelle du bétulinol (**2**)

Le bétulinol (**2**) ou lup-20(29)-en-3 β -28-diol (Fig. **6**) est l'un des premiers produits naturels extrait d'une matrice végétale. Ce triterpène pentacyclique de la famille du lupane a été isolé pour la première fois de l'écorce externe du bouleau blanc par un dénommé Lowitz en 1788. Ce n'est qu'environ 150 ans plus tard que la structure chimique de cette molécule a été établie. En plus de ses propriétés médicinales très diversifiées (anti-inflammatoire, antiphlogistique, ...), le bétulinol (**2**) est utilisé en cosmétique et comme émulsifiant [Patočka, 2003]. Plusieurs chercheurs ont mis au point des synthèses de l'acide bétulinique (**3**) à partir du bétulinol (**2**) en tirant profit de son abondance dans l'écorce externe du bouleau blanc [O'Connel *et al.*, 1988]. À cet effet, le groupe de Pezzuto a réussi la conversion du bétulinol (**2**) en acide bétulinique (**3**) en utilisant une approche qui implique une oxydation avec le réactif de Jones suivi d'une réduction subséquente au NaBH₄ (Fig. **7**). Le rendement global obtenu en acide bétulinique (**3**) pour la voie synthétique utilisée est de l'ordre de 71% en isomère- β après recristallisation [Kim *et al.*, 1997]. Une voie de synthèse utilisant des oxydants sélectifs a récemment été élaborée par notre groupe de recherche [Pichette *et al.*, 2004]. Celle-ci consiste en 1) l'oxydation du bétulinol (**2**) en aldéhyde bétulinique par l'action du CrO₃ adsorbé sur silice

et 2) l'oxydation subséquente de l'aldéhyde en acide par ajout de KMnO_4 (Fig. 7). Cette méthode permet d'obtenir uniquement l'isomère- β sans effectuer de recristallisation.

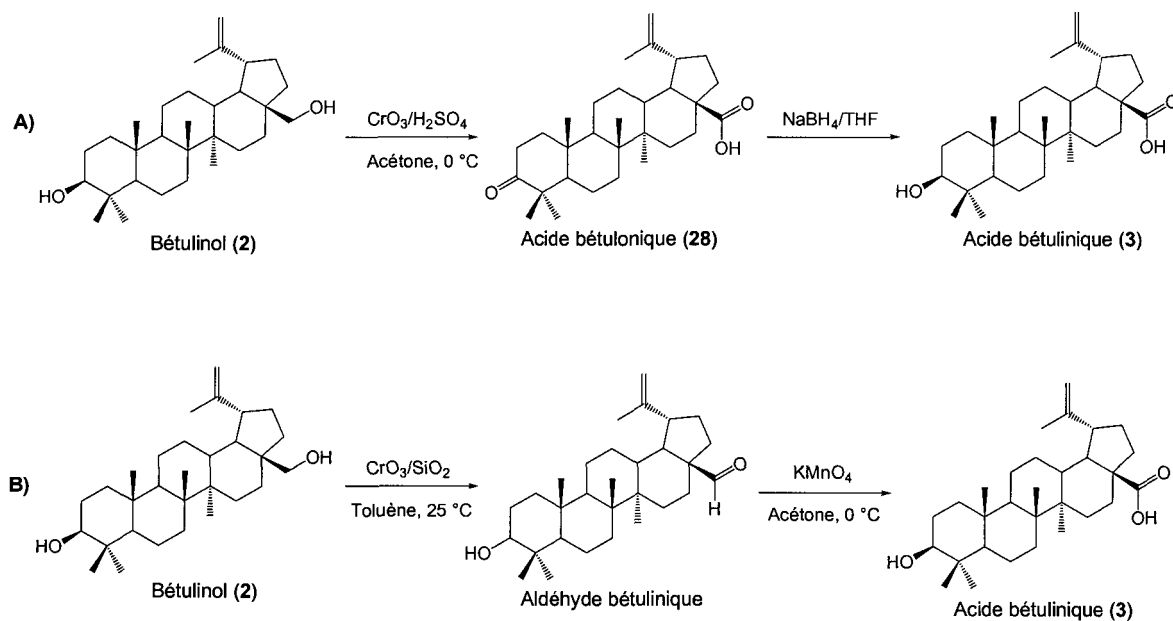


Figure 7. Voies de synthèse de l'acide bétulinique (3) à partir du bétulinol (2)

A) Kim *et al.*, 1997; B) Pichette *et al.*, 2004

2.2.3. Acide bétulinique

L'acide bétulinique (**3**) ou l'acide 3 β -hydroxy-lup-20(29)-en-28-oïque (Fig. 8) est sans aucun doute le composé le plus étudié de la série des triterpènes pentacycliques de la famille du lupane. En effet, les nombreuses revues de littérature publiées sur le sujet durant les dernières années démontrent bien l'intérêt de la communauté scientifique envers ce produit naturel [Baglin *et al.*, 2003; Cichewicz *et al.*, 2004; Eiznhamer *et al.*, 2004].

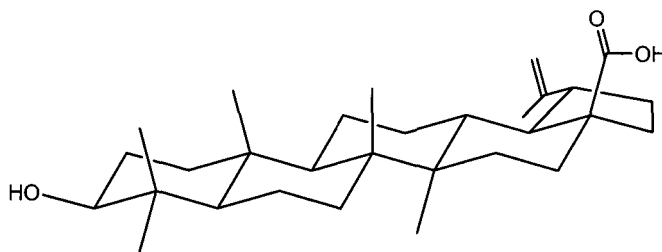
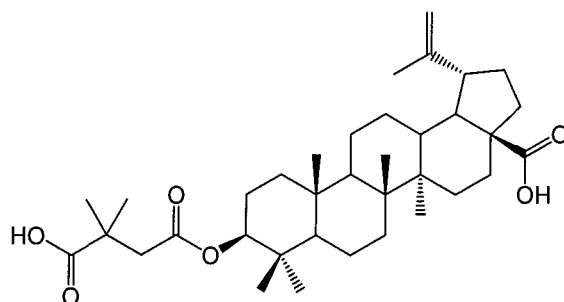


Figure 8. Structure tridimensionnelle de l'acide bétulinique (**3**)

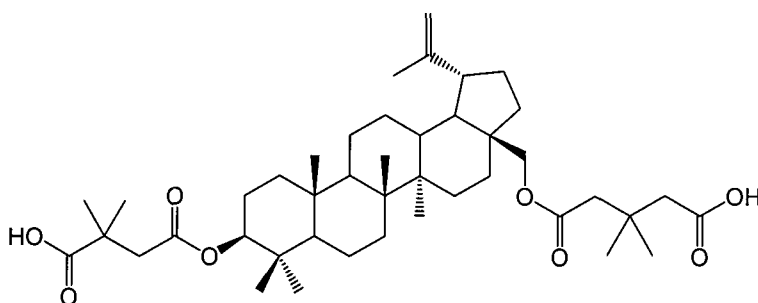
L'acide bétulinique (**3**) a été reconnue comme principe actif de plus de 2500 espèces végétales à travers le monde [Baglin *et al.*, 2003]. En plus de son action anti-inflammatoire [Safayhi *et al.*, 1997], il a été démontré que l'acide bétulinique (**3**) possède une activité antimalariale *in vitro* contre des souches résistantes (K1, IC₅₀ = 19,6 µg/mL) et sensibles (T9-96, IC₅₀ = 25,9 µg/mL) de *Plasmodium falciparum*. Lors de cette étude, le bétulinol (**2**) a également été testé et il n'a pas montré d'activité à la concentration maximale testée (IC₅₀ >500 µg/mL) [Steele *et al.*, 1999].

En 1994, une étude publiée dans *Journal of Natural Products* a indiqué que les triterpènes pentacycliques dont l'acide bétulinique (**3**) sont capable d'inhiber la réplication du VIH de type I dans un système modèle *in vitro* (ED₅₀ = 1,4 µM) [Fujioka *et al.*, 1994]. Depuis ce temps, de nombreux dérivés ont été synthétisés dans l'intérêt de trouver des

composés antiviraux actifs sur le VIH à de plus basses concentrations et pouvant rivaliser avec les agents thérapeutiques utilisés pour le traitement de cette pathologie. Parmi les dérivés les plus prometteurs (Fig. 9), les analogues 3-O-(3,3-diméthylsuccinyl) d'acide bétulinique (29) [Kashiwada *et al.*, 1996] et 3,28-di-O-(3,3-diméthylglutaryl) de bétulinol (30) [Sun *et al.*, 1998] ont exercé les plus fortes inhibitions ($ED_{50} < 3,5 \times 10^{-4} \mu M$).



Acide bétulinique 3-O-(3',3'-diméthylsuccinyl) (29)
 $ED_{50} = < 3,5 \times 10^{-4} \mu M$



Bétulinol 3,28-di-O-(3',3'-diméthylglutaryl) (30)
 $ED_{50} = 6,6 \times 10^{-4} \mu M$

Figure 9. Dérivés triterpéniques antiviraux spécifiques au VIH-1

L'activité anti-tumorale de l'acide bétulinique (3) est l'une de ses propriétés biologiques les plus intéressantes. Les premières études menées par le groupe de Pezzuto ont établi que l'acide bétulinique (3) était un composé possédant une activité cytotoxique spécifique au mélanome humain [Pisha *et al.*, 1995]. En effet, telle que présentée dans le tableau 1, la croissance des lignées cellulaires MEL-1, -2, -4 a été

inhibée sélectivement avec des valeurs d'ED₅₀ comprises entre 1-5 µg/mL. Ce type de réponse est en contraste avec la majorité des autres agents anti-tumoraux qui démontrent des activités cytotoxiques relativement intenses sans sélectivité vis-à-vis des cellules cancéreuses. Cette étude a donc permis de prouver que l'acide bétulinique (**3**) était capable d'inhiber sélectivement la croissance de plusieurs mélanomes humains.

Tableau 1. Cytotoxicité *in vitro* de l'acide bétulinique (**3**) sélective au mélanome

Composé	Lignée cellulaire humaine ED ₅₀ (µg/mL)						
	BC-1 ^a	COL-2 ^a	LNCaP ^a	LU-1 ^a	MEL-1 ^b	MEL-2 ^b	MEL-4 ^b
Acide bétulinique (3)	>20	>20	>20	>20	1,1	2,0	4,8
Camptothécine	0,07	0,005	0,006	0,004	0,02	0,02	0,02
Ellipticine	0,2	0,3	0,8	0,02	2,4	2,3	2,9
Homoharringtonine	0,03	0,1	0,03	0,03	0,04	0,06	0,05
Mithramycine A	0,3	0,06	0,05	0,2	0,5	0,5	0,2
Podophyllotoxine	0,03	0,005	0,04	0,008	0,02	0,01	0,01
Taxol	0,02	0,02	0,02	0,009	<0,0006	<0,0006	<0,0006
Vinblastine	0,06	0,01	0,1	0,02	0,02	0,01	0,001
Vincristine	0,01	0,02	0,1	0,05	<0,0006	<0,0006	<0,0006

^a Cellules saines: BC-1 (poitrine), COL-2 (colon), LNCaP (prostate), LU-1 (poumon).

^b Mélanomes: MEL-1 (nodule lymphatique), MEL-2 (fluide pleural), MEL-4 (tumeur primaire de la peau).

Ce même groupe a entrepris de confirmer l'activité antimélanome de l'acide bétulinique (**3**) sur un modèle de souris porteuses de tumeurs murines (Fig. 10). Pour ce faire, les chercheurs ont utilisé quatre groupes de souris (un groupe témoin et trois groupes traités) qu'ils ont injectées d'une manière sous-cutanée avec 6×10^4 cellules de MEL-1. Par la suite, les souris ont été traités avec l'acide bétulinique (**3**) immédiatement

après l'injection des cellules cancéreuses. Quant à lui, le groupe témoin s'est vu recevoir le traitement seulement au 40^e jour de l'expérimentation. Pour les trois groupes traités, les résultats montrent une inhibition complète de la croissance et du développement de la tumeur cancéreuse. Par ailleurs, pour le groupe témoin, une régression de 80 % du volume moyen de la tumeur a été enregistrée. De plus, lors de ces études *in vivo*, aucune toxicité, métastases ou anomalies structurales dans les organes vitaux des souris n'ont été notées.

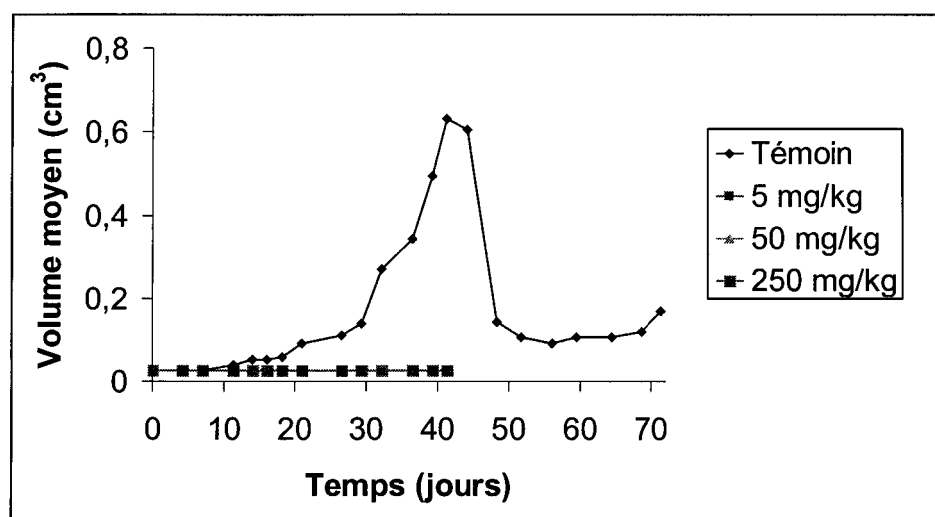


Figure 10. Activité antimélanome *in vivo* de l'acide bétulinique (3) [Pisha *et al.*, 1995]

Des études récentes ont clairement indiqué que le potentiel anticancéreux de l'acide bétulinique (3) était étendu à d'autres types de lignées cellulaires [Fulda *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 1997; Zuco *et al.*, 2002]. En effet, comme le montre le tableau 2, l'acide bétulinique (3) possède, entre autres, une action chimiothérapeutique significative sur le cancer du colon, du foie, du sein, du poumon, des ovaires et sur les glioblastomes (cerveau).

Tableau 2. Profil cytotoxique de l'acide bétulinique (**3**) [Setzer *et al.*, 2003]

Type de tumeur	Lignée cellulaire	IC ₅₀ μM
Carcinome du colon	Co-115	0,821
Glioblastome	LN-229	20
Glioblastome	U87MG	25
Glioblastome multiforme	T98G	25
Carcinome hépatocellulaire	Hep-G2	34
Adénocarcinome mammaire	MDA-MB-231	9,61
Carcinome du poumon	A-549	4
Adénocarcinome ovarien	SK-OV-3	8,3
Carcinome du colon	HCT-15	8,1

Par ailleurs, il a été reporté que l'acide bétulinique (**3**) induisait l'apoptose (mort cellulaire programmée) par un mécanisme faisant intervenir des changements dans le potentiel membranaire des mitochondries et la production d'espèces réactives oxygénées [Schmidt *et al.*, 1997]. En résumé, ces procédés entraînent l'envoi de facteurs apoptogéniques mitochondriaux dans le milieu intracellulaire ce qui enclenche l'activation des caspases et, enfin, la fragmentation du matériel génétique (ADN) [Fulda *et al.*, 1997].

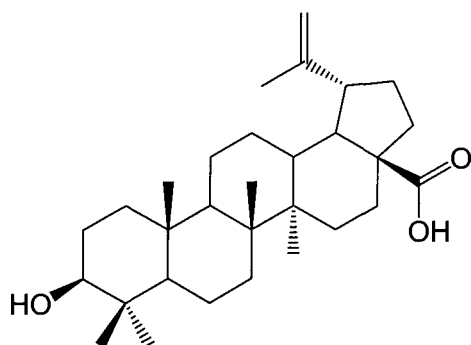
2.3. Dérivés anticancéreux et relations structure-activité

Comme il a été dit précédemment, l'acide bétulinique (**3**) est un agent thérapeutique très prometteur pour le traitement d'un grand nombre de cancers. Plusieurs dérivés de l'acide bétulinique (**3**) ont été synthétisés dans le but d'établir des relations significatives entre la structure chimique des analogues et l'activité anticancéreuse (Fig. 11). Par ailleurs, il est important de noter que la structure chimique de l'acide bétulinique (**3**) comporte trois positions fonctionnelles qui ont servi de cibles dans la synthèse d'analogues: l'hydroxyle en C-3, l'alcène en C-20 et l'acide carboxylique en C-28.

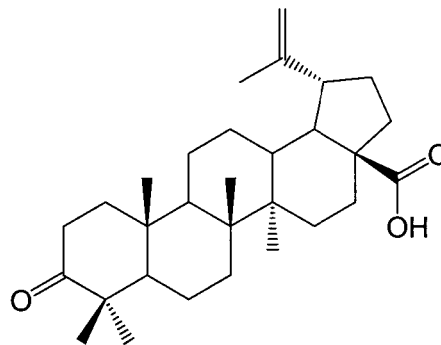
Au niveau des modifications en C-20, selon les conclusions d'une récente étude, cette position n'est pas un site fonctionnel favorable à modifier pour augmenter la cytotoxicité. En effet, l'introduction d'une fonction cétone ou oxime sur le carbone 29 voisin de l'alcène entraîne une perte de l'activité anticancéreuse [Kim *et al.*, 2001]. Cependant, il semble que l'hydrogénation du double lien présent en C-20 affecte peu la cytotoxicité de l'acide bétulinique (**3**) [Kim *et al.*, 1998].

Quelques dérivés en C-28 de l'acide bétulinique (**3**) ont été synthétisés. Dans tous les cas, la présence de la fonction carbonyle s'est avérée essentielle pour préserver l'activité cytotoxique [Kim *et al.*, 1998; Jeong *et al.*, 1999]. Des conjugués d'acides aminés avec une hydrosolubilité supérieure ont été préparés tels que leucine, alanine, valine et glycine (**33**) et ont démontré des propriétés cytotoxiques similaires à l'acide bétulinique (**3**) [Jeong *et al.*, 1999].

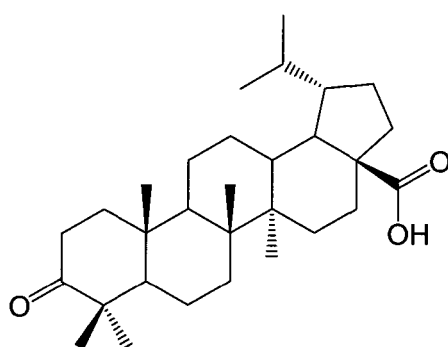
Concernant la synthèse d'analogues en position 3, seulement un nombre limité de structures a été évalué pour la cytotoxicité. La conversion du bétulinol (**2**) en acide bétulinique (**28**) par l'utilisation du réactif de Jones (Fig. 7) a donné un composé



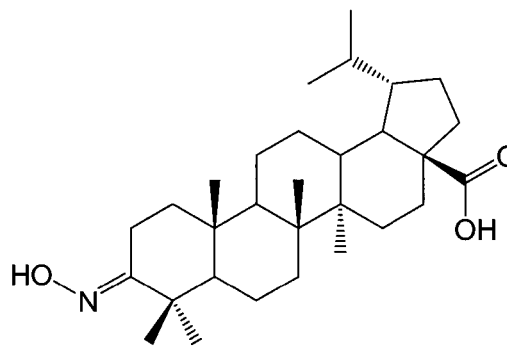
Acide bétulinique (**3**)
ED₅₀ = 1,2 µg/mL



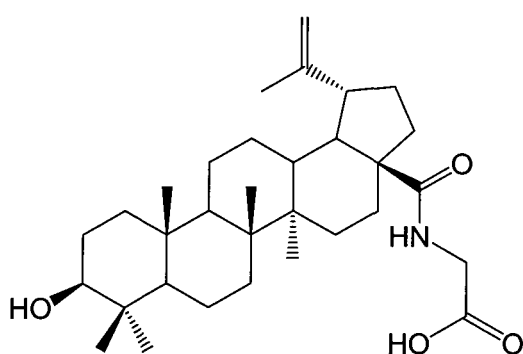
Acide bétulonique (**28**)
ED₅₀ = 2,5 µg/mL



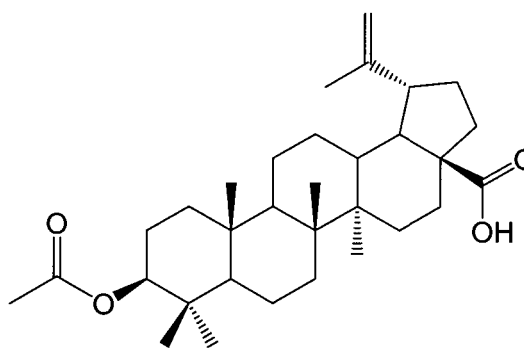
Acide dihydrobétulonique (**31**)
ED₅₀ = 0,7 µg/mL



Acide 3-hydroxyloxime dihydrobétulonique (**32**)
ED₅₀ = 2,2 µg/mL



Conjugué glycine d'acide bétulinique (**33**)
ED₅₀ = 4,2 µg/mL



Acide 3-acétylbétulinique (**34**)
ED₅₀ = 6,9 µg/mL

Figure 11. Dérivés anticancéreux de l'acide bétulinique (**3**) (MEL-2)

fortement cytotoxique, mais non sélectif au mélanome [Kim *et al.*, 1998]. Une réaction de dihydrogénation sur le double lien pour former l'acide dihydrobétulonique (31) a permis une légère augmentation de la cytotoxicité de l'acide bétulonique (28). Par ailleurs, l'ajout d'une fonction oxime sur l'hydroxyle en C-3 (32) n'a pas donné d'impact positif sur l'activité anticancéreuse en plus de provoquer la perte de sélectivité [Kim *et al.*, 1998]. Des études additionnelles sont donc nécessaires pour comprendre la relation entre les modifications structurales en position 3 de l'acide bétulinique (3) et l'activité anticancéreuse.

D'autres dérivés ont été obtenus par une voie différente de la synthèse organique. Par exemple, l'acide 7,15-dihydroxybétulinique (35) [Chatterjee *et al.*, 2000] et l'acide 7-hydroxybétulinique (36) [Kouzi *et al.*, 2000] ont été préparés par des réactions de biotransformation en présence de microorganismes tels que *Bacillus megaterium* et *Cunninghamella elegans* (Fig. 12). Ces composés sont moins actifs que l'acide bétulinique (3) sur le mélanome humain (MEL-2).

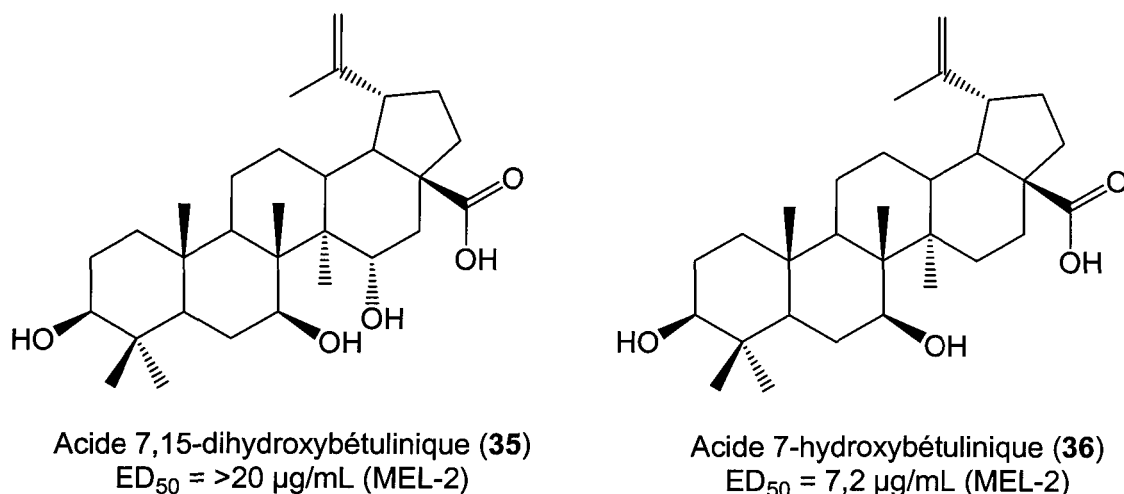


Figure 12. Dérivés d'acide bétulinique (3) obtenus par microbiotransformation

CHAPITRE III

SAPONINES TRITERPÉNIQUES

3.1. Considérations générales

3.1.1. Les glycosides naturels

Le terme glycoside désigne le nom général d'un aglycone (partie non sucre) lié de manière covalente à un hydrate de carbone par un lien O-glycosidique, C-glycosidique ou N-glycosidique selon le type d'atome impliqué dans la liaison. La section sucre peut être un ose simple comme le glucose (**24**), le galactose, le rhamnose (**25**), etc., ou même un polyoside comme, entre autres, la cellobiose et le maltotriose, tandis que la partie aglycone peut varier d'un alcane hydroxylé à une protéine entière. En considérant la stéréochimie de la liaison glycosidique (bêta ou alpha) ainsi que les nombreux sites d'attache potentiel entre les monomères de sucre (2-OH, 3-OH, 4-OH ou 6-OH pour les hexopyranoses), il est évident qu'une grande variété de structures sont possibles [Bruneton, 1999].

Les glycosides peuvent être classifiés sommairement selon l'origine biosynthétique de leur partie aglycone, c'est-à-dire en fonction du type de molécules liées à la partie sucre. Le tableau 3 de la page suivante présente les différentes classes de glycosides naturels.

Tableau 3. Exemples de glycosides naturels bioactifs [Křen *et al.*, 2001]

Classes	Sous-Classes	Glycosides
Antibiotiques	Aminoglycosides	Streptomycine
	Glycopeptides	Vancomycine
	Enediynes	Esperamycine C
	Anthracyclines	Daunomycine
	Polyènes	Amphotéricine B
	Macrolides	Érythromycine A
Vitamines	Hydrosolubles	Riboflavine-5'- α -D-glucoside
		Rutine
		2-O- α -Glucopyranosyl-L-acide ascorbique
Alcaloïdes	Liposolubles	Rétinoyl β -D-glucuronide
	Glycosides de l'ergot	Élymoclavine
	Glucuronides de morphine	Morphine 6- α -D-glucuronide
Terpènes et Stéroïdes	Glycosides cardiotoniques	Digitoxine
	Saponosides	α -Tomatine
Polyphénoliques	Anthocyanosides	Péonidine acyl-glycoside
	Glycosides flavonoïdiques	Gentiodelphine

Il est généralement accepté que les glycosides présentent une plus grande hydrosolubilité que leurs aglycones respectifs [Křen *et al.*, 2001]. C'est pourquoi, dans la plante, les glycosides jouent un rôle essentiel dans les phénomènes d'accumulation, d'entreposage et de transport des substances hydrophobiques. En effet, l'attachement d'une section saccharidique à une molécule donnée augmente sensiblement son hydrophilicité. En revanche, cela diminue sa réactivité, ce qui permet l'entreposage de la molécule par la cellule à l'extérieur d'une vacuole et protège ainsi la plante contre une toxicité ou bioactivité potentielle de l'aglycone libre [de Roode *et al.*, 2003].

Dans l'organisme vivant, une modification de l'hydrophilicité influence principalement les propriétés pharmacocinétiques, c'est-à-dire l'absorption, la distribution, la métabolisation et l'élimination du composé dans les fluides corporels, ainsi que le transport membranaire de la molécule. La glycosylation peut, dans certains cas, restreindre ou inhiber la diffusion de la molécule à travers la membrane cellulaire.

Quelquefois, la glycosylation peut également influencer fortement le transport à travers des barrières biologiques importantes comme la barrière hémato-encéphalique et bloquer ainsi l'entrée de plusieurs composés essentiels à l'intérieur du tissu cervical. En revanche, certains glucosides sont transportés activement via le cerveau en utilisant le système de transport du glucose [Křen *et al.*, 2001].

Dans le but de prédire l'activité *in vivo* des glycosides, il est primordial de tenir compte de leur susceptibilité envers le clivage du lien glycosidique dans des sites spécifiques de l'organisme. Ainsi, au début du tube digestif, la plupart des glycosides sont hydrolysés soit en raison de l'environnement acide de l'estomac ou par l'action des glycosidases présentes dans l'intestin grêle. Cependant, quelques glycosides comme les α -galactosides ne s'hydrolysent pas facilement. Ils sont donc incapables de franchir la barrière hémato-intestinale ou diffusent sous une forme non hydrolysée dans le sang. Les glycosides qui ne sont ni absorbés ni hydrolysés peuvent être clivés plus tard dans le colon ou métabolisés par la microflore intestinale. Les glycosidases sont également présentes dans les fluides corporels. Par exemple, le sérum sanguin contient des lysozymes clivant de manière efficiente les β -*N*-acétylglucosaminides [Křen *et al.*, 2001].

3.1.2. Les saponines

Les saponosides ou saponines sont un groupe de métabolites secondaires fréquemment rencontrés chez les végétaux. Ils tirent leur nom du latin *sapo* signifiant savon en raison de leur propriété à former des solutions moussantes en présence d'eau. Au niveau structural, les saponines sont classées en deux groupes en fonction de la nature de leur génine pouvant être de type stéroïdique (Fig. 13) ou triterpénique [Bruneton, 1999].

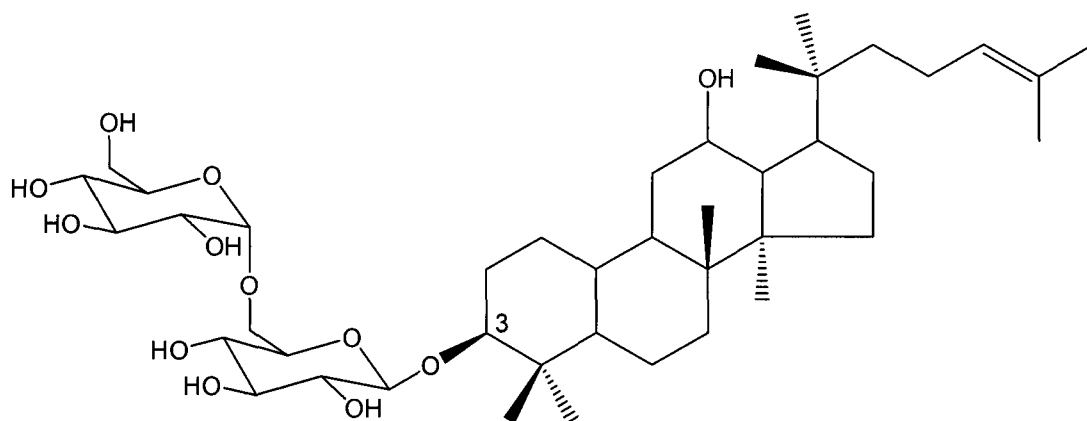


Figure 13. Saponine à génine stéroïdique: Ginsenoside M1 (**37**)

Les unités saccharides qui constituent les saponines sont communes: glucose (**24**), galactose, arabinose (**26**), rhamnose (**25**), xylose, fucose et acide glucuronique. La partie sucre de la molécule peut compter jusqu'à 11 oses liés à la génine par une liaison de type acétal. Habituellement, comme c'est le cas dans l'exemple de la figure **13**, la liaison glycosidique s'effectue entre une seule section saccharidique et le groupement hydroxyle en position 3 de la génine (monodesmoside). Toutefois, un deuxième chaînon peut s'ajouter par une liaison ester avec le carboxyle en position 28 (bidesmoside). Ces bidesmosides facilement convertis en monodesmosides par hydrolyse chimique ou enzymatique sont de loin les saponines les plus fréquentes de la pharmacopée végétale. Exceptionnellement, la littérature scientifique a rapporté l'isolation de quelques tridesmosides et des bidesmosides chez lesquels les sections sucres sont liées d'une manière covalente par une double estérification [Bruneton, 1999].

3.2. Propriétés biologiques des saponines triterpéniques

Les saponines triterpéniques sont considérées par certains chercheurs comme étant responsables de la plupart des activités biologiques des plantes de la médecine traditionnelle orientale [Liu *et al.*, 2002]. En effet, la littérature scientifique rapporte des propriétés médicinales très variées: anticarcinogénique, anti-inflammatoire, antitumoral, antiviral, antifongique, antithrombique, cardiovasculaire, cytotoxique, immunomodulatoire, spermicide et molluscicide [Sparg *et al.*, 2004; Rao *et al.*, 2000].

L'activité biologique des saponines a souvent été mise en relation avec leur capacité à s'attaquer aux érythrocytes présents dans le plasma sanguin. Cette activité hémolytique est généralement expliquée par l'interaction des saponines avec les stérols de la membrane cellulaire des érythrocytes. Les dommages causés sont irréversibles: la perméabilité de la membrane est modifiée ce qui entraîne une perte de l'hémoglobine sanguin. Cette propriété a amené la mise en place de tests hémolytiques permettant la détection des saponines dans les drogues ou extraits de plantes [Sparg *et al.*, 2004].

De nombreuses saponines possèdent une activité cytotoxique *in vitro* envers une grande variété de lignées cellulaires cancéreuses. Les valeurs d'IC₅₀ mentionnées dans la littérature varient entre environ 4 ng/mL à 20 µg/mL en fonction de la nature de la saponine et de la lignée cellulaire [Lacaille-Dubois, 2000]. OSW-1 (**38**), un cholestane acétylé isolé de *Ornithogalum saundersiae*, est l'une des saponines les plus cytotoxiques (Fig. 14). Son IC₅₀ inférieure à 1 nM en fait un agent anticancéreux environ 10 à 100 fois plus puissant que ceux actuellement utilisés en phase clinique comme le taxol, la camptothécine et la mitomycine C. Des études ont montré que les effets cytotoxiques de OSW-1 (**38**) pouvaient être causés par une induction de l'apoptose des cellules

cancéreuses. De surcroît, cette saponine n'a exercé qu'une faible toxicité *in vitro* sur des lignées cellulaires saines humaines [Deng, *et al.*, 1999].

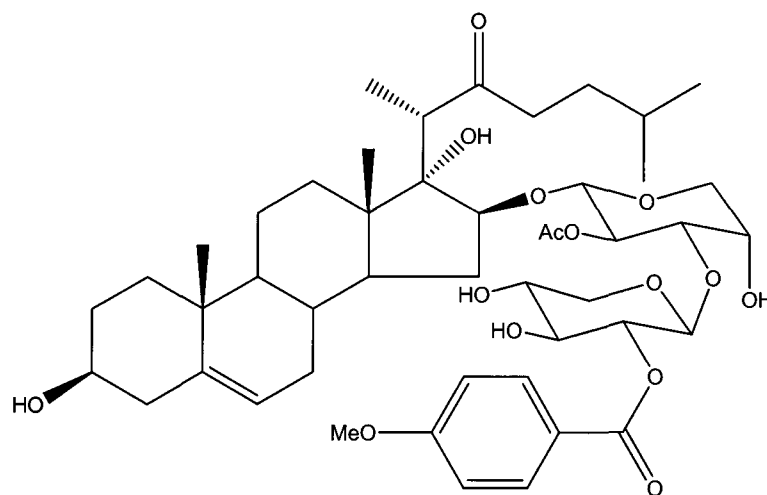


Figure 14. Saponine anticancéreuse OSW-1 (38)

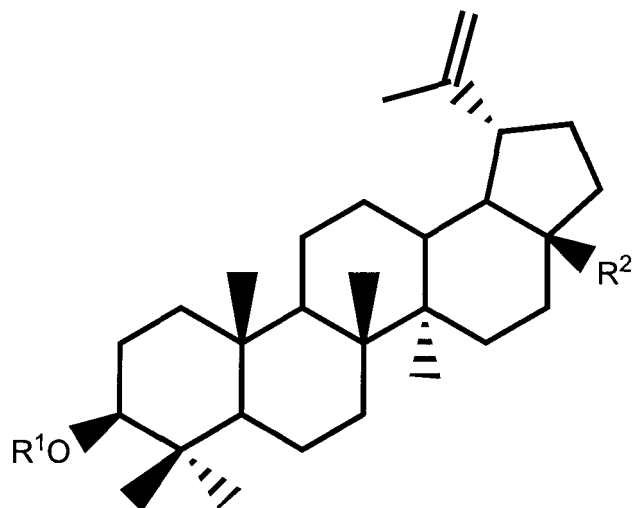
Au niveau des saponines avec génine triterpénique, la Virgaureasaponine E a exercé une activité anticancéreuse *in vivo* significative sur des souris porteuses d'un fibrosarcome. Dans cette expérience, la réduction de la taille de la tumeur était proportionnelle à la dose de saponine administrée d'une manière intrapéritonéale trois fois par semaines pendant 30 jours. Les résultats les plus probants ont montré une inhibition significative de 60 % de la croissance de la tumeur à une concentration de 0,1 mg/kg. Cet effet pourrait être dû à une activité immunostimulante telle que l'envoi du *Tumor Necrosis Factor α* ou TNF- α [Plohmann *et al.*, 1997].

3.3. Isolation de glycosides triterpéniques

Sauf en cas d'exceptions, les saponines ne peuvent être isolées d'une matrice végétale en une seule étape. Retrouvées fréquemment sous formes de mélanges complexes, plusieurs séparations sur différents supports solides doivent être effectuées pour parvenir au résultat escompté. Leur forte polarité, leur masse moléculaire élevée et les différences structurales minimales entre constituants d'un même extrait font qu'il est souvent long et difficile d'obtenir une saponine sous une forme pure et intacte. De plus, ces molécules cristallisent très mal en raison de leurs propriétés hygroscopiques, et, par le fait même, donnent rarement des points de fusion nets et sans décomposition [Bruneton, 1999].

Durant les dernières années, des milliers d'articles ont été écrits concernant l'isolation de saponines dans les plantes et arbres de la pharmacopée terrestre. Toutefois, seulement un nombre restreint de ceux-ci relatent l'isolation de saponines de type lupane. La figure 15 de la page suivante présente donc un résumé des principaux glycosides triterpéniques de lupéol (1), bétulinol (2) et acide bétulinique (3) isolés durant les dernières années. Certains de ceux-ci (10 et 22) ont été synthétisés dans le cadre de ce projet.

Dernièrement, une équipe italienne a rapporté l'isolation de deux bidesmosides d'acide bétulinique (3) possédant une activité anticarcinogénique significative sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses murines et humaines: le 3 β -O-(α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyl)-lup-20(29)-ène-28-O- β -D-glucopyranosyl ester (43) et le 3 β -O-(α -L-arabinopyranosyl)-lup-20(29)-ène-28-O- β -D-glucopyranosyl ester (44) [Braca *et al.*, 2004]. Toutefois, très peu de saponines triterpéniques au squelette du lupane isolées d'une matrice végétale ont été testées pour leur activité anticancéreuse.



Composé	R ¹	R ²	Référence
10	α-L-Rhamnopyranose	CH ₃	Srivastava <i>et al.</i> , 1983
22	α-L-Rhamnopyranose	COOH	Tiwari <i>et al.</i> , 1980
39	β-D-Xylopyranose	CH ₂ OH	Jain <i>et al.</i> , 1984
40	α-L-Arabinofuranosyl-(1→4)-O-β-D-glucuronopyranose	CH ₃	Minocha <i>et al.</i> , 1981
41	β-D-Glucopyranosyl-(2→1)-O-β-D-glucopyranose	COOH	Purohit <i>et al.</i> , 1991
42	β-D-Glucopyranosyl-(4→1)-O-α-L-rhamnopyranosyl-(2→1)-O-α-L-arabinofuranose	COOH	Tiwari <i>et al.</i> , 1980
43	α-L-Rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranose	COO-β-D-glucopyranose	Braca <i>et al.</i> , 2004
44	α-L-Arabinopyranose	COO-β-D-glucopyranose	Braca <i>et al.</i> , 2004

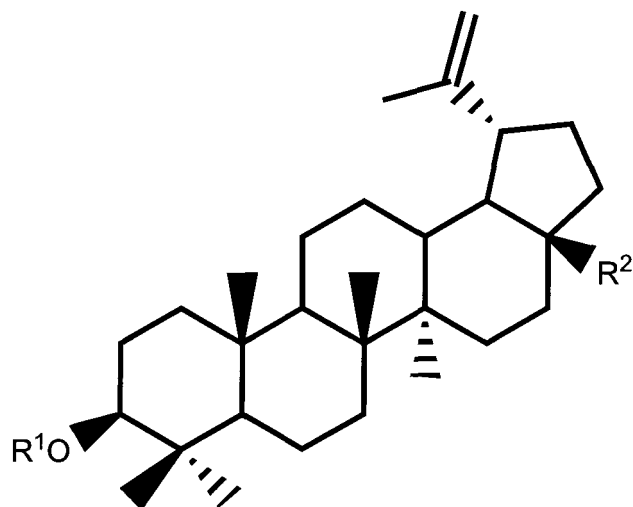
Figure 15. Saponines triterpéniques de type lupane isolées

3.4. Synthèse de glycosides triterpéniques

Plusieurs synthèses de glycosides stéroïdiques et triterpéniques existent dans la littérature scientifique [Deng *et al.*, 1999; Plé *et al.*, 2004]. Par contre, très peu de chercheurs se sont consacrés à la synthèse de saponines de type lupane (Fig. 16). Cette situation est peut-être due aux petites quantités d'aglycones obtenues par extraction et au coût élevé des triterpènes disponibles dans l'industrie pharmaceutique.

En 1997, un groupe de chercheurs a préparé une série de glucosides triterpéniques dont le 3-O- β -D-glucoside de bétulinate de méthyle (18), le 28-O- β -D-glucoside d'acide bétulinique (51) et le 3,28-O- β -D-diglucoside d'acide bétulinique (50) par la réaction du 1-bromo-tétra-O-acétyl- α -D-glucopyranosyl dans l'acétonitrile en présence du cyanure de mercure(II) [Klinitová *et al.*, 1997]. Une autre équipe de recherche a réussi la synthèse du 3-O- β -D-glucoside d'acide bétulinique (21) par un procédé similaire utilisant le même sucre bromé dans la pyridine avec cette fois de l'oxyde d'argent comme catalyseur. Toutefois, outre les faibles rendements obtenus, la multiplicité et les déplacements chimiques des protons de la partie sucre ne sont pas indiqués dans l'article et la molécule n'a pas été testée pour son activité biologique [Samoshina *et al.*, 2003].

Plusieurs monodesmosides de bétulinol (12, 45-49) ont été synthétisés enzymatiquement par l'action de la cyclodextrine glycosyltransferase (CGTase) de *Bacillus macerans* sur le 28-acétoxybétulinol (5). Ces glycosides ont été testés pour leurs effets sur la germination et la régulation de la croissance des plantes. Les résultats suggèrent une relation entre la longueur de la chaîne saccharidique et l'activité mesurée [Ohara *et al.*, 2003].



Composé	R ¹	R ²	Référence
12	β-D-Glucopyranose	CH ₂ OH	Ohara <i>et al.</i> , 1994
18	β-D-Glucopyranose	COOCH ₃	Klinitová <i>et al.</i> , 1997
21	β-D-Glucopyranose	COOH	Samoshina <i>et al.</i> , 2003
45	β-D-Cellobiose	CH ₂ OH	Ohara <i>et al.</i> , 2003
46	β-D-Maltose	CH ₂ OH	Ohara <i>et al.</i> , 2003
47	β-D-Maltotriose	CH ₂ OH	Ohara <i>et al.</i> , 2003
48	β-D-Maltotétraose	CH ₂ OH	Ohara <i>et al.</i> , 2003
49	β-D-Maltopentaose	CH ₂ OH	Ohara <i>et al.</i> , 2003
50	β-D-Glucopyranose	COO-β-D-glucopyranose	Klinitová <i>et al.</i> , 1997
51	H	COO-β-D-glucopyranose	Klinitová <i>et al.</i> , 1997 Baglin <i>et al.</i> , 2003

Figure 16. Saponines triterpéniques de type lupane synthétisées

En 1999, le groupe de Pezzuto a réussi la biotransformation de l'acide bétulinique (**3**) par l'action d'un micro-organisme du genre *Cunninghamella* pour donner le 28-O- β -D-glucoside d'acide bétulinique (**51**) dans un faible rendement de 0,77% (Fig. 17). Les tests de cytotoxicité *in vitro* pour ce composé n'ont révélé aucune activité anticancéreuse ($ED_{50} > 20 \mu\text{g/mL}$) envers plusieurs lignées cellulaires du mélanome humain [Chatterjee *et al.*, 1999; Baglin *et al.*, 2003]. Ces résultats semblent suggérer que l'activité antitumorale des dérivés du lupane est dépendante de la présence de la fonction acide en position 28.

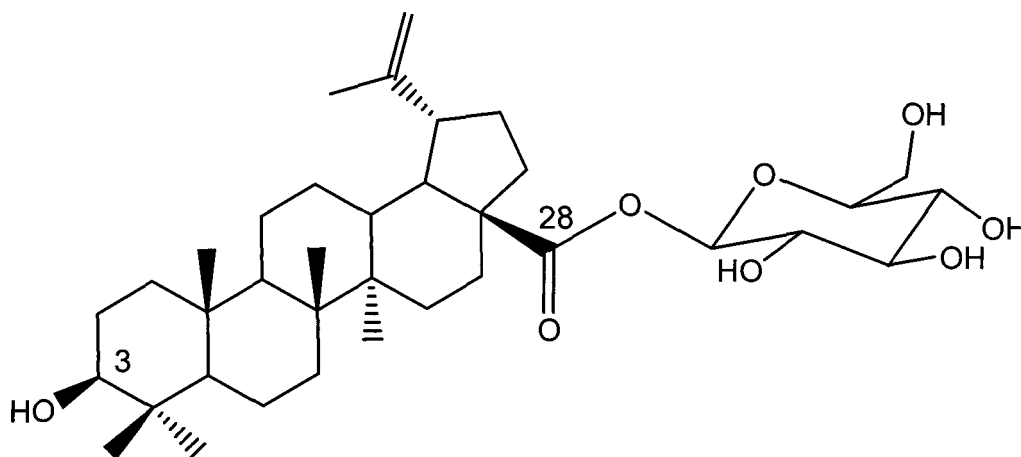


Figure 17. 28-O- β -D-Glucopyranoside d'acide bétulinique (**51**)

3.5. Trichloroacétimides

La méthode d'activation du carbone anomérique d'un sucre par la fonction trichloroacétimide, développée par Richard R. Schmidt au début des années 80, est aujourd'hui très utilisée par les chimistes organiciens pour la synthèse de glycosides de produits naturels dont, entre autres, les saponines triterpéniques [Deng *et al.*, 1999; Plé *et al.*, 2004]. Les trichloroacétimides sont formés par la réaction du trichloroacétonitrile en présence d'une base (NaH , K_2CO_3 , Cs_2CO_3) sur la fonction hydroxyle du carbone anomérique d'un sucre protégé. Pendant la réaction, l'anomère β cinétiquement favorisé est formé préférentiellement et souvent exclusivement selon une réaction d'addition réversible très rapide. Cependant, comme l'indique la figure 18, ce produit s'anomérise lentement et pratiquement complètement en anomère α thermodynamiquement stable [Schmidt, 1994]. Une étude a montré que l'utilisation du Cs_2CO_3 comme base augmente la nucléophilicité du groupement hydroxyle de l'anomère α et permet sa formation exclusive [Urban *et al.*, 1990].

L'application la plus courante des trichloroacétimides consiste en la réaction de ceux-ci avec une fonction alcool en présence d'un catalyseur acide de Lewis ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, TMSOTf). Pendant cette réaction, l'utilisation des groupements protecteurs participants (acétates, benzoyles) favorise la formation des liens 1,2-*trans*-glycosidiques (Annexe 4). Pour une réaction à température ambiante, la promotion par le TMSOTf est préférable au $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$. En effet, l'utilisation du $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ entraîne la formation d'un mélange complexe de produits ce qui complique l'étape de purification. Une récente étude a montré que, selon la méthode de glycosidation élaborée par Schmidt, la synthèse de plus de 35 g de trilline, une saponine bioactive, est réalisée d'une manière quantitative par la promotion avec le TMSOTf [Deng *et al.*, 1999].

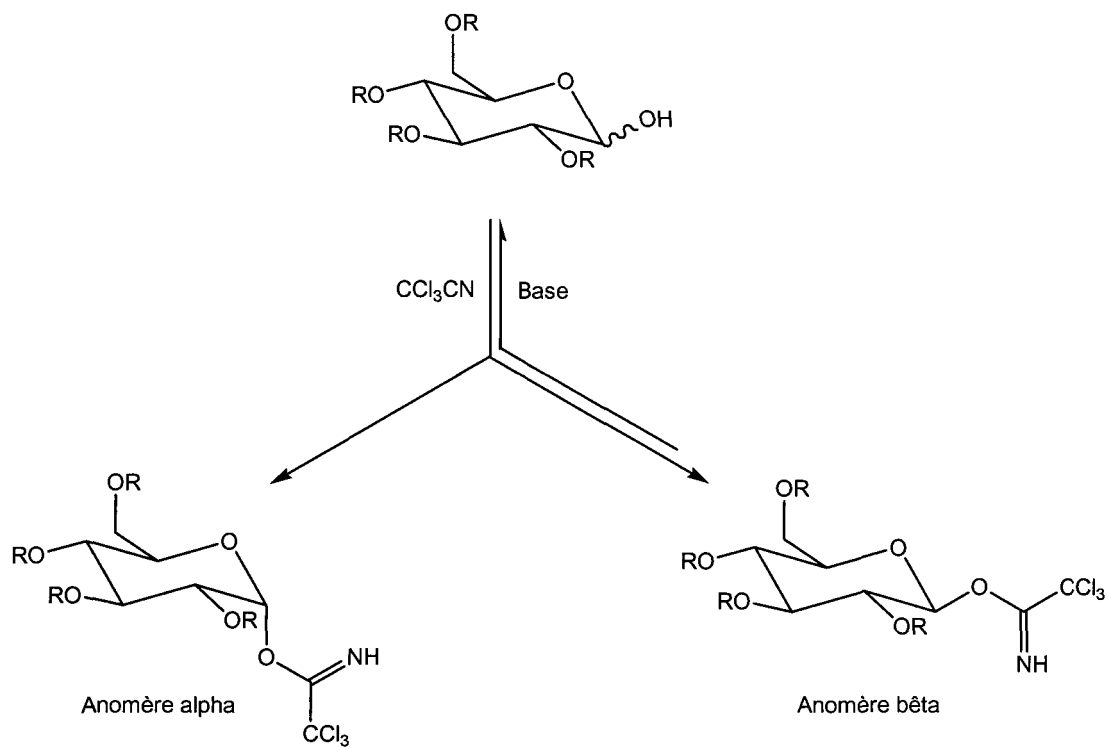


Figure 18. Addition de CCl_3CN sur la position anomérique d'un sucre

CHAPITRE IV

ARTICLE: *JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY*

Glycosidation of Lupane-Type Triterpenoids (Lupeol, Betulin, Betulinic Acid and Methyl Betulinate) as *In Vitro* Anticancer Agents: A Structure-Activity Relationship

Charles Gauthier, Jean Legault, Maxime Lebrun, Philippe Dufour, and André Pichette*

Laboratoire LASEVE, Département des Sciences Fondamentales, UQAC, Chicoutimi, Qc, Canada, G7H 2B1

Abstract

Due to its favorable therapeutic index and its lack of toxicity, betulinic acid is a very promising anticancer candidate. However, the further preclinical development of this natural product is hampered by its weak hydrosolubility. To circumvent this major inconvenience and to establish a structure-activity relationship, we synthesized monodesmoside glycosides (β -D-glucoside, α -L-rhamnoside, α -D-arabinoside) of lupeol, betulin, betulinic acid and methyl betulinate. All triterpenes and glycosides were tested for their *in vitro* cytotoxicity against three cancerous (A-549, DLD-1, B16-F1) and one healthy (WS-1) cell lines. Betulin exerted the strongest anticancer activity of triterpenes (IC_{50} 3.8-13.8 μ M), but the addition of a D-glucose moiety at the C-3 or C-28 position resulted in a total loss of activity. On the other hand, the 3-O- β -D-glucosidation of lupeol improved the cytotoxicity by 7- to 12-fold (IC_{50} 14-15.0 μ M). The *in vitro* results suggested that betulinic acid 3-O-glycosides are the only synthesized compounds in this study displaying differential selectivity. Indeed, the α -L-rhamnopyranose derivative has exhibited the strongest cytotoxicity of glycosides (IC_{50} 2.6-3.9 μ M) with an activity of 8- to 12-fold more potent toward cancerous cell lines than on healthy cells (IC_{50} 31 μ M). Thus, the presence of the carboxylic acid function at the C-28 position seems to be essential to enhance differential selectivity with regard to healthy cell lines.

* To whom correspondence should be addressed. Tel: (418) 545-5011, Fax: (418) 545-5012, E-mail: andre_pichette@uqac.ca, mail address: Université du Québec à Chicoutimi, Département des Sciences Fondamentales, LASEVE, 555 boul. Université, Chicoutimi, Qc, Canada, G7H 2B1.

Introduction

The lupane-type pentacyclic triterpenes lupeol (**1**), betulin (**2**) and betulinic acid (**3**) (Figure 1) are widely distributed in the plant kingdom. For example, in the boreal forest of North America, **1** and **2** are the most abundant constituents of the external bark of the yellow (*Betula alleghaniensis* Britton) and white (*Betula papyrifera* Marsh.) birches respectively.^{1,2}

1 known for its *in vivo* anti-inflammatory activity³ has exhibited *in vitro* cytotoxicity against human hepatocellular carcinoma (IC₅₀ 77 μ M, Hep-G2) and human epidermoid (IC₅₀ 101 μ M, A-431).⁴ Recently, **1** was found to exhibit a significant antiangiogenic activity on *in vitro* tube formation of human umbilical venous endothelial cells (HUVEC) while it did not affect the growth of tumor cell lines such human melanoma (MEL-2), human lung carcinoma (A-549) and murine melanoma (B16-F10).⁵ Besides, induction of apoptosis by **1** was observed in human leukemia HL-60 cells.⁶

Easily synthesized from **2** in a two-step process^{7,8}, **3** is the most interesting compound of this family as was reported in recent reviews⁹⁻¹². In addition to various medicinal properties including anti-inflammatory¹³, anti-malarial¹⁴ and anti-HIV¹⁵ activities, **3** possesses a strong *in vitro* cytotoxicity against a broad panel of human cancer like melanoma (ED₅₀ 2.0 μ g/mL, MEL-2)¹⁶, neuroectodermal¹⁷ and malignant brain¹⁸ tumor cell lines. The *in vivo* activity was first confirmed by experiments on mice infected by human melanoma. Indeed, after subcutaneous injection of human MEL-2 cells, **3** demonstrated highly effective tumor growth inhibition without inducing any side effects such as weight loss or mortality.¹⁶ Moreover, **3** seems to induce apoptosis (programmed cell death) in cancer cells via the activation of caspases independently of the p53 gene status.¹⁷ Due to the apparent lack of toxicity on normal cells¹⁹ and the favorable therapeutic index, **3** is a very promising anticancer agent.⁹ However, a major inconvenience for the future clinical development of **3** resides in the partial insolubility in common solvents used for bioassays.¹⁶

To circumvent this problem and to establish meaningful structure-activity relationships (SAR), many derivatives of **3** have been synthesized and evaluated for anticancer activity. A study showed that C-20 was an undesirable position to derive because it involves the loss of cytotoxicity.²⁰ On the

other hand, C-28 modifications of **3** showed the importance of the presence of the COOH group. Indeed, compounds substituted at this position like **1** (CH₃), **2** (CH₂OH) and methyl betulinate **7** (COOCH₃) were less active on human melanoma than **3** while a CHNOH group improved cytotoxicity but reduced selectivity.²¹ The group of Kim and co-workers also demonstrated that the introduction of the methoxy oxime (CH₃O-N=) at the C-3 position resulted in a loss of cytotoxicity while the hydroxy oxime (HO-N=) showed a good cytotoxic activity.²¹ Moreover, oxidation of **3** gave betulonic acid which possessed comparable cytotoxicity but less selectivity on human melanoma.²¹ Nevertheless, with regard to chemical modification of the 3 β -hydroxyl moiety, very little work was done to gain an understanding of the relation between the structure and the *in vitro* anticancerous activity.

Our research group is interested in the synthesis of triterpenoid saponins of the lupane type. For a long time, saponins are well-known for their biological activities including anti-tumoral and cytotoxic activities.^{22,23} Many natural products including triterpenes are present as glycoconjugates. Sugar moieties are known to influence the pharmacokinetic properties of the respective compounds such as absorption, distribution, metabolism and elimination.²⁴ Since it is generally accepted that glycosides are more water-soluble than the respective aglycons, glycosidation of triterpenes should increase hydrophilicity and probably the clinical efficacy. Furthermore, it is known that cancerous cells need a more significant sugar contribution than normal cells.²⁵ Consequently, this difference could be exploited to support the absorption of the therapeutic agent by the tumoral site.

To our knowledge, little work has been carried out on the synthesis and SAR of triterpenoid lupane-type saponins. Chatterjee and co-workers²⁶ obtained the 28-O- β -D-glucopyranosyl 3 β -hydroxy-lup-20(29)-en-28-oate by microbial transformation of **3** with *Cunninghamella* species while Baglin and co-workers²⁷ obtained it by organic synthesis. This glucoside did not exhibit any significant *in vitro* activity on human melanoma (MEL-2)²⁶ and human colic adenocarcinoma (HT 29)²⁷ cell lines which confirms the importance of the carboxylic acid function to preserve the cytotoxicity.

In this study, we report the synthesis of several monodesmoside (D-glucose, L-rhamnose, D-arabinose) triterpenoid saponins (**9-23**) at the C-3 position for **1**, **3** and its methyl ester **7** and at the C-3 and C-28 positions for **2**. Cytotoxicity of synthetic compounds was evaluated on human lung carcinoma (A-549), colon adenocarcinoma (DLD-1) and mice melanoma (B16-F1) cell lines to establish an SAR in comparison with lupane-type triterpenes. Investigations were also made on human fibroblasts (WS-1) to evaluate the differential cytotoxicity with respect to the healthy cells.

Results and Discussion

Chemistry. First of all, the external bark of yellow and white birches were refluxed in CHCl_3 . Purification of the extracts on silica gel followed by treatment with activated charcoal gave, respectively, the natural triterpenes **1** (1.2%) and **2** (17%). To perform the glycosidation at the C-3 and C-28 positions of **2**, we needed to prepare the corresponding acetates. As the reactivity of the C-28 hydroxyl group of **2** is much higher than the one at C-3, 28-acetoxymetulin (**5**) was obtained in moderate yield (73%) by using an excess of acetic anhydride (Ac_2O) in CH_2Cl_2 during a 24 h period at room temperature. As shown in Scheme 1, diacetylation of **2** with Ac_2O , pyridine and a catalytic amount of dimethylaminopyridine (DMAP) in CH_2Cl_2 afforded 3,28-diacetoxymetulin (**4**) in excellent yield (95%).²⁸ Subsequent selective deprotection of the C-28 alcohol using $\text{Mg}(\text{OCH}_3)_2$ in dry CH_3OH and THF furnished the 3-acetoxymetulin (**6**) in good yield (85%) as previously reported.²⁹ However, it is important to note that, in the same experimental conditions, contrary to the results of Xu and co-workers, the reaction was complete after 4 h instead of 3 days. As shown in Scheme 2, the methyl ester **7** of the commercially available **3** was synthesized in moderate yield (71%) by treatment with iodomethane in the presence of DBU.³⁰ Methods used to regenerate the carboxylic acid (NaOH 1N refluxed in DMF or dioxane and $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ in CH_3OH) from methyl metulinate glycosides (**18**, **19**, **20**) failed to yield the corresponding metulinic acid glycosides (**21**, **22**, **23**). Therefore, another more versatile protection group for the C-28 acid function was considered. To

this end, the synthesis of allyl betulinate (**8**) was carried out in good yield (84%) by reaction of **3** using allyl bromide in DMF in the presence of K_2CO_3 .³¹

Protection of sugar alcohols (Scheme 3) was achieved by using benzoyl chloride in pyridine with DMAP as catalyst to afford 1,2,3,4,6-penta-O-benzoyl- α,β -D-glucopyranose (**24**, 92%), 1,2,3,4-tetra-O-benzoyl- α,β -L-rhamnopyranose (**27**, 82%) and 1,2,3,4-tetra-O-benzoyl- α,β -D-arabinopyranose (**29**, 89%).³² Thereafter, bromation (HBr-HOAc 33%) of the benzoylated sugars follow by basic hydrolysis with silver carbonate (Ag_2CO_3) in acetone:H₂O 20:1 allowed the selective deprotection of the anomeric position in good yield for 2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α,β -D-glucopyranose (**25**, 86%) and in a quantitative way for L-rhamnose and D-arabinose derivatives.³³ Finally, trichloroacetimidate derivatives **26**³⁴ (85%), **28**³⁵ (72%, 2 steps), **30** (78%, 2 steps) were synthesized from the corresponding 1-OH sugars according to Schmidt's procedure³⁶ using trichloroacetonitrile (CCl_3CN) and a catalytic amount of cesium carbonate (Cs_2CO_3) in CH_2Cl_2 . It was reported that the use of Cs_2CO_3 leads to the formation of the thermodynamic α -anomer in preference of the kinetic β -anomer.³⁷ Consequently, trichloroacetimidates were preferentially obtained in the α -form as confirmed by NMR experiments.

Glycosidations of lupane-type triterpenoids were achieved by the reaction of acceptors (**1**, **5**, **6**, **7**, **8**) with donors (**26**, **28**, **30**) (Table 1) at room temperature in CH_2Cl_2 under the catalytic promotion of the lewis acid trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate (TMSOTf).³³ Subsequent removal of the protecting groups (benzoyl and acetate) by using NaOH 0.25 N in CH_3OH :THF:H₂O 1:2:1 gave glycosides **9-20** (52-87%, 2 steps). On the other hand, betulinic acid glycosides **21-23** (41-50%, 3 steps) were only obtained after the regeneration of the C-28 acid function in the presence of a catalytic amount of tetrakis(triphenyl)phosphine palladium $Pd^0(PPh_3)_4$ and pyrrolidine in dry THF.³¹ Since the glycosyl donors contained benzoyl participating neighboring groups, exclusively 1,2-*trans*-glycosides (β -D-glucosides, α -L-rhamnosides, α -D-arabinosides) were synthesized as confirmed by ¹H NMR experiments (Table 1). The glycosides showed a greater solubility than corresponding triterpenes in the polar solvents (DMSO and CH_3OH) used for bioassays (data not shown).

Anticancer Activity. The *in vitro* anticancer activity of triterpenes (**1-8**) and corresponding glycosides (**9-23**) was assessed towards human cancer (A-549, DLD-1), mice melanoma (B16-F1) and human fibroblast (WS-1) cell lines using the resazurin reduction test (RTT test) as previously described in the literature.³⁸ Measures of fluorescence were made after 48 continuous hours of contact between compounds and cells. Cytotoxicity results are presented in Table 2. The values are in μM and correspond to the concentration inhibiting 50% of the cell multiplication (IC_{50}).

First of all, our investigations were in accordance with the group of Moriarity and co-workers⁴ concerning the weak *in vitro* cytotoxicity of **1** (IC_{50} 104-165 μM against cancer lines). Surprisingly, results demonstrated that, among these triterpenes, **2** exhibited the strongest cytotoxicity towards cancer lines (IC_{50} 3.80-13.8 μM).³⁹ For example, **2** was 3- to 5-fold more potent against A-549 (IC_{50} 3.80 μM) in comparison to other well known compounds like **3** (IC_{50} 10.3 μM) and **7** (IC_{50} 19 μM). With regard to acetate derivatives of **2**, only the 28-acetoxy derivative **5** exerted a moderate cytotoxic activity (IC_{50} 43-75 μM against cancer lines). Moreover, as we expected, the allyl ester **8** was a totally inactive compound (IC_{50} >225 μM). It is significant to note that, for all tested triterpenes including **3**, no selectivity towards the healthy cells WS-1 was noticed.

Interestingly, the 3-O- β -D-glucosidation of **1** (lup-20(29)-ene-3 β -O- β -D-glucopyranoside, **9**) substantially enhanced anticancer activity (IC_{50} 14-15.0 μM , 7- to 12-fold more potent than **1**) to give a compound having an activity profile similar to **3**. On the other hand, lup-20(29)-ene-3 β -O- α -L-rhamnopyranoside (**10**) was inactive (IC_{50} >178 μM) while the D-arabinoside derivative **11** displayed a moderate cytotoxicity (IC_{50} 27-50 μM). We anticipated that adding a glucose section at the C-3 position of **2** should not deteriorate its biological activity. Unexpectedly and contrary to the beneficial effect of C-3 β -D-glucosidation for **1**, the cytotoxicity of **2** was totally lost against all cell lines (IC_{50} >200 μM) when it was converted to 28-hydroxy-lup-20(29)-ene-3 β -O- β -D-glucopyranoside (**12**). However, the replacement of D-glucose by L-rhamnose and D-arabinose at the same position gave compounds exerting moderate anticancer activity (IC_{50} 18-50 μM , **13**; 38-63 μM , **14**). In the same way that the 28-O- β -D-glucoside of **3** did not exhibit any significant activity^{26,27}, glycosidation on the

C-28 primary alcohol of **2** completely suppressed the cytotoxic activity ($IC_{50} > 248 \mu M$, **15**; $> 228 \mu M$, **16**; $> 175 \mu M$, **17**). These results suggest that the C-28 alcohol function of **2** is essential for the anti-cancer activity and, therefore, coupling a sugar moiety is not a desirable modification to carry out at this position.

In this study, the most interesting monodesmosides synthesized and evaluated were, out of any doubts, betulinic acid (**21-23**) and methyl betulinate (**18-20**) glycosides. Indeed, it appears that methyl lup-20(29)-en-28-oate-3 β -O- β -D-glucopyranoside (**18**) exhibited strong cytotoxicity towards DLD-1 and B16-F (IC_{50} 3.93 and 7.1 μM respectively). Moreover, the D-arabinoside derivative **20** also displayed an effective activity similarly to **3** and **9** (IC_{50} 13.3-18 μM) while the L-rhamnoside derivative **19** exerted moderate activity only against A-549 and B16-F (IC_{50} 59 and 55 μM respectively). Strong cytotoxicities were also obtained for α -L-rhamnopyranosyl-3 β -hydroxylup-20(29)-en-28-oic acid (**22**) and α -D-arabinopyranosyl-3 β -hydroxylup-20(29)-en-28-oic acid (**23**, IC_{50} 2.6-3.9 and 10-17 μM respectively). Surprisingly, in addition to their solubility in CH_3OH (data not shown), **21**, **22** and **23** are the only compounds displaying differential cytotoxicity. Indeed, **22** and **23** exhibit only a moderate activity against WS-1 (IC_{50} 31 and 47 μM respectively) while β -D-glucopyranosyl-3 β -hydroxylup-20(29)-en-28-oic acid (**21**) was totally inactive toward healthy cells ($IC_{50} > 178 \mu M$). These results suggest that, glycosidation of **3** at the C-3 position can give potent anticancer agents contrary to the previously reported inactive 28-O- β -D-glucoside derivative.^{26,27} Furthermore, it appears that, when we compare biological results for all synthesized glycosides, the acid function on C-28 position seems to be essential for the selectivity against cancer cells.²¹ Nevertheless, further *in vitro* assessments are needed on a broad panel of cell lines to confirm these statements.

Conclusion

In summary, some lupane-type triterpenoid monodesmosides were synthesized and evaluated for *in vitro* anticancer activity. By adding an α -L-rhamnopyranose moiety at the C-3 position of **3**, we obtained the strongest *in vitro* anticancer agent of all tested triterpenes and glycosides while the differential cytotoxicity with respect to the healthy cells increased up to 12-fold. Thus, *in vivo* studies on a murine model are now in progress in our laboratory to evaluate the toxicity and the anticancerous activity of this promising α -L-rhamnopyranoside derivative (**22**).

Experimental Section

Chemical Synthesis. Air and water sensitive reactions were performed in flame-dried glassware under a nitrogen or argon atmosphere. Moisture sensitive reagents were introduced via a dry syringe. Dichloromethane was distilled from CaH_2 . THF was distilled from sodium with benzophenone as indicator of moisture. **3** was purchased from Indofine Chemical Company. Tetrakis(triphenylphosphine) palladium(0) was prepared as mentioned in the literature⁴⁰ and stored under nitrogen. All other chemicals and materials were purchased from Sigma-Aldrich and were used as received. Flash chromatography was carried out using 60-230 mesh silica gel. Analytical thin-layer chromatography was performed with silica gel 60 F₂₅₄, 0.25 mm pre-coated TLC plates and visualized using UV₂₅₄ and cerium molybdate (2 g $\text{Ce}(\text{SO}_4)_4(\text{NH}_4)_4$, 5 g $\text{MoO}_4(\text{NH}_4)_2$, 200 mL H_2O , 20 mL H_2SO_4) with charring. All of the chemical yields are not optimized and generally represent the result of the mean of two experiments. ^1H NMR spectra were recorded at 400 MHz and ^{13}C NMR were recorded at 100 MHz on an Avance 400 Br ker spectrometer equipped with a 5 mm QNP probe. Complete elucidations of chemical structures were based on ^1H , ^{13}C , DEPT135, COSY, HSQC and HMBC NMR experiments. Chemical shifts are reported in parts per million (ppm) relative to residual solvent peaks. Signals are reported as m (multiplet), s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quintet), c (complex), brs (broad singlet) and coupling constants are reported in hertz (Hz). Melting points were determined in capillaries and are uncorrected. Optical rotations were

obtained using sodium D line at ambient temperature on a Jasco DIP-360 digital polarimeter. Mass spectral data (HRMS) were obtained at the Department of Chemistry, University of Kingston, Ontario, Canada. Elemental analyses were performed at the Département de Chimie, Université de Montréal, Québec, Canada.

Isolation of Lupeol (1). The finely ground external bark (150 g) of the yellow birch (*Betula alleghaniensis* Britton), collected in Saguenay, Quebec, Canada, was extracted with a soxhlet apparatus in CHCl_3 (1 L) and refluxed for 1 day. The mixture was filtered, dried (MgSO_4) and the solvents were evaporated under reduced pressure to produce a dark brown oily residue. The crude extract was purified by flash chromatography (CH_2Cl_2 to $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ 99:1). Fractions containing **1** were treated with activated charcoal, filtered and then the solvents were evaporated under reduced pressure to give **1** as a white powder (1.77 g; 1.2%): R_f 0.63 (CH_2Cl_2); mp 213-215 °C, lit.⁴¹ mp 215-216 °C; $[\alpha]_D^{20} +19.6^\circ$ (c 1.2, CHCl_3), lit.⁴¹ $[\alpha]_D +26.4^\circ$ (CHCl_3); positive-ion HREIMS m/z 426.3854 $[\text{M}]^+$ (calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$, 426.3862). ^1H and ^{13}C NMR spectral data of **1** were in agreement with those published in the literature.⁶

Isolation of Betulin (2). The finely ground external bark (150 g) of the white birch (*Betula papyrifera* Marsh), collected in Saguenay, Quebec, Canada, was soaked in CH_2Cl_2 (1 L) and refluxed for 1 day. The mixture was filtered, dried (MgSO_4) and the solvents were evaporated under reduced pressure to produce a dark yellow solid residue. The crude extract was purified by flash chromatography (CH_2Cl_2 to $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ 49:1). Fractions containing **2** were treated with activated charcoal, filtered and then the solvents were evaporated under reduced pressure to give **2** as a white powder (25 g, 17%): R_f 0.17 (CH_2Cl_2); mp 250-252 °C, lit.⁴¹ mp 251-252 °C; $[\alpha]_D^{20} +19.1^\circ$ (c 0.67, $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$), lit.⁴¹ $[\alpha]_D^{15} +20.0^\circ$ ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$); positive-ion HREIMS m/z 442.3804 $[\text{M}]^+$ (calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$, 442.3811), 411.3624 $[\text{M} - \text{CH}_3\text{O}]^+$ (calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{47}\text{O}$, 411.3627). ^1H and ^{13}C NMR spectral data of **2** were in agreement with those published in the literature.⁴²

3,28-Diacetoxylbetulin (4): Acetic anhydride (4.8 mL, 50 mmol) was added to a cooled solution (ice-water bath) of **2** (7.50 g, 17 mmol) in pyridine (182 mL) with DMAP (100 mg, 0.82 mmol) as

catalyst. After stirring at room temperature for 5 h, the mixture was diluted with CH_2Cl_2 , then, washed with cold H_2SO_4 3 N, saturated NaHCO_3 solution and brine. The solvents of the dried solution (MgSO_4) were evaporated under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (Hexanes to Hexanes:EtOAc 97:3) to give **4** as a white crystalline powder (8.48 g, 95%); R_f 0.74 (CH_2Cl_2); mp 216-218 °C, lit.⁴¹ mp 223-224 °C; $[\alpha]_D^{20} +19.7^\circ$ (c 1.67, CHCl_3), lit.⁴¹ $[\alpha]_D^{20} +22^\circ$; positive-ion HRESMS m/z 549.3925 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{54}\text{O}_4\text{Na}$, 549.3920). ^1H and ^{13}C NMR spectral data of **4** were in agreement with those published in the literature.²⁸

28-Acetoxybetulin (5): Acetic anhydride (300 mL, 3.1 mol) was added to a solution of **2** (11.6 g, 26.2 mmol) in CH_2Cl_2 (750 mL). After stirring overnight at room temperature, the mixture was washed exhaustively with saturated NaHCO_3 solution and brine. The solvents of the dried solution (MgSO_4) were evaporated under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (CH_2Cl_2 to $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ 49:1) to give **5** as a white powder (9.28 g, 73%); R_f 0.31 (CH_2Cl_2); mp 210-212 °C; $[\alpha]_D^{20} +8.5^\circ$ (c 1.58, CHCl_3); positive-ion HREIMS m/z 484.3903 $[\text{M}]^+$ (calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_3$, 484.3916), 466.3801 $[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$ (calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_2$, 466.3811). ^1H and ^{13}C NMR spectral data of **5** were in agreement with those published in the literature.^{28,43}

3-Acetoxybetulin (6): A solution of $\text{Mg}(\text{OCH}_3)_2$ in CH_3OH (224 mL, 8%) was added under N_2 to a solution of **4** (6.14 g, 11.7 mmol) in dry THF (181 mL) and dry CH_3OH (542 mL). After stirring 4 h at room temperature, the mixture was acidified with HCl 10% and extracted with CH_2Cl_2 (3x). Then, the organic layer was washed with saturated NaHCO_3 solution and brine. The solvents of the dried solution (MgSO_4) were evaporated under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (Hexanes to Hexanes:EtOAc 9:1) to give **6** as a white solid (4.80 g, 85%); R_f 0.49 (CH_2Cl_2); mp 258-260 °C, lit.²⁹ mp 256-258 °C; $[\alpha]_D^{20} +25.7^\circ$ (c 0.92, CHCl_3); positive-ion HREIMS m/z 484.3904 $[\text{M}]^+$ (calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_3$, 484.3916), 466.3795 $[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$ (calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_2$, 466.3811), 453.3713 $[\text{M} - \text{CH}_2\text{OH}]^+$ (calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{49}\text{O}_2$, 453.3733). ^1H and ^{13}C NMR spectral data of **6** were in agreement with those published in the literature.²⁹

Methyl betulinate (7): DBU (0.17 mL, 1.1 mmol) and CH₃I (0.21 mL, 3.3 mmol) were slowly added under N₂ to a cooled solution (ice-water bath) of **3** (502 mg, 1.09 mmol) in dry THF (10 mL). The reaction was stirred overnight at room temperature, then filtered off and washed with dry THF. The combined washings and the filtrate were concentrated to give a yellow solid. This residue was acidified (HCl 6N) and extracted with CH₂Cl₂ (3x). After that, the organic layer was washed with H₂O, dried (MgSO₄) and then the solvents were evaporated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂) to give **7** as a white powder (367 mg, 71%): *R*_f 0.54 (CH₂Cl₂); mp 218-220 °C, lit.⁴⁴ 217-220 °C; [α]²⁰_D +1.3° (c 0.58, CHCl₃), lit.⁴⁴ [α]²⁵_D +5° (c 0.17, CHCl₃), lit.⁴⁵ [α]²⁶_D +4.0° (c 0.5, CHCl₃); positive-ion HREIMS *m/z* 470.3744 [M]⁺ (calcd for C₃₁H₅₀O₃, 470.3760), 468.3578 [M – H₂]⁺ (calcd for C₃₁H₄₈O₃, 468.3603), 466.3432 [M – H₄]⁺ (calcd for C₃₁H₄₆O₃, 466.3447). ¹H and ¹³C NMR spectral data of **7** were in agreement with those published in the literature.⁴⁵⁻⁴⁷

Allyl betulinate (8): Allyl bromide (0.19 mL, 2.2 mmol) and K₂CO₃ (454 mg, 3.28 mmol) were added to a solution of **3** (501 mg, 1.10 mmol) in DMF (7 mL). The reaction mixture was stirred 7 h at 55 °C. After cooling, EtOAc was added and the organic layer was washed with 1 N HCl. The aqueous layer was extracted with EtOAc (3x) and the combined organic layers were washed with saturated NaHCO₃ and brine. After the solution was dried (MgSO₄), the solvents were evaporated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂) to give **8** as a white crystalline powder (458 mg, 84%): *R*_f 0.58 (CH₂Cl₂:CH₃OH 99:1); mp 152-154 °C; [α]²⁰_D +3.9° (c 1.00, CHCl₃); positive-ion HREIMS *m/z* 497.3985 [M + H]⁺ (calcd for C₃₃H₅₃O₃, 497.3995). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 0.69 (m, 1H, H-5); 0.77 (s, 3H, H-24); 0.83 (s, 3H, H-26); 0.91 (m, 1H, H-1a); 0.92 (s, 3H, H-25); 0.97 (s, 6H, H-23, H-27); 1.03 (m, 1H, H-12a); 1.16 (m, 1H, H-21a); 1.26 (m, 1H, H-11a); 1.27 (m, 1H, H-9); 1.37 (m, 1H, H-6a); 1.37 (m, 1H, H-15a); 1.37 (m, 2H, H-7); 1.41 (m, 1H, H-21b); 1.41 (m, 1H, H-16a); 1.42 (m, 1H, H-22a); 1.43 (m, 1H, H-11b); 1.51 (m, 1H, H-6b); 1.60 (m, 2H, H-2); 1.60 (m, 1H, H-19); 1.68 (m, 1H, H-1b); 1.69 (s, 3H, H-30); 1.71 (m, 1H, H-21b); 1.92 (m, 1H, H-22b); 1.92 (m, 1H, H-15b); 2.23 (m, 1H, H-13); 2.28 (m, 1H, H-16b); 3.02

(m, 1H, H-18); 3.19 (dd, 1H, $J = 11.0$ Hz, $J = 5.1$ Hz, H-3); 4.58 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 4.61 (brs, 1H, H-29a); 4.74 (brs, 1H, H-29b); 5.24 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, Ha); 5.35 (d, 1H, $J = 17.1$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, Hb); 5.94 (ddt, 1H, $J = 17.1$ Hz, $J = 10.5$ Hz, $J = 5.7$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 14.75 (C-27), 15.44 (C-24), 16.00 (C-25), 16.19 (C-26), 18.33 (C-6), 19.44 (C-30), 20.92 (C-11), 25.56 (C-12), 27.43 (C-2), 28.04 (C-23), 29.68 (C-21), 30.61 (C-15), 32.15 (C-16), 34.36 (C-7), 37.03 (C-22), 37.22 (C-10), 38.24 (C-13), 38.77 (C-1), 38.89 (C-4), 40.77 (C-8), 42.42 (C-14), 46.94 (C-18), 49.48 (C-19), 50.59 (C-9), 55.39 (C-5), 56.59 (C-17), 64.61 ($\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 78.91 (C-3), 109.64 (C-29), 118.15 ($\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 132.56 ($\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 150.53 (C-20), 175.72 (C-28).

1,2,3,4,6-Penta-O-benzoyl- α,β -D-glucopyranose (24): BzCl (77 mL, 666 mmol) was slowly added to a cooled solution (ice-water bath) of D-glucose (20.0 g, 111 mmol) in anhydrous pyridine (280 mL) with DMAP (136 mg, 1.1 mmol) as catalyst. The reaction was performed overnight at room temperature with constant stirring and then quenched with CH_3OH (31 mL). The mixture was diluted with CH_2Cl_2 and washed with cold H_2SO_4 3 N, saturated NaHCO_3 solution and brine. The solvents of the dried solution (MgSO_4) were evaporated under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (CH_2Cl_2) to give **24** as a white solid (71.6 g, 92%); R_f 0.68 (CH_2Cl_2); mp 172-174 °C; $[\alpha]_D^{20} +104.9^\circ$ (c 1.25, CHCl_3); positive-ion HRESMS m/z 723.1818 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (calcd for $\text{C}_{41}\text{H}_{32}\text{O}_{11}\text{Na}$, 723.1842). ^1H and ^{13}C NMR spectral data of **24** were in agreement with those published in the literature.^{32,48}

2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl- α,β -D-glucopyranose (25): HBr/HOAc (10 mL, 33%) was added under N_2 to a solution of **24** (10.0 g, 14.3 mmol) in dry CH_2Cl_2 (42 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h, then, the solution was washed with saturated NaHCO_3 solution and brine. The organic layer was dried (MgSO_4), filtered and the solvents were evaporated under reduced pressure. After the residue was dissolved in acetone (75 mL) and water (3 mL), Ag_2CO_3 (6.50 g, 23.6 mmol) was added portionwise. The hydrolysis was performed 1 h at room temperature with constant stirring, then, the mixture was filtered through a bed of Celite. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (CH_2Cl_2 : CH_3OH 99:1

to 49:1) to give **25** as a white foam (7.32 g, 86%); R_f 0.28 (CH_2Cl_2 : CH_3OH 99:1); mp 116-118 °C, lit.⁴⁹ mp 118-120 °C; $[\alpha]_D^{20} +70.1^\circ$ (c 1.42, CHCl_3), lit.⁴⁹ $[\alpha]_D^{22} +72.2^\circ$ (c 0.5, CHCl_3); positive-ion HRESMS m/z 619.1567 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{28}\text{O}_{10}\text{Na}$, 619.1580). ^1H and ^{13}C NMR spectral data of **25** were in agreement with those published in the literature.^{34,49}

2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl- α -D-glucopyranose trichloroacetimidate (26): CCl_3CN (6 mL, 59.8 mmol) was added to a solution of **25** (5.81 g, 9.74 mmol) and Cs_2CO_3 (315 mg, 0.97 mmol) in CH_2Cl_2 (100 mL). The reaction was stirred 4 h at room temperature and then filtered off. The solvents of the filtrate were evaporated under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (CH_2Cl_2) to give **26** as a white crystalline powder (6.13 g, 85%); R_f 0.64 (CH_2Cl_2 : CH_3OH 99:1); $[\alpha]_D^{20} +76.5^\circ$ (c 1.67, CHCl_3); positive-ion HRESMS m/z 778.0410 $[\text{M} + \text{K}]^+$ (calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{28}\text{NO}_{10}\text{Cl}_3\text{K}$, 778.0415), 762.0703 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{28}\text{NO}_{10}\text{Cl}_3\text{Na}$, 762.0676). ^1H and ^{13}C NMR spectra data of **26** were in agreement with those published in the literature.³⁴

1,2,3,4-Tetra-O-benzoyl- α,β -L-rhamnopyranose (27): This compound was prepared from L-rhamnose (2.05 g, 12.5 mmol) in the same manner as that described for compound **24**. Purification by flash chromatography (CH_2Cl_2) afforded **27** as a white crystalline powder (5.95 g, 82 %); R_f 0.65 (CH_2Cl_2); $[\alpha]_D^{20} +33.6^\circ$ (c 0.25, CHCl_3); positive-ion HRESMS m/z 603.1613 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{28}\text{O}_9\text{Na}$, 603.1631). ^1H NMR (CDCl_3) δ : 1.52 (d, 3H, $J = 6.2$ Hz, H-6); 4.20 (m, 1H, H-5); 5.85 (t, 1H, $J = 9.6$ Hz, H-4); 5.91 (dd, 1H, $J = 10.0$ Hz, $J = 3.2$ Hz, H-3); 6.24 (d, 1H, $J = 3.0$ Hz, H-2); 6.54 (brs, 1H, H-1); 7.20-7.25 (m, 2H, H-Ar); 7.28-7.41 (m, 5H, H-Ar); 7.44-7.54 (m, 4H, H-Ar); 7.58-7.64 (m, 1H, H-Ar); 7.88-7.92 (m, 2H, H-Ar); 7.97-8.05 (m, 4H, H-Ar); 8.23-8.27 (m, 2H, H-Ar). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 17.84 (C-6), 69.88 (C-5), 71.44 (C-2), 71.62 (C-3), 71.75 (C-4), 91.38 (C-1), 128.39-133.75 (C-Ar), 164.27 (C=O), 165.51 (C=O), 165.74 (C=O), 165.85 (C=O).

2,3,4-Tri-O-benzoyl- α -L-rhamnopyranose trichloroacetimidate (28): HBr/HOAc (2.3 mL, 33%) was added at room temperature under N_2 to a solution of **27** (2.31 g, 3.98 mmol) in dry CH_2Cl_2 (10 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h, then, the solution was washed with saturated NaHCO_3 solution and brine. The organic layer was dried over MgSO_4 , filtered and

the solvents were evaporated under reduced pressure. After the residue was dissolved in acetone (19 mL) and water (0.8 mL), Ag_2CO_3 (1.50 g, 5.44 mmol) was added portionwise. The hydrolysis was performed 1 h at room temperature with constant stirring, then, the mixture was filtered through a bed of Celite. The filtrate was concentrated under reduced pressure and dissolved in CH_2Cl_2 (50 mL). Cs_2CO_3 (130 mg, 0.40 mmol) was added, followed by CCl_3CN (2.4 mL, 23.9 mmol) and the reaction was stirred 4 h at room temperature. The mixture was then filtered off, concentrated under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (CH_2Cl_2) to give **28** as a white crystalline powder (1.78 g, 72%, 2 steps): R_f 0.74 (CH_2Cl_2); $[\alpha]^{20}_{\text{D}} +83.6^\circ$ (c 1.33, CHCl_3), lit.³⁵ $[\alpha]^{20}_{\text{D}} +97.5^\circ$ (c 1.0, CHCl_3); positive-ion HRESMS m/z 658.0189 $[\text{M} + \text{K}]^+$ (calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{24}\text{NO}_8\text{Cl}_3\text{K}$, 658.0204). ^1H and ^{13}C NMR spectra data of **28** were in agreement with those published in the literature.³⁵

1,2,3,4-Tetra-O-benzoyl- α,β -D-arabinopyranose (29): This compound was prepared from D-arabinose (4.92 g, 32.8 mmol) in the same manner as that described for compound **24**. Purification by flash chromatography (CH_2Cl_2) afforded **29** as a white crystalline powder (16.5 g, 89%): R_f 0.59 (CH_2Cl_2); $[\alpha]^{20}_{\text{D}} -274.2^\circ$ (c 1.00, CHCl_3); positive-ion HRESMS m/z 589.1457 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{26}\text{O}_9\text{Na}$, 589.1474). ^1H NMR (CDCl_3) δ : 4.21 (dd, 1H, $J = 13.4$ Hz, $J = 1.8$ Hz, H-5a); 4.44 (d, 1H, $J = 13.0$ Hz, H-5b); 5.93 (s, 1H, H-4); 6.10 (brs, 2H, H-2, H-3); 6.90 (brs, 1H, H-1); 7.26-7.34 (m, 4H, H-Ar); 7.42-7.56 (m, 6H, H-Ar); 7.61-7.68 (m, 2H, H-Ar); 7.88-7.93 (m, 4H, H-Ar); 8.13-8.18 (m, 4H, H-Ar). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 63.07 (C-5), 67.82 and 68.23 (C-2, C-3), 69.53 (C-4), 91.12 (C-1), 128.44-133.89 (C-Ar), 164.73 ($\underline{\text{CO}}$), 165.62 ($\underline{\text{CO}}$), 165.76 ($\underline{\text{CO}}$), 165.79 ($\underline{\text{CO}}$).

2,3,4-Tri-O-benzoyl- α -D-arabinopyranose trichloroacetimidate (30): This compound was prepared from **29** (5.70 g, 10.1 mmol) in the same manner as that described for compound **28**. Purification by flash chromatography (CH_2Cl_2) afforded **30** as a white foam (4.76 g, 78%, 2 steps): R_f 0.55 (CH_2Cl_2); $[\alpha]^{20}_{\text{D}} -182.8^\circ$ (c 1.00, CHCl_3); positive-ion HRESMS m/z 644.0076 $[\text{M} + \text{K}]^+$ (calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{22}\text{NO}_8\text{Cl}_3\text{K}$, 644.0048). ^1H NMR (CDCl_3) δ : 4.19 (dd, 1H, $J = 13.3$ Hz, $J = 2.0$ Hz, H-5a); 4.43 (d, 1H, $J = 12.8$ Hz, H-5b); 5.88 (m, 1H, H-4); 6.02 (ddd, 2H, $J = 16.7$ Hz, $J = 10.7$ Hz, $J = 3.0$

Hz, H-2, H-3); 6.83 (d, 1H, $J = 3.0$ Hz, H-1); 7.26-7.33 (m, 2H, H-Ar); 7.34-7.40 (m, 2H, H-Ar); 7.44-7.55 (m, 4H, H-Ar); 7.60-7.66 (m, 1H, H-Ar); 7.84-7.88 (m, 2H, H-Ar); 7.96-8.00 (m, 2H, H-Ar); 8.09-8.15 (m, 2H, H-Ar); 8.64 (brs, 1H, NH). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 63.18 (C-5), 68.00 (d, C-2, C-3), 69.45 (C-4), 90.89 (CCl_3), 94.35 (C-1), 128.38-133.57 (C-Ar), 160.80 ($\text{C}=\text{NH}$), 165.59 ($\text{C}=\text{O}$), 165.66 ($\text{C}=\text{O}$), 165.69 ($\text{C}=\text{O}$).

Lup-20(29)-ene-3 β -O- β -D-glucopyranoside (9): The acceptor **1** (1.01 g, 2.34 mmol), and the donor **26** (2.60 g, 3.52 mmol) were stirred in dry CH_2Cl_2 (80 mL) for 1 h with 4 Å MS. At this time, TMSOTf (24 μL , 0.13 mmol) was added under Ar while keeping rigorous anhydrous conditions. The reaction was usually performed in 30 min, then quenched by addition of Et_3N (0.3 mL). The solvents were evaporated under reduced pressure and the resulting residue was immediately dissolved in a NaOH 0.25 N solution of $\text{CH}_3\text{OH}:\text{THF}:\text{H}_2\text{O}$ 1:2:1 (240 mL). The reaction was stirred at room temperature for 2 h, dissolved in CH_2Cl_2 and washed with HCl 10% and brine. Once the solution was dried (MgSO_4), the solvents were evaporated under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$, 49:1 to 47:3) to give **9** as a white powder (1.38 g, 90%, 2 steps): R_f 0.24 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ 9:1); mp 176-178 °C; $[\alpha]_D^{20} +7.9^\circ$ (c 0.50, CHCl_3); positive-ion HRESMS m/z 611.4267 (calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{O}_6\text{Na}$, 611.4287). ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.67 (m, 1H, H-5); 0.79 (s, 3H, H-28); 0.80 (s, 3H, H-25); 0.83 (s, 3H, H-26); 0.86 (m, 1H, H-1a); 0.93 (s, 3H, H-27); 0.99 (m, 1H, H-2a); 0.99 (s, 3H, H-23); 1.02 (s, 3H, H-24); 1.04 (m, 1H, H-12a); 1.18 (m, 1H, H-22a); 1.23 (m, 1H, H-9); 1.23 (m, 1H, H-11a); 1.32 (m, 1H, H-21a); 1.35 (m, 1H, H-18); 1.36 (m, 1H, H-16a); 1.37 (m, 2H, H-7); 1.37 (m, 1H, H-6a); 1.38 (m, 1H, H-22b); 1.39 (m, 1H, H-11b); 1.48 (m, 1H, H-16b); 1.49 (m, 1H, H-6b); 1.64 (m, 1H, H-1b); 1.65 (m, 1H, H-15a); 1.66 (m, 1H, H-13); 1.67 (m, 1H, H-2b); 1.67 (m, 1H, H-12b); 1.68 (s, 3H, H-30); 1.75 (m, 1H, H-15b); 1.92 (m, 1H, H-21b); 2.37 (m, 1H, H-19); 2.63 (brs, 4H, 4xOH); 3.13 (dd, 1H, $J = 11.2$ Hz, $J = 4.8$ Hz, H-3); 3.36 (m, 1H, H'-5); 3.42 (t, 1H, $J = 8.3$ Hz, H'-2); 3.58 (q, 2H, $J = 8.7$ Hz, H'-3, H'-4); 3.80 (dd, 1H, $J = 11.8$ Hz, $J = 4.2$ Hz, H'-6b); 3.86 (dd, 1H, $J = 12.0$ Hz, $J = 3.1$ Hz, H'-6a); 4.36 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz, H'-1); 4.57 (brs, 1H, H-29a); 4.69 (brs, 1H, H-29b). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 14.70 (C-27), 16.15 (C-24), 16.38 (C-

26), 16.74 (C-25), 18.16 (C-28), 18.35 (C-6), 19.50 (C-30), 21.00 (C-11), 25.26 (C-12), 26.48 (C-15), 27.60 (C-2), 28.09 (C-23), 30.02 (C-21), 34.46 (C-7), 35.74 (C-16), 37.02 (C-10), 38.20 (C-13), 38.93 (C-1), 39.35 (C-4), 40.15 (C-22), 40.99 (C-8), 42.95 (C-14), 43.17 (C-17), 48.15 (C-19), 48.45 (C-18), 50.57 (C-9), 55.77 (C-5), 61.94 (C'-6), 69.69 (C'-4), 73.98 (C'-2), 75.29 (C'-5), 76.51 (C'-3), 90.29 (C-3), 105.32 (C'-1), 109.54 (C-29), 151.08 (C-20).

Lup-20(29)-ene-3 β -O- α -L-rhamnopyranoside (10): This compound was prepared from the acceptor **1** (502 mg, 1.18 mmol), and the donor **28** (1.09 g, 1.76 mmol) in the same manner as that described for compound **9**. Purification by flash chromatography (CH₂Cl₂:CH₃OH, 49:1 to 47:3) afforded **10** as a white powder (485 mg, 72%, 2 steps): *R_f* 0.33 (CH₂Cl₂:CH₃OH 9:1); mp 214-216 °C; [α]_D²⁰ -17.9° (c 0.50, CHCl₃); positive-ion HRESMS *m/z* 595.4335 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₆H₆₀O₅Na, 595.4338). ¹H NMR (CDCl₃) δ : 0.68 (m, 1H, H-5); 0.75 (s, 3H, H-25); 0.79 (s, 3H, H-28); 0.82 (m, 1H, H-1a); 0.83 (s, 3H, H-26); 0.90 (s, 3H, H-23); 0.94 (s, 3H, H-27); 1.00 (m, 1H, H-2a); 1.02 (s, 3H, H-24); 1.20 (m, 1H, H-22a); 1.24 (m, 1H, H-9); 1.24 (m, 1H, H-11a); 1.28 (d, 3H, *J* = 6.1 Hz, H'-6); 1.35 (m, 1H, H-21a); 1.36 (m, 1H, H-18); 1.36 (m, 1H, H-16a); 1.38 (m, 2H, H-7); 1.38 (m, 1H, H-6a); 1.38 (m, 1H, H-22b); 1.40 (m, 1H, H-11b); 1.46 (m, 1H, H-16b); 1.49 (m, 1H, H-6b); 1.66 (m, 1H, H-13); 1.67 (m, 1H, H-2b); 1.67 (m, 2H, H-15); 1.67 (m, 1H, H-12a); 1.69 (s, 3H, H-30); 1.76 (m, 1H, H-12b); 1.93 (m, 1H, H-21b); 2.38 (m, 1H, H-19); 3.07 (dd, 1H, *J* = 11.3 Hz, *J* = 4.8 Hz, H-3); 3.43 (t, 1H, *J* = 9.2 Hz, H'-4); 3.77 (t, 1H, *J* = 5.2 Hz, H'-3); 3.81 (dd, 1H, *J* = 9.0 Hz, *J* = 6.1 Hz, H'-5); 3.95 (brs, 1H, H'-2); 4.57 (brs, 1H); 4.69 (brs, 1H); 4.82 (brs, 1H). ¹³C NMR (CDCl₃) δ : 14.55 (C-27), 15.98 (C-24), 16.15 (C-26), 16.25 (C-25), 17.35 (C'-6), 18.01 (C-28), 18.30 (C-6), 19.33 (C-30), 20.95 (C-11), 25.14 (C-12), 25.52 (C-15), 27.44 (C-2), 28.19 (C-23), 29.86 (C-21), 34.25 (C-7), 35.59 (C-16), 36.89 (C-10), 38.05 (C-13), 38.64 (C-1), 39.06 (C-4), 40.01 (C-22), 40.85 (C-8), 42.83 (C-14), 43.02 (C-17), 48.00 (C-19), 48.31 (C-18), 50.40 (C-9), 55.45 (C-5), 67.65 (C'-5), 71.26 (C'-2), 71.98 (C'-3), 74.00 (C'-4), 89.71 (C-3), 101.67 (C'-1), 109.33 (C-29), 151.01 (C-20).

Lup-20(29)-ene-3 β -O- α -D-arabinopyranoside (11): This compound was prepared from the acceptor **1** (251 mg, 0.59 mmol), and the donor **30** (531 mg, 0.88 mmol) in the same manner as that

described for compound **9**. Purification by flash chromatography (CH₂Cl₂:CH₃OH, 49:1 to 47:3) afforded **11** as a white solid (286 mg, 87%, 2 steps): *R_f* 0.33 (CH₂Cl₂:CH₃OH 9:1); mp 212-214 °C; $[\alpha]_D^{20} +26.8^\circ$ (c 1.25, CHCl₃); positive-ion HRESMS *m/z* 581.4163 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₅H₅₈O₅Na, 581.4181). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 0.70 (m, 1H, H-5); 0.77 (s, 3H, H-25); 0.79 (s, 3H, H-28); 0.84 (m, 1H, H-1a); 0.84 (s, 3H, H-24); 0.92 (s, 3H, H-27); 0.97 (m, 1H, H-2a); 1.00 (s, 3H, H-23); 1.02 (s, 3H, H-26); 1.06 (m, 1H, H-15a); 1.20 (m, 1H, H-22a); 1.23 (m, 1H, H-9); 1.24 (m, 1H, H-11a); 1.25 (m, 1H, H-21a); 1.35 (m, 1H, H-18); 1.36 (m, 1H, H-16a); 1.37 (m, 2H, H-7); 1.38 (m, 1H, H-22b); 1.38 (m, 1H, H-6a); 1.40 (m, 1H, H-11b); 1.46 (m, 1H, H-16b); 1.50 (m, 1H, H-12a); 1.51 (m, 1H, H-6b); 1.66 (m, 1H, H-15b); 1.67 (m, 1H, H-2b); 1.67 (m, 1H, H-13); 1.68 (s, 3H, H-30); 1.69 (m, 1H, H-12b); 1.92 (m, 1H, H-21b); 2.38 (m, 1H, H-19); 2.64 (brs, 3H, 3xOH); 3.26 (dd, 1H, *J* = 11.9 Hz, *J* = 3.8 Hz, H-3); 3.54 (d, 1H, *J* = 11.4 Hz, H'-5a); 3.65 (m, 1H, H'-3); 3.68 (m, 1H, H'-2); 3.93 (brs, 1H, H'-4); 3.94 (d, 1H, *J* = 11.4 Hz, H'-5b); 4.34 (d, 1H, *J* = 5.9 Hz, H'-1); 4.57 (brs, 1H, H-29a); 4.68 (brs, 1H, H-29b). ¹³C NMR (CDCl₃) δ: 14.47 (C-27), 15.98 (C-24), 16.10 (C-26), 16.39 (C-25), 18.00 (C-28), 18.30 (C-6), 19.32 (C-30), 20.96 (C-11), 23.01 (C-12), 25.13 (C-15), 27.41 (C-2), 28.20 (C-23), 29.72, 29.84 (C-21), 34.26 (C-7), 35.56 (C-16), 37.03 (C-10), 38.02 (C-13), 38.22 (C-4), 38.39 (C-1), 40.00 (C-22), 40.88 (C-8), 42.82 (C-14), 43.02 (C-17), 47.98 (C-19), 48.30 (C-18), 50.39 (C-9), 55.84 (C-5), 64.83 (C'-5), 67.49 (C'-4), 71.62 (C'-3), 72.68 (C'-2), 84.59 (C-3), 99.53 (C'-1), 109.33 (C-29), 151.01 (C-20).

28-Hydroxy-lup-20(29)-ene-3β-O-β-D-glucopyranoside (12): This compound was prepared from the acceptor **5** (500 mg, 1.03 mmol), and the donor **26** (1.15 g, 1.55 mmol) in the same manner as that described for compound **9**. Purification by flash chromatography (CH₂Cl₂:CH₃OH, 49:1 to 47:3) afforded **12** as a white crystalline powder (406 mg, 65%, 2 steps): *R_f* 0.21 (CH₂Cl₂:CH₃OH 9:1); mp 192-194 °C; $[\alpha]_D +2.7^\circ$ (c 0.58, CH₃OH); positive-ion HRESMS *m/z* 627.4218 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₆H₆₀O₇Na, 627.4236). ¹H NMR (CD₃OD) δ: 0.74 (m, 1H, H-5); 0.84 (s, 3H, H-24); 0.88 (s, 3H, H-25); 0.93 (m, 1H, H-1a); 1.00 (m, 1H, H-7); 1.02 (s, 3H, H-27); 1.04 (m, 1H, H-2a); 1.05 (s, 3H, H-23); 1.07 (m, 1H, H-12a); 1.08 (s, 3H, H-26); 1.18 (m, 1H, H-16a); 1.23

(m, 1H, H-11a); 1.29 (m, 1H, H-21a); 1.34 (m, 1H, H-9); 1.40 (m, 1H, H-21b); 1.42 (m, 1H, H-11b); 1.44 (m, 1H, H-7b); 1.44 (m, 1H, H-22a); 1.44 (m, 1H, H-6a); 1.55 (m, 1H, H-6b); 1.62 (m, 1H, H-18); 1.69 (m, 1H, H-1b); 1.69 (m, 1H, H-13); 1.69 (m, 1H, H-12b); 1.69 (m, 1H, H-15a); 1.69 (s, 3H, H-30); 1.78 (m, 1H, H-2b); 1.91 (m, 1H, H-22b); 1.91 (m, 1H, H-15b); 1.98 (m, 1H, H-16b); 2.42 (m, 1H, H-19); 3.16 (dd, 1H, $J = 11.2$ Hz, $J = 5.0$ Hz, H-3); 3.18 (t, 1H, $J = 9.8$ Hz, H'-2); 3.25 (m, 1H, H'-5); 3.28 (t, 1H, $J = 11.7$ Hz, H'-4); 3.28 (d, 1H, $J = 11.7$ Hz, H-28a); 3.33 (t, 1H, $J = 9.8$ Hz); 3.28 (dd, 1H, $J = 11.9$ Hz, $J = 5.1$ Hz, H'-6a); 3.74 (d, 1H, $J = 11.7$ Hz, H-28b); 3.84 (dd, 1H, $J = 11.9$ Hz, $J = 1.9$ Hz, H'-6b); 4.58 (brs, 1H, H-29a); 4.69 (brs, 1H, H-29b). ^{13}C NMR (CD_3OD) δ : 15.22 (C-27), 16.54 (C-26), 16.77 (C-25), 16.82 (C-24), 19.28 (C-6), 19.38 (C-30), 21.99 (C-11), 26.62 (C-12), 27.19 (C-15), 28.17 (C-2), 28.41 (C-23), 30.37 (C-16), 30.84 (C-21), 35.10 (C-22), 35.47 (C-7), 38.02 (C-10), 38.70 (C-13), 40.00 (C-1), 40.28 (C-4), 42.16 (C-8), 43.81 (C-14), 48.53 (C-17), 49.25 (C-19), 50.03 (C-18), 51.83 (C-9), 57.10 (C-5), 60.35 (C-28), 62.79 (C'-6), 71.64 (C'-4), 75.66 (C'-2), 77.68 (C'-5), 78.27 (C'-3), 90.79 (C-3), 106.74 (C'-1), 110.26 (C-29), 151.87 (C-20).

28-Hydroxy-lup-20(29)-ene-3 β -O- α -L-rhamnopyranoside (13): This compound was prepared from the acceptor **5** (252 mg, 0.52 mmol), and the donor **28** (484 mg, 0.78 mmol) in the same manner as that described for compound **9**. Purification by flash chromatography (CH_2Cl_2 : CH_3OH , 49:1 to 47:3) afforded **13** as a white crystalline powder (159 mg, 52%, 2 steps): R_f 0.29 (CH_2Cl_2 : CH_3OH 9:1); mp >200 °C; $[\alpha]_D^{20}$ -20.3° (c 0.50, CH_3OH); positive-ion HRESMS m/z 611.4266 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{O}_6\text{Na}$, 611.4287). ^1H NMR (CD_3OD) δ : 0.76 (m, 1H, H-5); 0.79 (s, 3H, H-24); 0.88 (s, 3H, H-25); 0.93 (m, 1H, H-1a); 0.94 (s, 3H, H-23); 1.00 (m, 1H, H-7a); 1.02 (s, 3H, H-27); 1.04 (m, 1H, H-2a); 1.07 (m, 1H, H-12a); 1.08 (s, 3H, H-26); 1.18 (m, 1H, H-16a); 1.22 (d, 3H, $J = 6.3$ Hz, H'-6); 1.23 (m, 1H, H-11a); 1.29 (m, 1H, H-21a); 1.35 (m, 1H, H-9); 1.40 (m, 1H, H-21b); 1.42 (m, 1H, H-11b); 1.43 (m, 1H, H-7b); 1.43 (m, 1H, H-22a); 1.45 (m, 1H, H-6a); 1.54 (m, 1H, H-6b); 1.61 (m, 1H, H-18); 1.68 (m, 1H, H-1b); 1.68 (m, 1H, H-13); 1.69 (m, 1H, H-12b); 1.69 (m, 1H, H-15a); 1.69 (s, 3H, H-30); 1.78 (m, 1H, H-2b); 1.91 (m, 1H, H-22b); 1.91 (m, 1H, H-15b); 1.95 (m, 1H, H-16b); 2.42 (m, 1H, H-19); 3.07 (dd, 1H, $J = 11.3$ Hz, $J = 4.6$ Hz, H-3); 3.28 (d,

1H, $J = 10.9$ Hz, H-28a); 3.36 (t, 1H, $J = 9.5$ Hz, H'-4); 3.63 (dd, 1H, $J = 9.5$ Hz, $J = 3.2$ Hz, H'-3); 3.70 (m, 1H, H'-5); 3.74 (d, 1H, $J = 10.9$ Hz, H-28b); 3.82 (brs, 1H, H'-2); 4.57 (brs, 1H, H-29a); 4.68 (brs, 1H, H-29b); 4.72 (brs, 1H, H'-1). ^{13}C NMR (CD_3OD) δ : 15.20 (C-27), 16.51 (C-26), 16.72 (C-25), 16.77 (C-24), 17.83 (C'-6), 19.34 (C-6), 19.38 (C-30), 21.98 (C-11), 26.58 (C-12), 26.76 (C-15), 28.14 (C-2), 28.61 (C-23), 30.34 (C-16), 30.82 (C-21), 35.09 (C-22), 35.40 (C-7), 38.06 (C-10), 38.68 (C-13), 39.82 (C-1), 40.15 (C-4), 42.15 (C-8), 43.82 (C-14), 48.53 (C-17), 49.24 (C-19), 50.00 (C-18), 51.77 (C-9), 56.79 (C-5), 60.33 (C-28), 69.88 (C'-5), 72.48 (C'-2), 72.50 (C'-3), 74.07 (C'-4), 90.36 (C-3), 104.43 (C'-1), 110.25 (C-29), 151.86 (C-20).

28-Hydroxy-lup-20(29)-ene-3 β -O- α -D-arabinopyranoside (14): This compound was prepared from the acceptor **5** (250 mg, 0.52 mmol), and the donor **30** (442 mg, 0.78 mmol) in the same manner as that described for compound **9**. Purification by flash chromatography (CH_2Cl_2 : CH_3OH , 49:1 to 47:3) afforded **14** as a white powder (196 mg, 66%, 2 steps): R_f 0.29 (CH_2Cl_2 : CH_3OH 9:1); mp >200 °C; $[\alpha]_D^{20} +17.4$ (c 0.25, CH_3OH); positive-ion HRESMS m/z 587.4143 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{58}\text{O}_6\text{Na}$, 597.4131). ^1H NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 0.72 (m, 1H, H-5); 0.75 (s, 3H, H-25); 0.83 (m, 1H, H-11a); 0.84 (s, 3H, H-24); 0.95 (s, 3H, H-26); 1.03 (m, 1H, H-2a); 1.05 (s, 3H, H-27); 1.12 (m, 1H, H-11a); 1.12 (m, 1H, H-15a); 1.16 (m, 1H, H-7a); 1.22 (s, 3H, H-23); 1.30 (m, 1H, H-22a); 1.30 (m, 1H, H-9); 1.31 (m, 1H, H-6a); 1.31 (m, 1H, H-16a); 1.33 (m, 1H, H-11b); 1.34 (m, 1H, H-22b); 1.46 (m, 1H, H-6b); 1.49 (m, 1H, H-21a); 1.64 (m, 1H, H-11b); 1.66 (m, 1H, H-12a); 1.67 (m, 1H, H-18); 1.75 (m, 1H, H-13); 1.75 (s, 3H, H-30); 1.76 (m, 1H, H-15b); 1.88 (m, 1H, H-2b); 2.00 (m, 1H, H-12b); 2.15 (m, 1H, H-21b); 2.39 (m, 1H, H-7b); 2.42 (m, 1H, H-16b); 2.61 (m, 1H, H-19); 3.42 (dd, 1H, $J = 11.4$ Hz, $J = 4.2$ Hz, H-3); 3.64 (d, 1H, $J = 10.1$ Hz, H-28a); 3.80 (d, 1H, $J = 11.0$ Hz, H'-5); 4.07 (d, 1H, $J = 10.1$ Hz, H-28b); 4.18 (dd, 1H, $J = 8.7$ Hz, $J = 2.8$ Hz, H'-3); 4.32 (brs, 1H, H'-4); 4.34 (d, 1H, $J = 11.0$ Hz, H'-5); 4.39 (t, 1H, $J = 7.9$ Hz, H'-2); 4.70 (d, 1H, $J = 7.1$ Hz, H'-1); 4.74 (brs, 1H, H-29a); 4.88 (brs, 1H, H-29b); 4.99 (brs, 3H, 3xOH). ^{13}C NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 14.90 (C-27), 16.12 (C-26), 16.25 (C-25), 16.91 (C-24), 18.65 (C-6), 19.26 (C-30), 21.06 (C-11), 23.86 (C-12), 25.70 (C-15), 27.54 (C-2), 28.55 (C-23), 29.98 (C-10), 29.99 (C-16), 30.02 (C-21), 34.58 (C-22), 34.87 (C-7),

37.56 (C-13), 38.80 (C-1), 41.08 (C-4), 41.21 (C-8), 42.98 (C-14), 48.35 (C-19), 48.53 (C-17), 49.13 (C-18), 50.61 (C-9), 56.20 (C-5), 59.41 (C-28), 67.05 (C'-5), 69.61 (C'-4), 72.55 (C'-2), 74.79 (C'-3), 84.93 (C-3), 102.98 (C'-1), 109.93 (C-29), 151.25 (C-20).

28-O- β -D-Glucopyranosyl-lup-20(29)-en-3 β -ol (15): This compound was prepared from the acceptor **6** (501 mg, 1.03 mmol), and the donor **26** (1.15 g, 1.55 mmol) in the same manner as that described for compound **9** except for the basic hydrolysis reaction time (overnight). Purification by flash chromatography (CH₂Cl₂:CH₃OH, 49:1 to 47:3) afforded **15** as a white powder (338 mg, 54%, 2 steps): *R_f* 0.21 (CH₂Cl₂:CH₃OH 9:1); mp >200 °C; [α]_D²⁰ -12.8° (c 0.25, CH₃OH); positive-ion HRESMS *m/z* 627.4229 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₆H₆₀O₇Na, 627.4236). ¹H NMR (CD₃OD) δ : 0.71 (m, 1H, H-5); 0.76 (s, 3H, H-26); 0.87 (s, 3H, H-24); 0.92 (m, 1H, H-1a); 0.96 (s, 3H, H-23); 1.01 (m, 1H, H-7a); 1.01 (s, 3H, H-27); 1.04 (m, 1H, H-2a); 1.08 (m, 1H, H-12a); 1.09 (s, 3H, H-25); 1.19 (m, 1H, H-16a); 1.26 (m, 1H, H-11a); 1.34 (m, 1H, H-21a); 1.34 (m, 1H, H-9); 1.43 (m, 1H, H-11b); 1.44 (m, 1H, H-6a); 1.44 (m, 1H, H-22a); 1.44 (m, 1H, H-7b); 1.54 (m, 1H, H-6b); 1.58 (m, 1H, H-15); 1.60 (m, 1H, H-18); 1.68 (m, 1H, H-12b); 1.69 (m, 1H, H-1b); 1.69 (s, 3H, H-30); 1.70 (m, 1H, H-13); 1.80 (m, 1H, H-2b); 2.00 (m, 1H, H-22b); 2.01 (m, 1H, H-21b); 2.14 (m, 1H, H-16b); 2.46 (m, 1H, H-19); 3.13 (dd, 1H, *J* = 11.1 Hz, *J* = 4.9 Hz, H-3); 3.19 (t, 1H, *J* = 8.4 Hz, H'-2); 3.28 (d, 1H, *J* = 4.7 Hz, H'-5); 3.28 (d, 1H, *J* = 6.0 Hz, H'-4); 3.36 (t, 1H, *J* = 8.9 Hz, H'-3); 3.61 (d, 1H, *J* = 9.5 Hz, H-28a); 3.68 (dd, 1H, *J* = 11.8 Hz, *J* = 5.0 Hz, H'-6a); 3.73 (d, 1H, *J* = 9.5 Hz, H-28b); 3.89 (d, 1H, *J* = 11.6 Hz, H'-6b); 4.22 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz, H'-1); 4.57 (brs, 1H, H-29a); 4.68 (brs, 1H, H-29b). ¹³C NMR (CD₃OD) δ : 15.33 (C-27), 16.18 (C-26), 16.67 (C-25), 16.75 (C-24), 19.46 (C-6), 19.50 (C-30), 22.03 (C-11), 26.66 (C-12), 28.08 (C-15), 28.40 (C-2), 28.66 (C-23), 30.69 (C-16), 30.89 (C-21), 35.51 (C-22), 35.87 (C-7), 38.32 (C-10), 38.97 (C-13), 40.00 (C-4), 40.09 (C-1), 42.18 (C-8), 43.86 (C-14), 46.96 (C-17), 49.31 (C-19), 50.17 (C-18), 51.89 (C-9), 56.85 (C-5), 62.87 (C'-6), 68.91 (C-28), 71.77 (C'-4), 75.29 (C'-2), 77.96 (C'-5), 78.21 (C'-3), 79.70 (C-3), 105.35 (C'-1), 110.23 (C-29), 152.00 (C-20).

28-O- α -L-Rhamnopyranosyl-lup-20(29)-en-3 β -ol (16): This compound was prepared from the acceptor **6** (250 mg, 0.52 mmol), and the donor **28** (480 mg, 0.77 mol) in the same manner as that described for compound **9** except for the basic hydrolysis reaction time (overnight). Purification by flash chromatography (CH₂Cl₂:CH₃OH, 49:1 to 47:3) afforded **16** as a white powder (203 mg, 67%, 2 steps): *R_f* 0.31 (CH₂Cl₂:CH₃OH 9:1); mp >200 °C; [α]_D²⁰ -42.9° (c 0.83, CH₃OH); positive-ion HRESMS *m/z* 611.4268 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₆H₆₀O₆Na, 611.4287). ¹H NMR (C₅D₅N) δ : 0.79 (m, 1H, H-5); 0.87 (s, 3H, H-24); 0.95 (s, 3H, H-25); 0.96 (m, 1H, H-1a); 0.98 (m, 1H, H-15a); 0.98 (s, 3H, H-26); 1.03 (s, 3H, H-27); 1.09 (m, 1H, H-7a); 1.13 (m, 1H, H-12a); 1.15 (m, 1H, H-11a); 1.22 (s, 3H, H-23); 1.27 (m, 1H, H-21a); 1.31 (m, 1H, H-9); 1.33 (m, 1H, H-22a); 1.40 (m, 1H, H-6a); 1.40 (m, 1H, H-11b); 1.40 (m, 1H, 22b); 1.44 (m, 1H, H-21b); 1.55 (m, 1H, H-6b); 1.60 (m, 1H, H-18); 1.64 (m, 1H, H-13); 1.67 (m, 1H, H-1b); 1.71 (m, 1H, H-15b); 1.73 (m, 1H, H-12b); 1.73 (s, 3H, H-30); 1.73 (d, 3H, *J* = 6.3 Hz, H'-6); 1.85 (m, 2H, H-2); 2.10 (m, 1H, H-7b); 2.12 (m, 2H, H-16); 2.60 (m, 1H, H-19); 3.45 (m, 1H, H-3); 3.61 (d, 1H, *J* = 9.4 Hz, H-28a); 3.83 (d, 1H, *J* = 9.4 Hz, H-28b); 4.22 (c, 1H, H'-5); 4.33 (t, 1H, *J* = 9.2 Hz, H'-4); 4.51 (dd, 1H, *J* = 9.1 Hz, *J* = 2.9 Hz, H'-3); 4.63 (brs, 1H, H'-2); 4.73 (brs, 1H, H-29a); 4.88 (brs, 1H, H-29b); 5.39 (brs, 1H, H'-1). ¹³C NMR (C₅D₅N) δ : 14.89 (C-27), 16.12 (C-26), 16.37 (C-25), 16.43 (C-24), 18.74 (C'-6), 19.32 (C-30), 21.00 (C-6), 25.64 (C-11), 27.55 (C-12, C-15), 28.31 (C-2), 28.66 (C-23), 30.33 (C-16), 30.48 (C-21), 34.59 (C-22), 35.39 (C-7), 37.46 (C-10), 37.68 (C-13), 39.27 (C-1), 39.53 (C-4), 41.15 (C-8), 42.93 (C-14), 47.31 (C-17), 48.07 (C-19), 49.07 (C-18), 50.71 (C-9), 55.83 (C-5), 66.18 (C-28), 70.06 (C'-5), 72.45 (C'-2), 73.14 (C'-3), 73.94 (C'-4), 78.08 (C-3), 102.30 (C'-1), 110.11 (C-29), 150.89 (C-20).

28-O- α -D-Arabinopyranosyl-lup-20(29)-en-3 β -ol (17): This compound was prepared from the acceptor **6** (250 mg, 0.52 mmol), and the donor **30** (469 mg, 0.77 mmol) in the same manner as that described for compound **9** except for the basic hydrolysis reaction time (overnight). Purification by flash chromatography (CH₂Cl₂:CH₃OH, 49:1 to 47:3) afforded **17** as a white crystalline powder (178 mg, 60%, 2 steps): *R_f* 0.43 (CH₂Cl₂:CH₃OH 9:1); mp 204-206 °C; [α]_D²⁰ +4.6° (c 0.25, CH₃OH); positive-ion HRESMS *m/z* 597.4156 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₅H₅₈O₆Na, 597.4131). ¹H NMR (DMSO-

d_6) δ : 0.62 (m 1H, H-5); 0.65 (s, 3H, H-25); 0.76 (s, 3H, H-24); 0.82 (m, 1H, H-1a); 0.87 (s, 3H, H-23); 0.93 (m, 1H, H-15a); 0.93 (s, 3H, H-27); 0.95 (m, 1H, H-7a); 0.97 (m, 1H, H-12a); 0.97 (s, 3H, H-26); 1.13 (m, 1H, H-21a); 1.16 (m, 1H, H-11a); 1.23 (m, 1H, H-9); 1.27 (m, 1H, H-16a); 1.32 (m, 1H, H-6a); 1.33 (m, 1H, H-11b); 1.33 (m, 2H, H-22); 1.42 (m, 2H, H-2); 1.44 (m, 1H, H-6b); 1.47 (m, 1H, H-19); 1.55 (m, 1H, H-1b); 1.59 (m, 1H, H-12b); 1.60 (m, 1H, H-13); 1.63 (s, 3H, H-30); 1.65 (m, 1H, H-15b); 1.88 (m, 1H, H-16b); 1.92 (m, 1H, H-21b); 1.94 (m, 1H, H-7b); 2.40 (m, 1H, H-19); 2.96 (m, 1H, H-3); 2.99 (d, 1H, J = 9.3 Hz, H-28a); 3.32 (m, 1H, H'-3); 3.33 (m, 1H, H'-2); 3.35 (d, 1H, J = 11.8 Hz, H'-5a); 3.61 (m, 1H, H'-4); 3.66 (dd, 1H, J = 11.8 Hz, J = 3.4 Hz, H'-5b); 3.89 (d, 1H, J = 9.3 Hz, H-28b); 4.06 (d, 1H, J = 5.6 Hz, H'-1); 4.54 (brs, 1H, H-29a); 4.67 (brs, 1H, H-29b). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 14.58 (C-27), 15.67 (C-26), 15.82 (C-25), 15.90 (C-24), 17.97 (C-6), 18.76 (C-30), 20.35 (C-11), 24.74 (C-12), 26.67 (C-15), 27.18 (C-2), 28.11 (C-23), 29.29 (C-16), 29.46 (C-21), 33.76 (C-22), 34.03 (C-7), 36.68 (C-10), 37.00 (C-13), 38.25 (C-1), 38.51 (C-4), 40.45 (C-8), 42.19 (C-14), 46.60 (C-17), 47.33 (C-19), 48.33 (C-18), 49.83 (C-9), 54.86 (C-5), 64.80 (C'-5), 66.33 (C-28), 67.40 (C'-4), 70.59 (C'-2), 72.60 (C'-3), 76.80 (C-3), 103.81 (C'-1), 109.77 (C-29) 150.17 (C-20).

Methyl Lup-20(29)-en-28-oate-3 β -O- β -D-glucopyranoside (18): This compound was prepared from the acceptor **7** (251 mg, 0.53 mmol), and the donor **26** (593 mg, 0.80 mmol) in the same manner as that described for compound **9**. Purification by flash chromatography (CH_2Cl_2 : CH_3OH , 49:1 to 47:3) afforded **18** as a white crystalline powder (189 mg, 56%, 2 steps): R_f 0.24 (CH_2Cl_2 : CH_3OH 9:1); mp 196-198 °C, lit.⁵⁰ mp 197-200 °C; $[\alpha]_D^{20}$ -6.6° (c 0.50, CHCl_3), lit.⁵⁰ $[\alpha]_D$ -3° (c 0.38, CH_3OH); positive-ion HRESMS m/z 655.4164 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{37}\text{H}_{60}\text{O}_8\text{Na}$, 655.4186). ^1H NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 0.73 (m, 1H, H-5); 0.75 (s, 3H, H-25); 0.84 (m, 1H, H-1a); 0.94 (s, 3H, H-24); 0.98 (s, 3H, H-26); 1.02 (s, 3H, H-27); 1.12 (m, 1H, H-11a); 1.14 (m, 1H, H-12a); 1.14 (m, 1H, H-21a); 1.28 (m, 1H, H-9); 1.30 (s, 3H, H-23); 1.31 (m, 1H, H-6a); 1.32 (m, 2H, H-7); 1.34 (m, 1H, H-11b); 1.43 (m, 1H, H-15a); 1.45 (m, 1H, H-22a); 1.46 (m, 1H, H-16a); 1.47 (m, 1H, H-6b); 1.48 (m, 1H, H-21b); 1.51 (m, 1H, H-1b); 1.67 (m, 1H, H-18); 1.72 (s, 3H, H-30); 1.81 (m, 1H, H-2a); 1.84 (m,

1H, H-12b); 1.97 (m, 1H, H-22b); 1.99 (m, 1H, H-15b); 2.24 (m, 1H, H-2b); 2.34 (m, 1H, H-16b); 2.45 (m, 1H, H-13); 3.30 (m, 1H, H-19); 3.40 (dd, 1H, $J = 11.7$ Hz, $J = 4.3$ Hz, H-3); 3.70 (s, 3H, COOCH₃); 4.01 (m, 1H, H'-5); 4.05 (t, 1H, $J = 8.3$ Hz, H'-2); 4.23 (t, 1H, $J = 8.8$ Hz, H'-4); 4.26 (t, 1H, $J = 8.5$ Hz, H'-3); 4.41 (dd, 1H, $J = 11.6$ Hz, $J = 5.4$ Hz, H'-6a); 4.59 (dd, 1H, $J = 11.6$ Hz, $J = 2.2$ Hz, H'-6b); 4.72 (brs, 1H, H-29a); 4.88 (brs, 1H, H-29b); 4.95 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz, H'-1). ¹³C NMR (C₅D₅N) δ : 14.80 (C-27), 16.16 (C-24), 16.32 (C-25), 16.84 (C-26), 18.42 (C-6), 19.37 (C-30), 21.05 (C-11), 25.90 (C-12), 26.76 (C-2), 28.13 (C-23), 30.04 (C-21), 30.91 (C-15), 32.31 (C-16), 34.64 (C-7), 37.08 (C-22, C-10), 38.49 (C-13), 38.99 (C-1), 39.63 (C-4), 40.98 (C-8), 42.67 (C-14), 47.54 (C-19), 49.75 (C-18), 50.69 (C-9), 51.33 (COOCH₃), 55.87 (C-5), 56.77 (C-17), 63.04 (C'-6), 71.84 (C'-4), 75.82 (C'-2), 78.35 (C'-5), 78.79 (C'-3), 88.81 (C-3), 106.92 (C'-1), 110.12 (C-29), 150.82 (C-20), 176.45 (C-28).

Methyl Lup-20(29)-en-28-oate-3 β -O- α -L-rhamnopyranoside (19): This compound was prepared from the acceptor **7** (201 mg, 0.43 mmol), and the donor **28** (398 mg, 0.64 mmol) in the same manner as that described for compound **9**. Purification by flash chromatography (CH₂Cl₂:CH₃OH, 49:1 to 47:3) afforded **19** as a white powder (176 mg, 67%, 2 steps): R_f 0.24 (CH₂Cl₂:CH₃OH 9:1); mp >200 °C; $[\alpha]_D^{20}$ -17.1° (c 0.42, CHCl₃); positive-ion HRESMS m/z 639.4223 (calcd for C₃₇H₆₀O₇Na, 639.4237). ¹H NMR (C₅D₅N) δ : 0.66 (m, 1H, H-5); 0.77 (s, 6H, H-25, H-26); 0.81 (m, 1H, H-1a); 0.89 (s, 3H, H-23); 0.96 (s, 3H, H-24); 1.00 (s, 3H, H-27); 1.12 (m, 1H, H-21a); 1.13 (m, 1H, H-12a); 1.14 (m, 1H, H-11a); 1.27 (m, 1H, H-9); 1.29 (m, 1H, H-6a); 1.31 (m, 2H, H-7); 1.35 (m, 1H, H-11b); 1.40 (m, 1H, H-6b); 1.43 (m, 1H, H-15a); 1.44 (m, 1H, H-22a); 1.46 (m, 1H, H-16a); 1.47 (m, 1H, H-21b); 1.56 (m, 1H, H-1b); 1.65 (d, 3H, $J = 5.4$ Hz, H'-6); 1.66 (m, 1H, H-18); 1.71 (m, 1H, H-2a); 1.72 (s, 3H, H-30); 1.83 (m, 1H, H-12b); 1.96 (m, 1H, H-22b); 1.98 (m, 1H, H-2b); 1.99 (m, 1H, H-15b); 2.34 (m, 1H, H-16b); 2.45 (m, 1H, H-13); 3.14 (dd, 1H, $J = 11.7$ Hz, $J = 4.3$ Hz, H-3); 3.30 (m, 1H, H-19); 3.70 (s, 3H, COOCH₃); 4.29 (m, 1H, H'-4); 4.32 (m, 1H, H'-5); 4.49 (m, 1H, H'-3); 4.72 (brs, 1H, H'-2); 4.72 (brs, 1H, H-29a); 4.88 (brs, 1H, H-29b); 5.32 (brs, 1H, H'-1). ¹³C NMR (C₅D₅N) δ : 14.768 (C-27), 16.14 (C-24), 16.27 (C-25), 16.54 (C-26), 18.52 (C'-6), 19.35

(C-30), 21.05 (C-6), 21.13 (C-11), 25.88 (C-12), 26.05 (C-2), 28.13 (C-23), 30.02 (C-21), 30.90 (C-15), 32.29 (C-16), 33.71 (C-10), 34.56 (C-7), 37.07 (C-22), 38.46 (C-13), 38.80 (C-1), 39.28 (C-4), 40.96 (C-8), 42.65 (C-14), 47.53 (C-19), 49.73 (C-18), 50.66 (C-19), 51.34 (COOCH₃), 55.61 (C-5), 56.77 (C-17), 69.87 (C'-5), 72.51 (C'-2), 72.91 (C'-3), 74.12 (C'-4), 88.51 (C-3), 104.42 (C'-1), 110.13 (C-29), 150.80 (C-20), 176.44 (C-28).

Methyl Lup-20(29)-en-28-oate-3 β -O- α -D-arabinopyranoside (20): This compound was prepared from the acceptor **7** (200 mg, 0.42 mmol), and the donor **30** (387 mg, 0.64 mmol) in the same manner as that described for compound **9**. Purification by flash chromatography (CH₂Cl₂:CH₃OH, 49:1 to 47:3) afforded **20** as a white powder (169 mg, 66%, 2 steps): *R_f* 0.24 (CH₂Cl₂:CH₃OH 9:1); mp >200 °C; [α]_D²⁰ +22.7° (c 0.42, CHCl₃); positive-ion HRESMS *m/z* 625.4073 (calcd for C₃₆H₅₈O₇Na, 625.4080). ¹H NMR (CDCl₃) δ : 0.68 (m, 1H, H-5); 0.75 (s, 3H, H-25); 0.81 (s, 3H, H-26); 0.83 (m, 1H, H-1); 0.90 (s, 3H, H-24); 0.93 (s, 3H, H-27); 0.98 (s, 3H, H-23); 1.02 (m, 1H, H-2a); 1.13 (m, 1H, H-21a); 1.24 (m, 1H, H-9); 1.24 (m, 1H, H-11a); 1.34 (m, 1H, H-6a); 1.35 (m, 2H, H-7); 1.37 (m, 1H, H-15a); 1.37 (m, 1H, H-16a); 1.37 (m, 1H, H-21b); 1.40 (m, 1H, H-11b); 1.41 (m, 1H, H-22a); 1.50 (m, 1H, H-6b); 1.51 (m, 1H, H-12a); 1.56 (m, 1H, H-18); 1.68 (m, 1H, H-2b); 1.68 (m, 1H, H-12b); 1.68 (s, 3H, H-30); 1.87 (m, 1H, H-22b); 1.87 (m, 1H, H-15b); 2.19 (m, 1H, H-13); 2.22 (m, 1H, H-16b); 3.00 (m, 1H, H-19); 3.02 (brs, 3H, 3xOH); 3.23 (dd, 1H, *J* = 11.8 Hz, *J* = 3.8 Hz, H-3); 3.52 (d, 1H, *J* = 11.4 Hz, H'-5a); 3.66 (s, 3H, COOCH₃); 3.66 (m, 1H, H'-3); 3.70 (m, 1H, H'-2); 3.93 (m, 1H, H'-4); 3.95 (d, 1H, *J* = 9.4 Hz, H'-5b); 4.31 (d, 1H, *J* = 6.1 Hz, H'-1); 4.59 (brs, 1H, H-29a); 4.73 (brs, 1H, H-29b). ¹³C NMR (CDCl₃) δ : 14.76 (C-27), 16.09 (C-24), 16.23 (C-25), 16.54 (C-26), 18.42 (C-6), 19.51 (C-30), 21.04 (C-11), 23.15 (C-12), 25.63 (C-2), 28.32 (C-23), 29.78 (C-21), 30.73 (C-15), 32.29 (C-16), 34.44 (C-7), 37.11 (C-22), 37.18 (C-10), 38.34 (C-4), 38.37 (C-13), 38.54 (C-1), 40.85 (C-8), 42.51 (C-14), 47.10 (C-19), 49.59 (C-18), 50.63 (C-9), 51.44 (COOCH₃), 56.02 (C-5), 56.69 (C-17), 65.10 (C'-5), 67.80 (C'-4), 71.69 (C'-3), 72.85 (C'-2), 84.81 (C-3), 99.79 (C'-1), 109.72 (C-29), 150.74 (C-20), 176.81 (C-28).

β -D-Glucopyranosyl-3 β -hydroxylup-20(29)-en-28-oic acid (21): The acceptor **8** (107 mg, 0.22 mmol), and the donor **26** (239 mg, 0.32 mmol) were stirred in dry CH_2Cl_2 (10 mL) for 1 h with 4 Å MS. At this time, TMSOTf (3 μL , 0.01 mmol) was added under Ar while keeping rigorous anhydrous conditions. The reaction was usually performed in 30 min, then quenched by addition of Et_3N (50 μL). The solvents were evaporated under reduce pressure and the resulting residue was immediately dissolved in a NaOH 0.25 N solution of $\text{CH}_3\text{OH}:\text{THF}:\text{H}_2\text{O}$ 1:2:1 (30 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h, dissolved in CH_2Cl_2 and washed with HCl 10% and brine. Once the solution was dried (MgSO_4), the solvents were evaporated under reduced pressure to give an oily residue. It was dissolved in a solution of PPh_3 (32 mg, 0.121 mmol) and pyrrolidine (34 μL , 0.403 mmol) in dry THF (1 mL), then $\text{Pd}^0(\text{PPh}_3)_4$ (70 mg, 0.060 mmol), was added and the reaction was stirred overnight at room temperature. After evaporation of the solvent under reduced pressure, the residue was purified by flash chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$, 49:1 to 4:1) to give **21** as a white powder (63 mg, 47%, 3 steps): R_f 0.38 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ 4:1); mp 234-236 °C; $[\alpha]_D^{20} +1.3^\circ$ (c 0.33, CH_3OH); positive-ion HRESMS m/z 641.4019 (calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{58}\text{O}_8\text{Na}$, 641.4029). ^1H NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 0.73 (m, 1H, H-5); 0.73 (s, 3H, H-25); 0.84 (m, 1H, H-1a); 0.97 (s, 3H, H-26); 1.01 (s, 3H, H-24); 1.09 (s, 3H, H-27); 1.18 (m, 1H, H-12a); 1.18 (m, 1H, H-11a); 1.23 (m, 1H, H-21a); 1.28 (m, 1H, H-6a); 1.30 (s, 3H, H-23); 1.31 (m, 1H, H-9); 1.33 (m, 2H, H-7); 1.36 (m, 1H, H-11b); 1.45 (m, 1H, H-6b); 1.50 (m, 1H, H-15a); 1.51 (m, 1H, H-1b); 1.53 (m, 1H, H-16a); 1.54 (m, 1H, H-22a); 1.74 (m, 1H, H-18); 1.77 (s, 3H, H-30); 1.80 (m, 1H, H-2a); 1.83 (m, 1H, H-21b); 1.91 (m, 1H, H-12b); 2.22 (m, 1H, H-15b); 2.22 (m, 1H, H-22b); 2.24 (m, 1H, H-2b); 2.61 (m, 1H, H-16b); 2.69 (m, 1H, H-13); 3.41 (dd, 1H, $J = 11.6$ Hz, $J = 4.0$ Hz, H-3); 3.54 (m, 1H, H-19); 4.02 (m, 1H, H'-5); 4.05 (t, 1H, $J = 11.1$ Hz, H'-2); 4.24 (m, 1H, H'-4); 4.26 (m, 1H, H'-3); 4.42 (dd, 1H, $J = 11.6$ Hz, $J = 5.2$ Hz, H'-6a); 4.60 (d, 1H, $J = 11.1$ Hz, H'-6b); 4.75 (brs, 1H, H-29a); 4.93 (brs, 1H, H-29b); 4.95 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, H'-1). ^{13}C NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 14.84 (C-27), 16.31 (C-24), 16.35 (C-25), 16.82 (C-26), 18.44 (C-30), 19.43 (C-30), 21.15 (C-11), 26.05 (C-12), 26.76 (C-2), 28.19 (C-23), 30.25 (C-21), 31.18 (C-15), 32.85 (C-16), 34.72 (C-7), 37.11 (C-10), 37.57 (C-22), 38.56 (C-13), 39.00 (C-1), 39.63 (C-4),

41.07 (C-8), 42.83 (C-14), 47.76 (C-19), 49.71 (C-18), 50.77 (C-9), 55.88 (C-5), 56.62 (C-17), 63.03 (C'-6), 71.84 (C'-4), 75.82 (C'-2), 78.34 (C'-5), 78.78 (C'-3), 88.82 (C-3), 106.92 (C'-1), 109.95 (C-29), 151.29 (C-20), 178.87 (C-28).

α -L-Rhamnopyranosyl-3 β -hydroxylup-20(29)-en-28-oic acid (22): This compound was prepared from the acceptor **8** (100 mg, 0.20 mmol), and the donor **28** (187 mg, 0.30 mmol) in the same manner as that described for compound **21**. Purification by flash chromatography (CH₂Cl₂:CH₃OH, 49:1 to 4:1) afforded **22** as a white solid (50 mg, 41%, 3 steps): *R_f* 0.18 (CH₂Cl₂:CH₃OH 9:1); mp >200 °C; [α]_D²⁰ -22.8° (c 0.42, CH₃OH); positive-ion HRESMS *m/z* 625.4057 (calcd for C₃₆H₅₈O₇Na, 625.4080). ¹H NMR (C₅D₅N) δ : 0.67 (m, 1H, H-5); 0.75 (s, 3H, H-25); 0.76 (s, 3H, H-26); 0.81 (m, 1H, H-1a); 0.89 (s, 3H, H-23); 1.02 (s, 3H, H-24); 1.07 (s, 3H, H-27); 1.18 (m, 1H, H-12a); 1.19 (m, 1H, H-11a); 1.25 (m, 1H, H-21a); 1.27 (m, 1H, H-6a); 1.31 (m, 1H, H-9); 1.33 (m, 2H, H-7); 1.38 (m, 1H, H-11b); 1.39 (m, 1H, H-6b); 1.52 (m, 1H, H-15a); 1.52 (m, 1H, H-16a); 1.55 (m, 1H, H-22a); 1.57 (m, 1H, H-1b); 1.66 (d, 3H, *J* = 5.0 Hz, H'-6); 1.71 (m, 1H, H-12b); 1.73 (m, 1H, H-18); 1.77 (s, 3H, H-30); 1.85 (m, 1H, H-21b); 1.95 (m, 2H, H-2); 2.23 (m, 1H, H-22b); 2.23 (m, 1H, H-15b); 2.61 (m, 1H, H-16b); 2.71 (m, 1H, H-13); 3.16 (dd, 1H, *J* = 11.5 Hz, *J* = 4.0 Hz, H-3); 3.53 (m, 1H, H-19); 4.29 (m, 1H, H'-4); 4.31 (m, 1H, H'-5); 4.48 (m, 1H, H'-3); 4.58 (brs, 1H, H'-2); 4.75 (brs, 1H, H-29a); 4.93 (brs, 1H, H-29b); 5.33 (brs, 1H, H'-1). ¹³C NMR (C₅D₅N) δ : 14.83 (C-27), 16.28 (C-29), 16.36 (C-25), 16.54 (C-26), 18.49 (C-6), 18.53 (C'-6), 19.44 (C-30), 21.18 (C-11), 25.80 (C-12), 26.06 (C-2), 28.15 (C-23), 30.26 (C-21), 31.20 (C-15), 32.86 (C-16), 34.68 (C-7), 37.13 (C-10), 37.58 (C-22), 38.56 (C-13), 38.84 (C-1), 39.30 (C-4), 41.07 (C-8), 42.84 (C-14), 47.77 (C-19), 49.73 (C-18), 50.77 (C-9), 55.65 (C-5), 56.64 (C-17), 69.88 (C'-5), 72.52 (C'-2), 72.93 (C'-3), 74.15 (C'-4), 88.53 (C-3), 104.42 (C'-1), 109.97 (C-29), 151.29 (C-20), 178.88 (C-28).

α -D-Arabinopyranosyl-3 β -hydroxylup-20(29)-en-28-oic acid (23): This compound was prepared from the acceptor **8** (102 mg, 0.21 mmol), and the donor **30** (187 mg, 0.31 mmol) in the same manner as that described for compound **21**. Purification by flash chromatography

(CH₂Cl₂:CH₃OH, 49:1 to 4:1) afforded **23** as a white powder (60 mg, 50%, 3 steps): *R_f* 0.19 (CH₂Cl₂:CH₃OH 9:1); mp >200 °C; [α]_D²⁰ +14.0° (c 1.00, CH₃OH); positive-ion HRESMS *m/z* 611.3908 (calcd for C₃₅H₅₆O₇Na, 611.3924). ¹H NMR (C₅D₅N) δ: 0.71 (s, 3H, H-24); 0.73 (m, 1H, H-5); 0.81 (s, 3H, H-26); 0.84 (m, 1H, H-1a); 1.01 (s, 3H, H-25); 1.07 (s, 3H, H-27); 1.16 (m, 1H, H-2a); 1.16 (m, 1H, H-11a); 1.21 (s, 3H, H-23); 1.22 (m, 1H, H-21a); 1.31 (m, 1H, H-6a); 1.33 (m, 1H, H-9); 1.33 (m, 2H, H-7); 1.35 (m, 1H, H-11b); 1.46 (m, 1H, H-6b); 1.52 (m, 1H, H-15a); 1.53 (m, 1H, H-16a); 1.55 (m, 1H, H-22a); 1.62 (m, 1H, H-1b); 1.65 (m, 1H, H-12a); 1.74 (m, 1H, H-18); 1.78 (s, 3H, H-30); 1.84 (m, 1H, H-21b); 1.91 (m, 1H, H-2b); 1.98 (m, 1H, H-12a); 2.23 (m, 1H, H-15b); 2.23 (m, 1H, H-22b); 2.61 (m, 1H, H-16b); 2.72 (m, 1H, H-13); 3.42 (dd, 1H, *J* = 11.6 Hz, *J* = 4.0 Hz, H-3); 3.53 (m, 1H, H-19); 3.80 (d, 1H, *J* = 11.0 Hz, H'-5a); 4.18 (dd, 1H, *J* = 8.7 Hz, *J* = 2.7 Hz, H'-3); 4.33 (brs, 1H, H'-4); 4.34 (d, 1H, *J* = 11.0 Hz, H'-5b); 4.39 (t, 1H, *J* = 7.9 Hz, H'-2); 4.67 (d, 1H, *J* = 7.0 Hz, H'-1); 4.77 (brs, 1H, H-29a); 4.94 (brs, 1H, H-29b). ¹³C NMR (C₅D₅N) δ: 14.80 (C-27), 16.20 (C-24), 16.33 (C-25), 16.86 (C-26), 18.62 (C-6), 19.40 (C-30), 21.16 (C-11), 23.84 (C-12), 26.04 (C-2), 28.53 (C-23), 30.22 (C-21), 31.15 (C-15), 32.83 (C-16), 34.71 (C-7), 37.29 (C-10), 37.56 (C-22), 38.53 (C-13), 38.78 (C-1), 38.81 (C-4), 41.08 (C-8), 42.81 (C-14), 47.75 (C-19), 49.72 (C-18), 50.76 (C-9), 56.25 (C-5), 56.60 (C-17), 67.02 (C'-5), 69.58 (C'-4), 72.51 (C'-2), 74.75 (C'-3), 84.93 (C-3), 102.97 (C'-1), 109.96 (C-29), 151.30 (C-20), 178.82 (C-28).

Cell Culture

Human lung carcinoma (A-549), human colon adenocarcinoma (DLD-1), human fibroblasts (WS-1) and mice melanoma (B16-F1) 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 µg/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.

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 μ L of culture medium and were allowed to adhere for 16 hours before treatment. Increasing concentrations of each compound in DMSO (Sigma-Aldrich) were then added (100 μ L per well) and the cells were incubated for 48 h. The final concentration of DMSO in the culture medium was maintained at 0.5% (volume/volume) to avoid solvent toxicity. Cytotoxicity was assessed using resazurin³⁸ on an automated 96-well Fluoroskan Ascent F1TM plate reader (Labsystems) using excitation and emission wavelengths of 530 nm and 590 nm, respectively. Fluorescence was proportional to the cellular metabolic activity in each well. Survival percentage was calculated from the curve of concentration-dependent survival percentage, 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. IC₅₀ were calculated by regression analysis of the concentration-response data and results expressed as mean \pm standard deviation. After reading, cells were prepared for cellular DNA assay with Hoechst dye 33342. After a rinse with PBS solution, cells were dried and plates stored at -80 °C until the Hoechst assay was carried out according to Rago et al. procedure⁵¹ (Data not shown).

Supporting Information Available: This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- (1) O'Connel, M. M; Bently, M. D.; Campbell, C. S.; Cole, B. J. W. Betulin and lupeol in bark from four white-barked birches. *Phytochemistry* **1988**, 27, 2175-2176.
- (2) 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, 83-91.

- (3) Geetha, T.; Varalakshmi, P. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. *J. Ethnopharmacol.* **2001**, *76*, 77-80.
- (4) Moriarity, D. M.; Huang, J.; Yancey, C. A.; Zhang, P.; Setzer, W. N.; Lawton, R. O.; Bates, R. B.; Caldera, S. Lupeol is the cytotoxic principle in the leaf extract *Dendropanax cf. querceti*. *Planta Med.* **1998**, *64*, 370-372.
- (5) You, Y.-J.; Nam, N.-H.; Kim, Y.; Bae, K.-H.; Ahn, B.-Z. Antiangiogenic activity of lupeol from *Bombax ceiba*. *Phytother. Res.* **2003**, *17*, 341-344.
- (6) Aratanechemuge, Y.; Hibasami, H.; Sanpin, K.; Katsuzaki, H.; Imai, K.; Komiya, T. Induction of apoptosis by lupeol isolated from mokumem (*Gossampinus malabarica* L. Merr) in human promyelotic leukemia HL-60 cells. *Oncol. Rep.* **2004**, *11*, 289-292.
- (7) Kim, D. S. H. L.; Chen, Z.; Nguyen, V. T.; Pezzuto, J. M.; Qiu, S.; Lu, Z.-Z. A concise semi-synthetic approach to betulinic acid from betulin. *Synthetic Commun.* **1997**, *27*, 1607-1612.
- (8) Pichette, A.; Liu, H.; Roy, C.; Tanguay, S.; Simard, F.; Lavoie, S. Selective oxidation of betulin for the preparation of betulinic acid, an antitumor compound. *Synthetic Commun.* **2004**, *34*, 3925-3937.
- (9) 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*, 90-114.
- (10) Eiznhamer, D. A.; Xu, Z.-Q. Betulinic acid: a promising anticancer candidate. *IDrugs* **2004**, *7*, 359-373.
- (11) Baglin, I.; Mitaine-Offer, A.-C.; Nour, M.; Tan, K.; Cavé, C.; Lacaille-Dubois, M.-A. A review of natural and modified betulinic, ursolic and echinocystic acid derivatives as potential antitumor and anti-HIV agents. *Min. Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 159-165.
- (12) Setzer, W. N.; Setzer, M. C. Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents. *Min. Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 540-556.

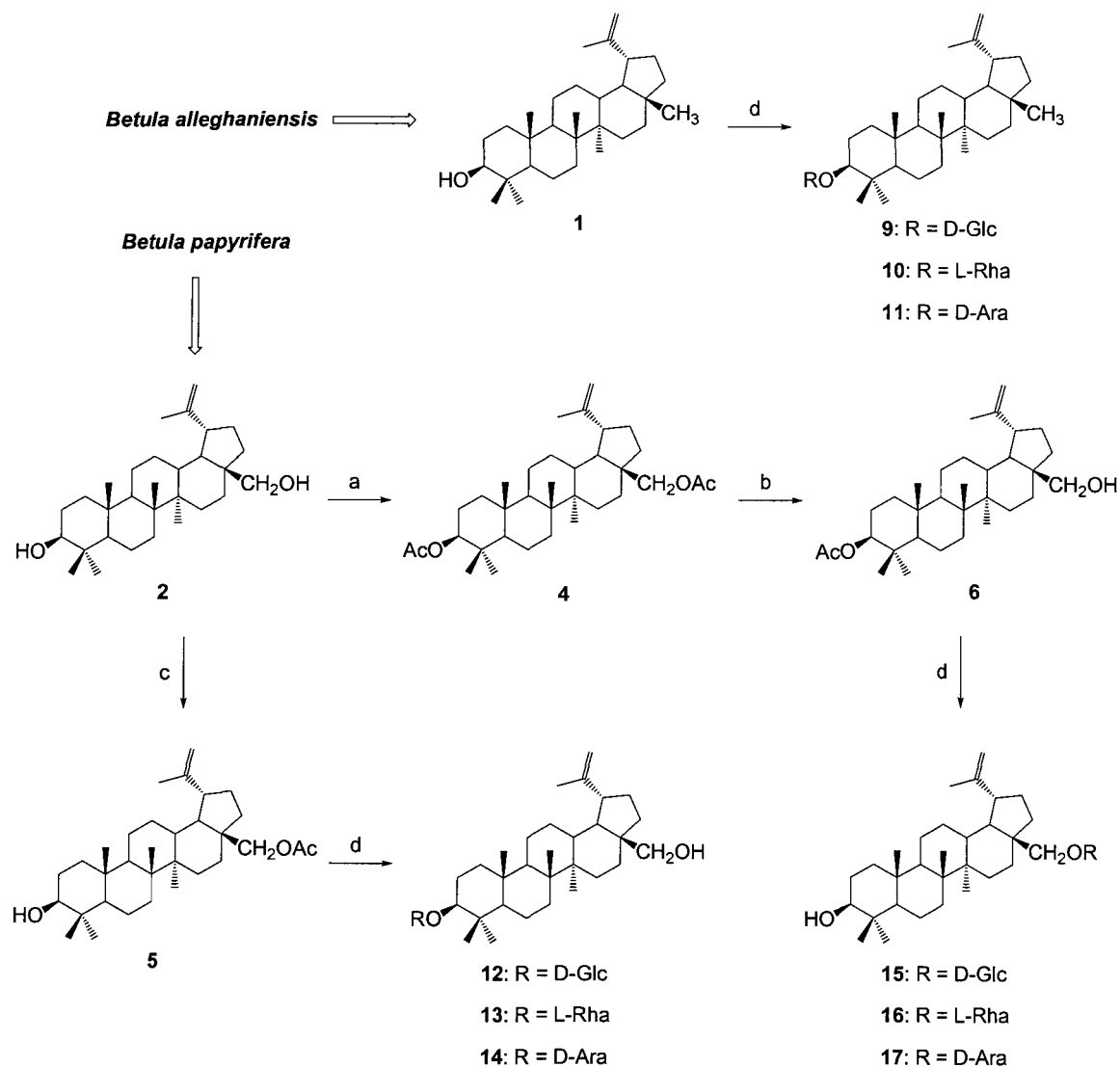
- (13) Safayhi, H.; Sailer, E.-R. Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. *Planta Med.* **1997**, *63*, 487-493.
- (14) Steele, J. C. P.; Warhurst, D. C.; Kirby, G. C.; Simmonds, M. S. J. *In vitro* and *in vivo* evaluation of betulinic acid as an antimalarial. *Phytother. Res.* **1999**, *13*, 115-119.
- (15) 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. Anti-AIDS agents. 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzigium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenes. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 243-247.
- (16) Pisha, E.; Chai, H.; Lee, I.-S.; Chagwedera, T. E.; Farnsworth, N. R.; Cordell, G. A.; Beecher, C. W. W.; Fong, H. H. S.; Kinghorn, A. D.; Brown, D. 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.
- (17) 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.
- (18) 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.
- (19) 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.
- (20) 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.
- (21) 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.

- (22) Konoshima, T. Anti-tumor-promoting activities of triterpenoid glycosides; cancer chemoprevention by saponins. In *Saponins used in traditional and modern medicine*, Plenum Press, New-York, **1996**, pp 87-100.
- (23) Sparg, S. G.; Light, M. E.; van Staden, J. Biological activities and distribution of plant saponins. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *94*, 219-243.
- (24) Křen, V.; Martínková, L. Glycosides in medicine: "The role of glycosidic residue in biological activity". *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 1313-1338.
- (25) Smith, T. A. Facilitative glucose transporter expression in human cancer tissue. *Brit. J. Biomed. Sci.* **1999**, *56*, 285-292.
- (26) Chatterjee, P.; Pezzuto, J. M.; Kouzi, S. A. Glucosidation of betulinic acid by *Cunninghamella* species. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 761-763.
- (27) Baglin, I.; Poumaroux, A.; Nour, M.; Tan, K.; Mitaine-Offer, A. C.; Lacaille-Dubois, M. A.; Chauffert, B.; Cavé, C. New ursolic and betulinic derivatives as potential cytotoxic agents. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2003**, *18*, 111-117.
- (28) 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.
- (29) Xu, Y.-C.; Bizuneh, A.; Walker, C. A reagent for selective deprotection of alkyl acetates. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9086-9089.
- (30) Mal, D. Chemoselective methylation of carboxylic acids using DBU and iodomethane. *Synth. Commun.* **1986**, *16*, 331-335.
- (31) Plé, K.; Chwalek, M.; Voutquenne-Nazabadioko, L. Synthesis of α -hederin, δ -hederin, and related triterpenoid saponins. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 1588-1603.
- (32) Trujillo, M.; Morales, E. Q.; Vázquez, J. T. Tetra-O-benzoylglucosylation: a new ^1H nuclear magnetic resonance method for determination of the absolute configuration of secondary alcohols. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6637-6642.

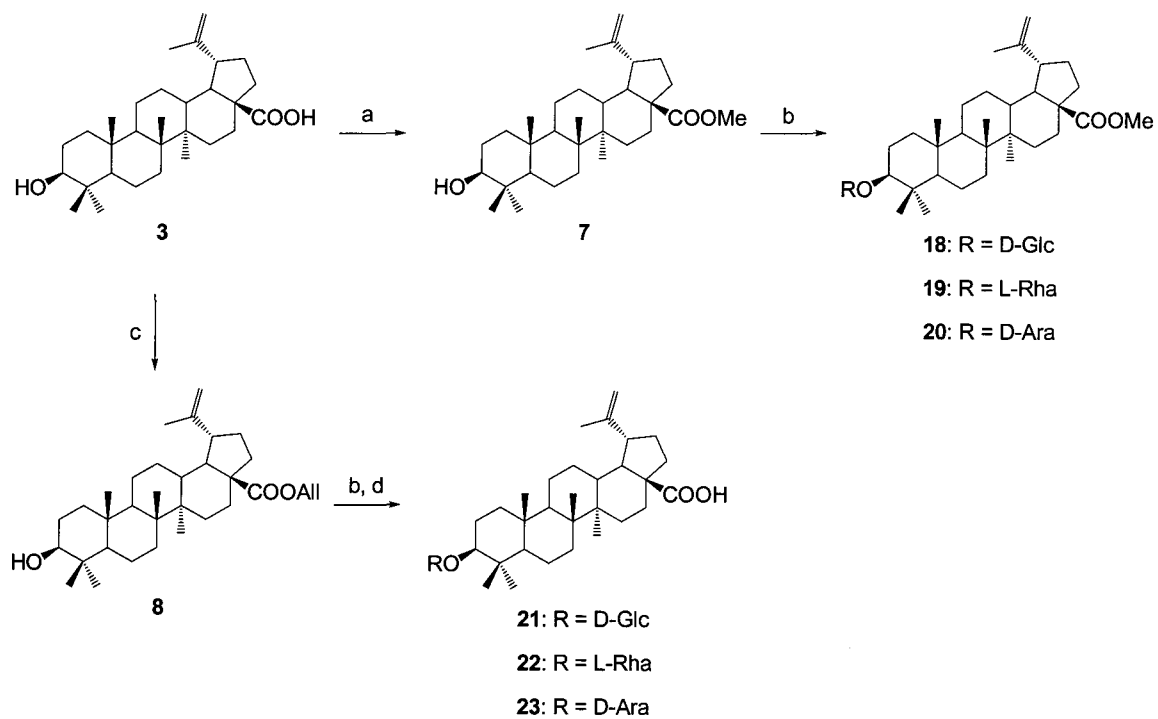
- (33) Deng, S.; Yu, B.; Xie, J.; Hui, Y. Highly efficient glycosylation of sapogenins. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7265-7266.
- (34) Fukase, K.; Winarno, H.; Kusumoto, S. Activation of trichloroacetimidates using montmorillonite as a heterogeneous acid catalyst convenient glycosidation and benzylation reactions. *Chem. Express* **1993**, *8*, 409-412.
- (35) Ziegler, T.; Bien, F.; Jurisch, C. Chemoenzymatic synthesis of enantiomerically pure alkene 1,2-diols and glycosides thereof. *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 765-780.
- (36) Schmidt, R. R. Anomeric-oxygen activation for glycoside synthesis: the trichloroacetimidate method. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1994**, *50*, 21-123.
- (37) Urban, F. J.; Moore, B. S.; Breitenbach, R. Synthesis of tigogenyl β -O-cellobioside heptaacetate and glycoside tetraacetate via schmidt's trichloroacetimidate method; some new observations. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 4421-4424.
- (38) O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5421-5426.
- (39) Unpublished results.
- (40) Coulson, D. R. Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0). *Inorg. Syn.* **1972**, *13*, 121-124.
- (41) Connolly, J. D.; Hill, R. A. Dictionary of Triterpenoids. Di- and higher terpenoids vol. 2, *Chapman & Hall*, Cambridge, Great Britain, **1991**, 1460 p.
- (42) Tinto, W. F.; Blair, L. C.; Alli, A. Lupane triterpenoids of *Salacia cordata*. *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 395-398.
- (43) Ohara, S.; Hishiyama, S. Synthesis of betulin glycosides by cyclodextrin glycosyltransferase. *Mok. Gakk.* **1994**, *40*, 444-451.
- (44) Ziegler, H. L.; Franzyk, H.; Sairafianpour, M.; Tabatabai, M.; Tehrani, M. D.; Bagherzadeh, K.; Hägerstrand, H.; Staerk, D.; Jaroszewski, J. W. Erythrocyte membrane modifying agents

and the inhibition of *Plasmodium falciparum* growth: structure-activity relationships for betulinic acid analogues. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 119-127.

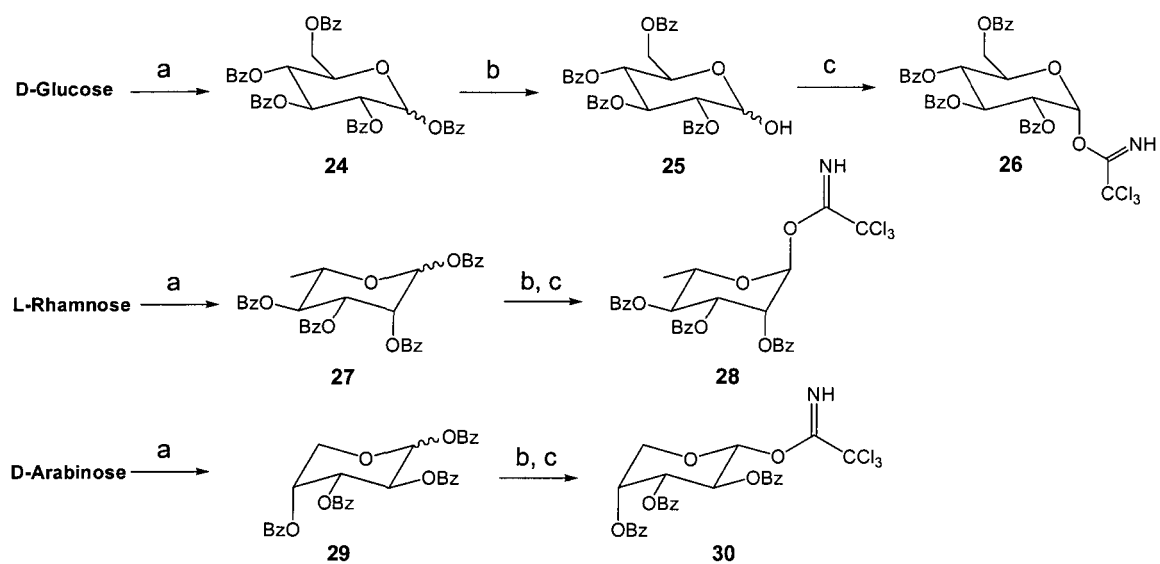
- (45) Kojima, H.; Tominaga, H.; Sato, S.; Ogura, H. Pentacyclic triterpenoids from *Prunella vulgaris*. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 1107-1111.
- (46) Takeoka, G.; Dao, L.; Teranishi, R.; Wong, R.; Flessa, S.; Harden, L.; Edwards, R. Identification of three triterpenoids in almond hulls. *J. Agr. Food Chem.* **2000**, *48*, 3437-3439.
- (47) Yagi, A.; Okamura, N.; Haraguchi, Y.; Noda, K.; Nishioka, I. Studies on the constituents of zizyphi fructus. I. Structure of three new p-coumaroylates of aliphatic acid. *Chem. Pharm. Bull.* **1978**, *26*, 1798-1802.
- (48) D'Accorso, N. B.; Thiel, I. M. E. Proton and C-13 nuclear magnetic resonance spectra of some benzoylated aldohexoses, *Carbohydr. Res.* **1983**, *124*, 177-184.
- (49) Salinas, A. E.; Sproviero, J. F.; Deulofeu, V. Ammonolysis of penta-O-benzoyl- α -D-glucopyranose in an aprotic medium. Characterization of the products isolated, and conformational analysis of eleven N-benzoyl-D-glucofuranosylamine derivatives. *Carbohydr. Res.* **1987**, *170*, 71-99.
- (50) Klinotová, E.; Křeček, V.; Klinot, J.; Endová, M.; Eisenreichová, J.; Buděšínský, M.; Štícha, M. Glycosylation of triterpene alcohols and acids of the lupane and a-secolupane series. *Collect. Czech. Chem. C.* **1997**, *62*, 1776-1798.
- (51) Rago, R.; Mitchen, J.; Wilding, G. DNA fluorometric assay in 96-well tissue culture plates using Hoechst 33 258 after cell lysis by freezing in distilled water. *Anal Biochem.* **1990**, *191*, 31-34.

Scheme 1^a

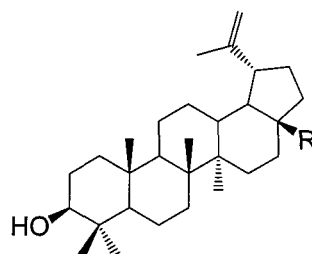
^a Reagents and conditions: (a) Ac_2O , Py, DMAP, 0°C -rt, 5 h; (b) $\text{Mg}(\text{OCH}_3)_2$, CH_3OH -THF, rt, 4 h; (c) Ac_2O , CH_2Cl_2 , rt, 24 h; (d) (i) Trichloroacetimidate, TMSOTf, 4 Å MS, CH_2Cl_2 , rt, 30 min.; (ii) CH_3OH -THF- H_2O 1:2:1, NaOH 0.25 N, rt, 3-24 h.

Scheme 2^a

^a Reagents and conditions: (a) DBU, CH₃I, THF, 0 °C-rt, 24 h; (b) (i) Trichloroacetimidate, TMSOTf, 4 Å MS, CH₂Cl₂, rt, 30 min.; (ii) CH₃OH-THF-H₂O 1:2:1, NaOH 0.25 N, rt, 3 h; (c) AlIBr, K₂CO₃, 55 °C, 7 h; (d) Pd⁰(PPh₃)₄, PPh₃, pyrrolidine, THF, 24 h.

Scheme 3^a

^a Reagents and conditions: (a) BzCl, Py, DMAP, 0 °C-rt, 24 h; (b) (i) HBr-HOAc 33%, CH₂Cl₂, rt, 2 h; (ii) Ag₂CO₃, Acetone-H₂O 20:1, rt, 1 h; (c) CCl₃CN, Cs₂CO₃, CH₂Cl₂, rt, 4 h.



Lupeol **1**: R = CH₃

Betulin **2**: R = CH₂OH

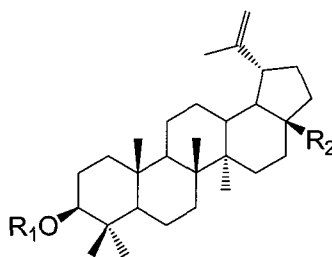
Betulinic Acid **3**: R = COOH

Figure 1. Lupane-Type Triterpenoids

Table 1. Glycosylation Reaction Yields

Donor	Acceptor	Product	Empirical Formula	M. W. g·mol ⁻¹	Yields ^a %	Ratio α:β ^b
26	1	9	C ₃₆ H ₆₀ O ₆	588,86	90	0:1
	5	12	C ₃₆ H ₆₀ O ₇	604,86	65	
	6	15	C ₃₆ H ₆₀ O ₇	604,86	54	
	7	18	C ₃₇ H ₆₀ O ₈	632,87	56	
	8	21	C ₃₆ H ₅₈ O ₈	618,84	47	
28	1	10	C ₃₆ H ₆₀ O ₅	572,86	72	1:0
	5	13	C ₃₆ H ₆₀ O ₆	588,86	52	
	6	16	C ₃₆ H ₆₀ O ₆	588,86	67	
	7	19	C ₃₇ H ₆₀ O ₇	616,87	67	
	8	22	C ₃₆ H ₅₈ O ₇	602,84	41	
30	1	11	C ₃₅ H ₅₈ O ₅	558,83	87	1:0
	5	14	C ₃₅ H ₅₈ O ₆	574,83	66	
	6	17	C ₃₅ H ₅₈ O ₆	574,83	60	
	7	20	C ₃₆ H ₅₈ O ₇	602,84	66	
	8	23	C ₃₅ H ₅₆ O ₇	588,81	50	

^a Isolated yields. 2 steps for **9-20**, 3 steps for **21-23**. ^b Based on spectral NMR ¹H 400 MHz data.

Table 2. Cytotoxicity of Lupane-Type Triterpenoid Derivatives and Glycosides

Compound	R ₁	R ₂	Cell Line IC ₅₀ (μM ± SD) ^a			
			A-549 ^b	DLD-1 ^c	B16-F1 ^d	WS-1 ^e
1	H	CH ₃	165 ± 8	125 ± 6	104 ± 6	63 ± 3
2	H	CH ₂ OH	3.80 ± 0.09	6.6 ± 0.3	13.8 ± 0.5	3.58 ± 0.07
3	H	COOH	10.3 ± 0.4	15.0 ± 0.3	16.1 ± 0.5	12 ± 1
4	Ac	CH ₂ OAc	>95	>95	>95	>95
5	H	CH ₂ OAc	75 ± 7	56 ± 4	43 ± 2	44 ± 2
6	Ac	CH ₂ OH	>253	>253	>253	>253
7	H	COOCH ₃	19 ± 3	25 ± 4	26 ± 1	19 ± 2
8	H	COOAlI	>225	>225	>225	>225
9	Glc	CH ₃	14 ± 1	14 ± 1	15.0 ± 0.7	13.3 ± 0.5
10	Rha	CH ₃	>178	>178	>178	>178
11	Ara	CH ₃	28 ± 2	50 ± 6	27 ± 2	15.8 ± 0.8
12	Glc	CH ₂ OH	>200	>200	>200	>200
13	Rha	CH ₂ OH	22 ± 3	50 ± 10	18 ± 1	33 ± 5
14	Ara	CH ₂ OH	41 ± 3	63 ± 8	38 ± 3	59 ± 5
15	H	CH ₂ O-Glc	>248	>248	>248	>248
16	H	CH ₂ O-Rha	>228	>228	>228	>228
17	H	CH ₂ O-Ara	>175	>175	>175	>175
18	Glc	COOCH ₃	8.4 ± 3	3.93 ± 0.09	7.1 ± 0.3	9.3 ± 0.2
19	Rha	COOCH ₃	59 ± 3	>183	55 ± 2	53 ± 2
20	Ara	COOCH ₃	13.5 ± 0.6	18 ± 1	13.3 ± 0.4	12.5 ± 0.4
21	Glc	COOH	>178	32 ± 9	49 ± 13	> 178
22	Rha	COOH	2.6 ± 0.6	3.9 ± 0.4	3.9 ± 0.4	31 ± 3
23	Ara	COOH	10 ± 2	17 ± 3	11 ± 1	47 ± 5

^a Data represent mean values (±SD) for three independent experiments. ^b Human lung carcinoma. ^c Human colon carcinoma. ^d Mice melanoma. ^e Human fibroblasts. Glc: β-D-Glucopyranose, Rha: α-L-Rhamnopyranose, Ara: α-D-Arabinopyranose, Ac: Acetate, AlI: Allyl.

CHAPITRE V

ÉTAT D'AVANCEMENT DU PROJET

5.1. Chimie

Lors de ce projet de maîtrise, le lupéol (**1**) a été isolé de l'écorce externe du bouleau jaune (*Betula alleghaniensis* Britton) récoltée à la station de recherche Simoncouche de l'Université du Québec à Chicoutimi. Le tableau **4** suivant présente les rendements d'extraction obtenus pour le lupéol (**1**) en fonction de la méthode utilisée (reflux ou soxhlet), du solvant (CH_2Cl_2 ou CHCl_3) et du temps d'extraction.

Tableau 4. Rendements d'extraction du lupéol

Solvant V	Extraction	Temps (hrs)	Masse écorce (g)	Masse lupéol (g)	Rendement (%)
CHCl_3 2 L	Reflux	2	400	2,19	0,5
CH_2Cl_2 1,5 L	Reflux	24	300	1,06	0,4
CHCl_3 1 L	Soxhlet	24	150	1,77	1,2

À la lumière de ces résultats, il est évident que, pour obtenir un rendement élevé en lupéol (**1**), l'extraction doit être effectuée par soxhlet dans le chloroforme (CHCl_3) pendant au moins 24 heures. Par ailleurs, lors de l'isolation du lupéol (**1**) par chromatographie éclair sur colonne de gel de silice, un composé de polarité moins élevée a été isolé avec un rendement massique de 0,16%. Ce composé, le lupénone (**52**), a été

identifié par RMN ^1H et ^{13}C en comparaison avec les données spectrales de la littérature. Le lupénone (**52**) n'a présenté aucune activité cytotoxique *in vitro* sur les lignées cellulaires A-549, DLD-1, B16-F1 et WS-1 à la plus haute concentration testée ($\text{IC}_{50} > 300 \mu\text{M}$).

Dans le cadre de la recherche, seulement les monosaccharides D-glucose (**24**), L-rhamnose (**25**) et D-arabinose (**26**) ont été couplés aux triterpènes étudiés. En revanche, dès le début du projet, le D-galactose, des disaccharides (D-cellobiose, D-lactose et D-maltose) et un trisaccharide (D-maltotriose) ont été protégés par des groupements benzoyles, déprotégés en position anomérique et activés par les trichloroacétimides selon les conditions expérimentales détaillées dans l'article. Les rendements pour chacune de ces étapes sont présentés dans le tableau 5 ci-dessous en comparaison avec ceux obtenus pour les monosaccharides.

Tableau 5. Rendements de synthèse des dérivés sucrés

Sucre	Rendement (%)		
	Protection	Déprotection	Activation
D-Glucose (24)	92	86	85
L-Rhamnose (25)	82	nd	72
D-Arabinose (26)	89	nd	78
D-Galactose	50	86	nd
D-Cellobiose	36	89	31
D-Lactose	44	nd	nd
D-Maltose	92	74	17
D-Maltotriose	51	79	32

Ces résultats montrent que, sous ces conditions, la synthèse de trichloroacétimides pour les dérivés sucrés disaccharides et trisaccharides est possible,

mais que ce n'est pas la bonne voie à suivre en raison des rendements inférieurs à ceux obtenus avec les monosaccharides. De plus, la masse moléculaire élevée de ces composés ($M = 1\,689,88\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour le 2, 3, 6, 8, 9, 12, 14, 15, 16, 18-déca-O-benzoyl- α -D-maltotriopyranose trichloroacétimide) rend difficile la répétition de la réaction de glycosidation à plus grande échelle puisque, dans ce cas, la masse de produit nécessaire est d'environ 1,5 g de sucre pour 250 mg de triterpène, ce qui est exigeant en terme de temps et de manipulation.

La méthode de glycosidation catalysée par l'acide de Lewis TMSOTf a donné des résultats très satisfaisants pour le lupéol (**1**) en particulier. La réaction se déroule très rapidement (maximum de 30 min.), la molécule de départ n'est pas détectée par CCM ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ 49:1) et le produit formé est majoritaire (Fig. **19**).

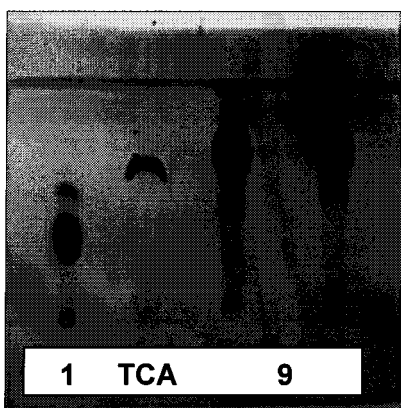


Figure 19. CCM de la réaction de glucosidation du lupéol (révélée au CAM)

Après la déprotection et l'isolation, un rendement supérieur à 90% a été obtenu pour une masse d'environ 1,38 g de la molécule anticancéreuse lup-20(29)-ène-3 β -O- β -D-glucopyranoside (**9**). Il est important de noter que des conditions de séparation optimale ont été développées pour ce type de composés à l'aide d'un appareil de chromatographie

éclairage haute performance (HPFC). Par exemple, avec ce dispositif, pour environ 500 mg de glycoside formé, il suffit de passer 1 L de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ 98:2 suivi de 1 L de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ 92:8 dans une colonne de 90 g de SiO_2 pour obtenir une séparation satisfaisante et une pureté élevée.

La solubilité des glycosides synthétisés a été évaluée sommairement avec quelques solvants organiques usuels (Tab. 6). Il est intéressant de souligner que tous les glycosides synthétisés sont solubles dans le DMSO, solvant couramment utilisé dans les formulations destinées aux études précliniques. De plus, seuls les 3-O- β -glycosides de bétulinol (**12-14**) et d'acide bétulinique (**21-23**) sont complètement solubles dans le MeOH.

Tableau 6. Solubilité relative des glycosides triterpéniques

Composé		Solubilité ^a		
		CH_2Cl_2	DMSO	CH_3OH
1	Lup	+	-	-
2	Bet	±	±	-
3	BetA	±	+	-
4	BetDiAc	+	-	-
5	Bet28Ac	+	-	-
6	Bet3Ac	+	-	-
7	MeBetA	+	-	-
8	BetAll	+	-	-
9	GluLup	+	+	±
10	RhaLup	+	+	±
11	AraLup	+	+	±
12	3GluBet	-	+	+
13	3RhaBet	-	+	+
14	3AraBet	-	+	+
15	28GluBet	-	+	±
16	28RhaBet	-	+	±
17	28AraBet	-	+	±
18	GluMeBetA	+	+	±
19	RhaMeBetA	+	+	±
20	AraMeBetA	+	+	±
21	GluBetA	-	+	+
22	RhaBetA	-	+	+
23	AraBetA	-	+	+

^a +: soluble, ±: peu soluble, -: insoluble

5.2. Biologie

Dans le but de pouvoir comparer l'activité cytotoxique de tous les composés testés (triterpènes et glycosides), il est plus facile de placer les résultats dans des histogrammes. La figure 20 présente les résultats pour le test de réduction à la résazurine (RTT Test) tandis que le tableau 7 et la figure 21 correspondent aux résultats pour la quantification de l'ADN cellulaire (Test Hoechst). Les valeurs d'IC₅₀ données dans chacun des graphiques équivalent à la moyenne d'activité sur les trois cancers (A-549, DLD-1 et B16-F1) et l'activité sur les cellules saines du fibroblaste humain (WS-1). Les expériences ont été réalisées trois fois chacune d'une manière indépendante et en triplicata.

Tableau 7. Résultats de la quantification de l'ADN cellulaire par le test Hoechst

Composé		IC ₅₀ ± SD (µM)			
		Lignée cellulaire			
		A-549	DLD-1	B16-F1	WS-1
1	Lup	130 ± 20	102 ± 6	72 ± 9	70 ± 10
2	Bet	4,5 ± 0,3	5,9 ± 0,6	10,3 ± 0,7	5 ± 1
3	BetA	8 ± 1	12 ± 1	18 ± 2	14 ± 2
4	BetDiAc	nd	nd	nd	nd
5	Bet28Ac	49 ± 7	46 ± 5	35 ± 1	47 ± 2
6	Bet3Ac	90 ± 10	>253	42 ± 6	>180
7	MeBetA	19 ± 2	21 ± 1	15,7 ± 0,9	19 ± 4
8	BetAll	>225	>225	>225	>225
9	GluLup	22 ± 2	19 ± 1	18 ± 2	20 ± 2
10	RhaLup	>178	>178	>178	>178
11	AraLup	34 ± 2	69 ± 7	28 ± 1	24 ± 1
12	3GluBet	>200	>200	>200	>200
13	3RhaBet	nd	nd	nd	nd
14	3AraBet	nd	nd	nd	nd
15	28GluBet	>194	>194	>194	>194
16	28RhaBet	>194	>194	>194	>194
17	28AraBet	>194	>194	>194	>194
18	GluMeBetA	9,3 ± 0,6	4,0 ± 0,2	7,2 ± 0,8	12 ± 2
19	RhaMeBetA	58 ± 2	>150	46 ± 1	65 ± 5
20	AraMeBetA	11,7 ± 0,8	16,0 ± 0,6	12,6 ± 0,5	13,2 ± 0,7
21	GluBetA	>178	12 ± 3	17 ± 4	>178
22	RhaBetA	2,6 ± 0,3	3,4 ± 0,5	4,2 ± 0,5	38 ± 6
23	AraBetA	5,7 ± 0,8	10 ± 1	10,2 ± 0,6	32 ± 2

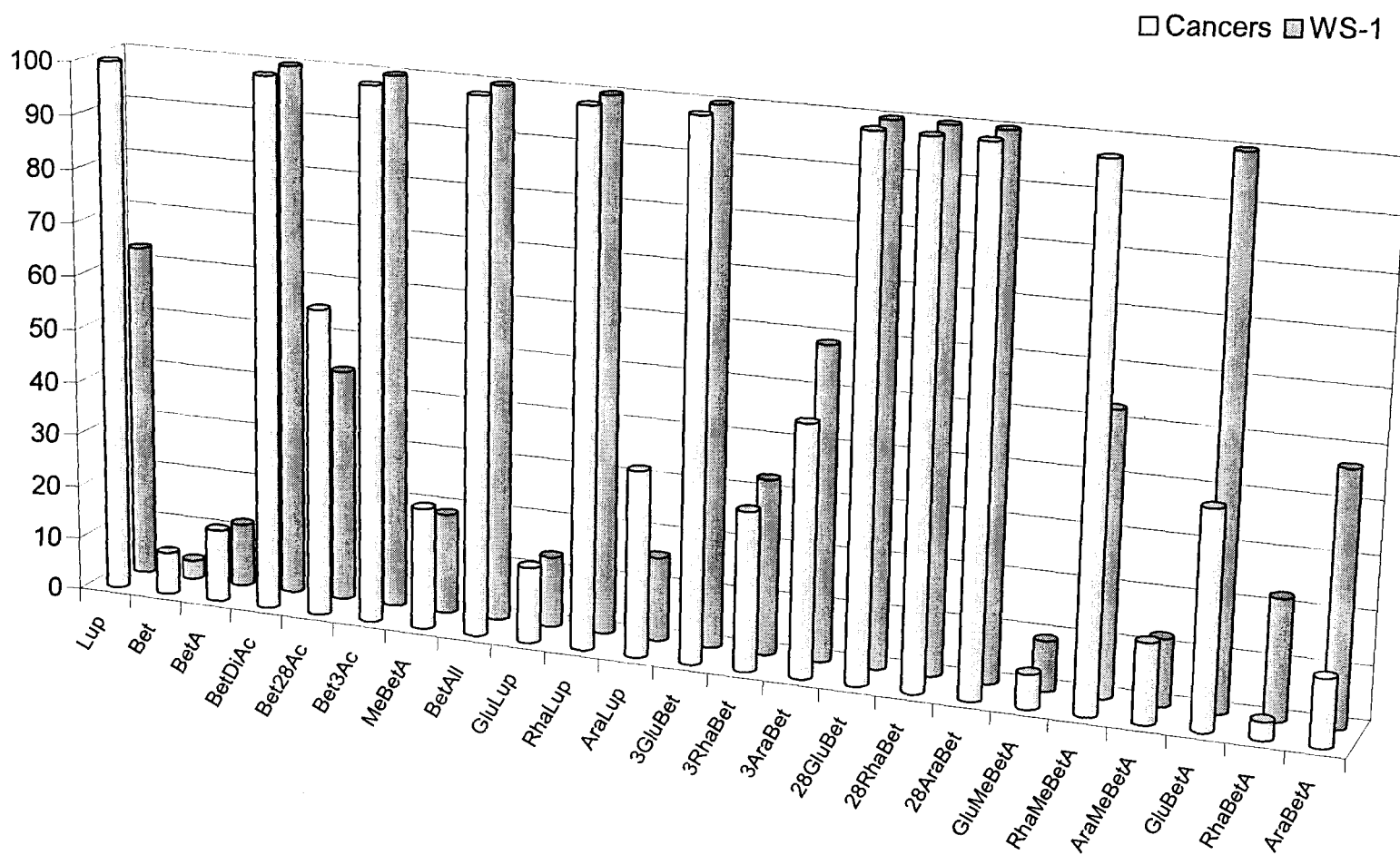


Figure 20. Cytotoxicité des triterpènes et glycosides (Test RTT, IC₅₀ μM en Y)

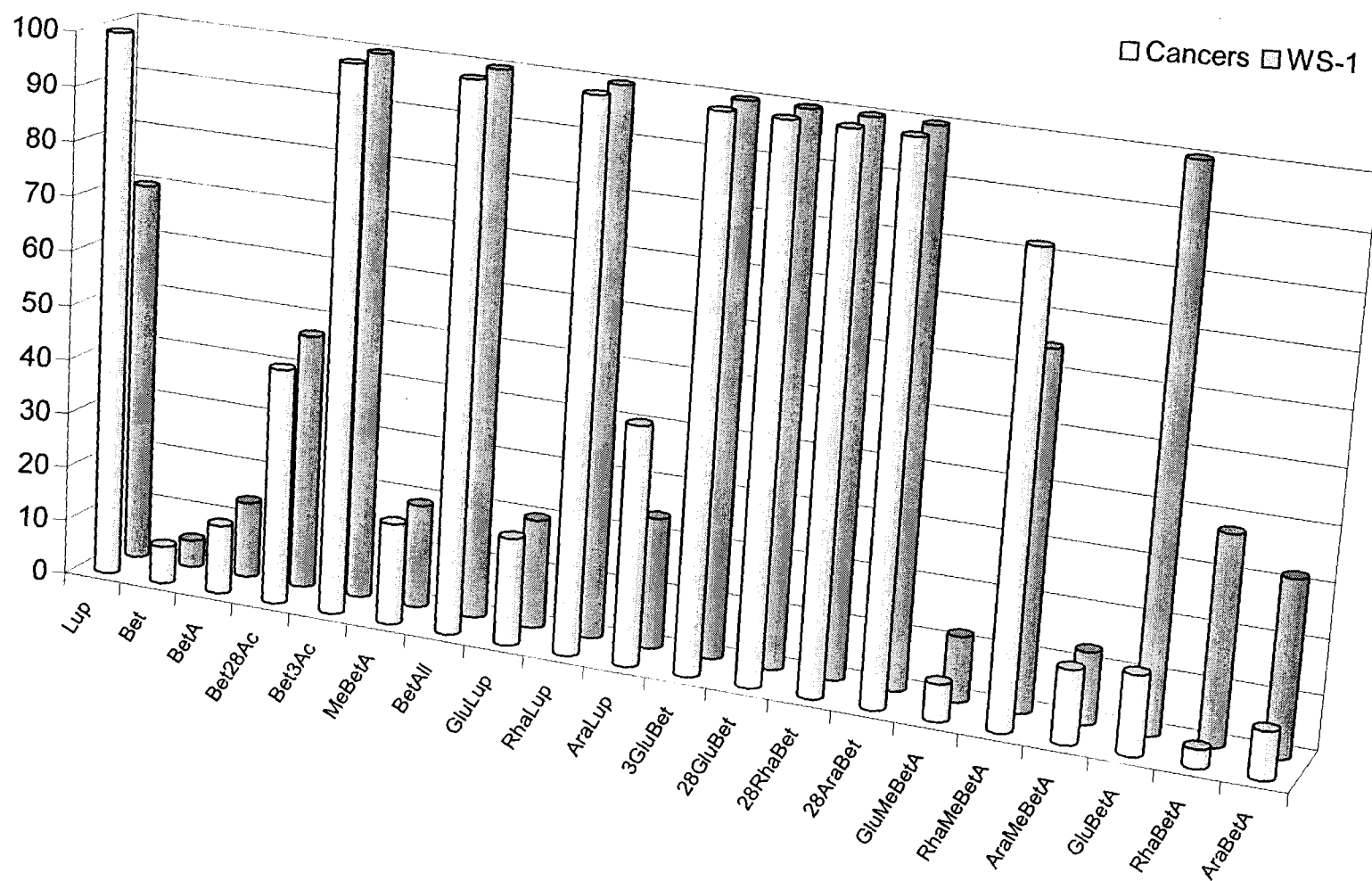


Figure 21. Cytotoxicité des triterpènes et glycosides (Test Hoechst, IC₅₀ μM en Y)

CHAPITRE VI

CONCLUSION

6.1. Conclusions

Les triterpènes pentacycliques de la famille du lupane dont le lupéol (1), le bétulinol (2) et l'acide bétulinique (3) font depuis peu l'objet d'études intensives concernant leurs propriétés médicinales variées. L'acide bétulinique (3), identifiée comme molécule la plus intéressante de cette série, est un agent thérapeutique très prometteur pour le traitement de certains cancers. Par un mécanisme d'action différent des agents anti-tumoraux connus (taxol, camptothécine, etc.), l'acide bétulinique (3) possède une sélectivité marquée sur les mélanomes. Par contre, sa faible hydrosolubilité est l'un des obstacles majeurs rencontrés pour son développement préclinique. Dans le but d'améliorer l'hydrosolubilité de ces triterpènes et de réaliser une étude structure-activité, plusieurs glycosides ont été synthétisés et évalués *in vitro* pour leur activité anticancéreuse. Ce type de dérivés a été privilégié à d'autres étant donné que les glycosides sont généralement plus hydrophiles et que leurs sections sucres sont souvent impliquées dans divers processus biologiques. De plus, les saponines triterpéniques sont fréquemment rencontrées dans la nature et considérées comme substances responsables des propriétés biologiques de plusieurs espèces végétales utilisées en médecine traditionnelle orientale.

Le lupéol (**1**, 1,2%) et le bétulinol (**2**, 17%) ont été extraits et isolés des écorces externes du bouleau jaune (*Betula alleghaniensis* Britton) et du bouleau blanc (*Betula papyrifera* Marsh.) respectivement. Ensuite, le 3-acétoxybétulinol (**6**, 85%, 2 étapes), le 28-acétoxybétulinol (**5**, 71%), le bétulinate de méthyle (**7**, 71%) et le bétulinate d'allyle (**8**, 84%), dérivés de protection du bétulinol (**2**) et de l'acide bétulinique (**3**), ont été synthétisés (Annexe 3).

Les fonctions hydroxyles du D-glucose (**24**), L-rhamnose (**25**) et D-arabinose (**26**) ont été préalablement protégées par des groupements benzoyles. Par la suite, la fonction hydroxyle présente sur la position anomérique a été régénérée et activée par la méthode des trichloroacétimides. Cette voie de synthèse a permis la préparation des sucres trichloroacétimides dans des rendements globaux allant de 59 à 69% (Annexes 3 et 4).

Enfin, les réactions de glycosidation entre les triterpènes de départ et les trichloroacétimides suivies de la déprotection des groupements benzoyles, acétates et allyles, ont permis l'obtention de 15 glycosides triterpéniques (**12-20**, 52-90%, 2 étapes; **21-23**, 41-50%, 3 étapes) (Annexes 2 et 3) dont certains n'ont jamais été répertoriés dans la littérature scientifique. Par l'utilisation des groupements protecteurs benzoyles participants, les liens 1,2-*trans*-glycosidiques ont été formés préférentiellement (β -D-glucosides, α -L-rhamnosides et α -D-arabinosides) tels que confirmés par spectroscopie RMN ^1H (Annexe 5).

Étonnamment, l'acide bétulinique (**3**) n'a montré aucune sélectivité sur les cellules A-549 et DLD-1 comparativement aux fibroblastes WS-1. Dans la série des triterpènes, le bétulinol (**2**, $\text{IC}_{50} = 3,80\text{-}13,8 \mu\text{M}$) a exercé la plus forte cytotoxicité sur les trois lignées cellulaires cancéreuses dépassant même celle de l'acide bétulinique (**3**, $\text{IC}_{50} = 10,3\text{-}16,1 \mu\text{M}$) et du bétulinate de méthyle (**7**, $\text{IC}_{50} = 19\text{-}26 \mu\text{M}$). Toutefois, la β -D-glucosidation du

bétulinol (**3**) a entraîné une perte totale de l'activité que ce soit en position 3 ou en position 28 (**12** et **15**, $IC_{50} > 200 \mu M$). En revanche, l'ajout d'un monosaccharide de D-glucose sur le lupéol (**1**, $IC_{50} = 104-165 \mu M$) a bonifié significativement son activité anticancéreuse (**9**, $IC_{50} = 14-15,0 \mu M$).

Les glycosides triterpéniques possédant une fonction carboxyle en position 28 ont exercé les activités les plus intéressantes. D'une part, le β -D-glucoside (**18**, $IC_{50} = 3,93-8,4 \mu M$) et le α -D-arabinoside (**20**, $IC_{50} = 13,3-18 \mu M$) de bétulinate de méthyle (**4**) ont montré une forte cytotoxicité surpassant celle de la molécule initiale. D'autre part, en plus d'accroître le potentiel cytotoxique, la glycosidation de l'acide bétulinique (**3**) a entraîné un gain significatif concernant la sélectivité vis-à-vis des cellules cancéreuses. En effet, le α -L-rhamnoside d'acide bétulinique (**22**) a démontré la plus forte activité anticancéreuse des 23 triterpènes et glycosides testés avec un IC_{50} moyen d'environ $3 \mu M$ sur les trois lignées cancéreuses et une sélectivité jusqu'à 12 fois supérieure ($IC_{50} = 31 \mu M$, WS-1). De surcroît, le β -D-glucoside d'acide bétulinique (**21**), fortement anticancéreux selon le test Hoechst ($IC_{50} = 12 \mu M$, DLD-1), s'est révélé complètement inactif sur des fibroblastes humains normaux ($IC_{50} > 178 \mu M$).

En somme, les objectifs du projet ont été atteints: l'hydrosolubilité, l'activité anticancéreuse et la sélectivité de l'acide bétulinique (**3**) ont été bonifiées par l'ajout d'une section sucre sur la fonction hydroxyle en position 3 de l'acide bétulinique. Toutefois, des études supplémentaires sur un plus large éventail de cellules seront nécessaires pour confirmer les résultats obtenus lors de ce projet de recherche.

6.2. Perspectives Futures

Au Québec, des milliers de tonnes d'écorce de bouleau sont enfouies ou brûlées à chaque année par l'industrie du sciage. C'est donc des quantités phénoménales de bétulinol (**2**) qui s'envolent en fumée. Or ce projet de maîtrise a, entre autres, mis en valeur le fort potentiel anticancéreux de cette molécule naturelle. Il serait donc intéressant de mettre en place un système d'extraction à grande échelle du bétulinol (**2**). Une fois extraites, ces mêmes écorces pourraient être utilisées de nouveau sans problèmes par l'industrie pour en tirer de l'énergie par combustion.

La méthode utilisée pour la synthèse de glycosides pourrait être appliquée systématiquement pour d'autres types de produits naturels hydroxylés isolés de la forêt boréale comme par exemple les flavonoïdes et autres terpènes. D'ailleurs, notre laboratoire a déjà complété la synthèse de glycosides d'alcool de β -caryophyllène, d'allobétulinol et d'oxyallobétulinol dans de bons rendements.

Les récents travaux du Dr. Vakhtang Mshvildadze ont mis en évidence une séquence osidique particulière, O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside, induisant une forte activité anticancéreuse lorsque branchée en position 3 d'une génine triterpénique [Barthomeuf *et al*, 2002]. Par conséquent, il serait intéressant de brancher ce type de section saccharidique sur les triterpènes étudiés.

Les résultats de ce projet concernant les relations entre la structure moléculaire et l'activité anticancéreuse ont amené beaucoup d'interrogations. Un des points essentiels à connaître dans le but de synthétiser d'autres dérivés potentiellement actifs réside probablement dans la polarité relative des composés. Une étude comparative des coefficients de partition (rapport entre hydrosolubilité et liposolubilité) pourrait donc être

effectuée par HPLC. Ceci permettrait peut-être d'établir une relation entre la polarité des glycosides triterpéniques et leur cytotoxicité.

Les résultats concernant l'activité anticancéreuse *in vitro* étant positifs pour certains dérivés, l'étape suivante consisterait à tester l'effet de l'un de ces agents thérapeutiques sur des souris porteuses de tumeurs murines. Les glycosides d'acide bétulinique (**21-23**) seraient sans doute les composés les plus prometteurs étant donné leur hydrosolubilité supérieure ainsi que leur faible toxicité sur les cellules saines. Des études préliminaires pourraient donc être effectuées pour évaluer la dose maximale non toxique sur l'animal. Par la suite, s'il s'avérait que le composé n'est peu ou pas toxique, une évaluation de la régression de la tumeur sur un groupe de souris serait envisageable.

Comme il a été établi dans la revue de littérature, les triterpènes pentacycliques de la famille du lupane possèdent des activités biologiques très variées. Il serait donc intéressant de tester les glycosides synthétisés pour leur activité antibactérienne, antifongique, anti-inflammatoire et même antivirale (VIH-1). D'ailleurs, de récentes expérimentations effectuées dans notre laboratoire confirment une forte activité anti-inflammatoire inhibant la génération de radicaux nitroxyles pour le 3-acétoxy-28-O- α -D-arabinopyranoside de bétulinol.

Il serait également intéressant d'évaluer les paramètres pharmacocinétiques (absorption, distribution, métabolisation et élimination) des glycosides triterpéniques comparativement à ceux des triterpènes. De cette façon, il serait possible de déterminer si l'ajout d'une section saccharidique sur l'acide bétulinique (**3**), par exemple, améliorerait significativement ces paramètres. De plus, la glycosidation pourrait favoriser le passage des triterpènes au travers de la barrière hémato-encéphalique et permettre ainsi le

traitement des tumeurs au cerveau (neuroblastomes et gliomes). Il n'existe actuellement que très peu de traitements efficaces pour ce type de tumeur.

Finalement, le mécanisme d'action des composés les plus prometteurs pourrait être étudié par les techniques courantes de biologie moléculaire à savoir s'ils agissent par apoptose tout comme l'acide bétulinique (**3**) ou par un mécanisme faisant appel à une autre voie métabolique.

BIBLIOGRAPHIE

- Aratanechemuge, Y.; Hibasami, H.; Sanpin, K.; Katsuzaki, H.; Imai, K.; Komiya, T.
Induction of apoptosis by lupeol isolated from mokumem (*Gossampinus malabarica* L. Merr) in human promyelotic leukemia HL-60 cells. *Oncol. Rep.* **2004**, *11*, 289-292.
- Baglin, I.; Mitaine-Offer, A.-C.; Nour, M.; Tan, K.; Cavé, C.; Lacaille-Dubois, M.-A. **A review of natural and modified betulinic, ursolic and echinocystic acid derivatives as potential antitumor and anti-HIV agents.** *Min. Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 159-165.
- Baglin, I.; Poumaroux, A.; Nour, M.; Tan, K.; Mitaine-Offer, A. C.; Lacaille-Dubois, M. A.; Chauffert, B.; Cavé, C. **New ursolic and betulinic derivatives as potential cytotoxic agents.** *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2003**, *18*, 111-117.
- Bartomeuf, C.; Mshvildadze, V.; Kemertelidze, E.; Balansard, G. ***In vitro* activity of hederacolchisid A₁ compared with other saponins from *Hedera colchica* against proliferation of human carcinoma and melanoma cells.** *Planta Med.* **2002**, *68*, 672-675.
- Braca, A.; Autore, G.; De Simone, F.; Marzocco, S.; Morelli, I.; Venturella, F.; De Tommasi, N. **Cytotoxic saponins from *Schefflera rotundifolia*.** *Planta Med.* **2004**, *70*, 960-966.

- Bruneton, J. **Pharmacognosie. Phytochimie des plantes médicinales.** 2^e Édition, Technique et Documentation Lavoisier, Paris, **1999**, 915 p.
- Chatterjee, P.; Kouzi, S. A.; Pezzuto, J. M.; Hamann, M. T. **Biotransformation of the antimelanoma agent betulinic acid by *Bacillus megaterium* ATCC 13368.** *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 3850-3855.
- Cichewicz, R. H.; Kouzi, S. A. **Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potentiel of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection.** *Med. Res. Rev.* **2004**, *24*, 90-114.
- Cragg, G. M.; Newman, D. J. **Plants as a source of anti-cancer agents.** *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *100*, 72-79.
- Deng, S.; Yu, B.; Lou, Y.; Hui, Y. **First total synthesis of an exceptionally potent antitumor saponin OSW-1.** *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 202-208.
- Deng, S.; Yu, B.; Xie, J.; Hui, Y. **Highly efficient glycosylation of sapogenins.** *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7265-7266.
- de Roode, B. M.; Franssen, M. C.; van der Padt, A.; Boom, R. M. **Perspectives for the industrial enzymatic production of glycosides.** *Biotechnol. Prog.* **2003**, *19*, 1391-1402.
- Eiznhamer, D. A.; Xu, Z.-Q. **Betulinic acid: a promising anticancer candidate.** *IDrugs* **2004**, *7*, 359-373

- Fernández, M. A.; de las Heras, B.; García, M. D.; Sáenz, M. T.; Villar, A. **New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol.** *J. Pharm. Pharmacol.* **2001**, *53*, 1533-1539.
- 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.
- 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.
- 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. **Anti-AIDS agents. 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzigium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenes.** *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 243-247.
- Geetha, T.; Varalakshmi, P.; Latha, M. **Effect of triterpenes from *Crataeva nurvala* stem bark on lipid peroxidation in adjuvant induced arthritis in rats.** *Pharmacol. Res.* **1998**, *37*, 191-195.
- Habiyaremye, 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*, 83-91.

- Jain, S. A.; Srivastava, S. K. **Betulin-3 β -O- β -D-xylopyranoside from the roots of *Amoora rohituka*. *Indian J. Pharm. Sci.* **1984**, 161-162.**
- Jean, F.-I. **Analyse de produits naturels de *Taxus canadensis*. Mémoire de maîtrise en ressources renouvelables, UQAC, 1992, 104 p.**
- 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.**
- Kashiwada, Y.; Hashimoto, F.; Cosentino, L. M.; Chen, C. H.; Garrett, P. E.; Lee, K. H. **Betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives as potent anti-HIV agents. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 1016-1017.**
- Kim, D. S. H. L.; Chen, Z.; Nguyen, V. T.; Pezzuto, J. M.; Qiu, S.; Lu, Z.-Z. **A concise semi-synthetic approach to betulinic acid from betulin. *Synthetic Commun.* **1997**, 27, 1607-1612.**
- 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.**
- 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.**
- Klinotová, E.; Křeček, V.; Klinot, J.; Endová, M.; Eisenreichová, J.; Buděšínský, M.; Štícha, M. **Glycosylation of triterpene alcohols and acids of the lupane and a-secolupane series. *Collect. Czech. Chem. C.* **1997**, 62, 1776-1798.**

- Kouzi, S. A.; Chatterjee, P.; Pezzuto, J. M.; Hamann, M. T. **Microbial transformations of the antimelanoma agent betulinic acid.** *J. Nat. Prod.* **2000**, 63, 1653-1657.
- Křen, V.; Martínková, L. **Glycosides in medicine: "The role of glycosidic residue in biological activity".** *Curr. Med. Chem.* **2001**, 8, 1313-1338.
- Lacaille-Dubois, M. A. **Biologically and pharmacologically active saponins from plants: recent advances.** *Saponins in Food, Feedstuffs and Medicinal Plants.* Kluwer Academic Publishers, Pays-Bas, **2000**, 205-218.
- Liu, J.; Henkel, T. **Traditional chinese medicine (TCM): Are polyphenols and saponins the key ingredients triggering biological activities?** *Curr. Med. Chem.* **2002**, 9, 1483-1485.
- Marie-Victorin, F. **Flore laurentienne.** 3^e Édition, Gaëtan Morin Éditeur Ltée, Boucherville, **2002**, 1093 p.
- Marles, R. J.; Clavelle, C.; Monteleone, L.; Tays, N.; Burns, D. **Aboriginal plant use in Canada's northwest boreal forest.** UBC Press, Vancouver, **2000**, 368 p.
- Minocha, P. K.; Tiwari, K. P. **A triterpenoidal saponin from roots of *Acanthus illicifolius*.** *Phytochemistry* **1981**, 20, 135-137.
- Moriarty, D. M.; Huang, J.; Yancey, C. A.; Zhang, P.; Setzer, W. N.; Lawton, R. O.; Bates, R. B.; Caldera, S. **Lupeol is the cytotoxic principle in the leaf extract of *Dendropanax cf. querceti*.** *Planta Med.* **1998**, 64, 370-372.

- O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. **Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity.** *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5421-5426.
- O'Connel, M. M; Bently, M. D.; Campbell, C. S.; Cole, B. J. W. **Betulin and lupeol in bark from four white-barked birches.** *Phytochemistry* **1988**, *27*, 2175-2176.
- Ohara, S.; Hishiyama, S. **Utilization of triterpenoids I. Synthesis of betulin glycosides by cyclodextrin glycosyltransferase.** *Mokuzai Gakkaishi* **1994**, *40*, 444-451.
- Ohara, S.; Ohira, T. **Plant growth regulation effects of triterpenoid saponins.** *J. Wood Sci.* **2003**, *49*, 59-64.
- Patočka, J. **Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification.** *J. Appl. Biomed.* **2003**, *1*, 7-12.
- Pichette, A.; Liu, H.; Roy, C.; Tanguay, S.; Simard, F.; Lavoie, S. **Selective oxidation of betulin for the preparation of betulinic acid, an antitumor compound.** *Synthetic Commun.* **2004**, *34*, 3925-3937.
- Pisha, E.; Chai, H.; Lee, I.-S.; Chagwedera, T. E.; Farnsworth, N. R.; Cordell, G. A.; Beecher, C. W. W.; Fong, H. H. S.; Kinghorn, A. D.; Brown, D. 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.

- Plé, K.; Chwalek, M.; Voutquenne-Nazabadioko, L. **Synthesis of α -hederin, δ -hederin, and related triterpenoid saponins.** *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 1588-1603.
- Plohmann, B.; Bader, G.; Hiller, K.; Franz, G. **Immunomodulatory and antitumoral effects of triterpenoid saponins.** *Pharmazie* **1997**, 52, 953-957.
- Purohit, M. C.; Pant, G.; Rawat, M. S. M. **A betulinic acid glycoside from *Schefflera venulosa*.** *Phytochemistry* **1991**, 30, 2419.
- Rago, R.; Mitchen, J.; Wilding, G. **DNA fluorometric assay in 96-well tissue culture plates using Hoechst 33 258 after cell lysis by freezing in distilled water.** *Anal Biochem.* **1990**, 191, 31-34.
- Rao, A. V.; Gurfinkel, D. M. **The bioactivity of saponins: triterpenoid and steroidal glycosides.** *Drug Metab. Drug Interact.* **2000**, 17, 211-235.
- Safayhi, H.; Sailer, E.-R. **Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes.** *Planta Med.* **1997**, 63, 487-493.
- Samoshina, N. F.; Denisenko, M. V.; Denisenko, V. A.; Uvarova, N. I. **Synthesis of glycosides of lupane-type triterpene acids.** *Chem. Nat. Compd.* **2003**, 39, 575-582.
- 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, 2007-2010.

- Schmidt, R. R. **Anomeric-oxygen activation for glycoside synthesis: the trichloroacetimidate method.** *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1994**, *50*, 21-123.
- Setzer, W. N.; Setzer, M. C. **Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents.** *Min. Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 540-556.
- Sparg, S. G.; Light, M. E.; van Staden, J. **Biological activities and distribution of plant saponins.** *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *94*, 219-243.
- Srivastava, S. K.; Srivastava, S. D. **Lupa-20(29)-ene-3-O- α -L-rhamnopyranoside from the roots of *Cordia oblique*.** *J. Indian Chem. Soc.* **1983**, *60*, 202.
- Steele, J. C. P.; Warhurst, D. C.; Kirby, G. C.; Simmonds, M. S. J. ***In vitro* and *in vivo* evaluation of betulinic acid as an antimalarial.** *Phytother. Res.* **1999**, *13*, 115-119.
- 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.
- Tiwari, K. P.; Minocha, P. K. **Pavophylline, a new saponin from the stem of *Pavonia zeylanica*.** *Phytochemistry* **1980**, *19*, 701-704.
- Tiwari, K. P.; Srivastava, S. D.; Srivastava, S. K. **α -L-Rhamnopyranosyl-3 β -hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid from the stem of *Dillenia pentagyna*.** *Phytochemistry* **1980**, *19*, 980-981.

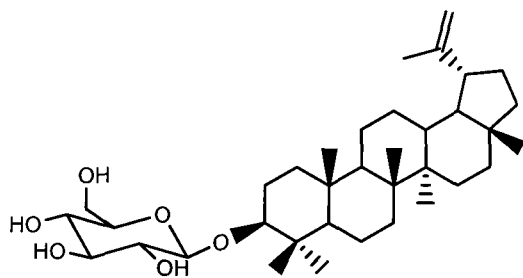
- Udeani, G. O.; Zhao, G. M.; Geun Shin, Y.; Cooke, B. P.; Graham, J.; Beecher, C. W.; Kinghorn, A. D.; Pezzuto, J. M. **Pharmacokinetics and tissue distribution of betulinic acid in CD-1 mice.** *Biopharm. Drug. Dispos.* **1999**, *20*, 379-383.
- Urban, F. J.; Moore, B. S.; Breitenbach, R. **Synthesis of tigogenyl β -O-cellobioside heptaacetate and glycoside tetraacetate via schmidt's trichloroacetimidate method; some new observations.** *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 4421-4424.
- Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M.; Coggon, P.; McPhail, A. T. **Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*.** *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2325-2327.
- Xu, R.; Fazio, G. C.; Matsuda, S. P. T. **On the origins of triterpenoid skeletal diversity.** *Phytochemistry.* **2004**, *65*, 261-291.
- You, Y.-J.; Nam, N.-H.; Kim, Y.; Bae, K.-H.; Ahn, B.-Z. **Antiangiogenic activity of lupeol from *Bombax ceiba*.** *Phytother. Res.* **2003**, *17*, 341-344.
- 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.

ANNEXE 1
LISTE DES ABRÉVIATIONS

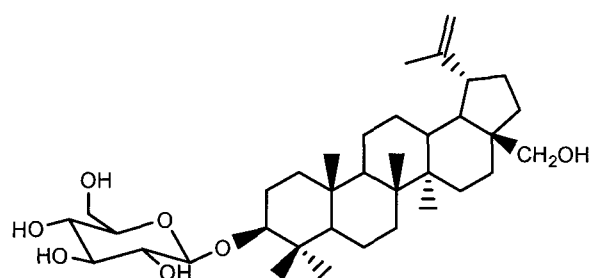
Ac ₂ O:	Anhydride acétique
AcOH:	Acide acétique
ADN:	Acide désoxyribonucléique
Ag ₂ CO ₃ :	Carbonate d'argent
AlIBr:	Bromure d'allyle
Ara:	D-Arabinose (26)
Bet:	Bétulinol (2)
Bet3Ac:	3-Acétoxybétulinol (6)
Bet28Ac:	28-Acétoxybétulinol (5)
BetDiAc:	3,28-Diacétoxybétulinol (4)
BetA:	Acide bétulinique (3)
BetAll:	Bétulinate d'allyle (8)
BzCl:	Chlorure de benzoyle
CAM:	<i>Ceric ammonium molybdate</i>
CCM:	Chromatographie sur couche mince
CCl ₃ CN:	Trichloroacétonitrile
CH ₂ Cl ₂ :	Dichlorométhane
CHCl ₃ :	Chloroforme
CH ₃ I:	Iodométhane
CrO ₃ :	Trioxyde de chrome
Cs ₂ CO ₃ :	Carbonate de césium
DBU:	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DMAP:	Diméthylaminopyridine
DMF:	Diméthylformamide
DMSO:	Diméthylsulfoxyde
ED ₅₀ :	Dose efficace inhibant 50% de l'activité
Et ₃ N:	Triéthylamine
EtOAc:	Acétate d'éthyle
Glu:	D-Glucose (24)
H ₂ O:	Eau
HBr:	Acide bromique
HCl:	Acide chlorhydrique
HPFC:	<i>High performance flash chromatography</i>
HPLC:	<i>High performance liquid chromatography</i>
HRMS:	<i>High resolution mass spectroscopy</i>
H ₂ SO ₄ :	Acide sulfurique
IC ₅₀ :	Concentration inhibant 50% de l'activité
K ₂ CO ₃ :	Carbonate de potassium
MeBetA:	Bétulinate de méthyle (7)
MeOH:	Méthanol
Mg(OMe) ₂ :	Diméthoxyde de magnésium
MgSO ₄ :	Sulfate de magnésium
MS:	<i>Molecular sieves</i>
NaBH ₄ :	Borohydrure de sodium
NaCl:	Chlorure de sodium
NaHCO ₃ :	Bicarbonate de sodium
NaOH:	Hydroxyde de sodium
nd:	Non-déterminé
PPh ₃ :	Triphénylphosphine
Pd ⁰ (PPh ₃) ₄ :	Tétrakis(triphénylphosphine) palladium(0)
Py:	Pyridine
Rha:	L-Rhamnose (25)
RMN:	Résonance magnétique nucléaire
SiO ₂ :	Dioxyde de silicium
TCA:	Trichloroacétimide
THF:	Tétrahydrofurane
TMSOTf:	Triméthylsilyl trifluorométhanesulfonate
VIH:	Virus d'immunodéficience humaine

ANNEXE 2

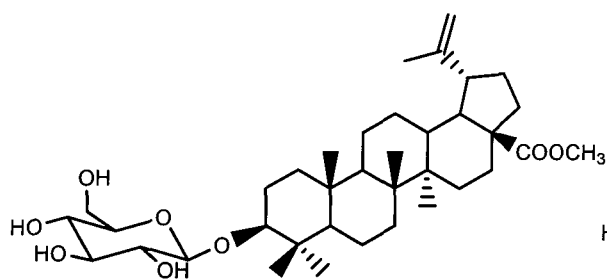
STRUCTURE MOLÉCULAIRE DES GLYCOSIDES TRITERPÉNIQUES



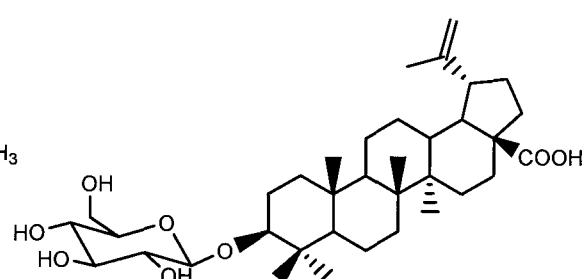
3-O-bêta-D-glucopyranoside de lupéol

9

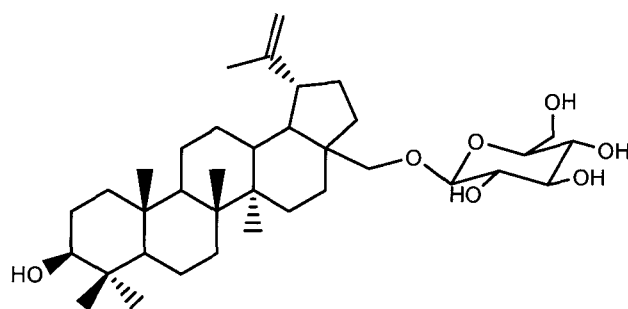
3-O-bêta-D-glucopyranoside de bétulinol

12

3-O-bêta-D-glucopyranoside de bétulinate de méthyle

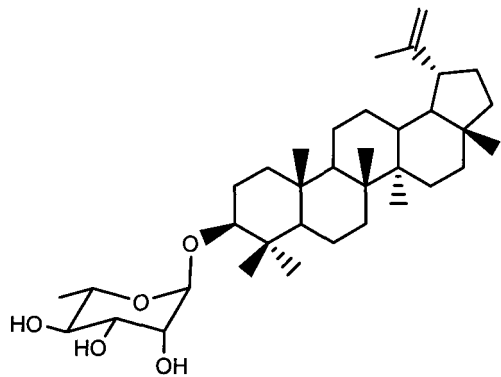
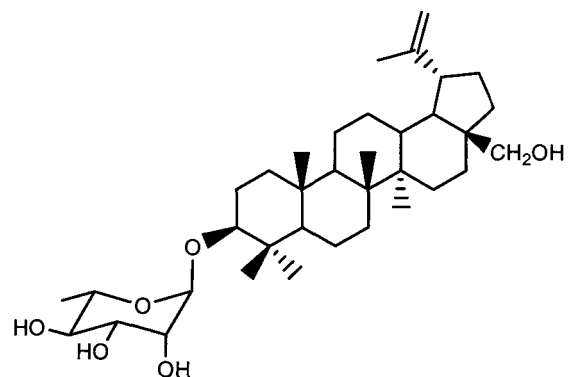
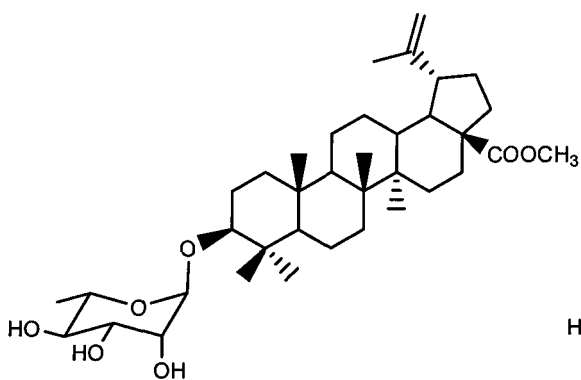
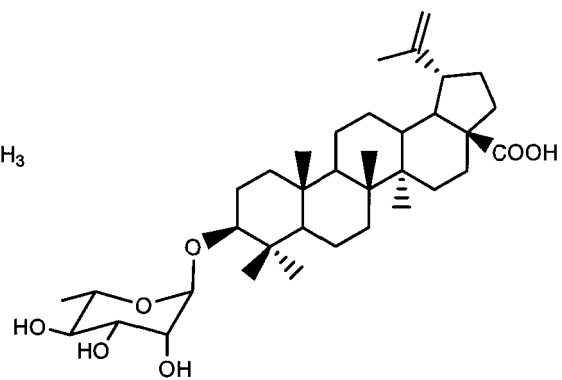
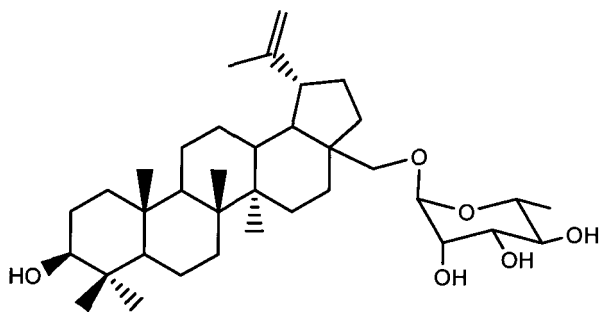
18

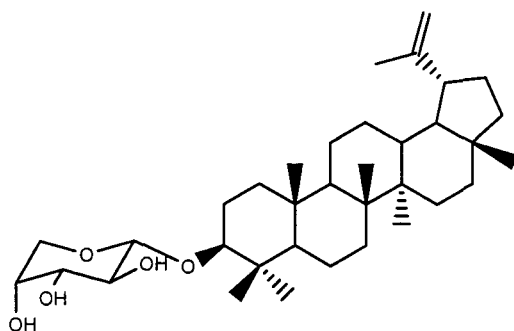
Acide 3-O-bêta-D-glucopyranoside bétulinique

21

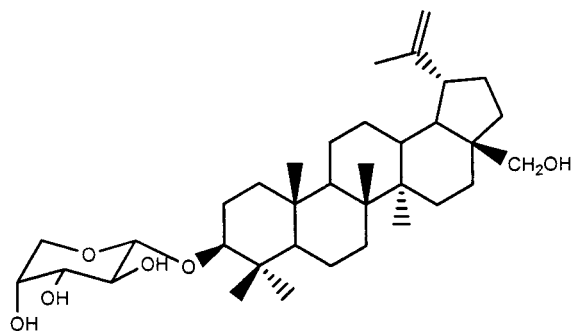
28-O-bêta-D-glucopyranoside de bétulinol

15

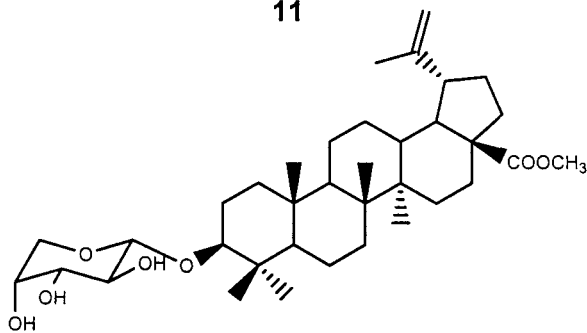
3-O- α -L-rhamnoside de lupéol**10**3-O- α -L-rhamnoside de bétulinol**13**3-O- α -L-rhamnoside de bétulinate de méthyle**19**Acide 3-O- α -L-rhamnoside bétulinique**22**28-O- α -L-rhamnoside de bétulinol**16**



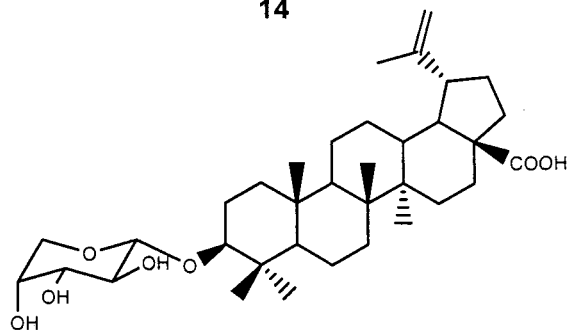
3-O-alpha-D-arabinopyranoside de lupéol

11

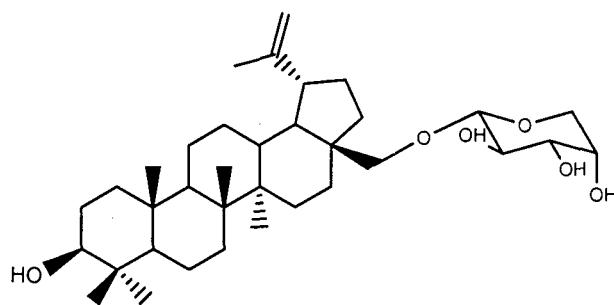
3-O-alpha-D-arabinopyranoside de bétulinol

14

3-O-alpha-D-arabinopyranoside de bétulinate de méthyle

20

Acide 3-O-alpha-D-arabinopyranoside bétulinique

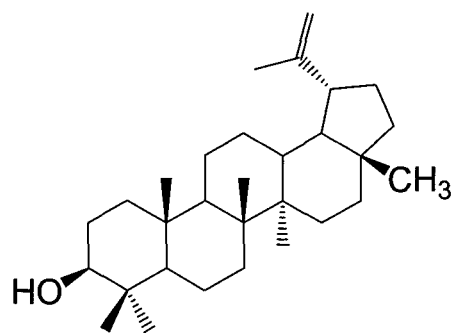
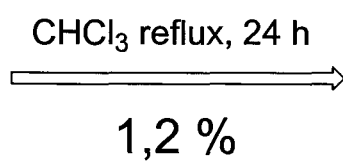
23

28-O-alpha-D-arabinopyranoside de bétulinol

17

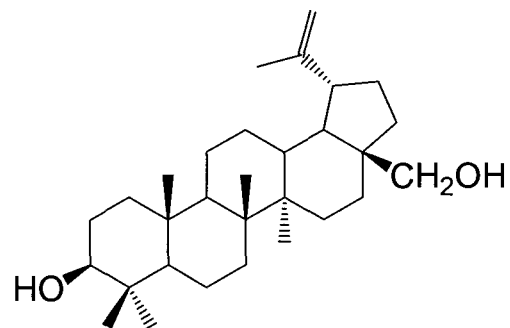
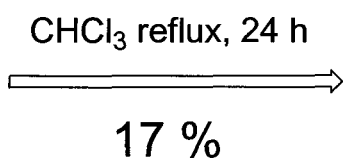
ANNEXE 3
SCHÉMAS RÉACTIONNELS

Bouleau Jaune

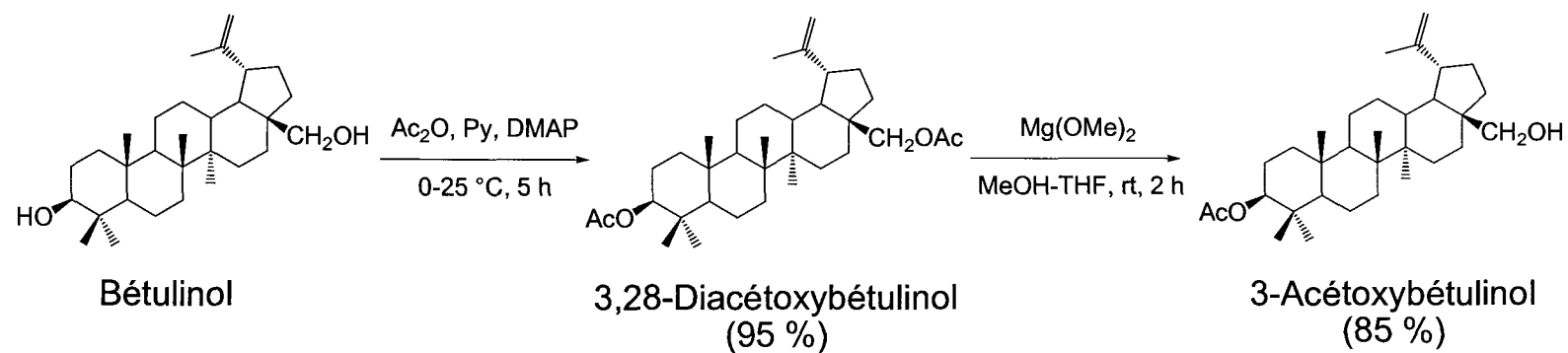
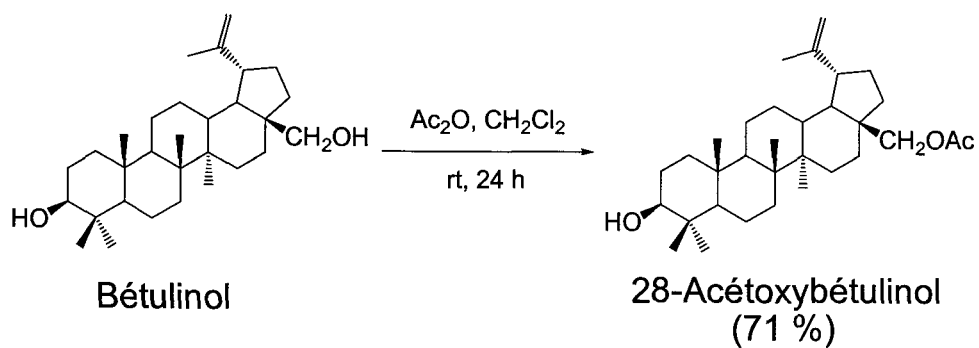


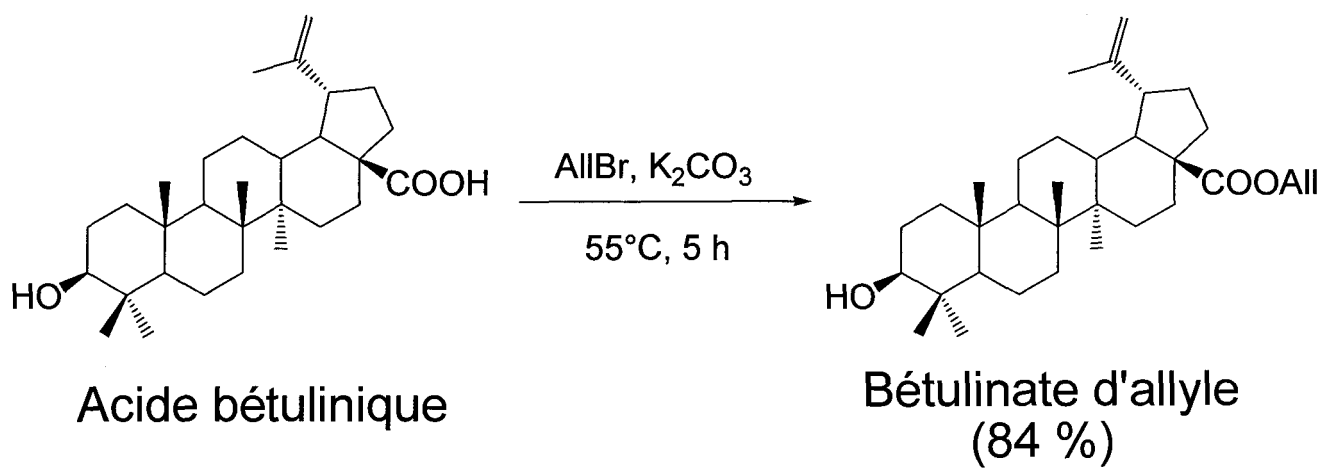
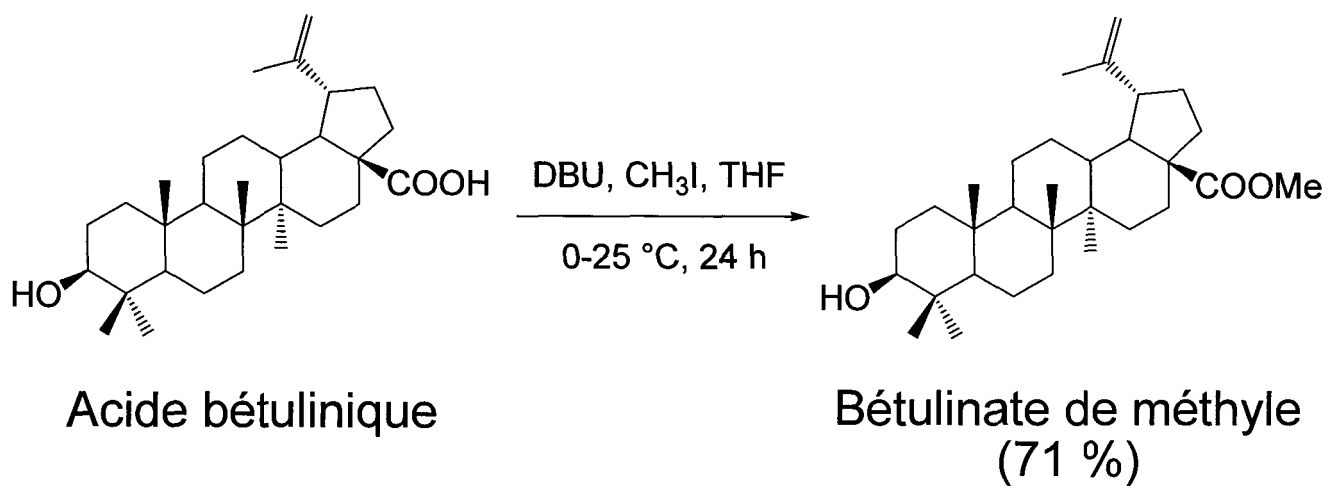
Lupéol

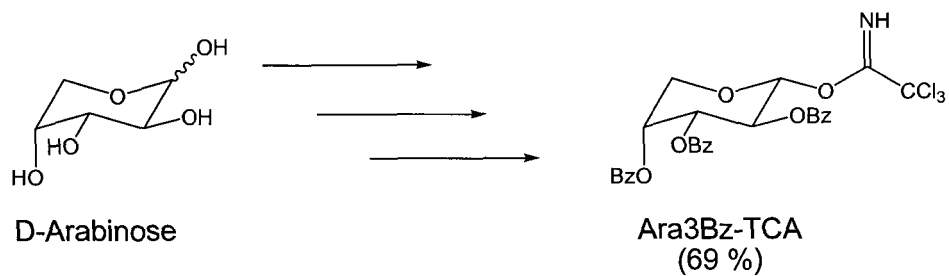
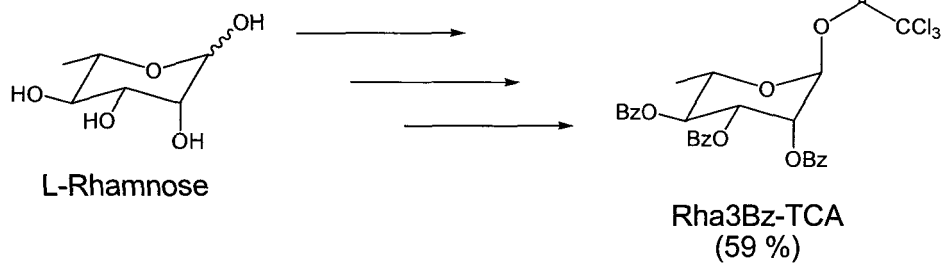
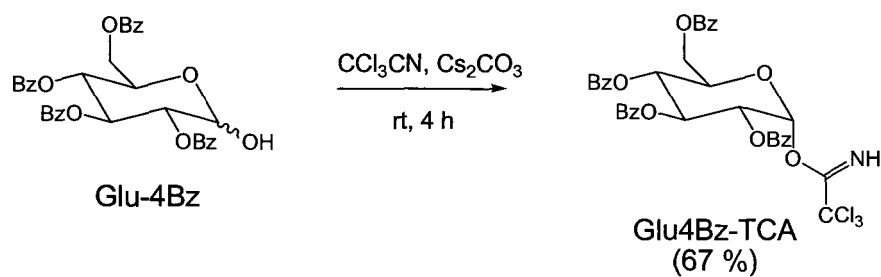
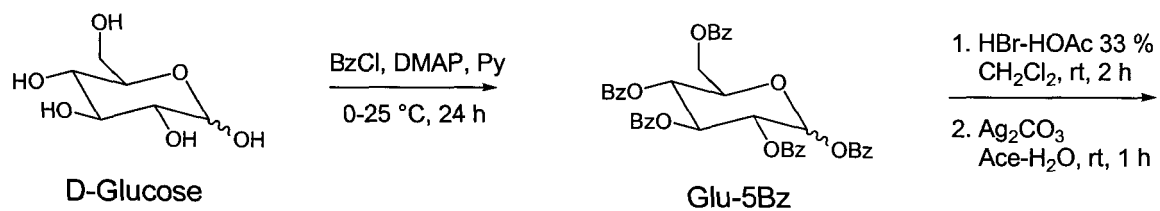
Bouleau Blanc

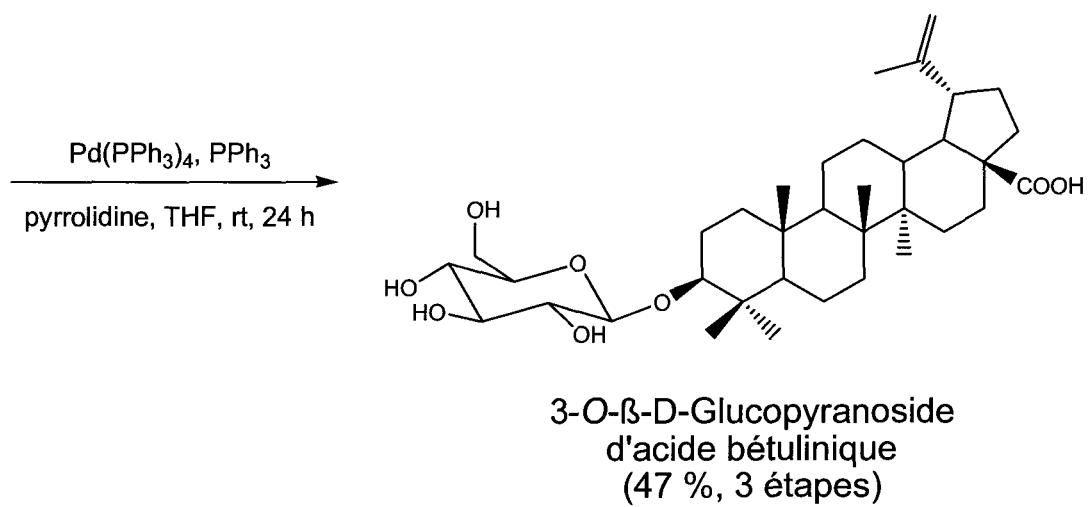
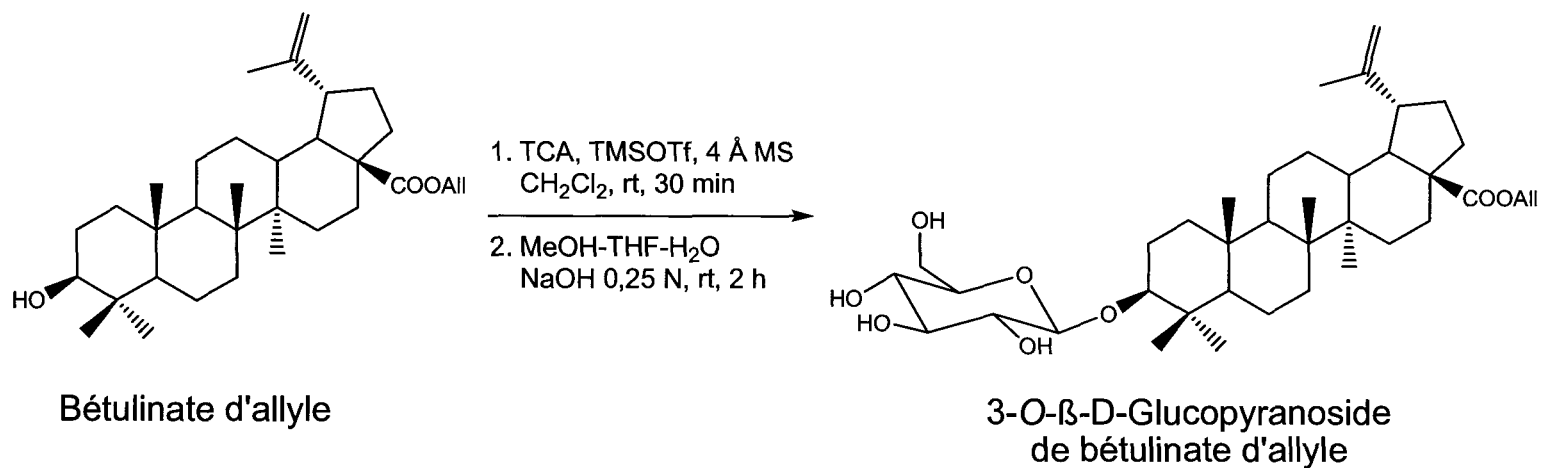


Bétulinol



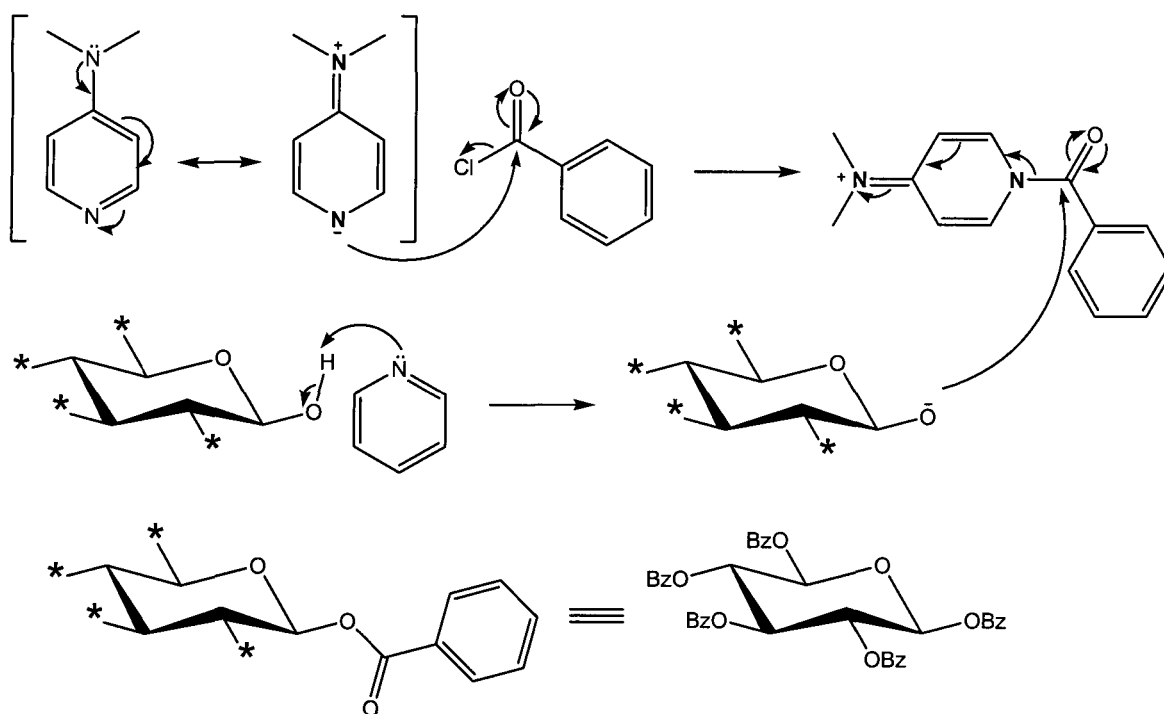




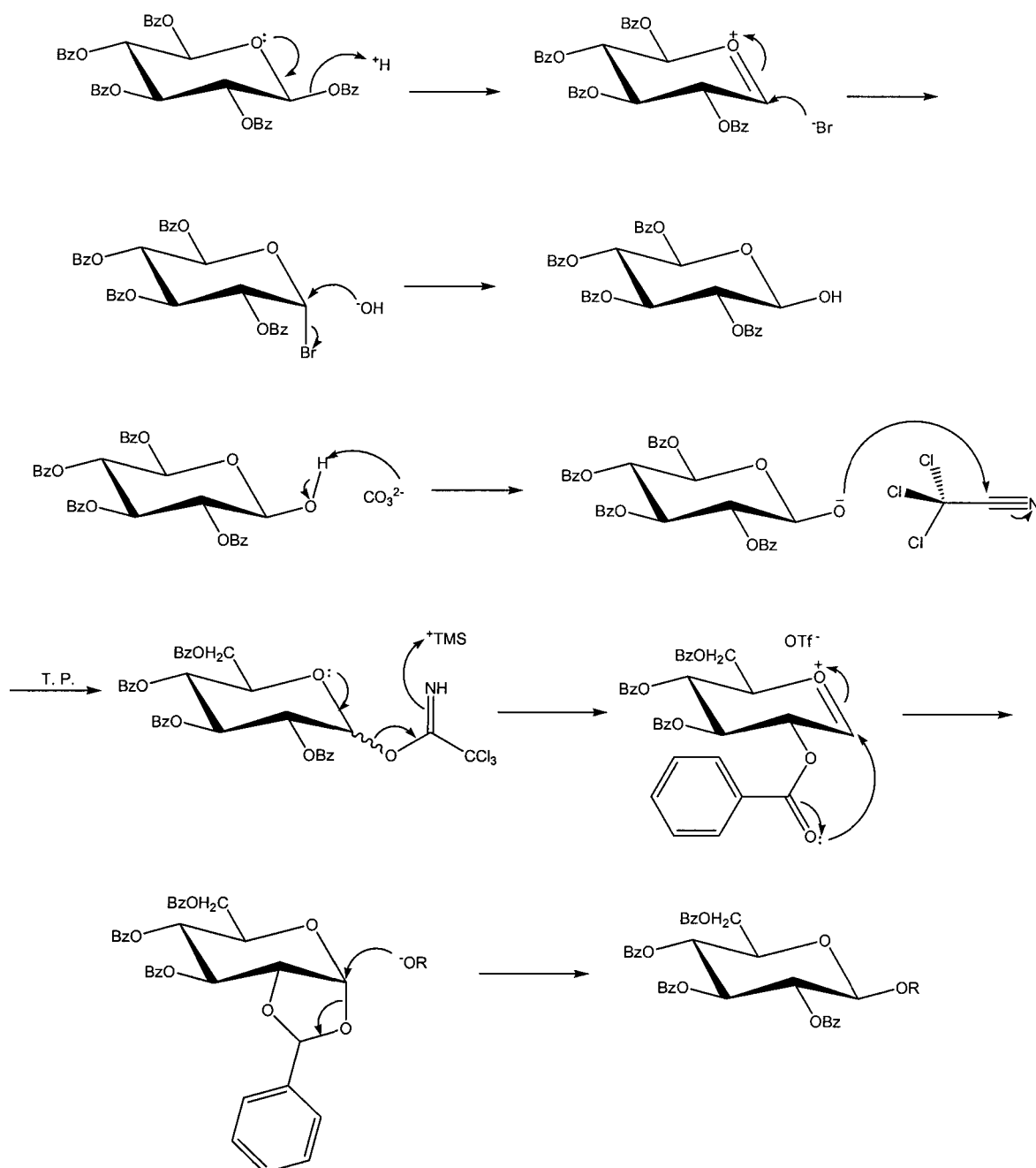


ANNEXE 4
MÉCANISMES RÉACTIONNELS

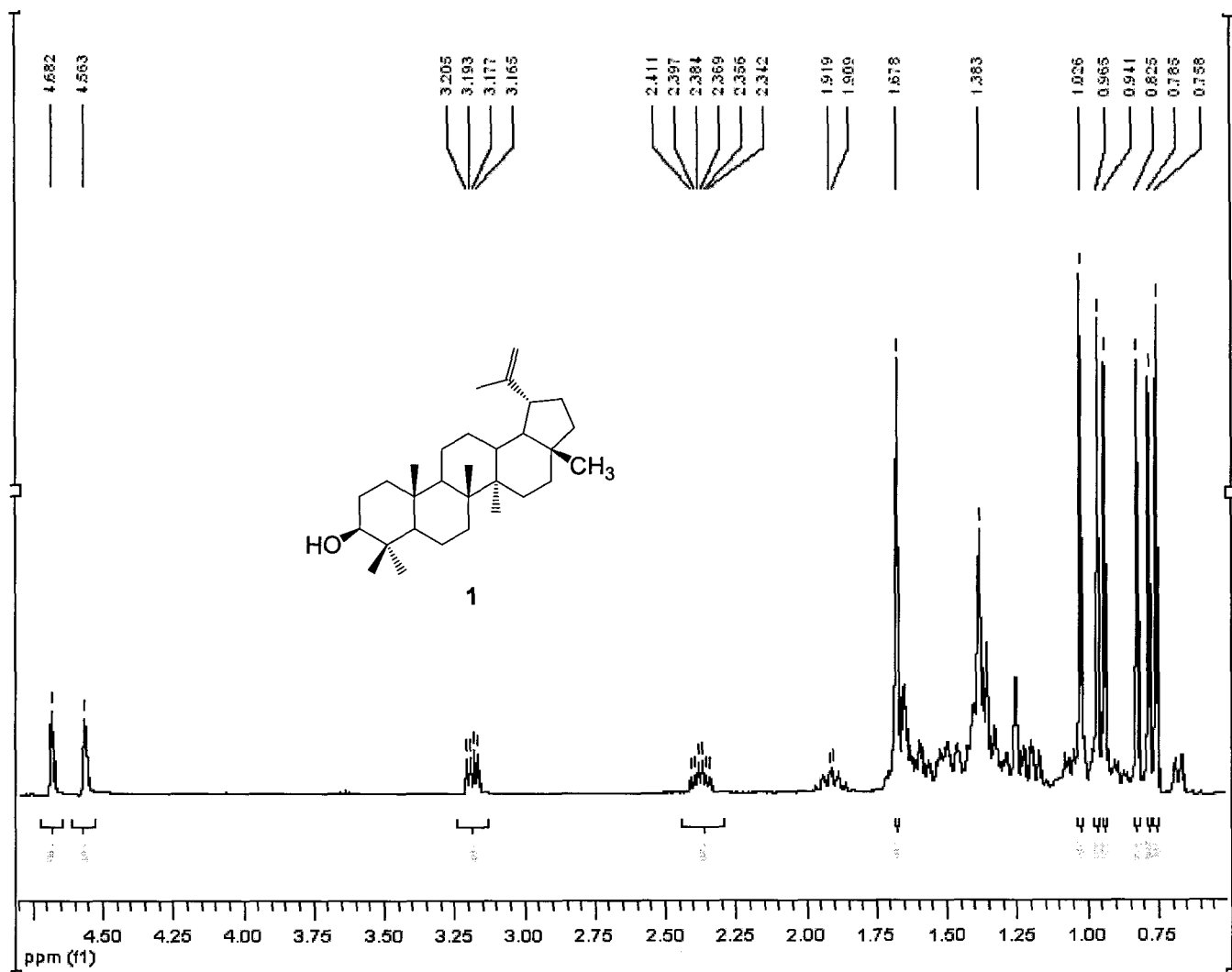
BENZOYLATION DES SUCRES

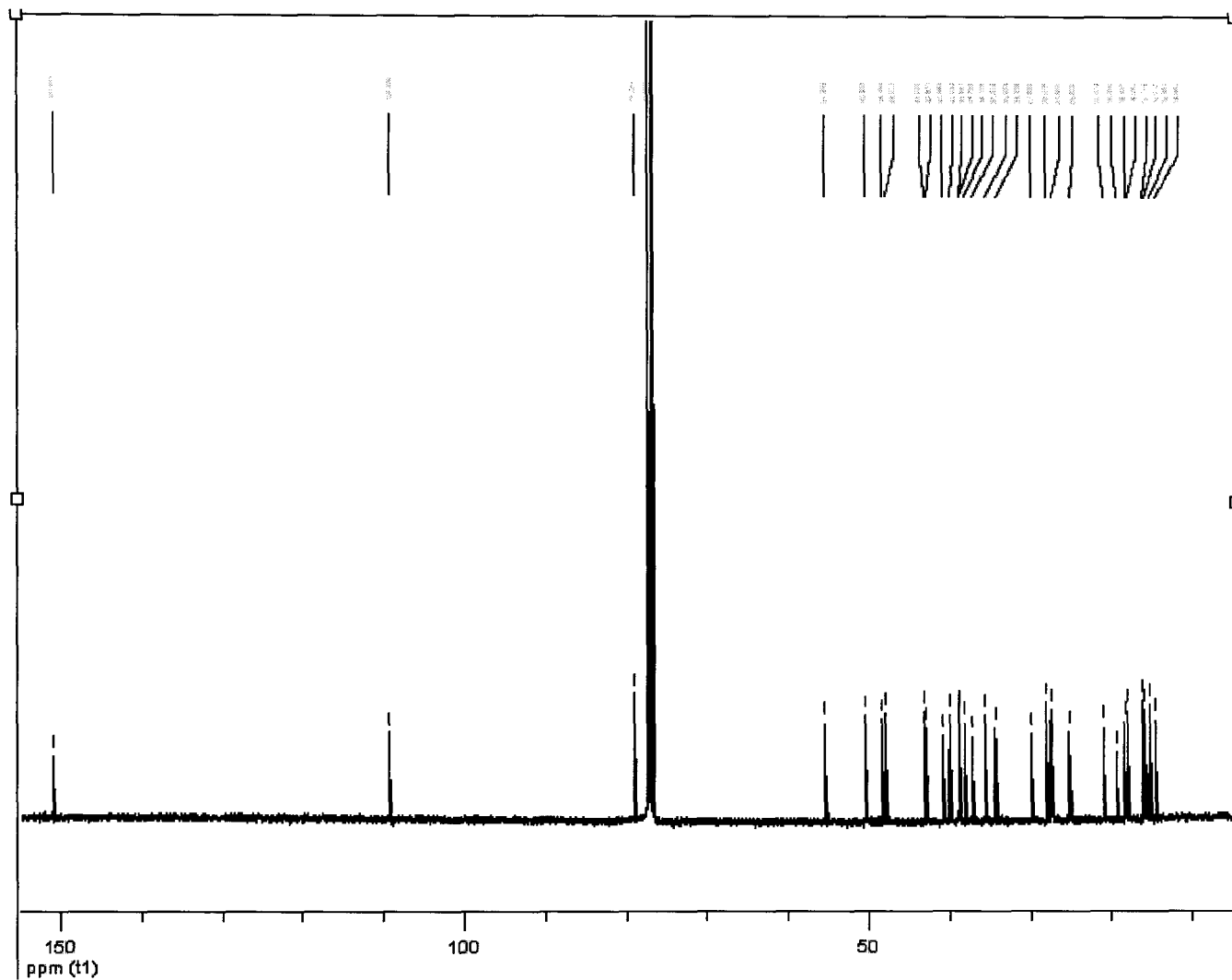


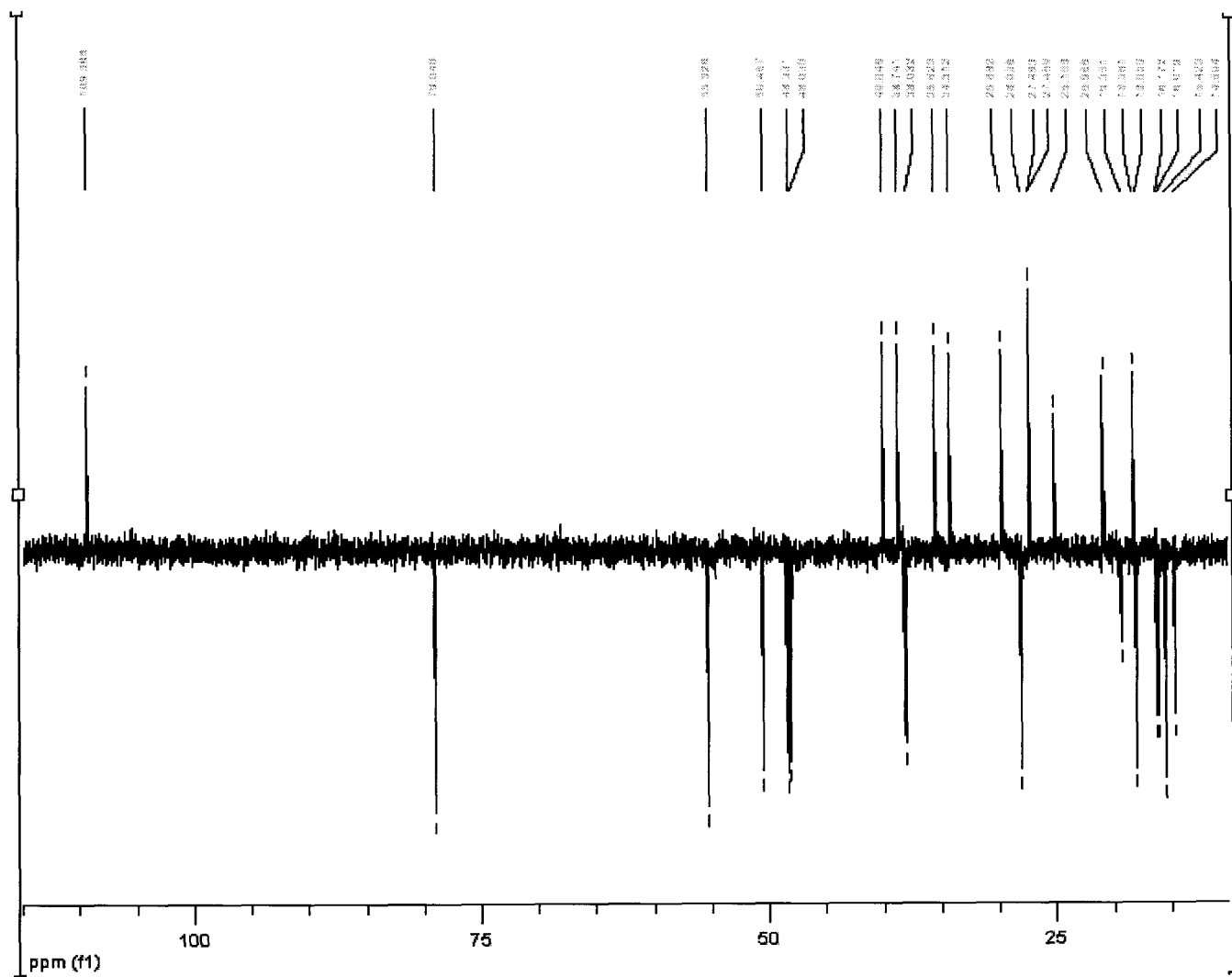
SYNTHÈSE DES TRICHLOROACÉTIMITIDATES ET GLYCOSIDATION



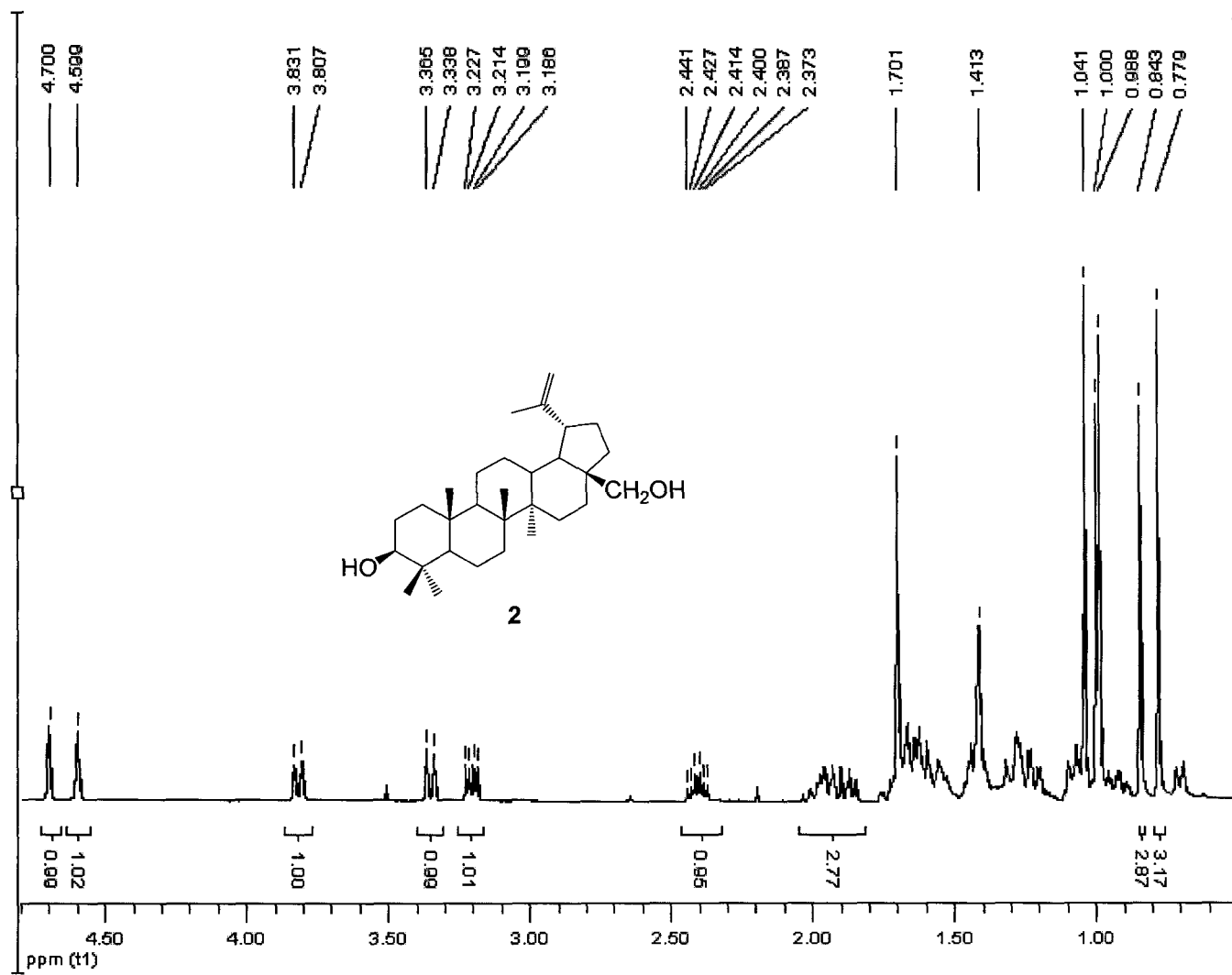
ANNEXE 5
SPECTRES RMN

 ^1H Lupéol (1)

¹³C Lupéol (1)

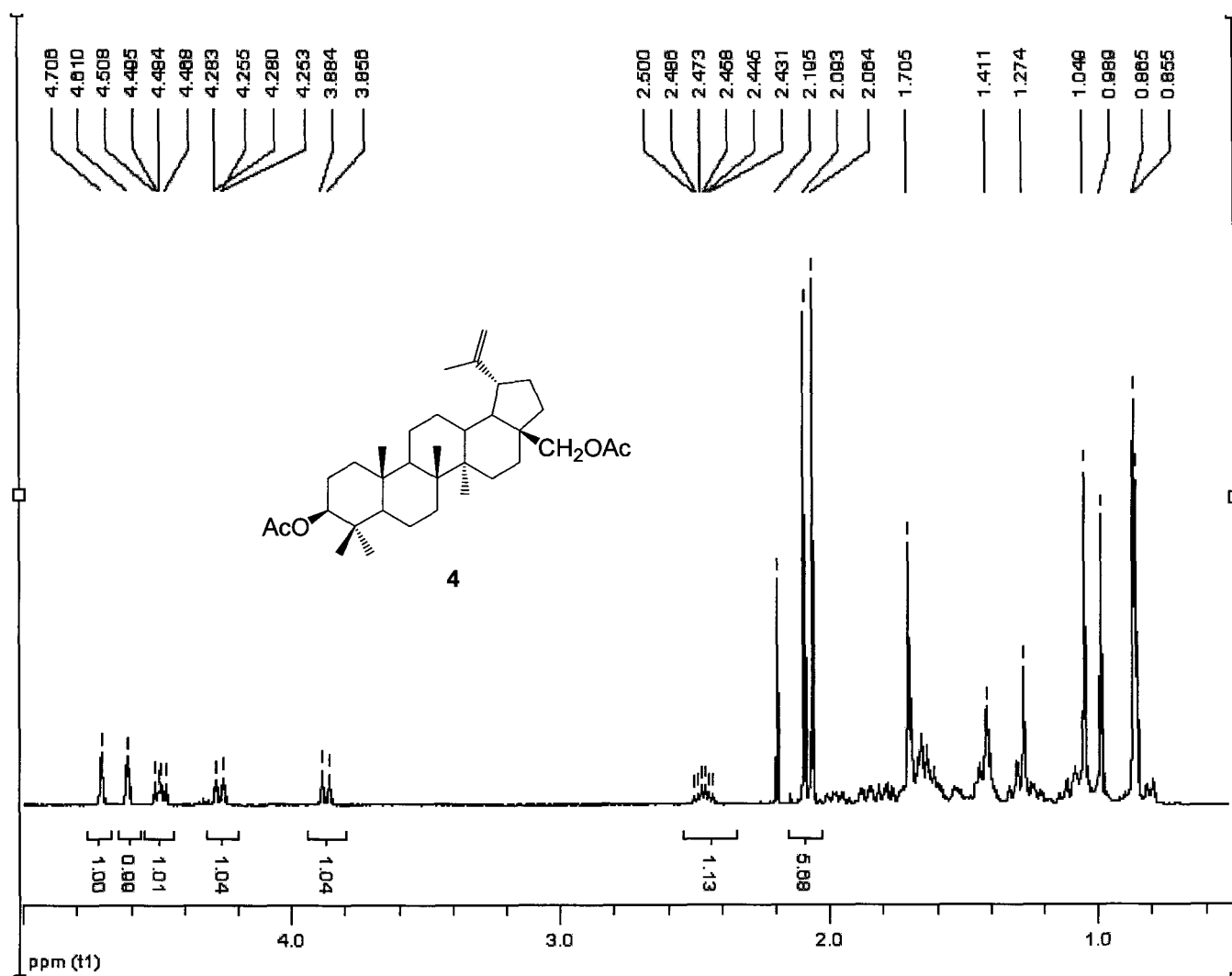


DEPT135 Lupéol (1)

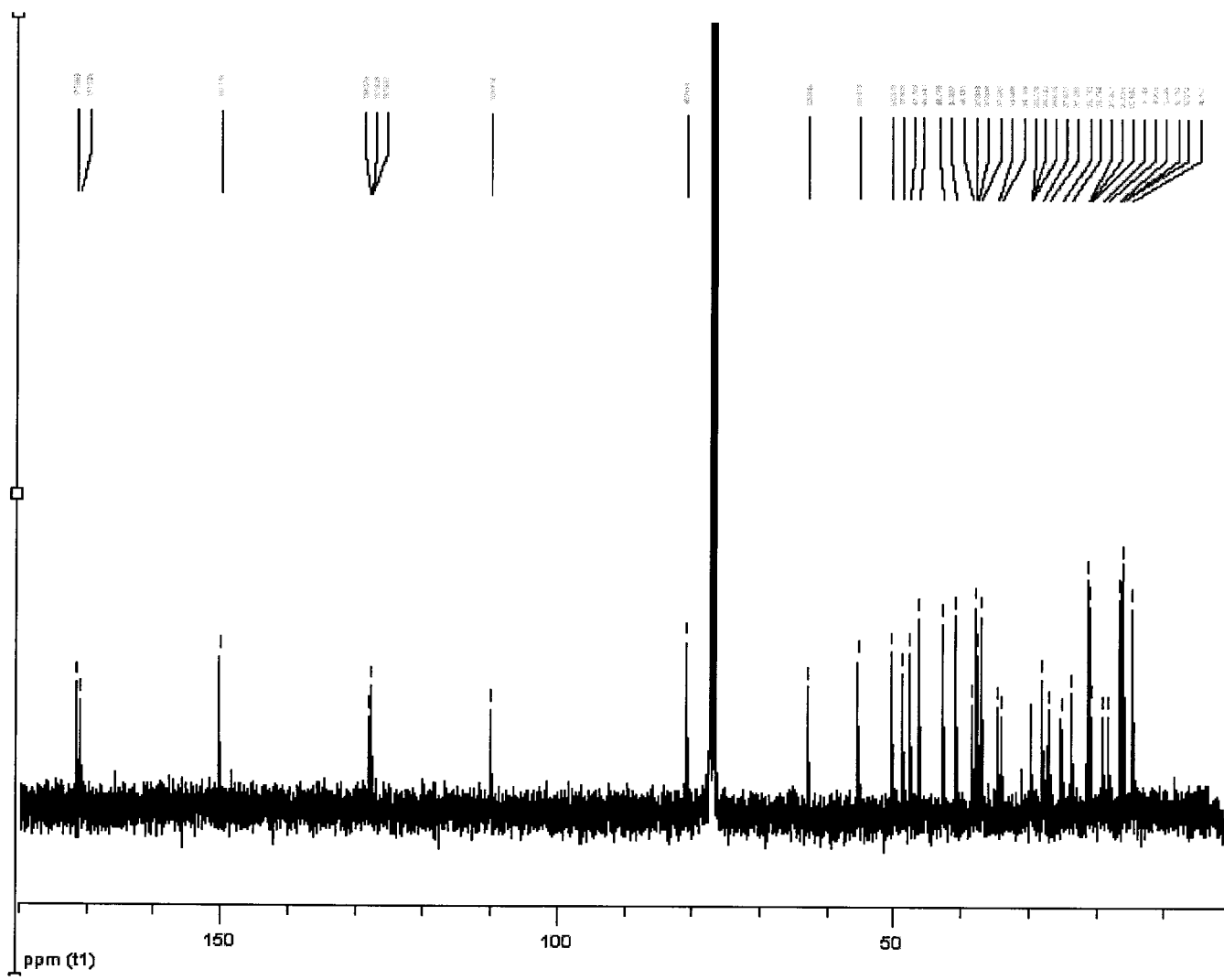


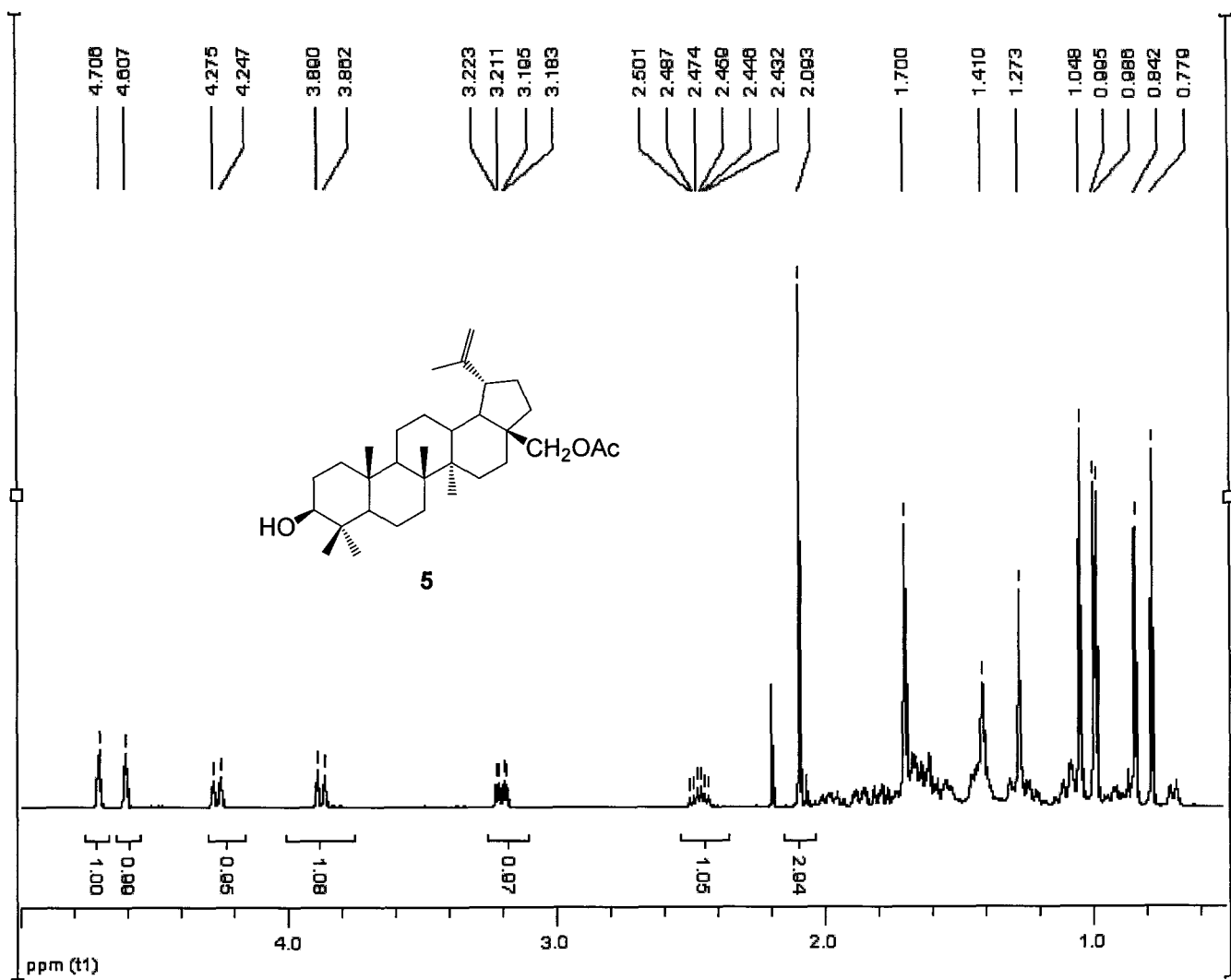
¹H Bétulinol (2)

¹³C Bétulinol (2)

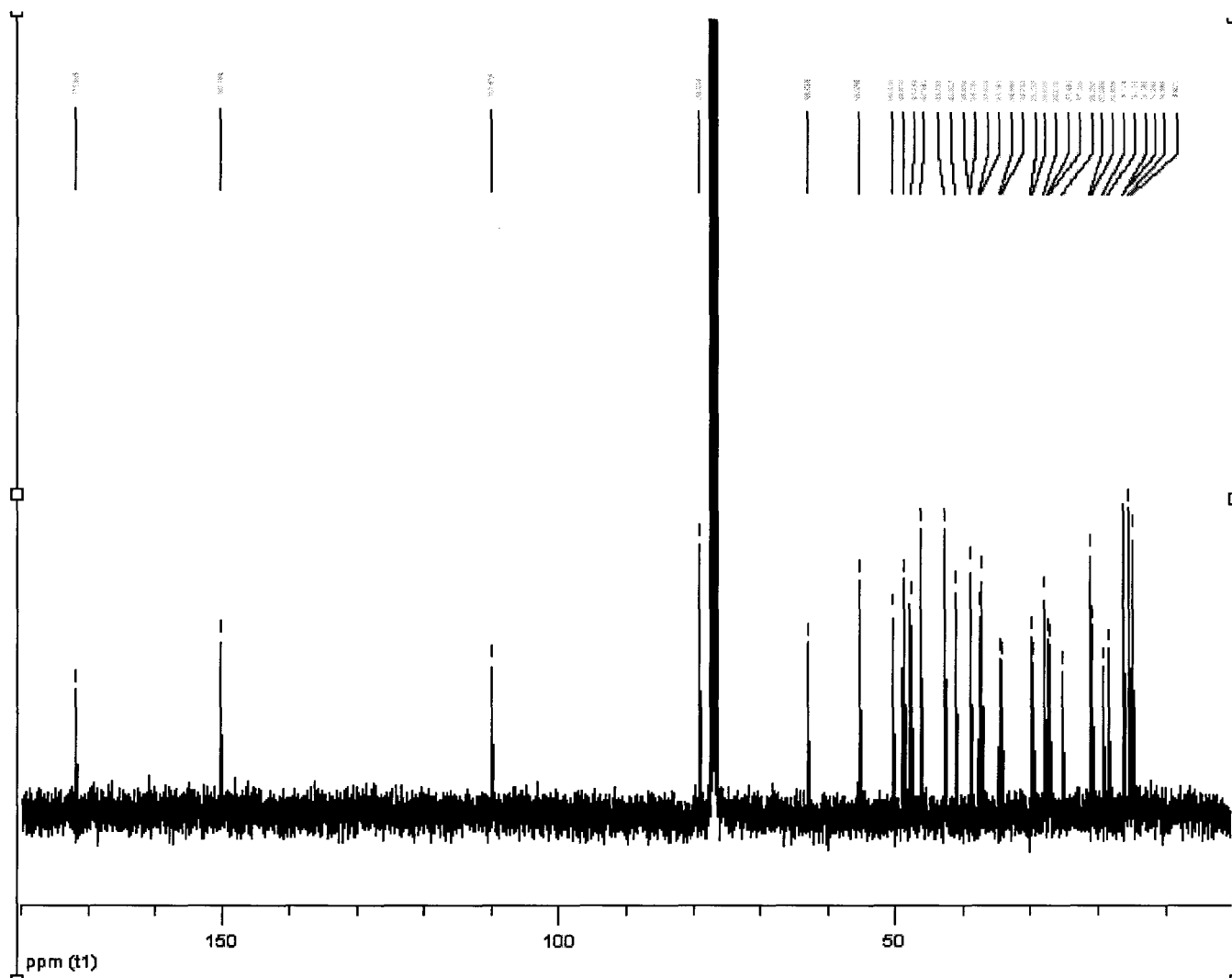


¹H 3,28-Diacetoxybétulinol (4)

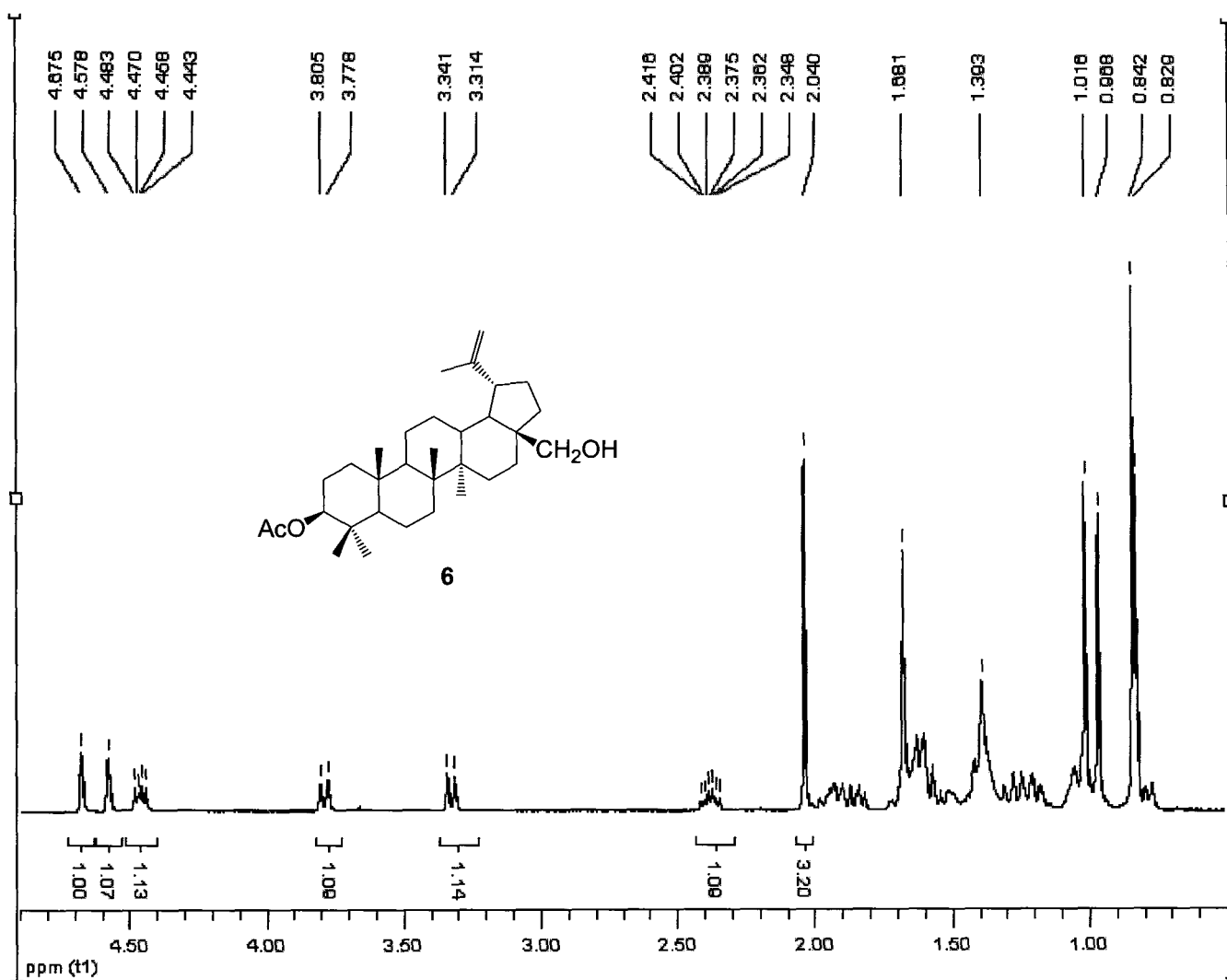


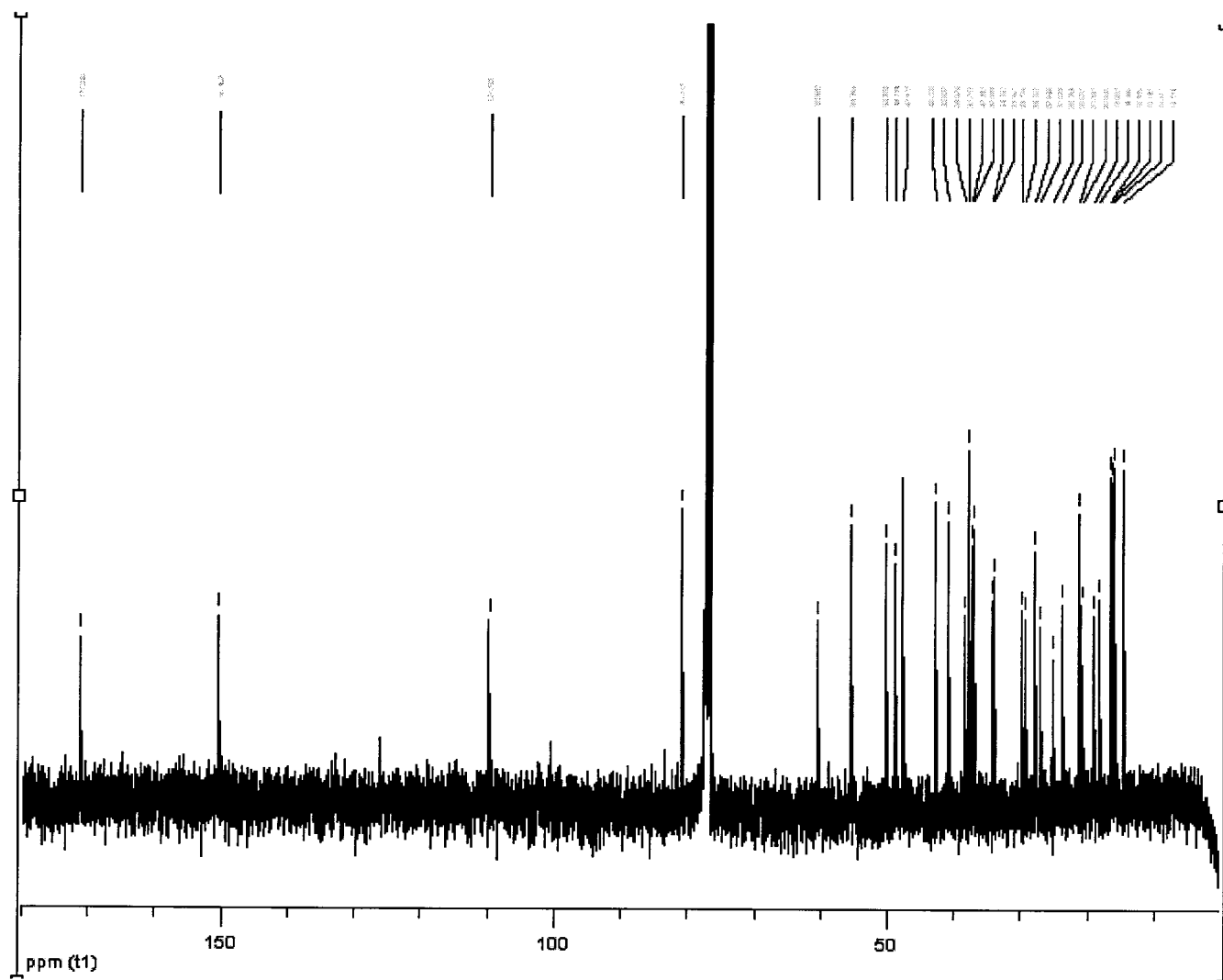


¹H 28-Acétóxybétulinol (5)

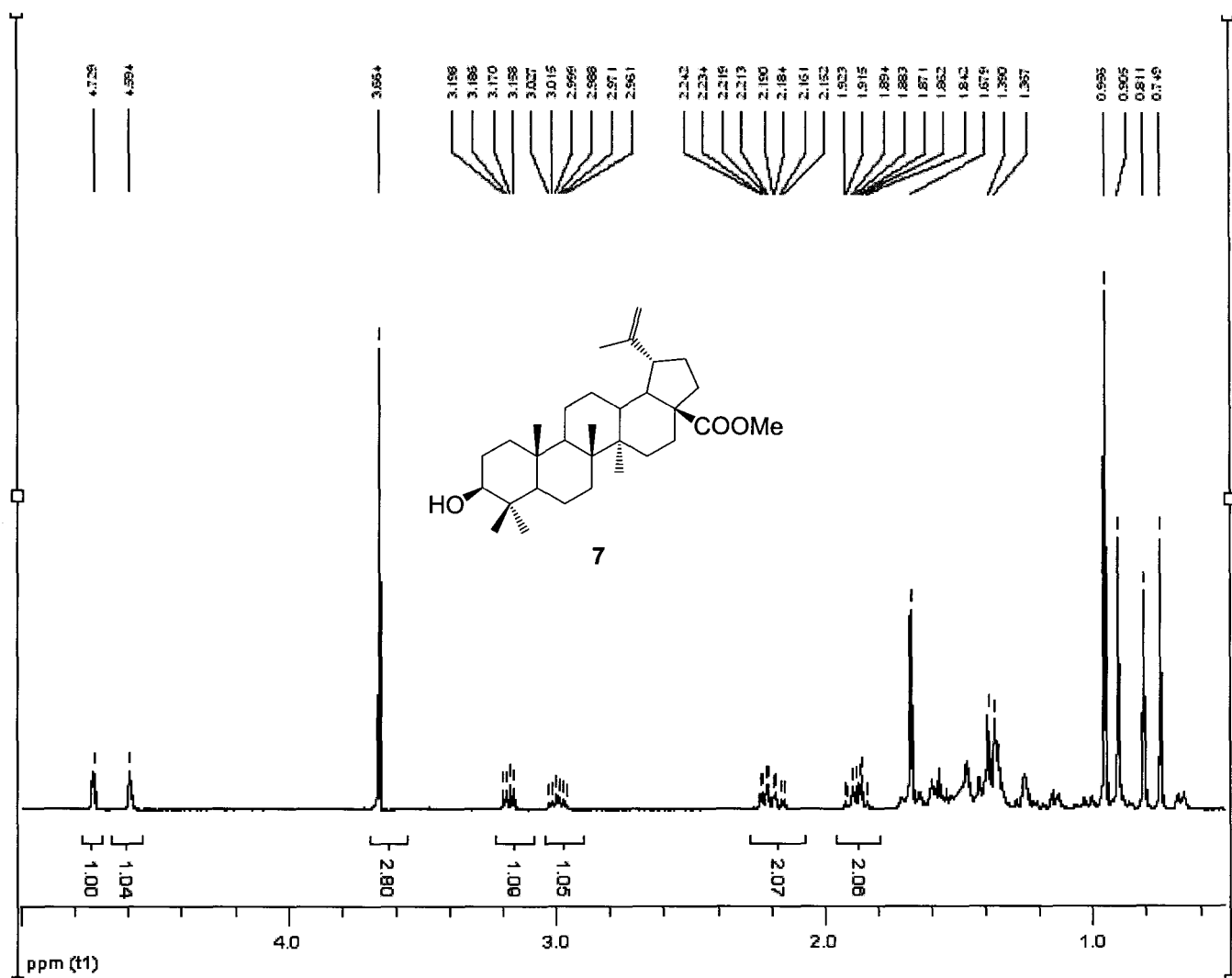


¹³C 28-Acét oxybétulinol (5)

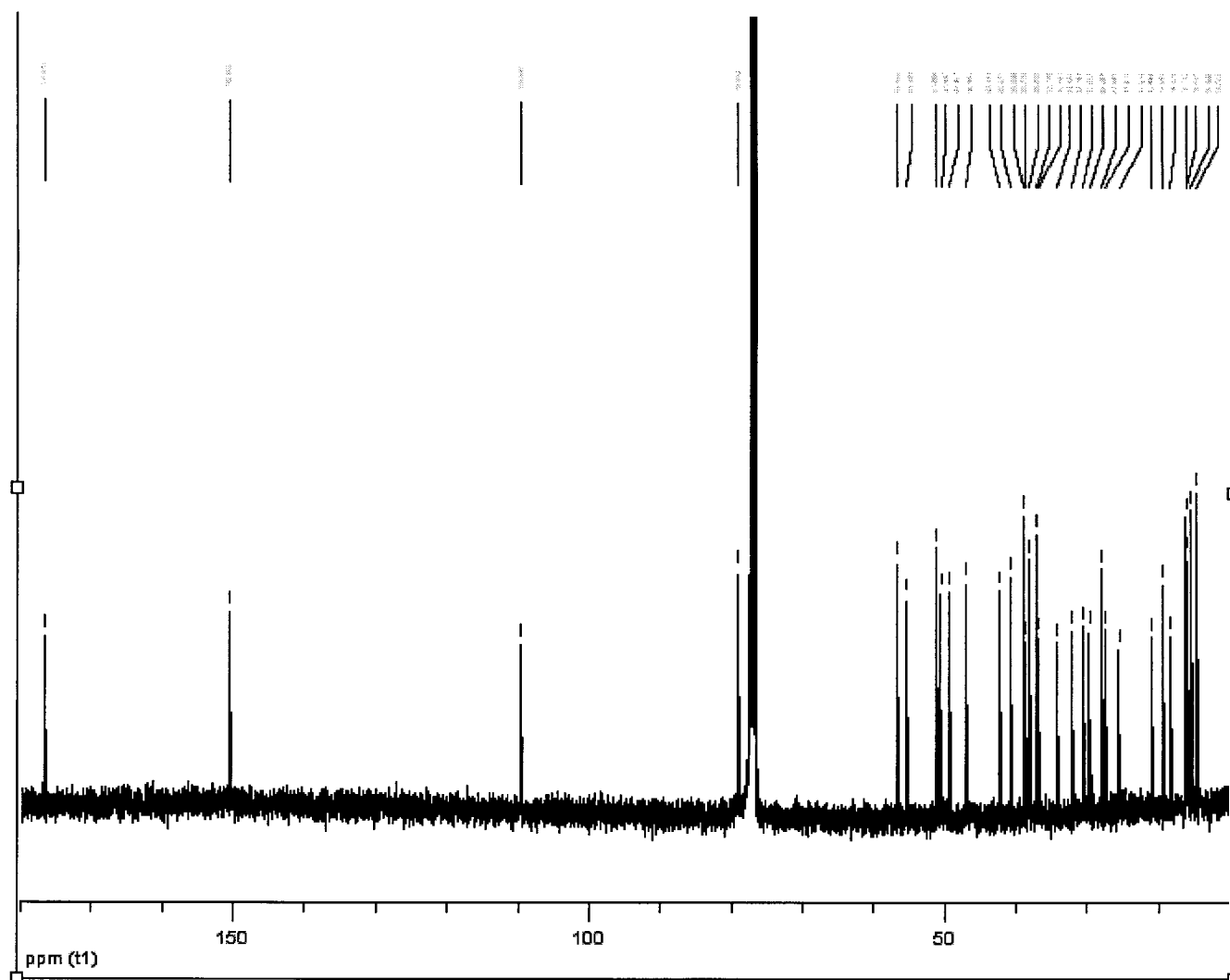
 ^1H 3-Acét oxybétulinol (6)

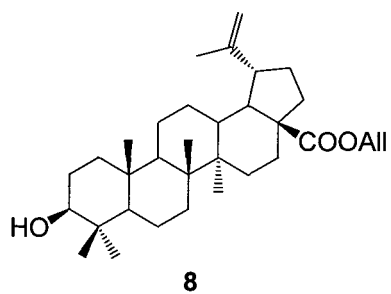


^{13}C 3-Acétoxybétulinol (6)

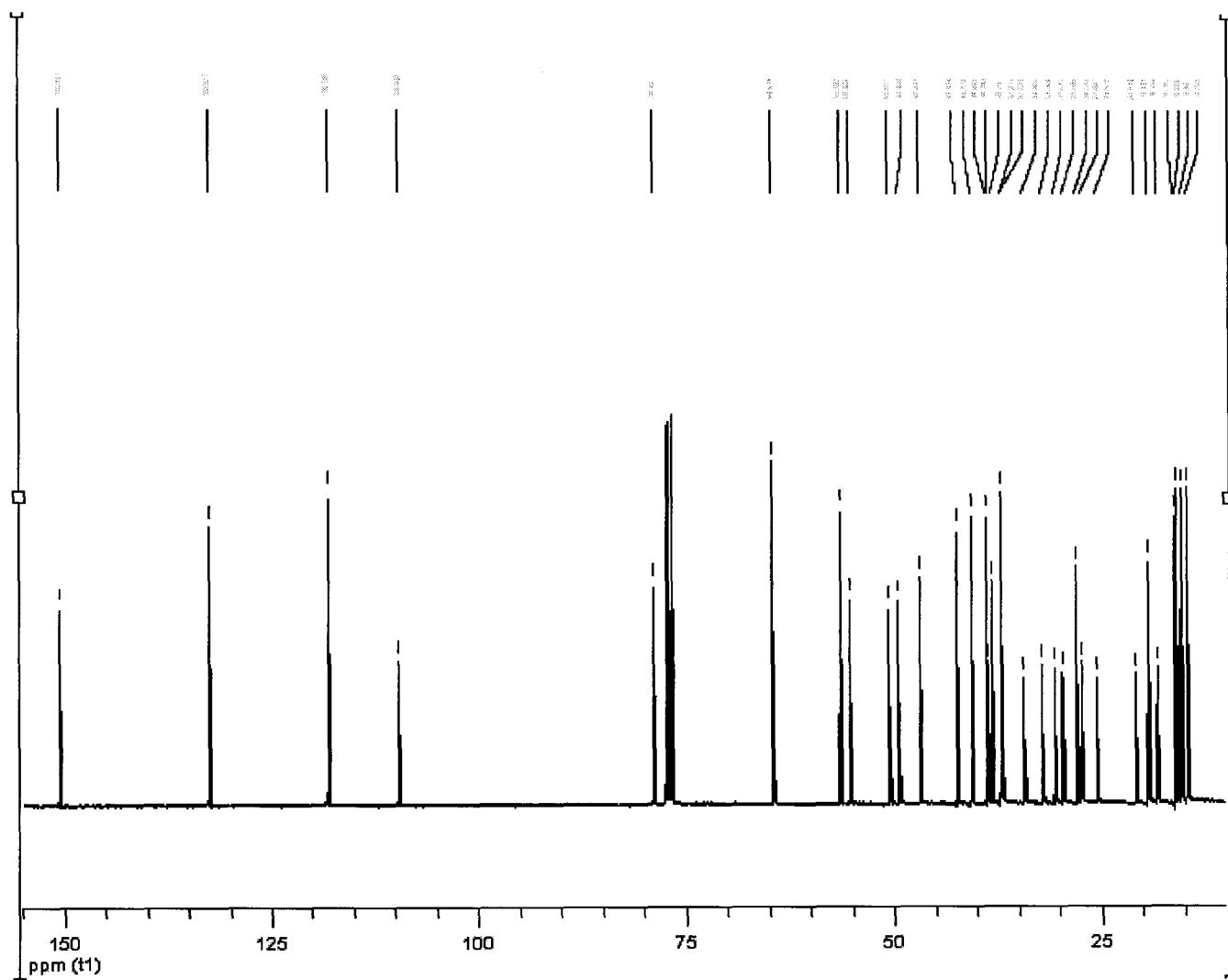


^1H Bétulinate de méthyle (7)

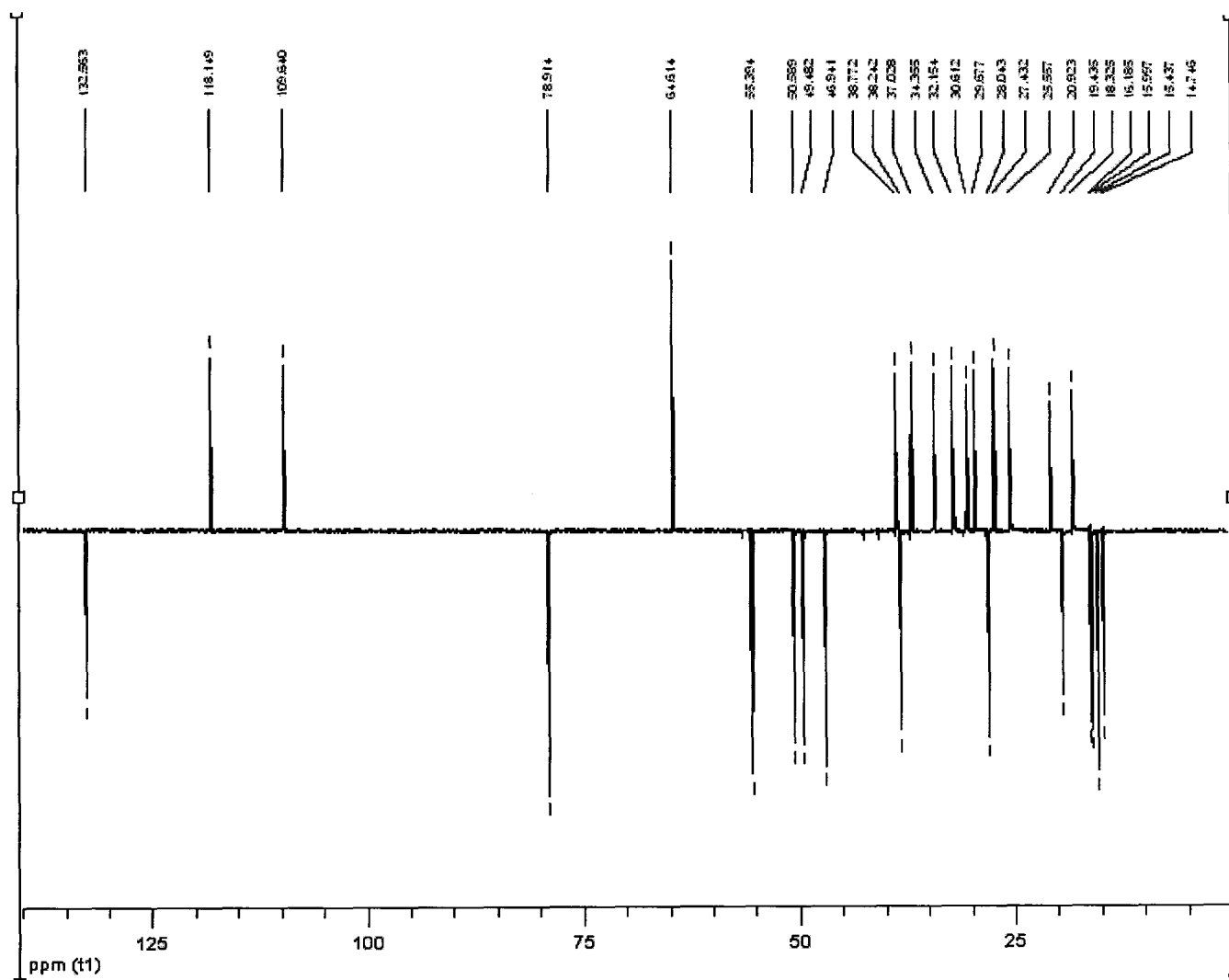




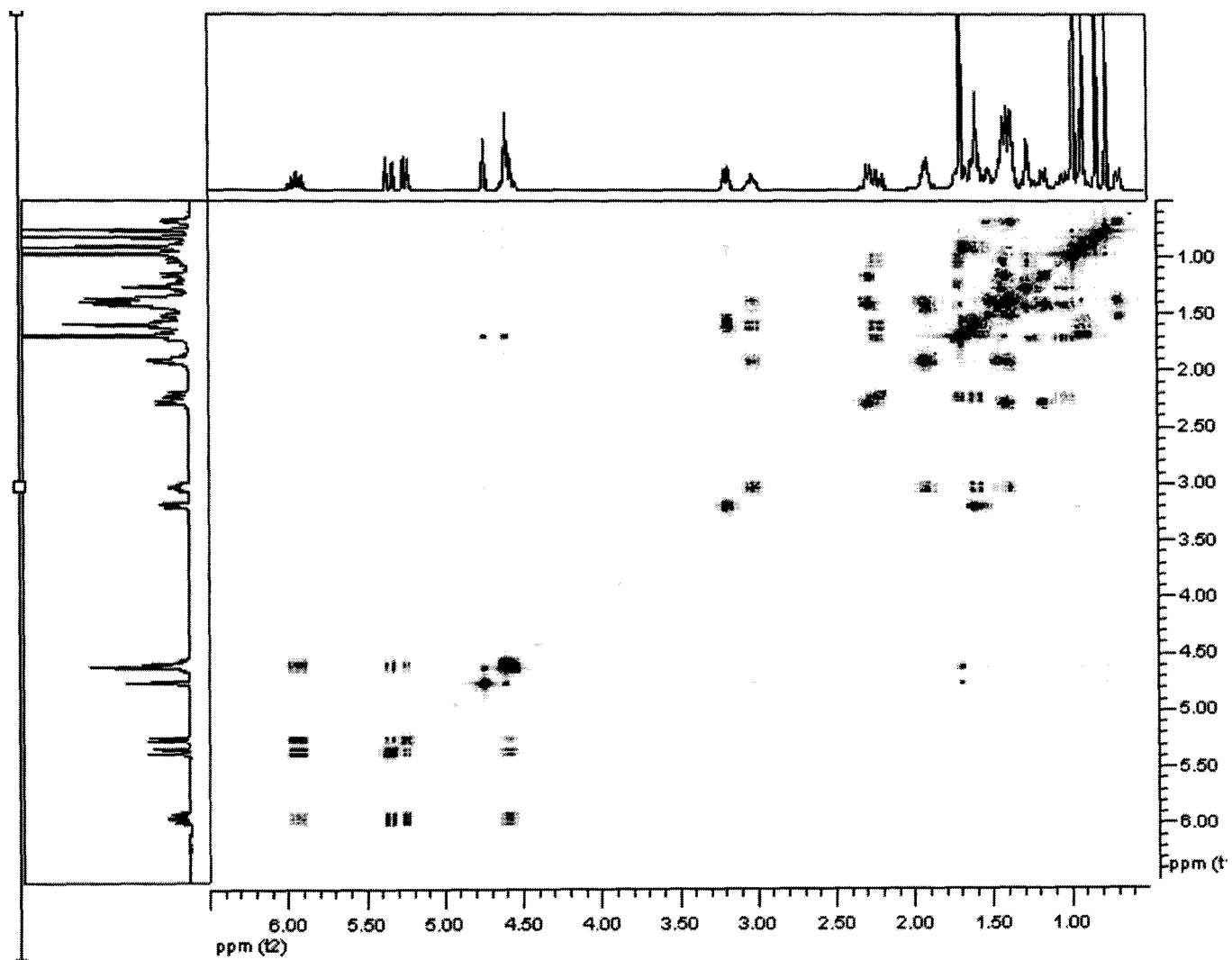
¹H Bétulinate d'allyle (8)



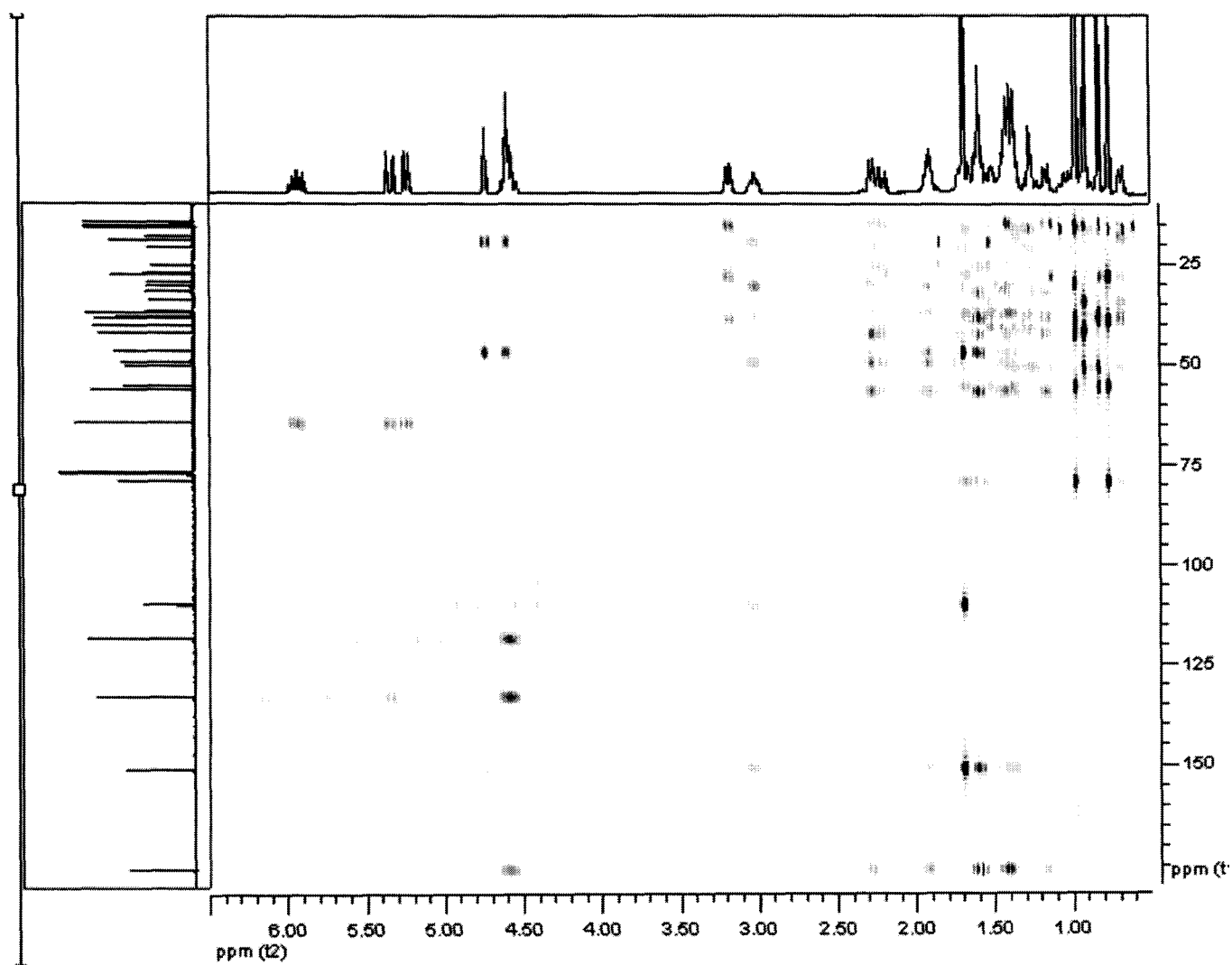
¹³C Bétulinate d'allyle (8)



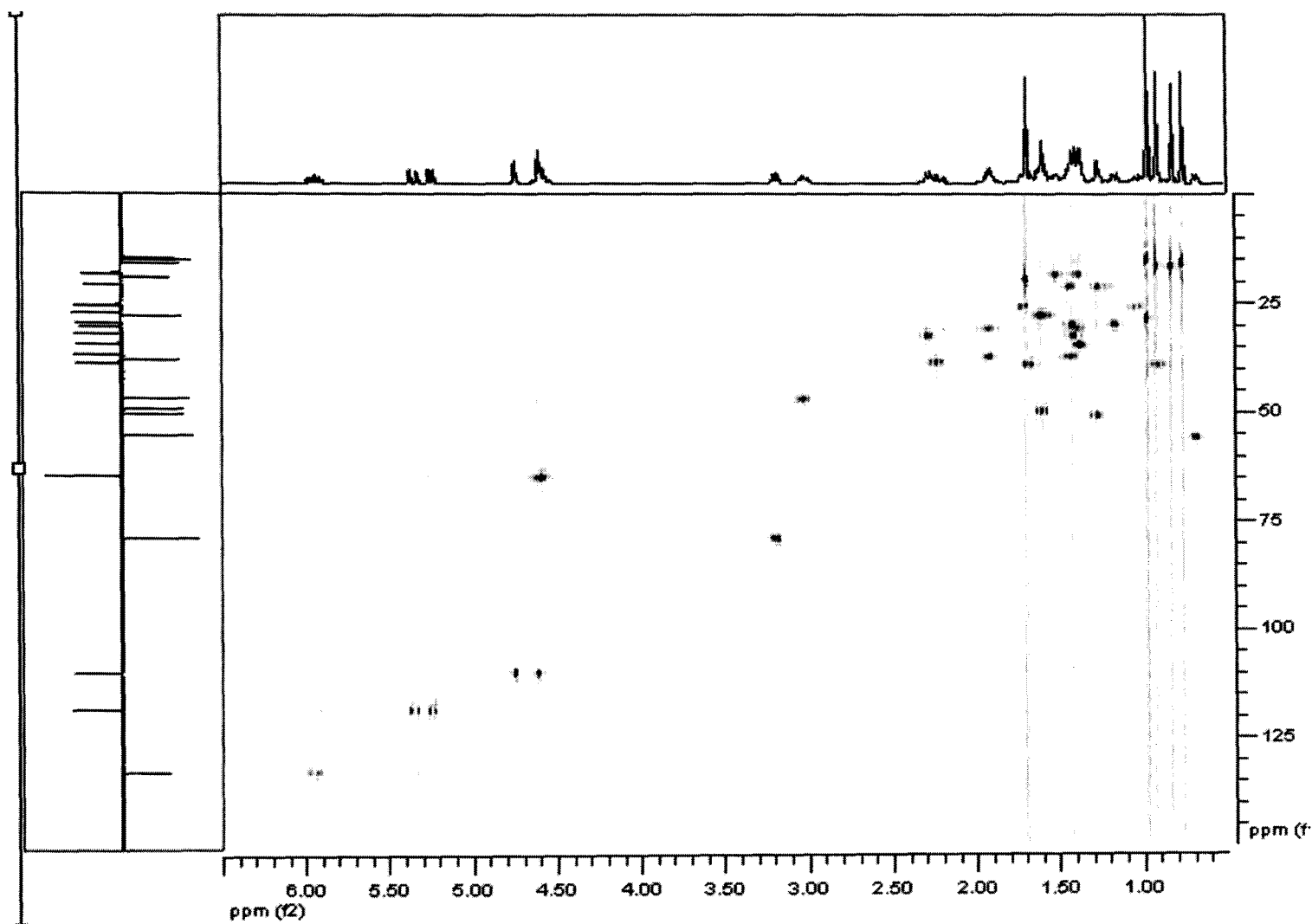
DEPT135 Bétulinate d'allyle (8)



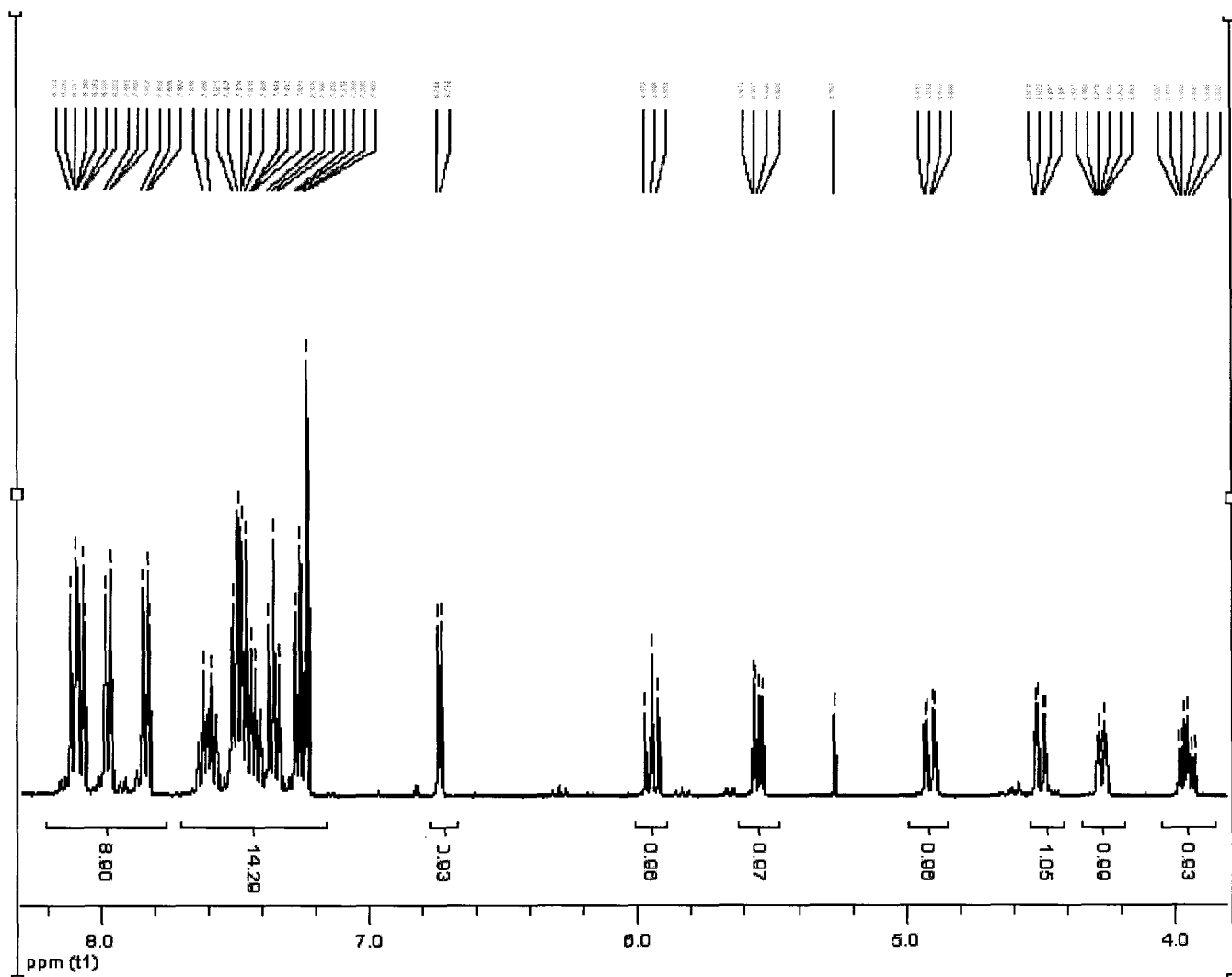
COSY Bétulinate d'allyle (8)



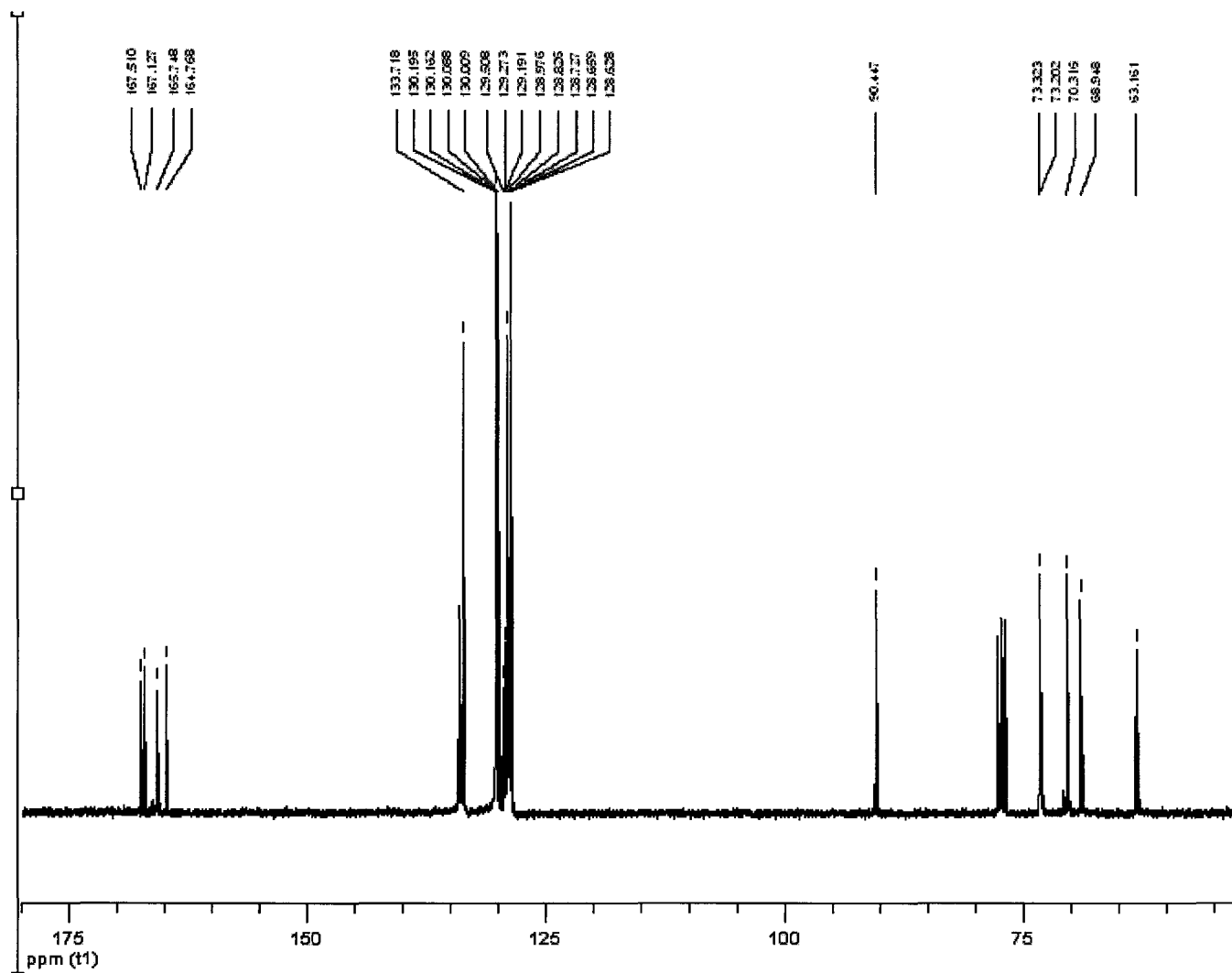
HMBC Bétulinate d'allyle (8)



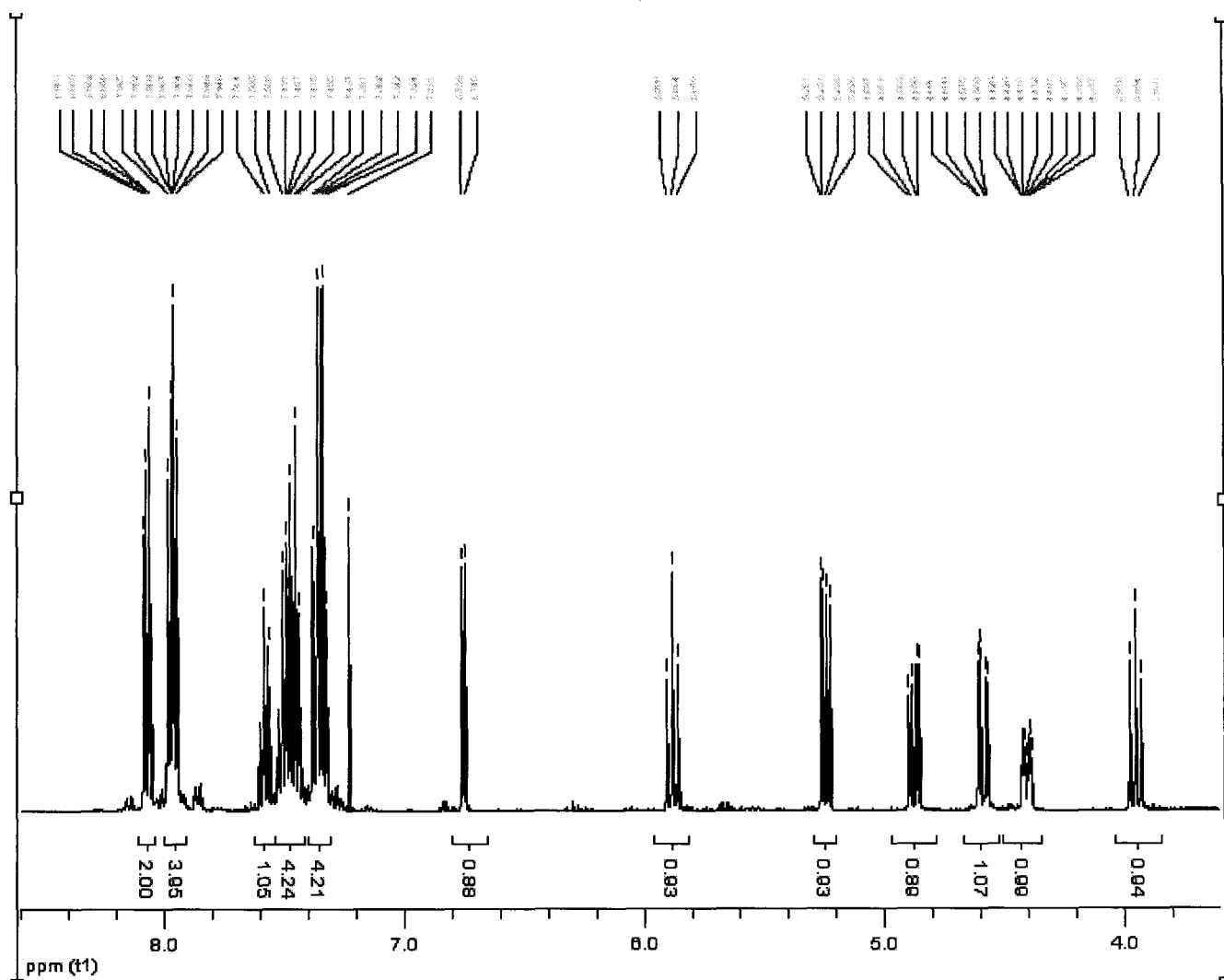
HSQC Bétulinate d'allyle (8)



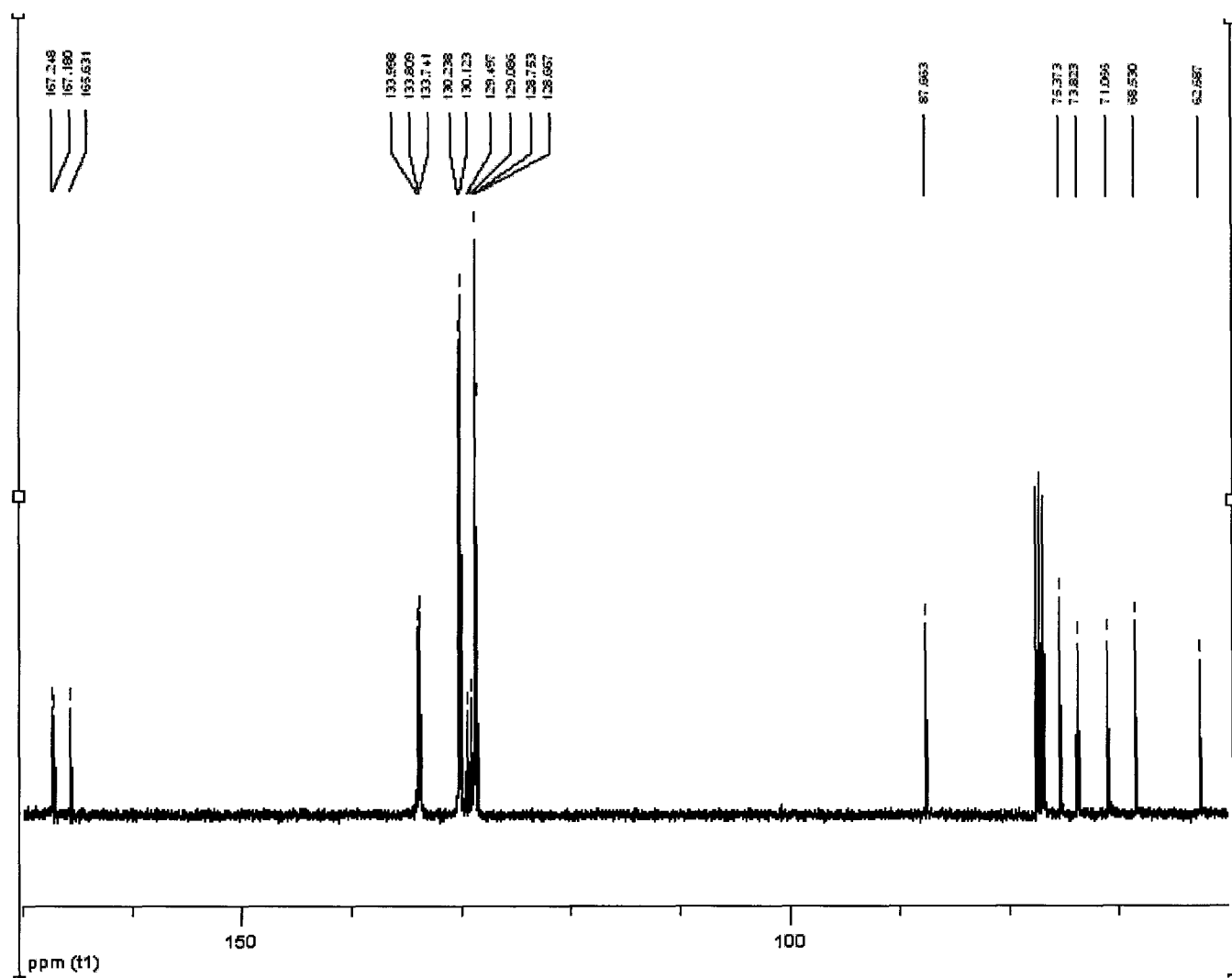
¹H 1,2,3,4,6-penta-O-benzoyl-α,β-D-glucopyranose (24)



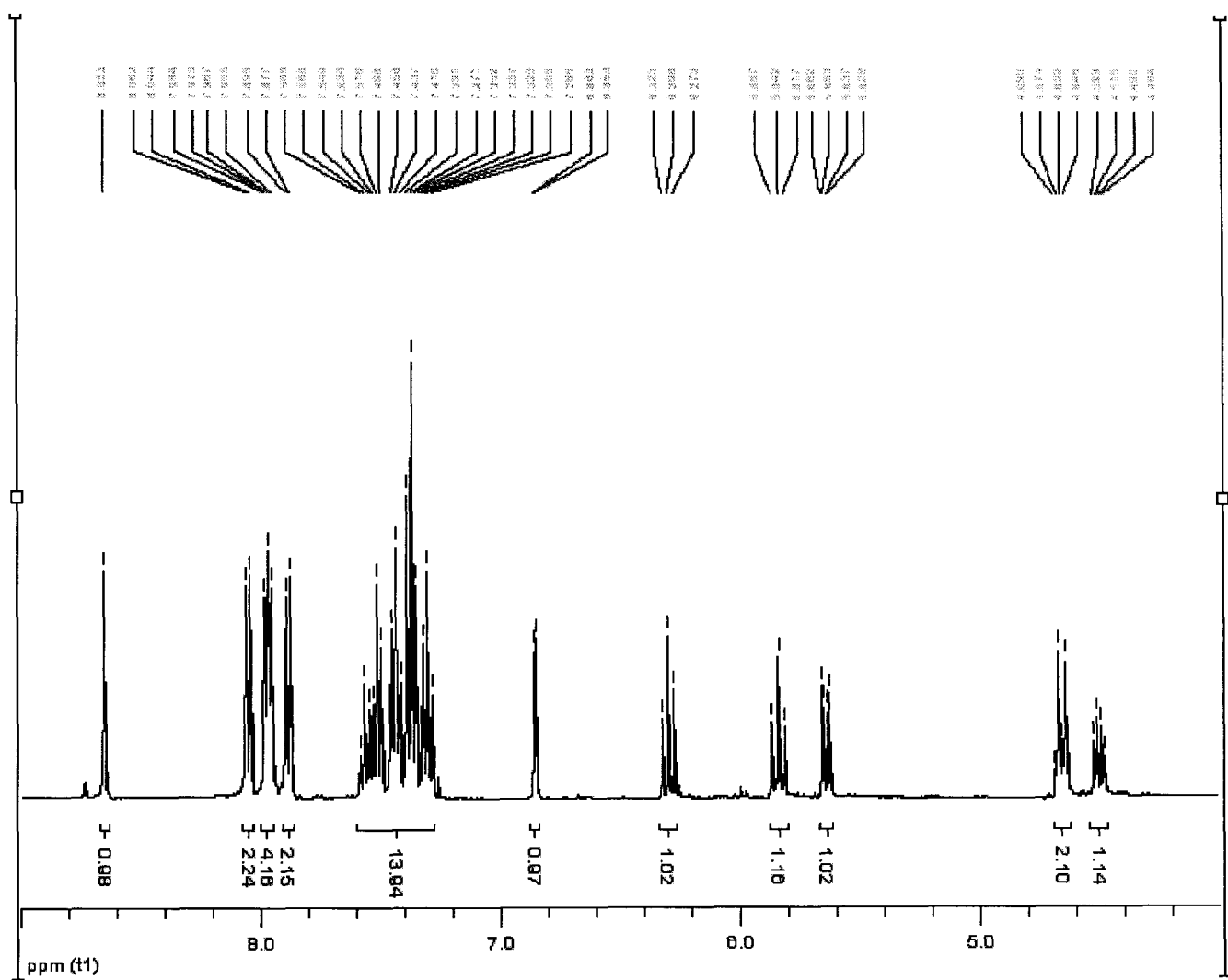
¹³C 1,2,3,4,6-penta-O-benzoyl-α,β-D-glucopyranose (24)



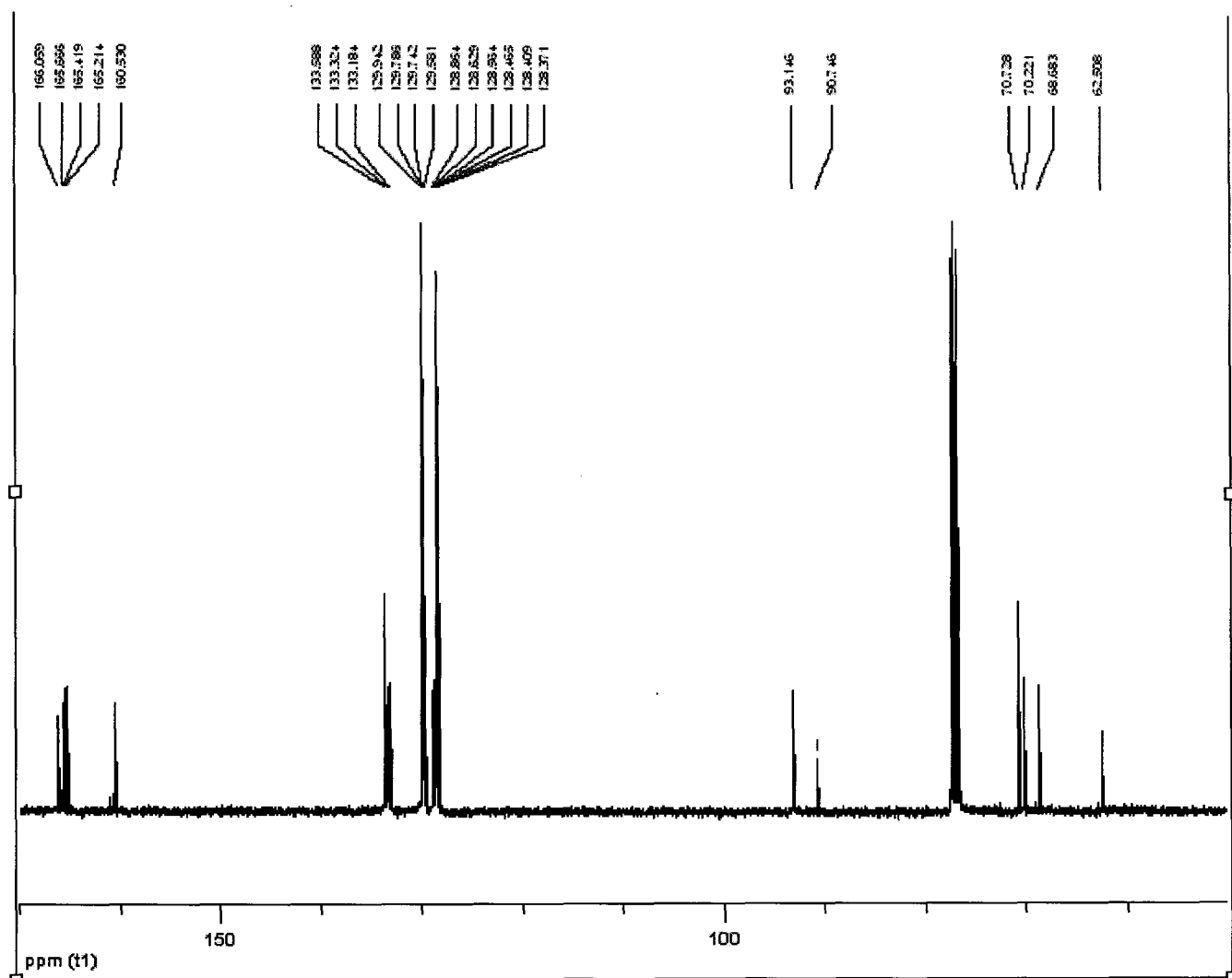
¹H 2,3,4,6-tétra-O-benzoyl-α,β-D-glucopyranose (25)



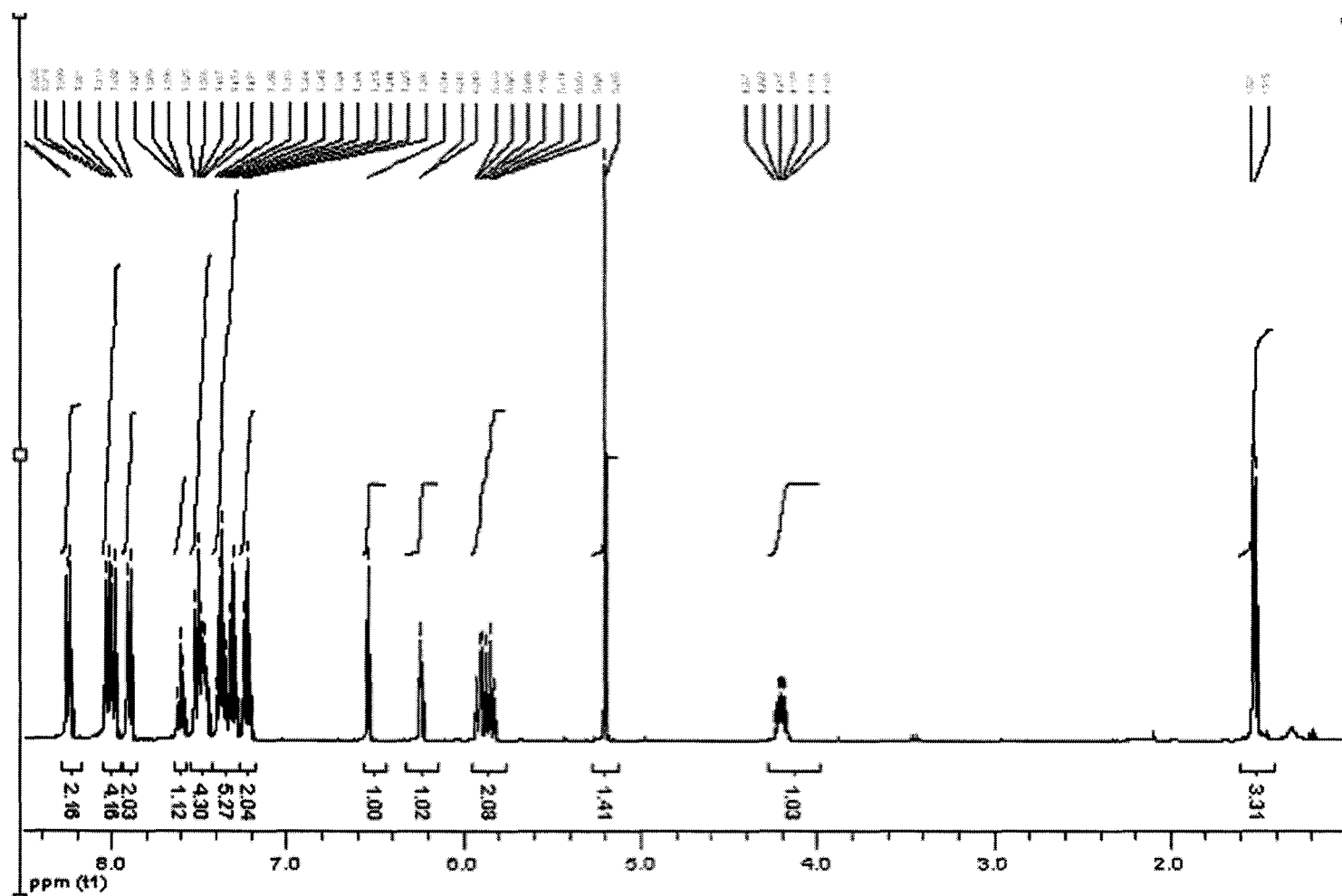
¹³C 2,3,4,6-tétra-O-benzoyl-α,β-D-glucopyranose (25)



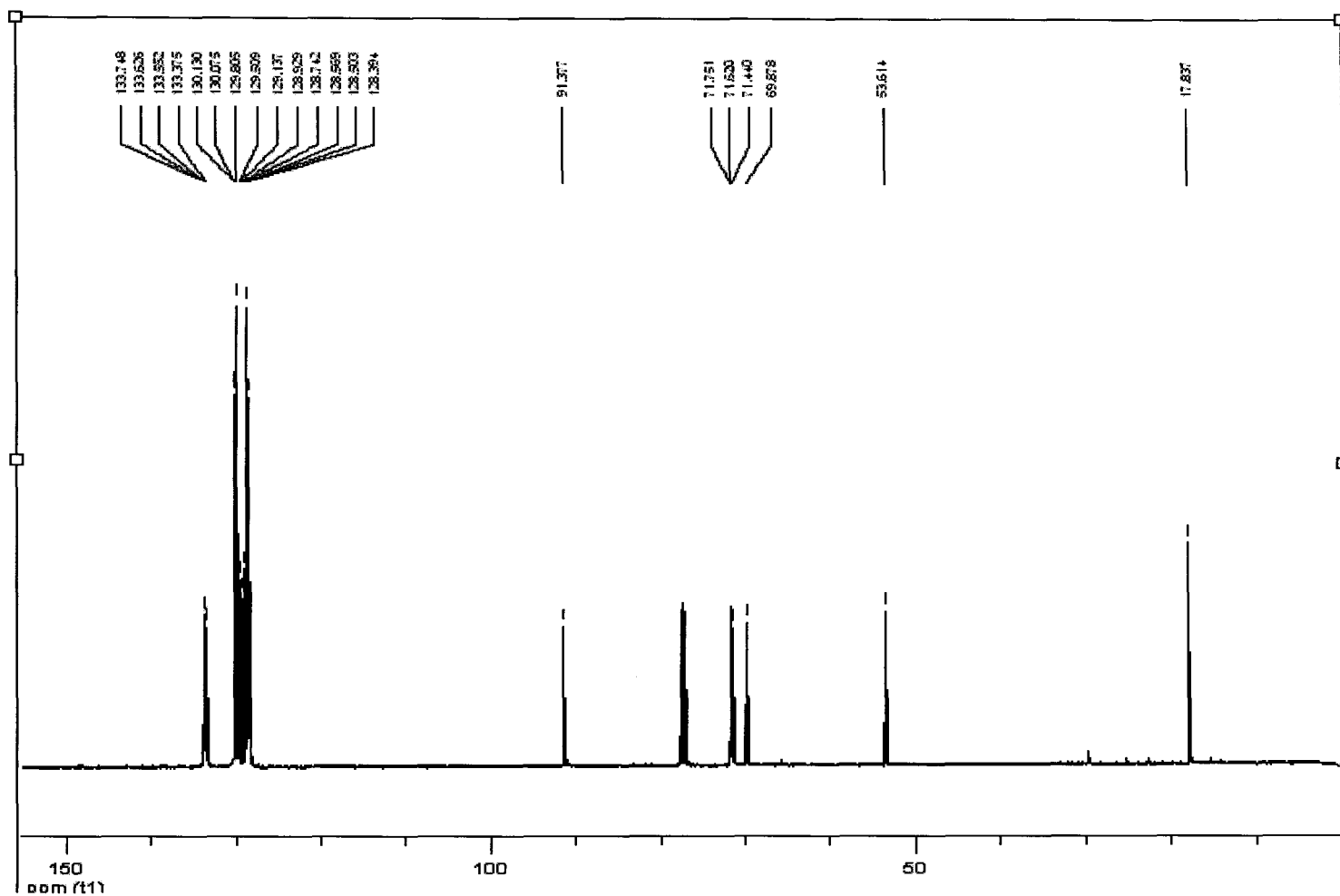
^1H 2,3,4,6-tétra-O-benzoyl- α -D-glucopyranose trichloroacétimide (**26**)



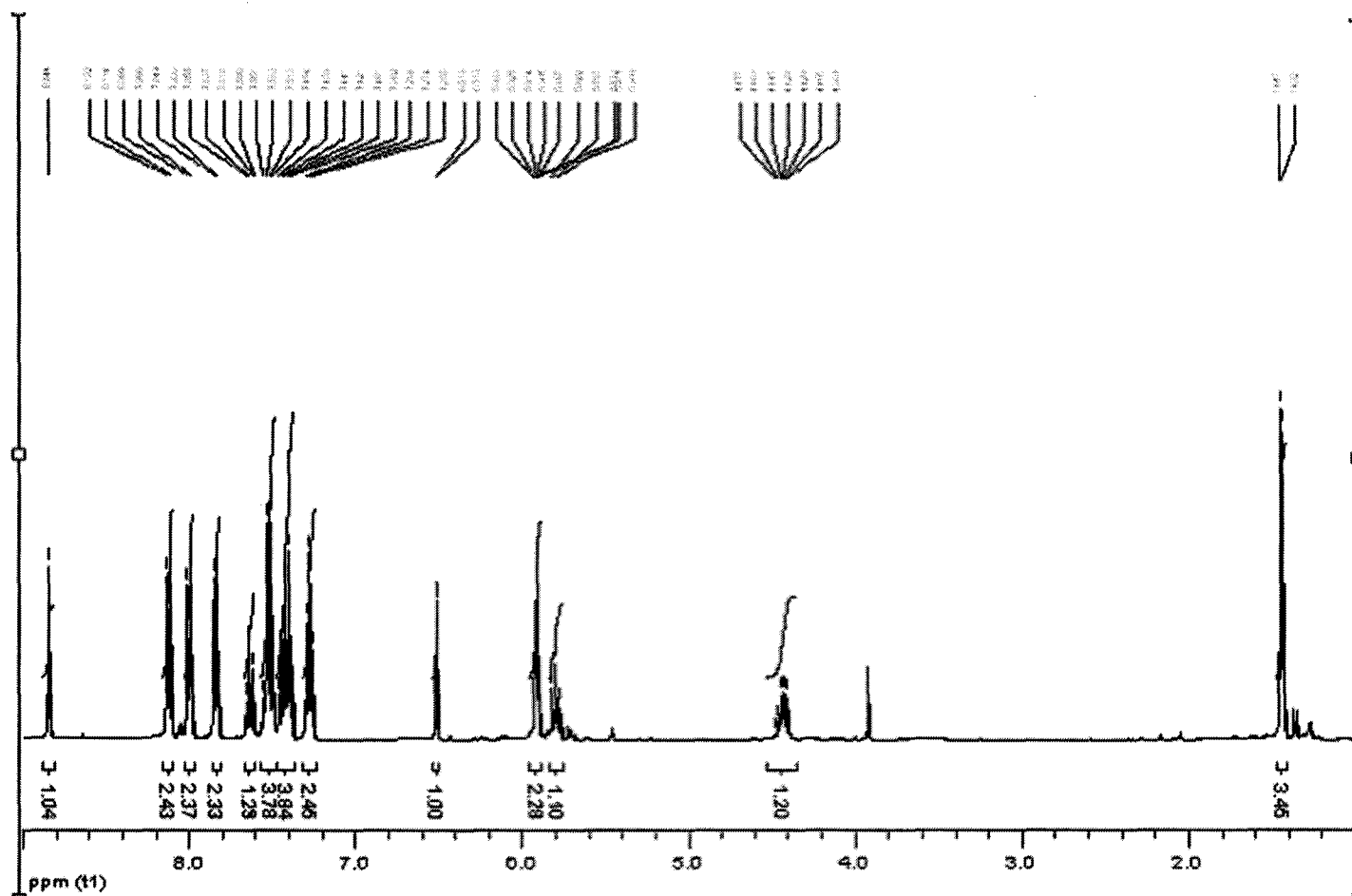
¹³C 2,3,4,6-tétra-O-benzoyl-α-D-glucopyranose trichloroacétimide (26)



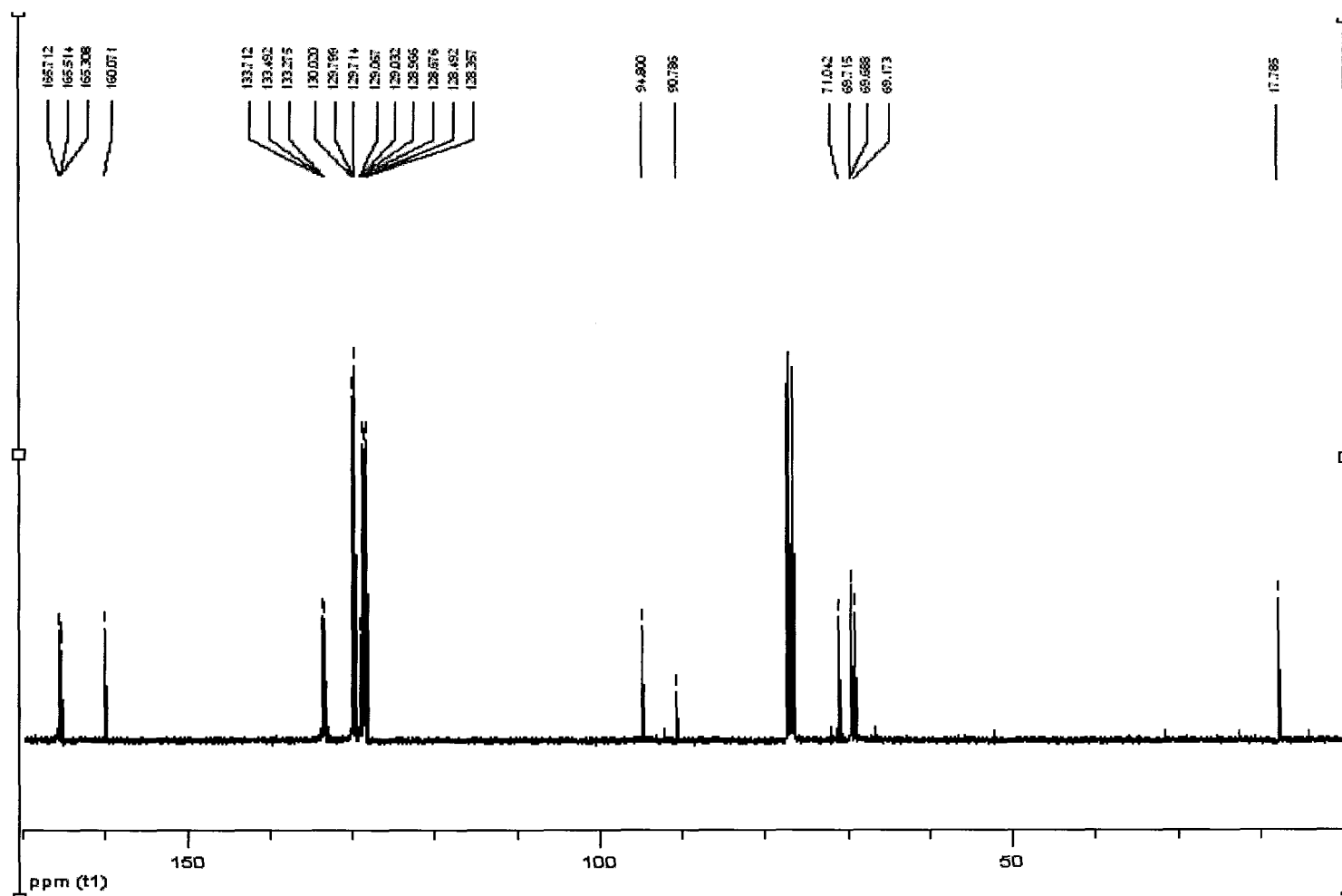
¹H 1,2,3,4-tétra-O-benzoyl- α,β -L-rhamnopyranose (**27**)



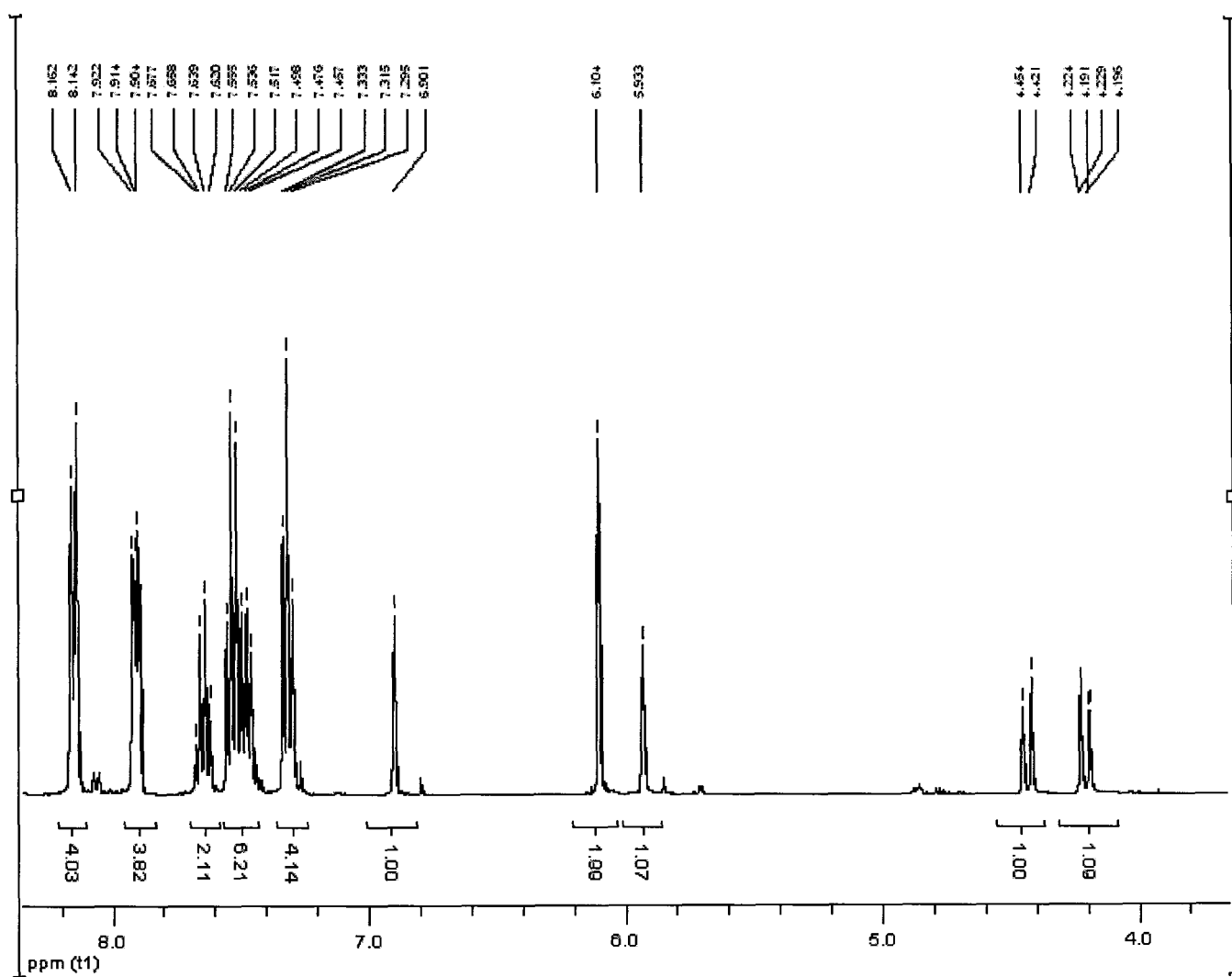
¹³C 1,2,3,4-tétra-O-benzoyl- α,β -L-rhamnopyranose (27)



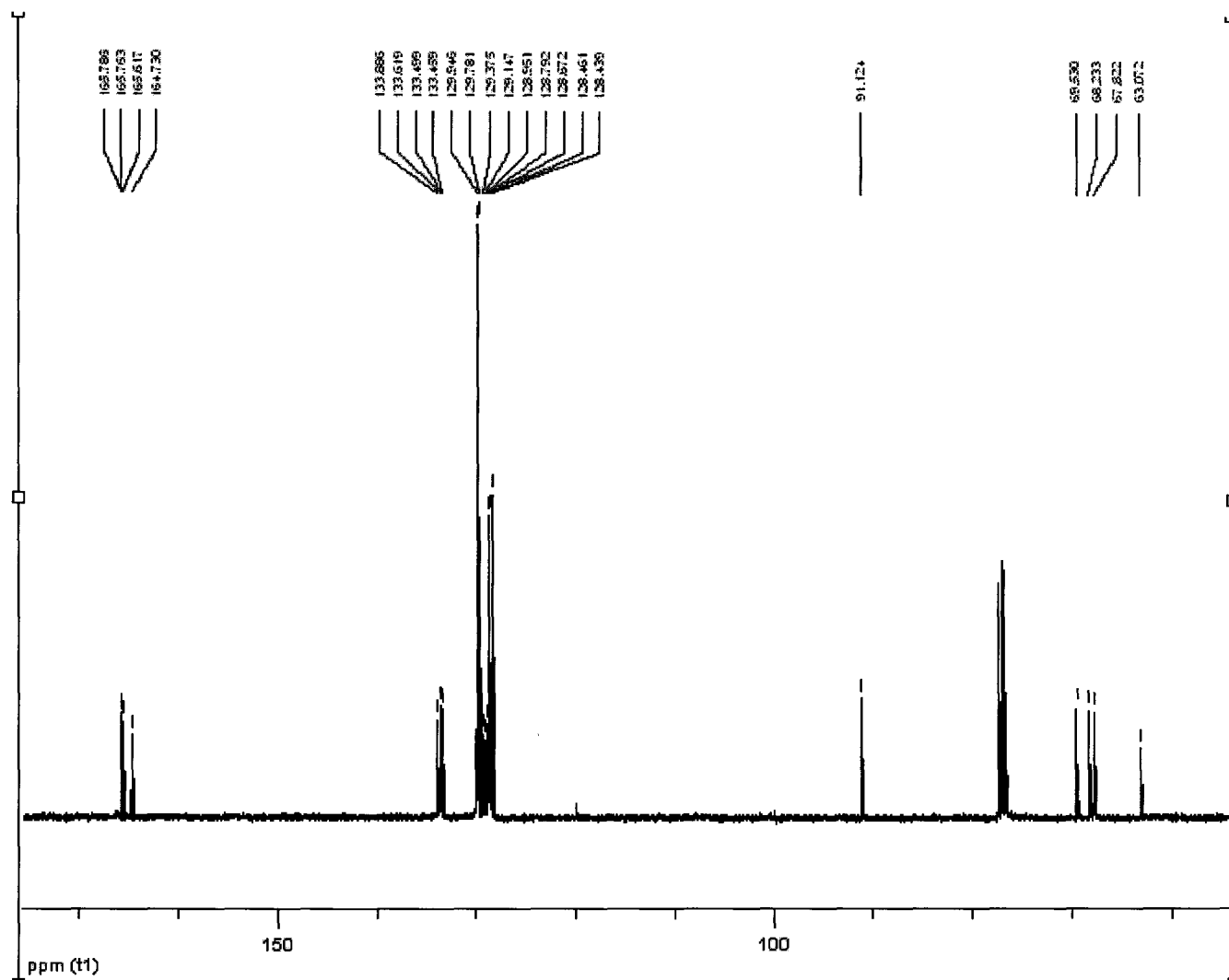
¹H 2,3,4-tri-O-benzoyl-α-L-rhamnopyranose trichloroacétimide (28)



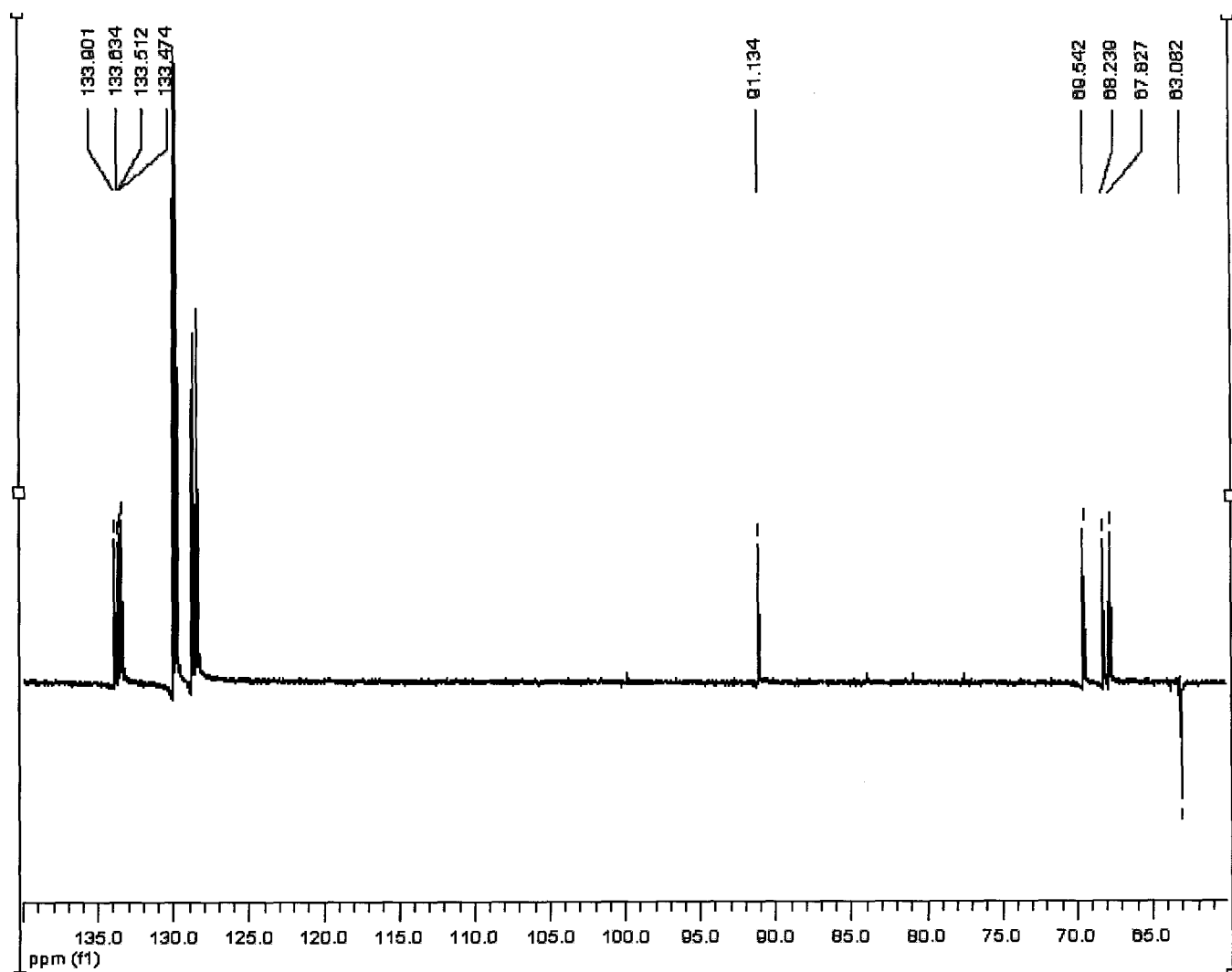
¹³C 2,3,4-tri-O-benzoyl-α-L-rhamnopyranose trichloroacétimide (28)



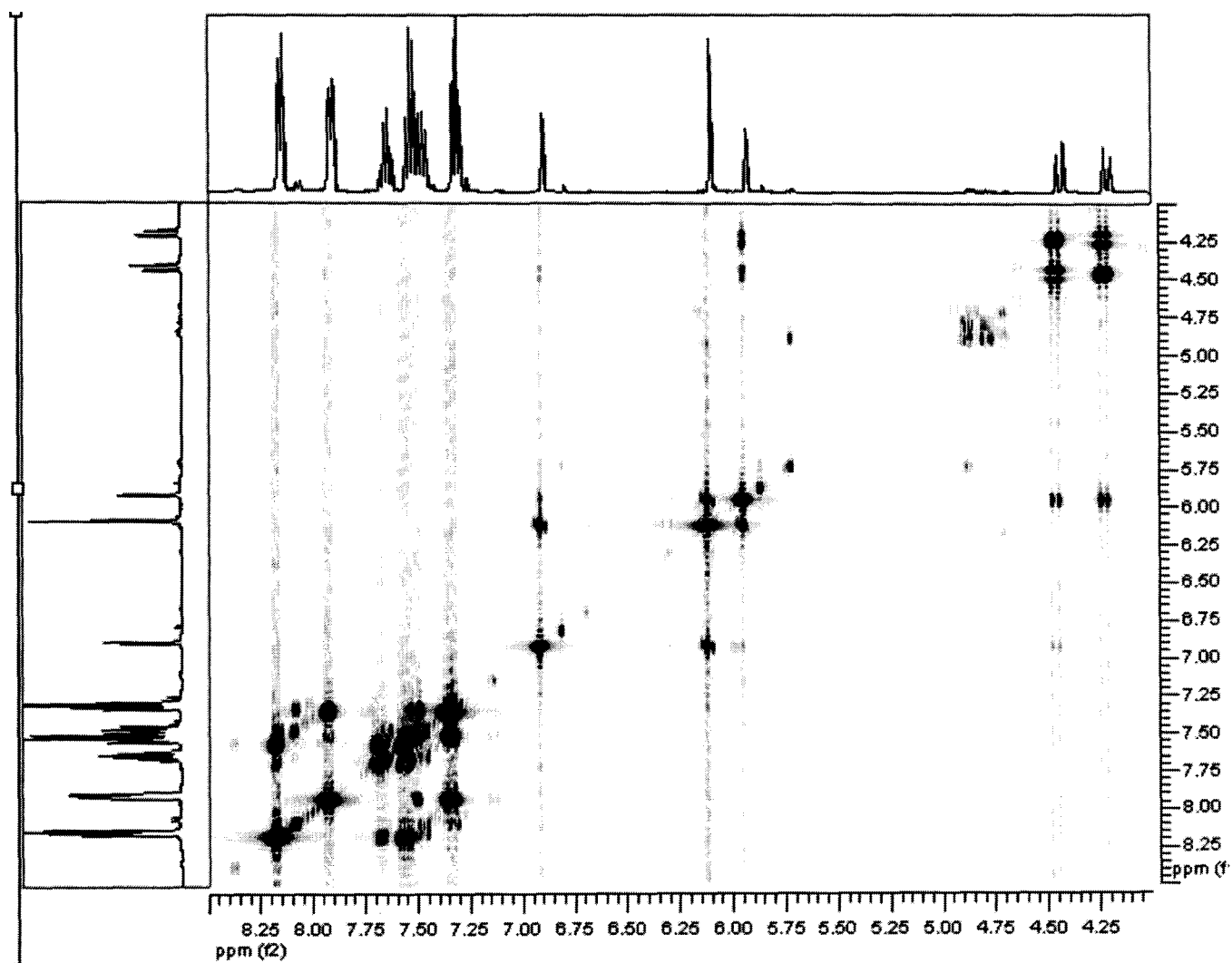
¹H 1,2,3,4-tétra-O-benzoyl-α,β-D-arabinopyranose (29)



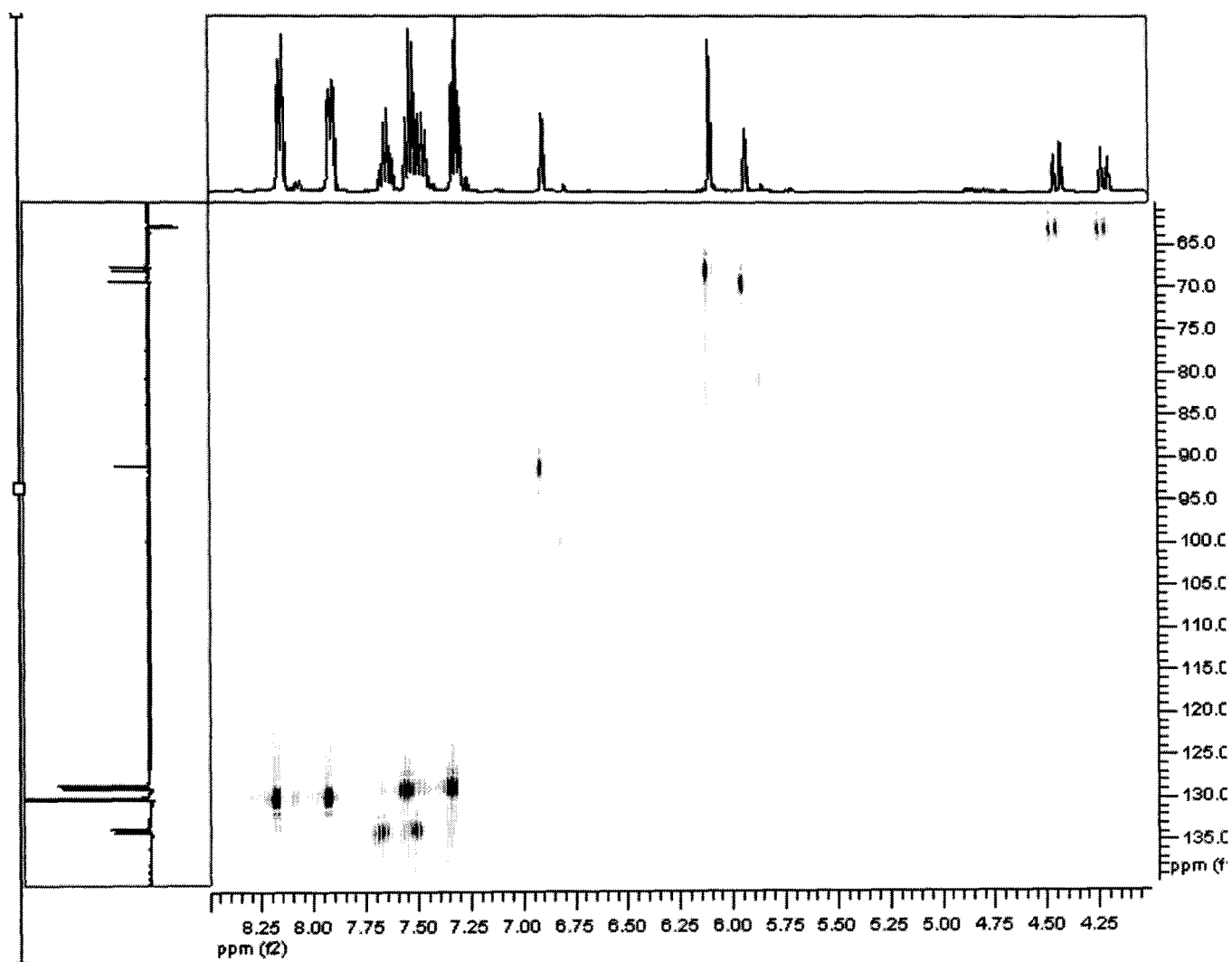
¹³C 1,2,3,4-tétra-O-benzoyl-α,β-D-arabinopyranose (29)



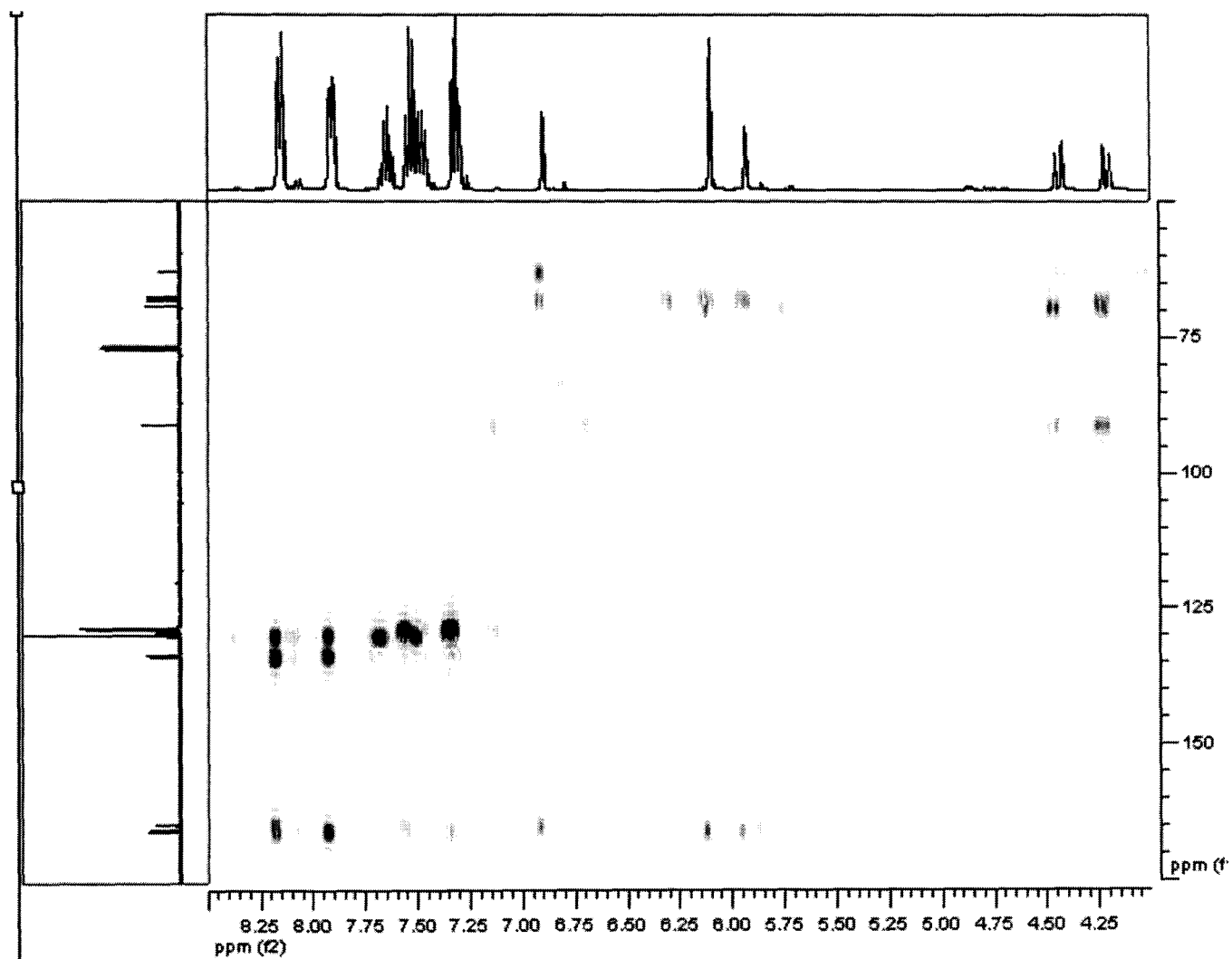
DEPT135 1,2,3,4-tétra-O-benzoyl- α,β -D-arabinopyranose (**29**)



COSY 1,2,3,4-tétra-O-benzoyl- α,β -D-arabinopyranose (**29**)

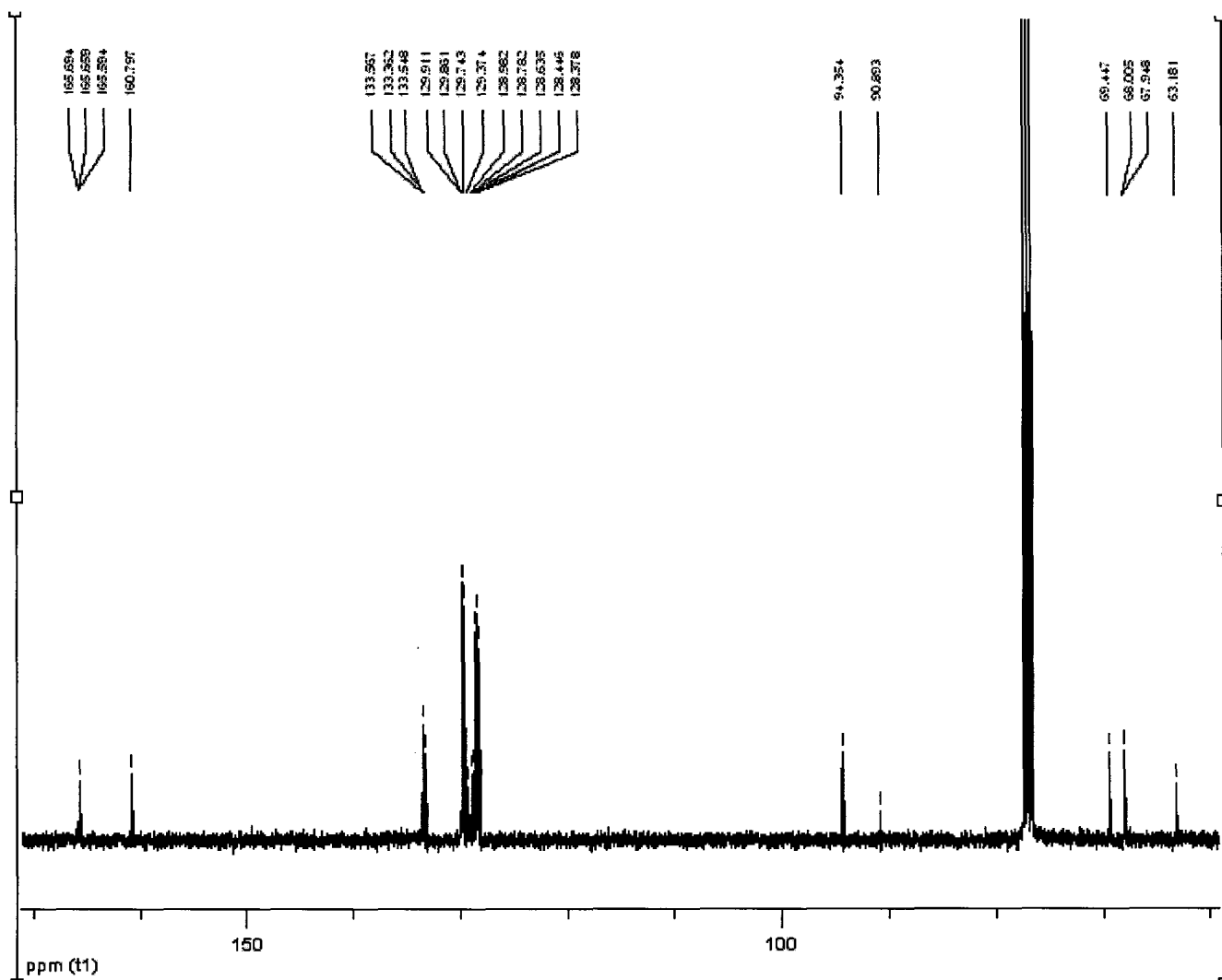


HSQC 1,2,3,4-tétra-O-benzoyl- α,β -D-arabinopyranose (**29**)

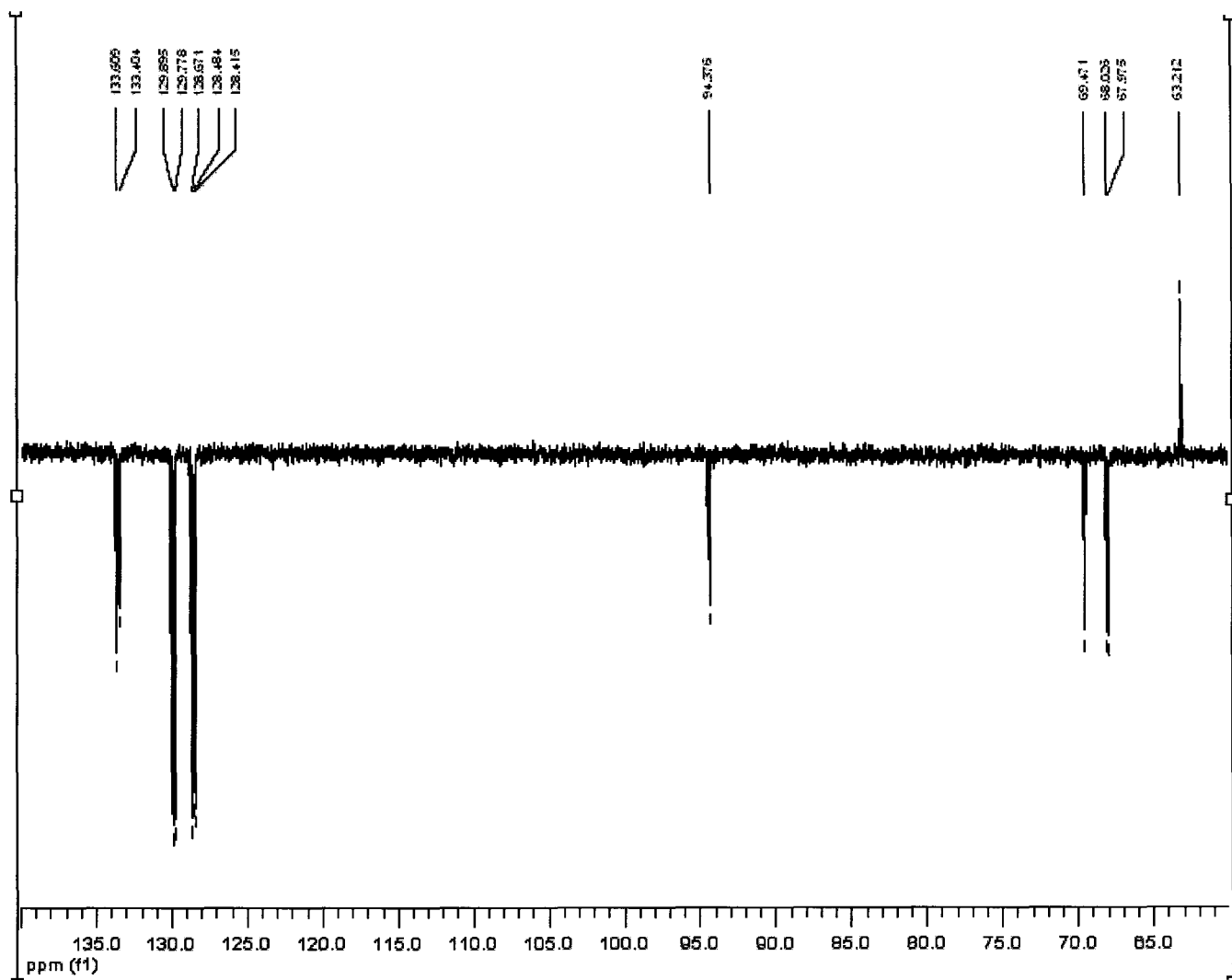


HMBC 1,2,3,4-tétra-O-benzoyl- α,β -D-arabinopyranose (**29**)

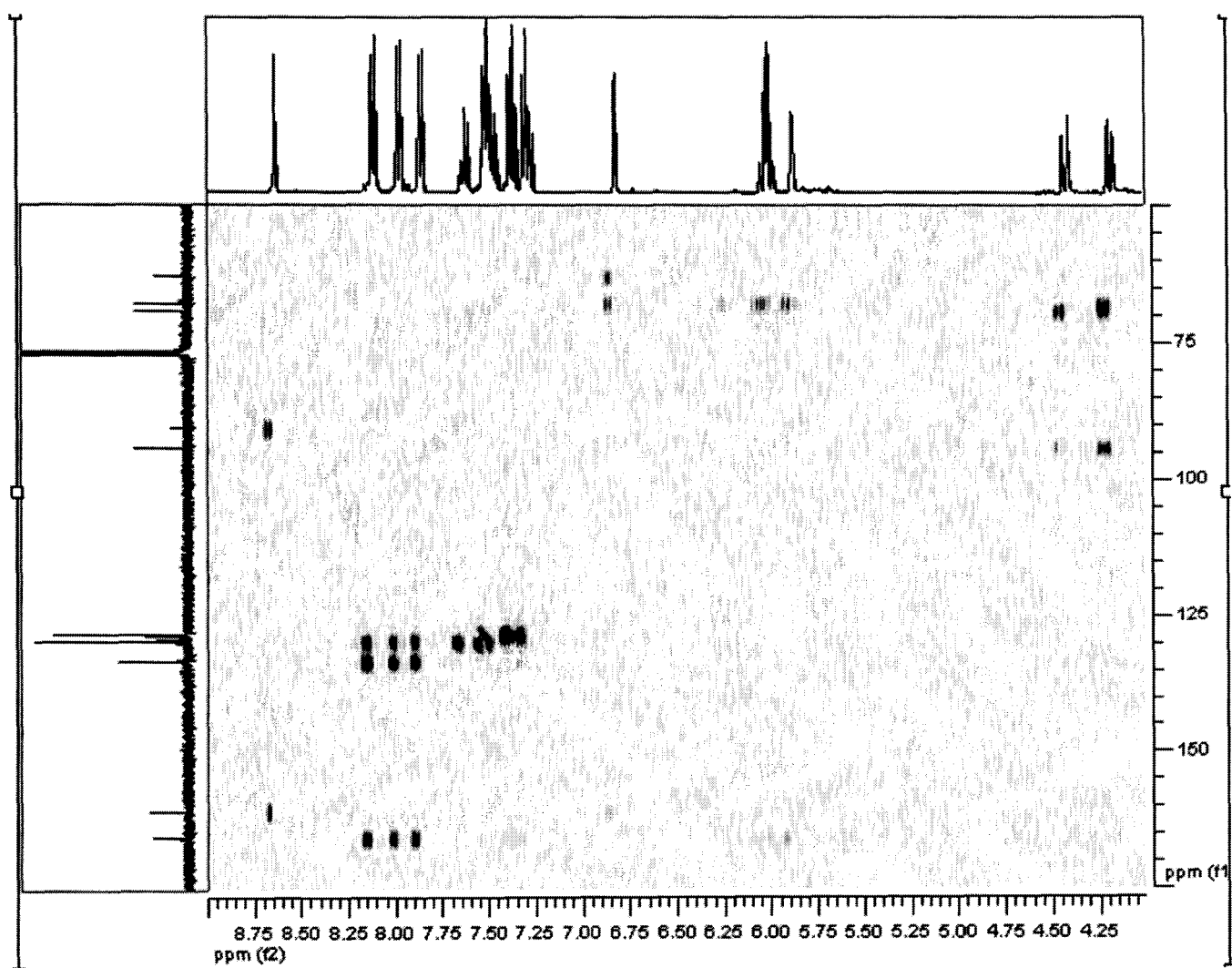
¹H 2,3,4-tri-O-benzoyl-α,β-D-arabinopyranose trichloroacétimide (**30**)



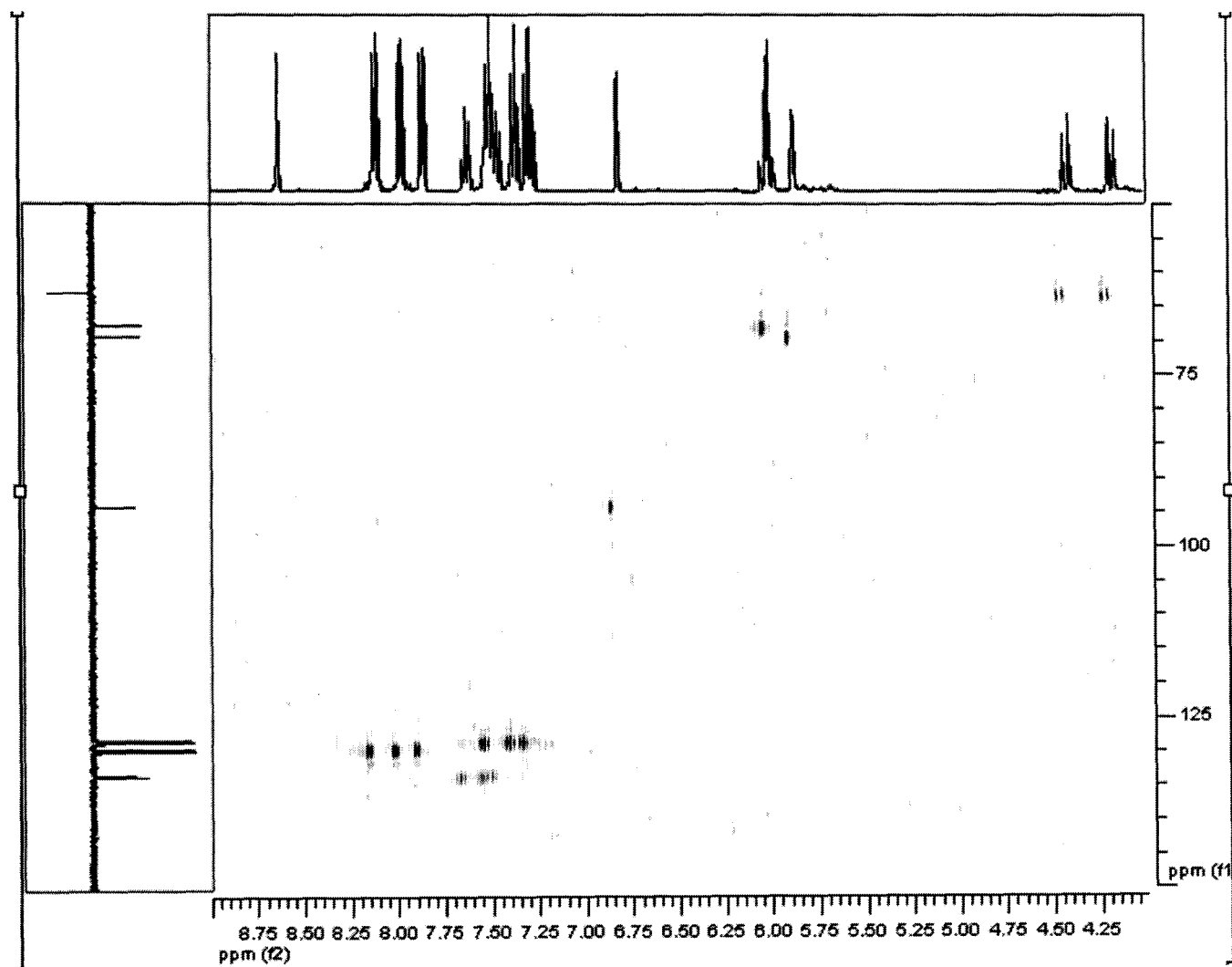
¹³C 2,3,4-tri-O-benzoyl-α,β-D-arabinopyranose trichloroacétimide (30)



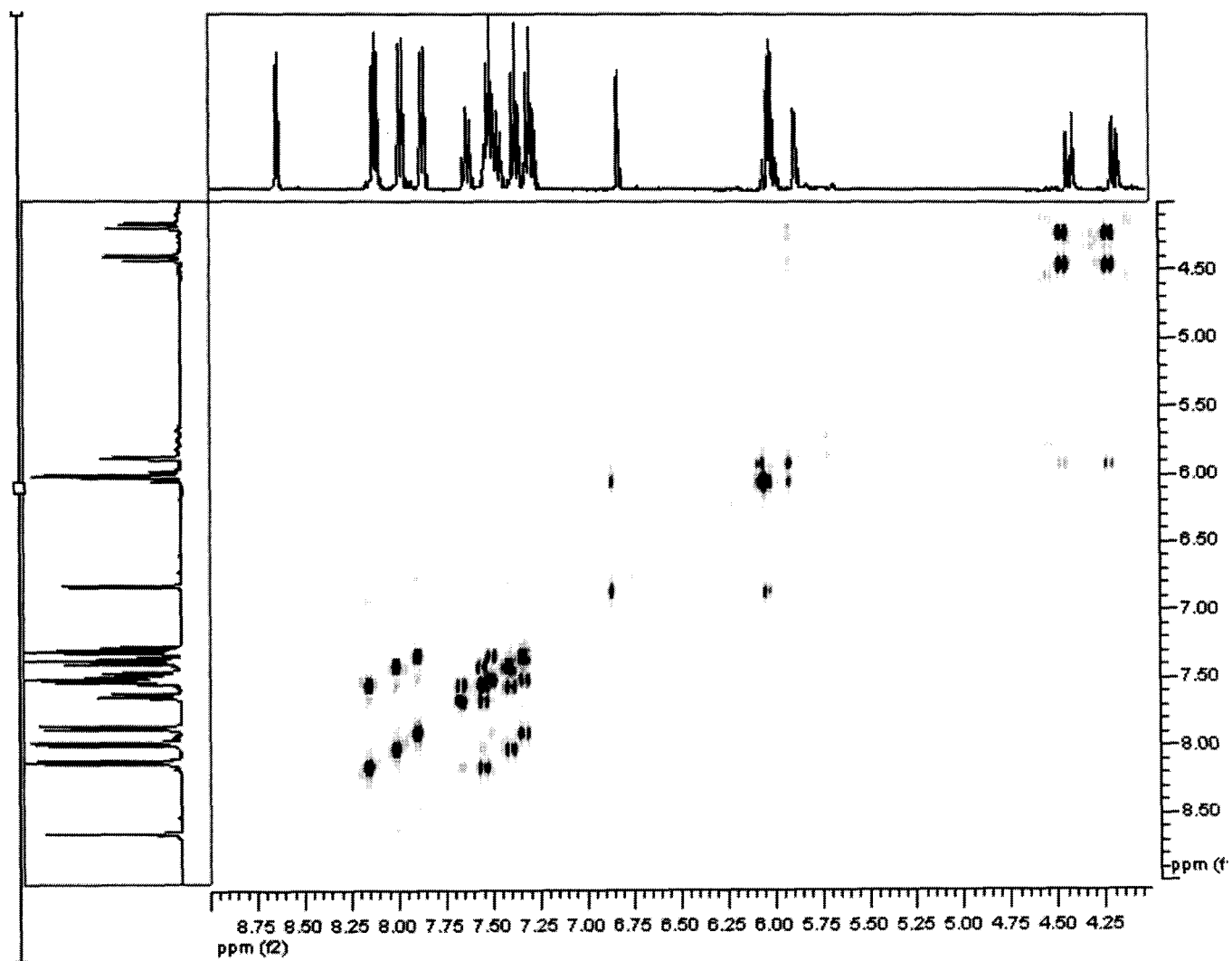
DEPT135 2,3,4-tri-O-benzoyl- α,β -D-arabinopyranose trichloroacétimide (30)



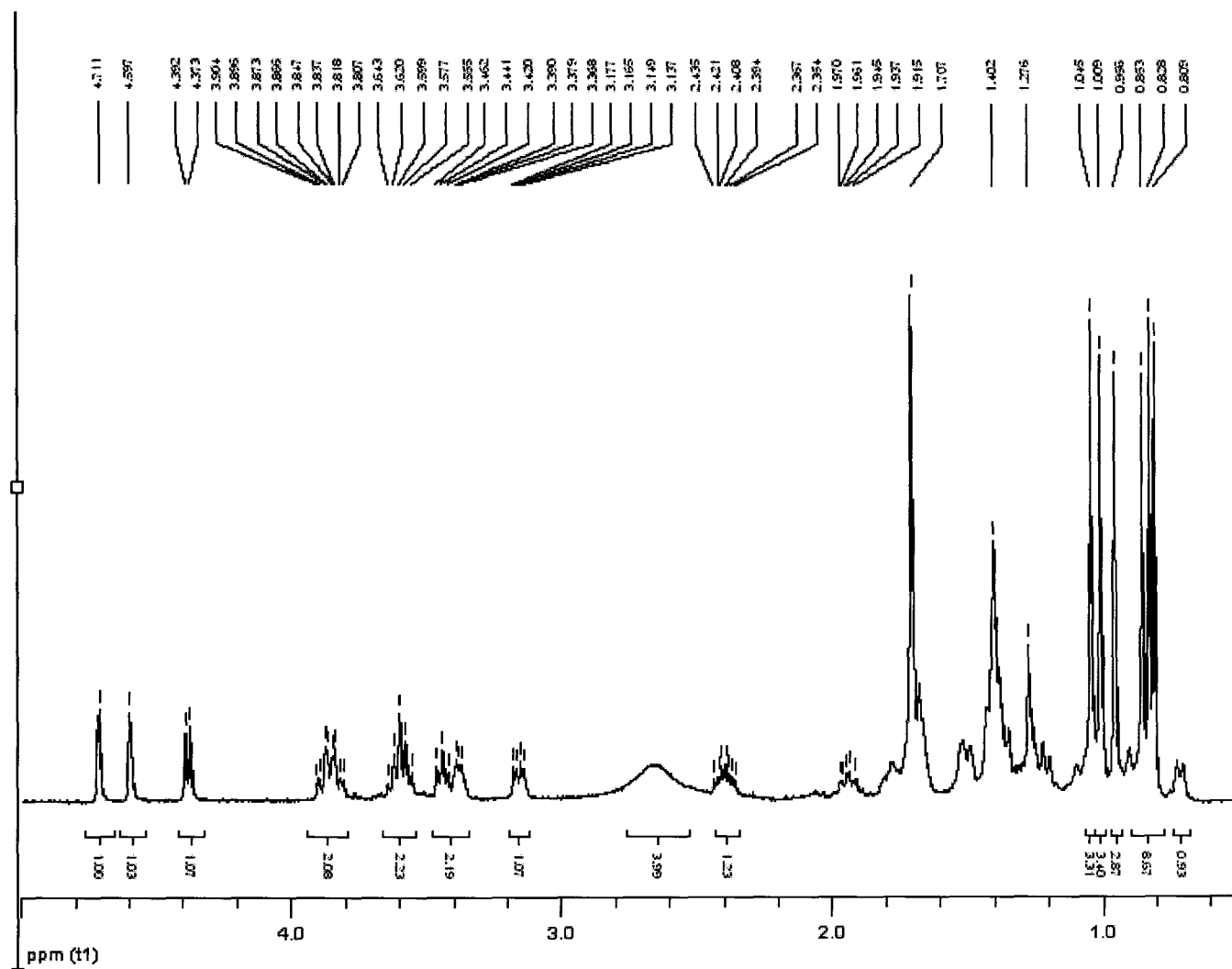
HMBC 2,3,4-tri-O-benzoyl- α,β -D-arabinopyranose trichloroacétimide (**30**)



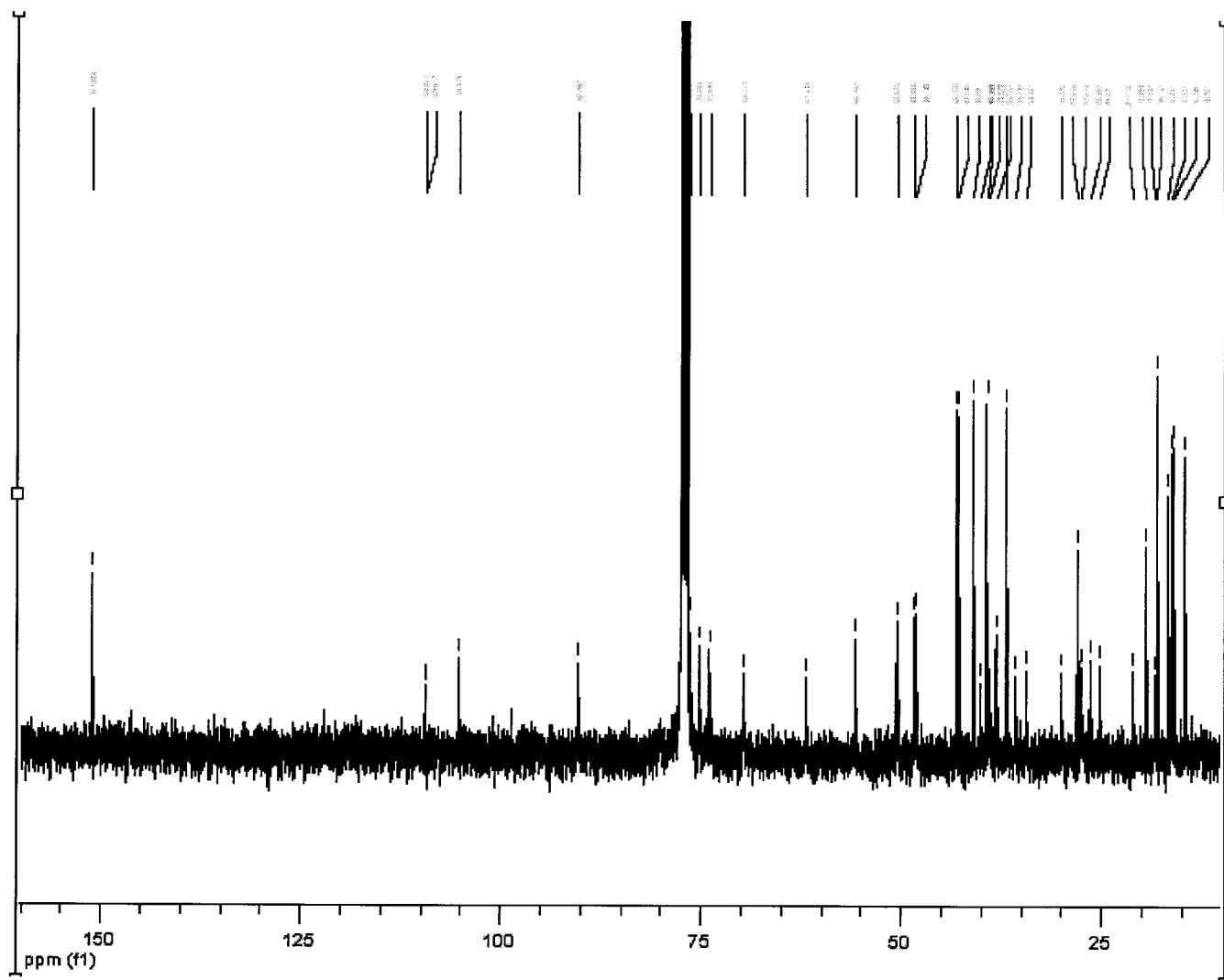
HSQC 2,3,4-tri-O-benzoyl- α,β -D-arabinopyranose trichloroacétimide (**30**)

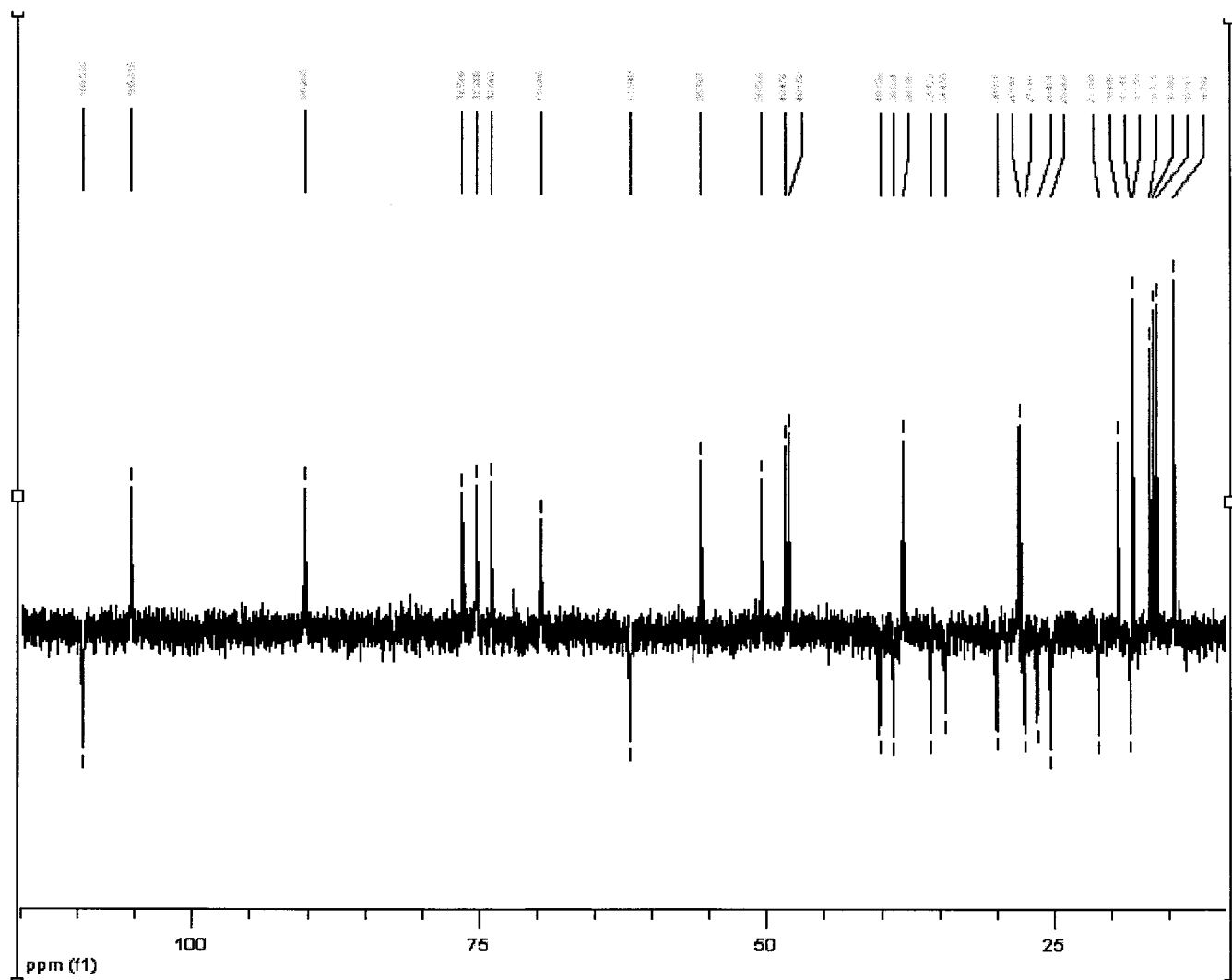


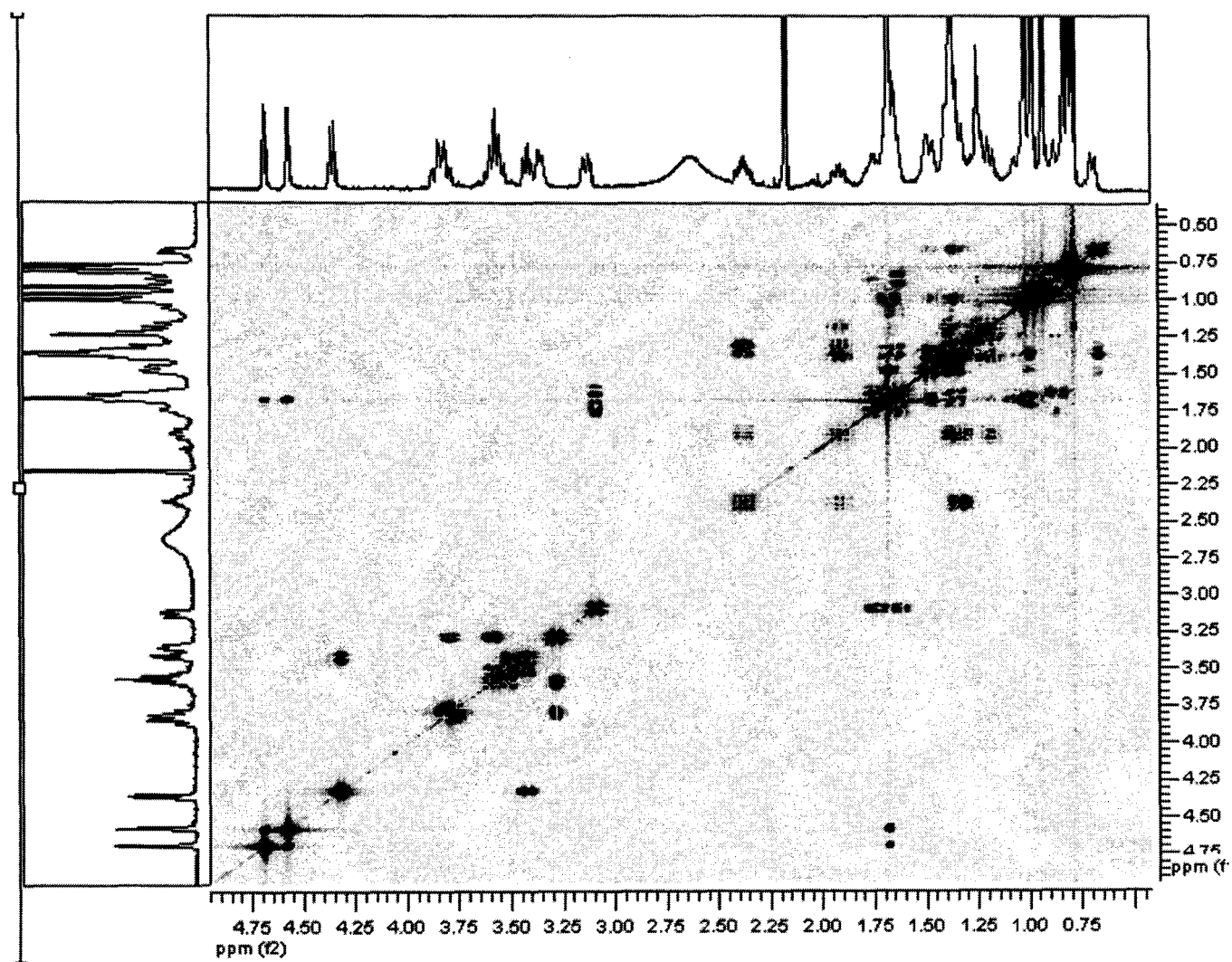
COSY 2,3,4-tri-O-benzoyl- α,β -D-arabinopyranose trichloroacétimide (**30**)



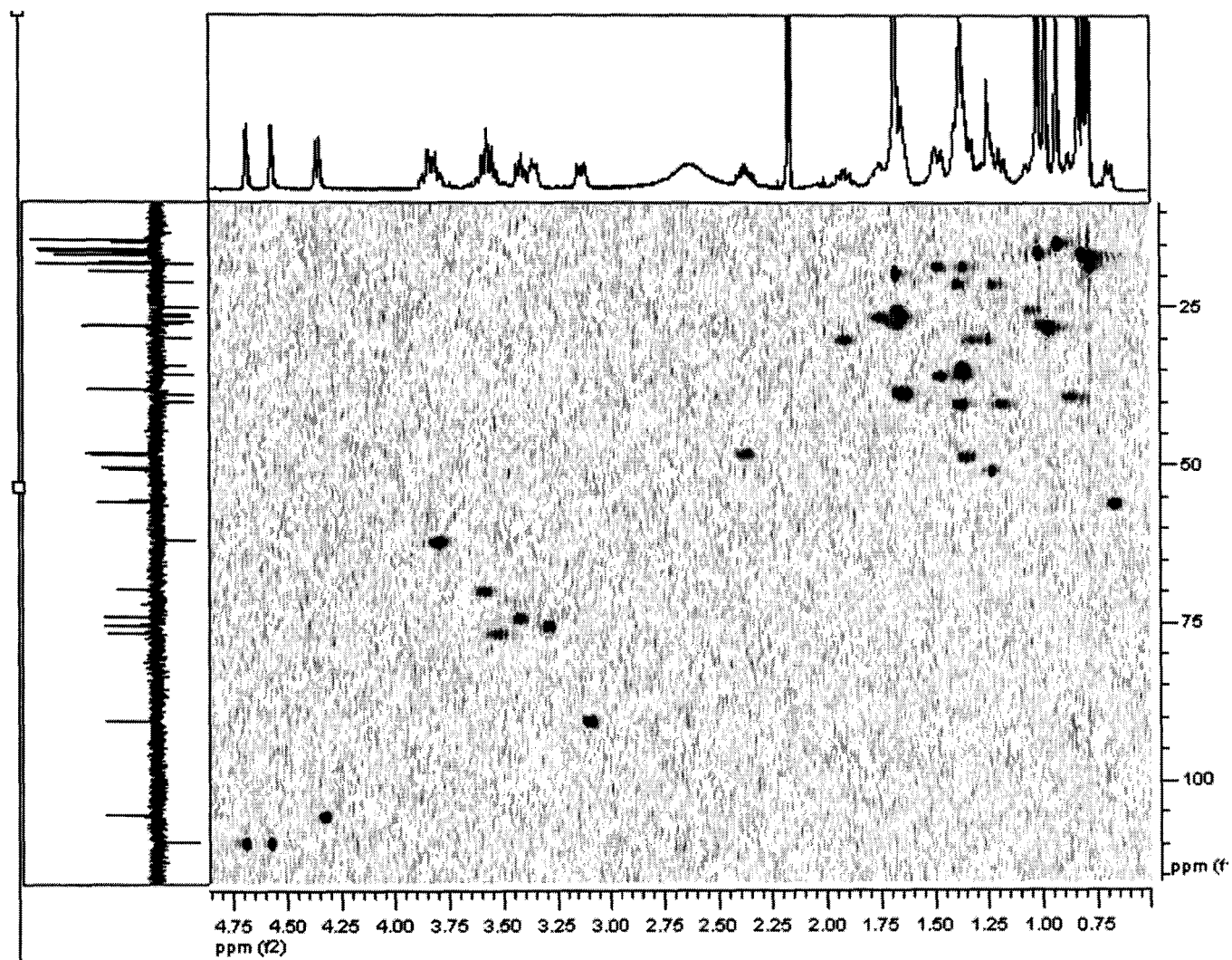
¹H 3-O-β-D-Glucopyranoside de lupéol (9)



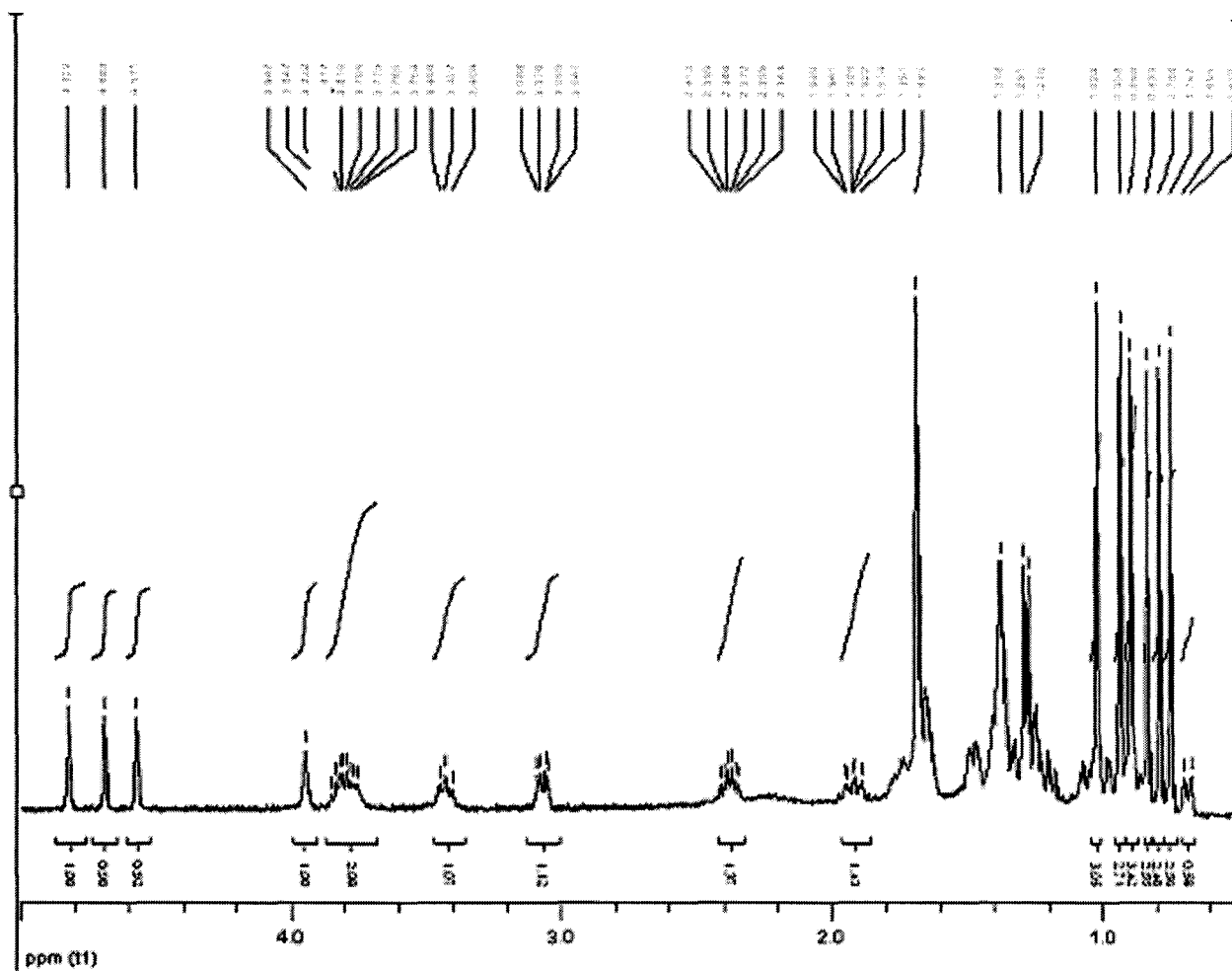


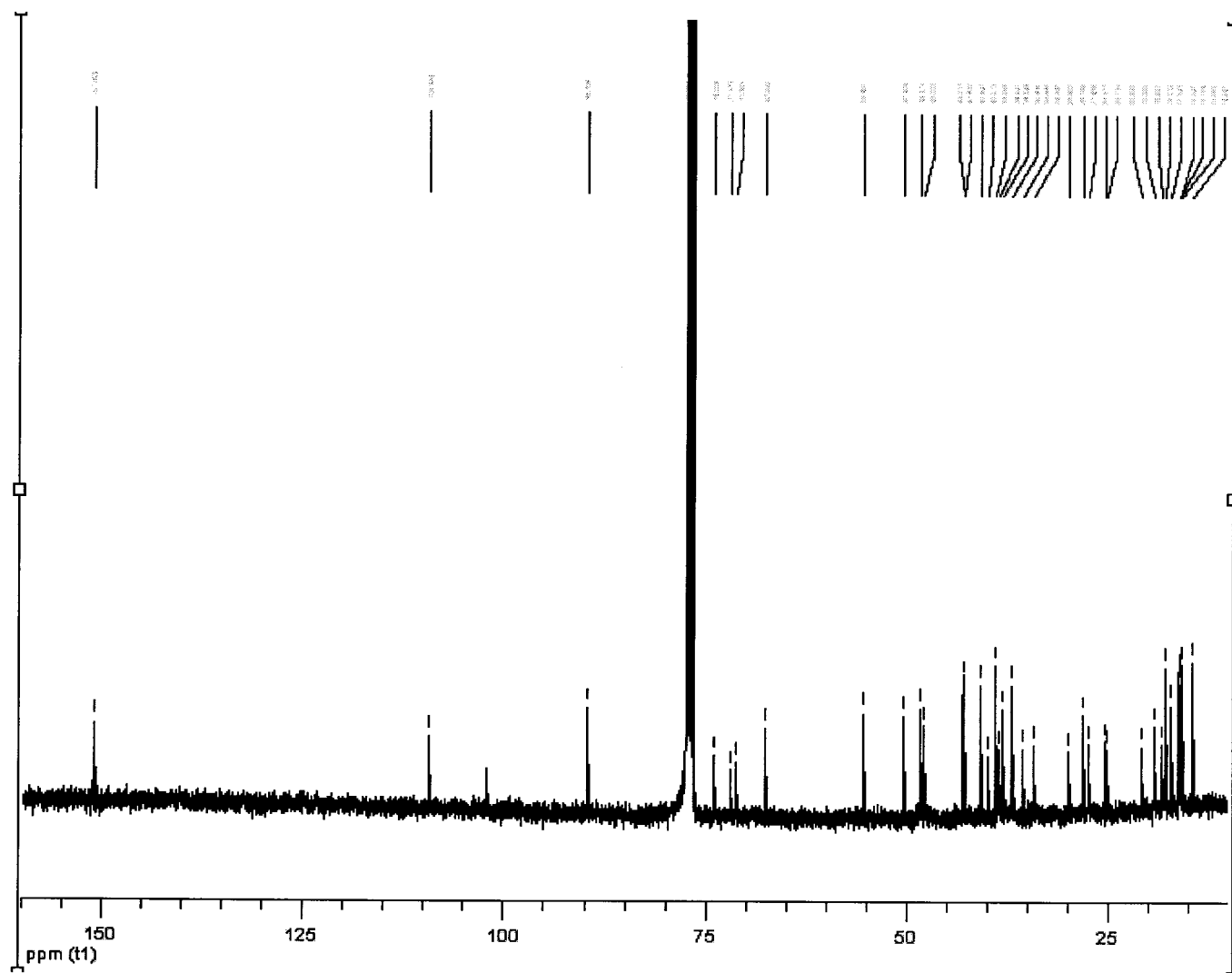


COSY 3-O-β-D-Glucopyranoside de lupéol (9)

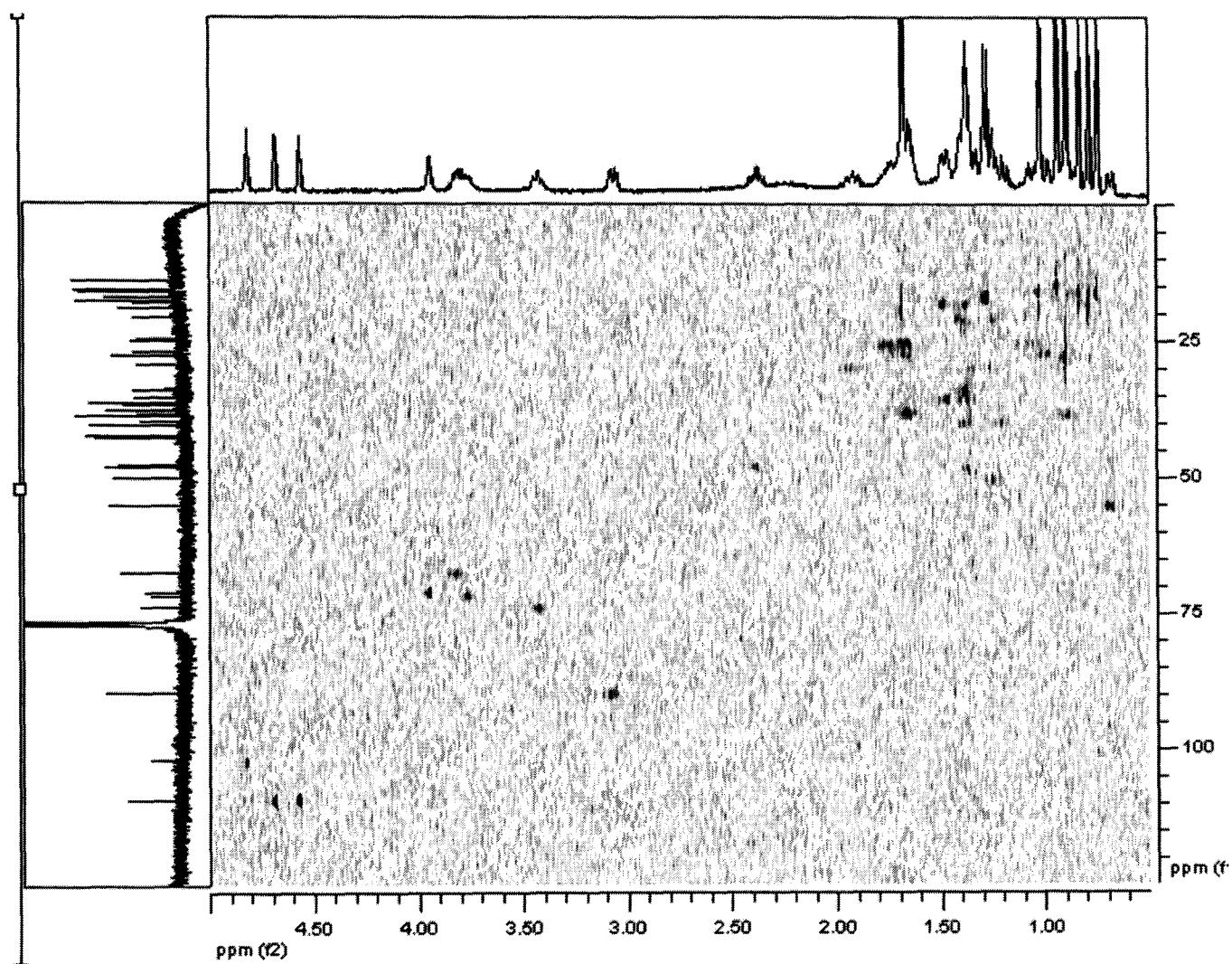


HSQC 3-O-β-D-Glucopyranoside de lupéol (9)

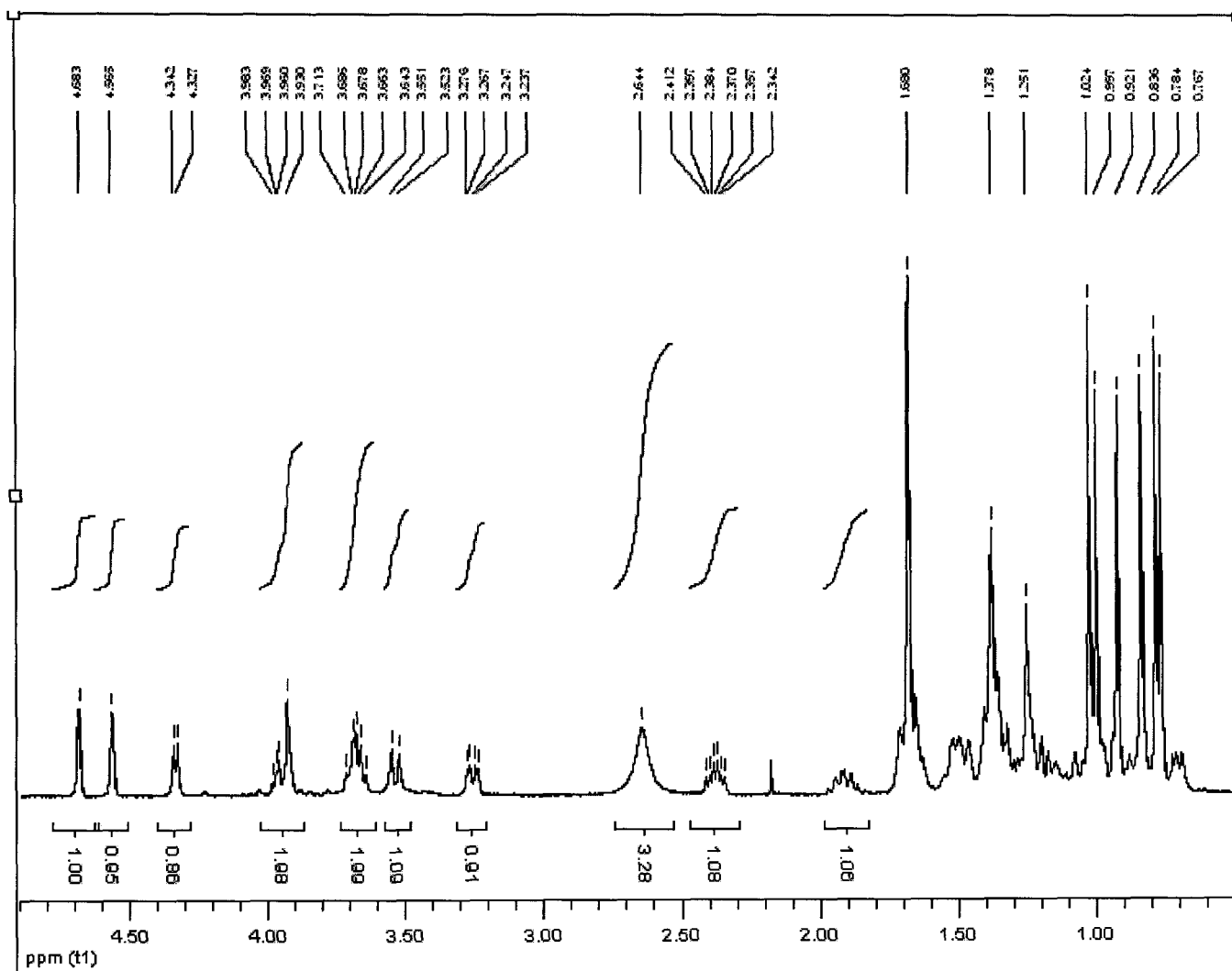




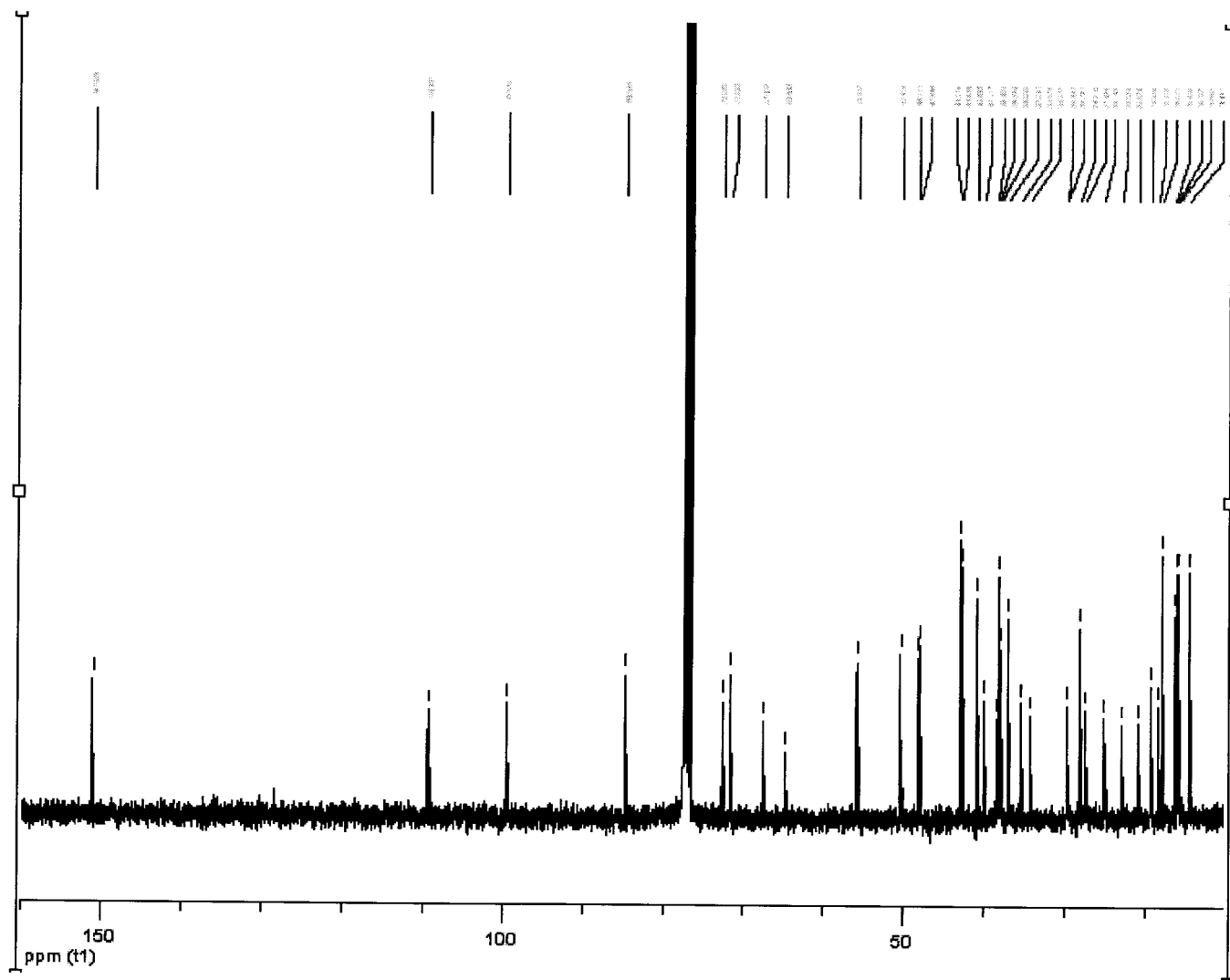
¹³C 3-O-α-L-Rhamnopyranoside de lupéol (10)



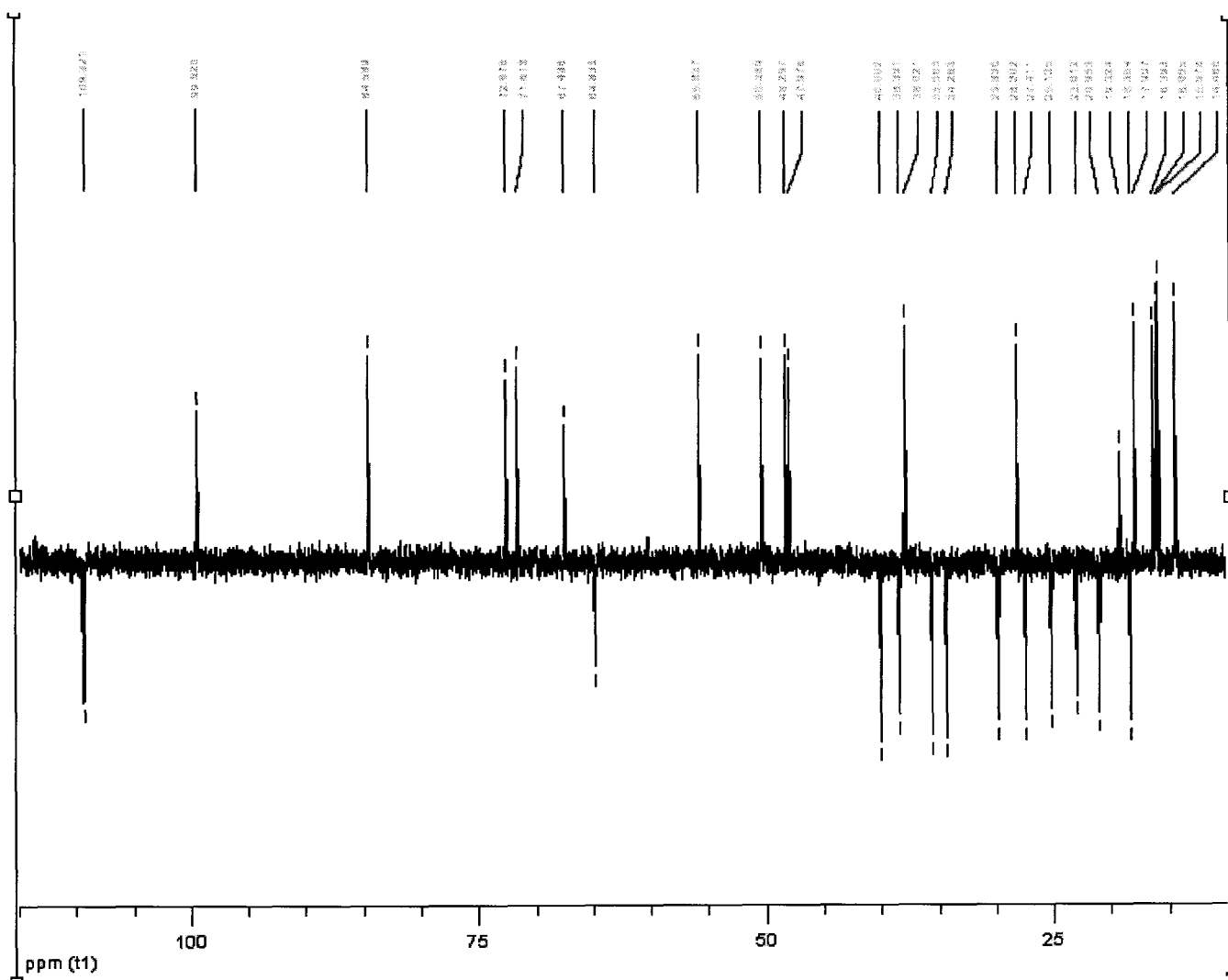
HSQC 3-O- α -L-Rhamnopyranoside de lupéol (10)



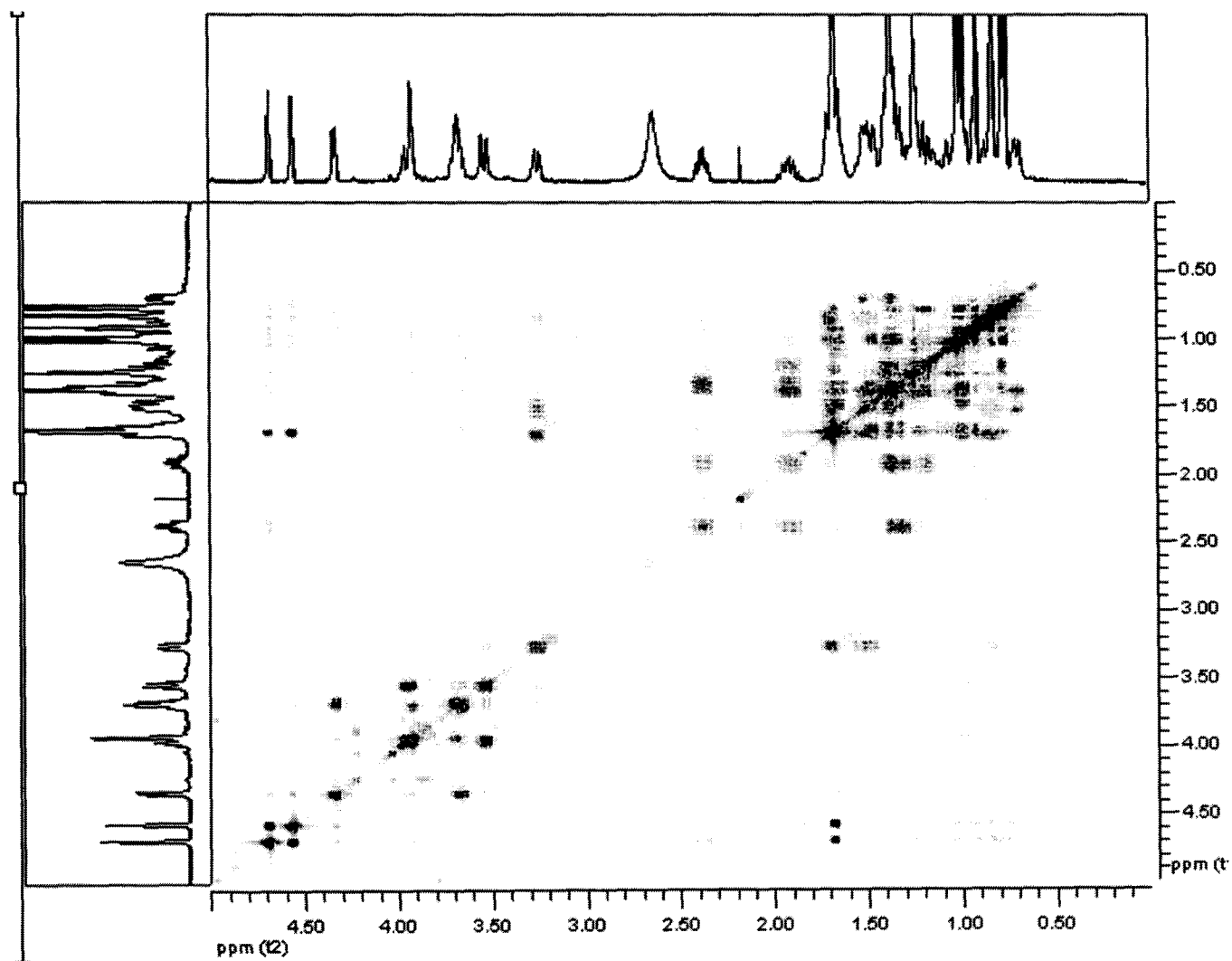
^1H 3-O- β -D-Arabinopyranoside de lupéol (11)



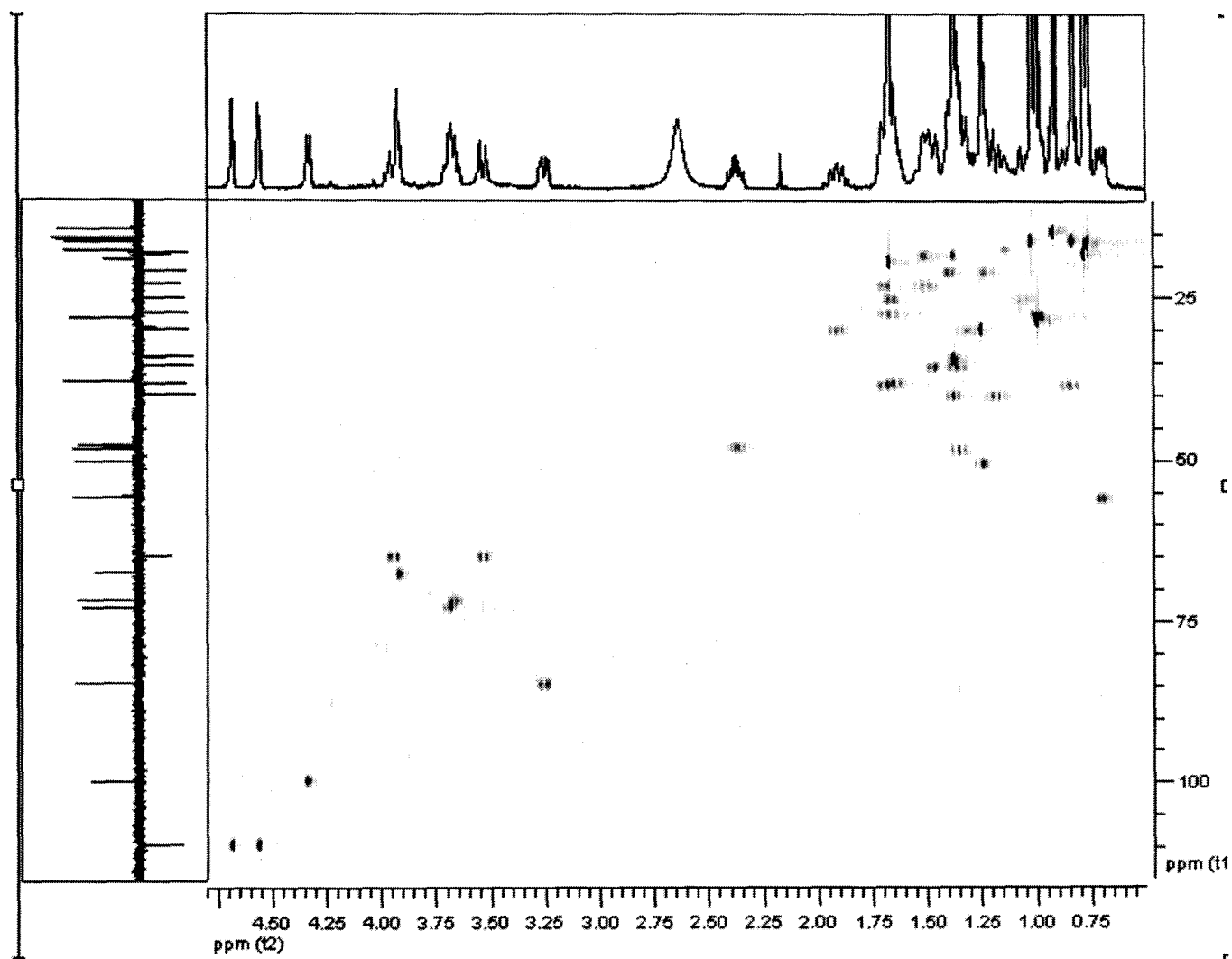
¹³C 3-O-β-D-Arabinopyranoside de lupéol (11)



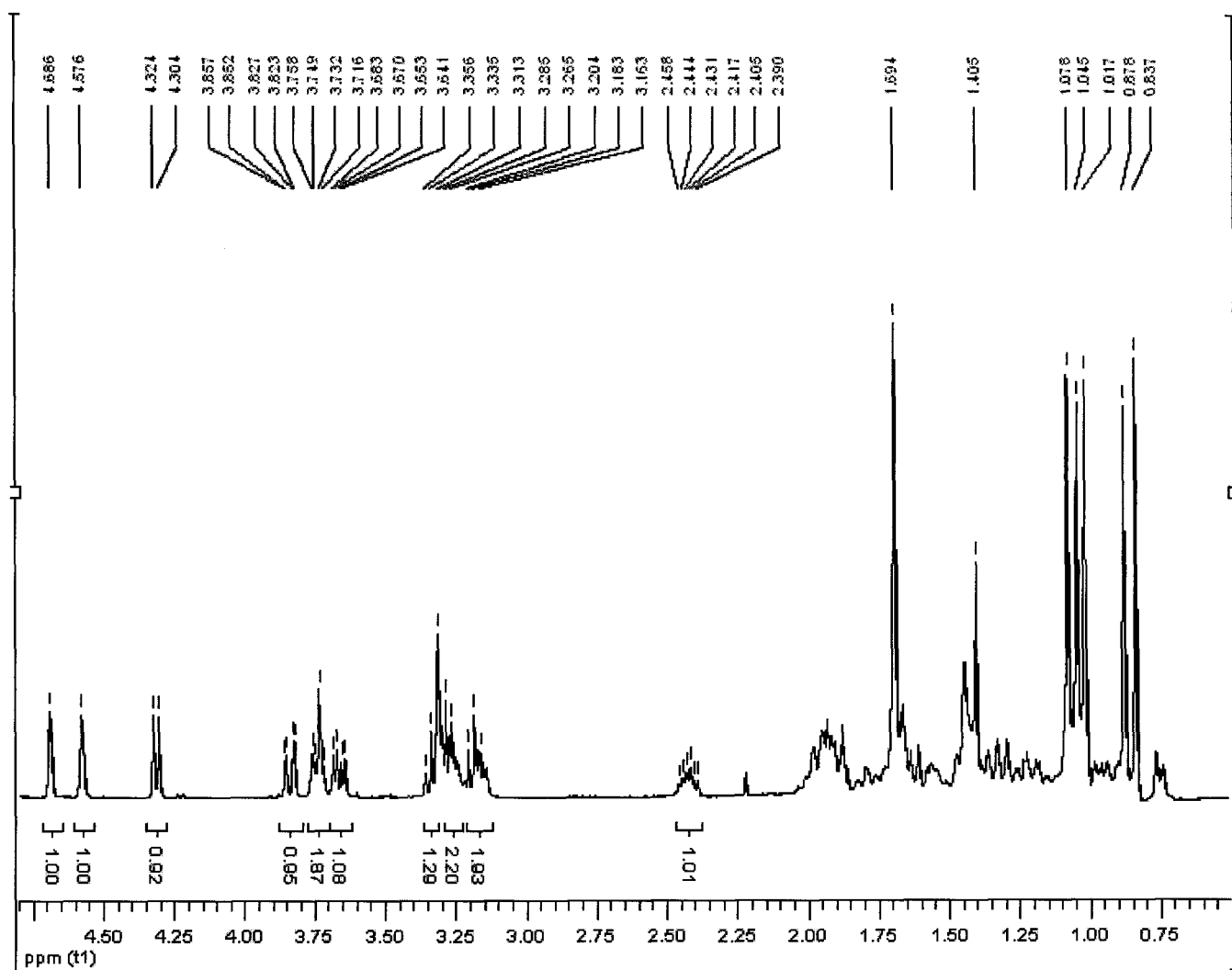
DEPT135 3-O-β-D-Arabinopyranoside de lupéol (11)



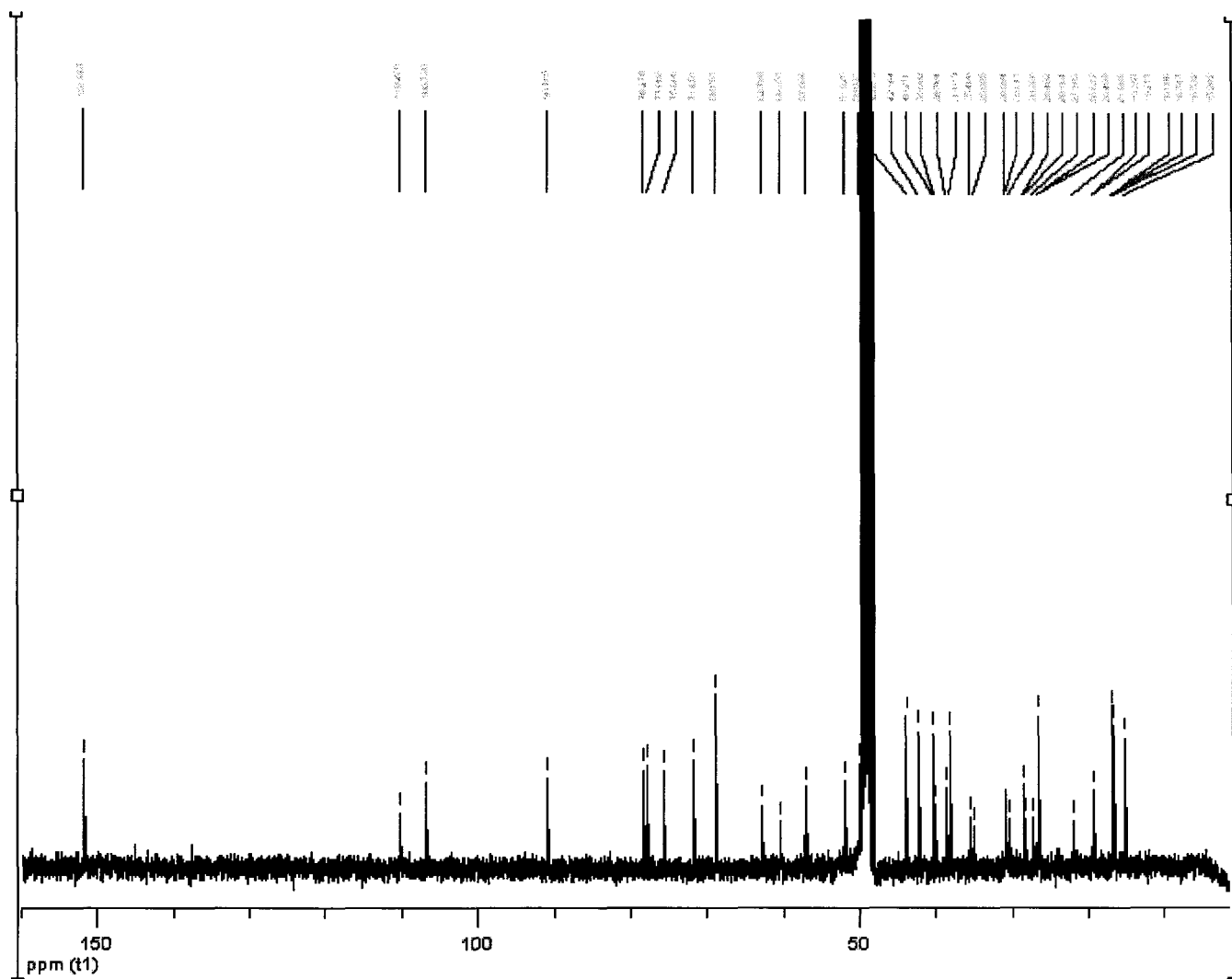
COSY 3-O-β-D-Arabinopyranoside de lupéol (11)



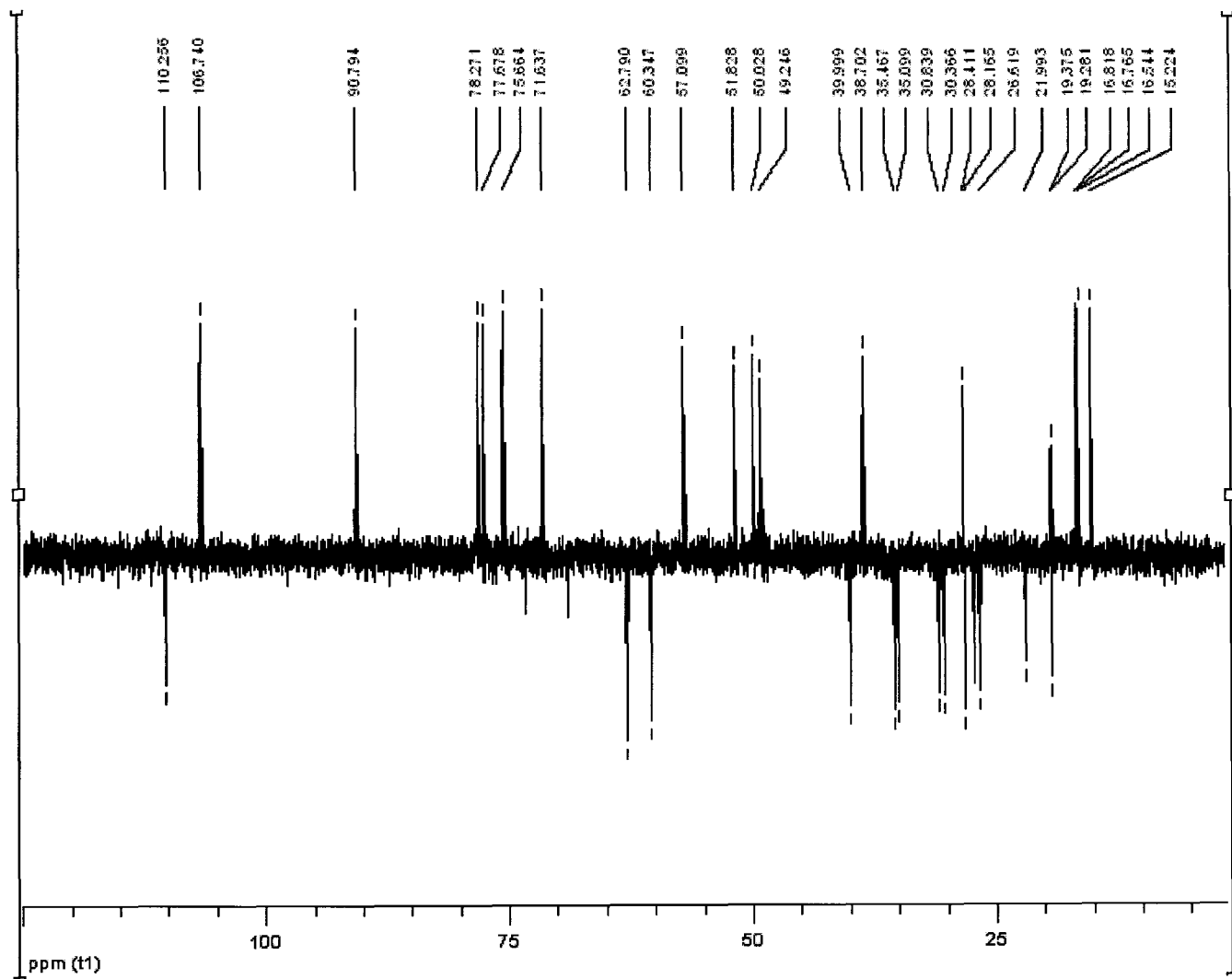
HSQC 3-O-β-D-Arabinopyranoside de lupéol (11)



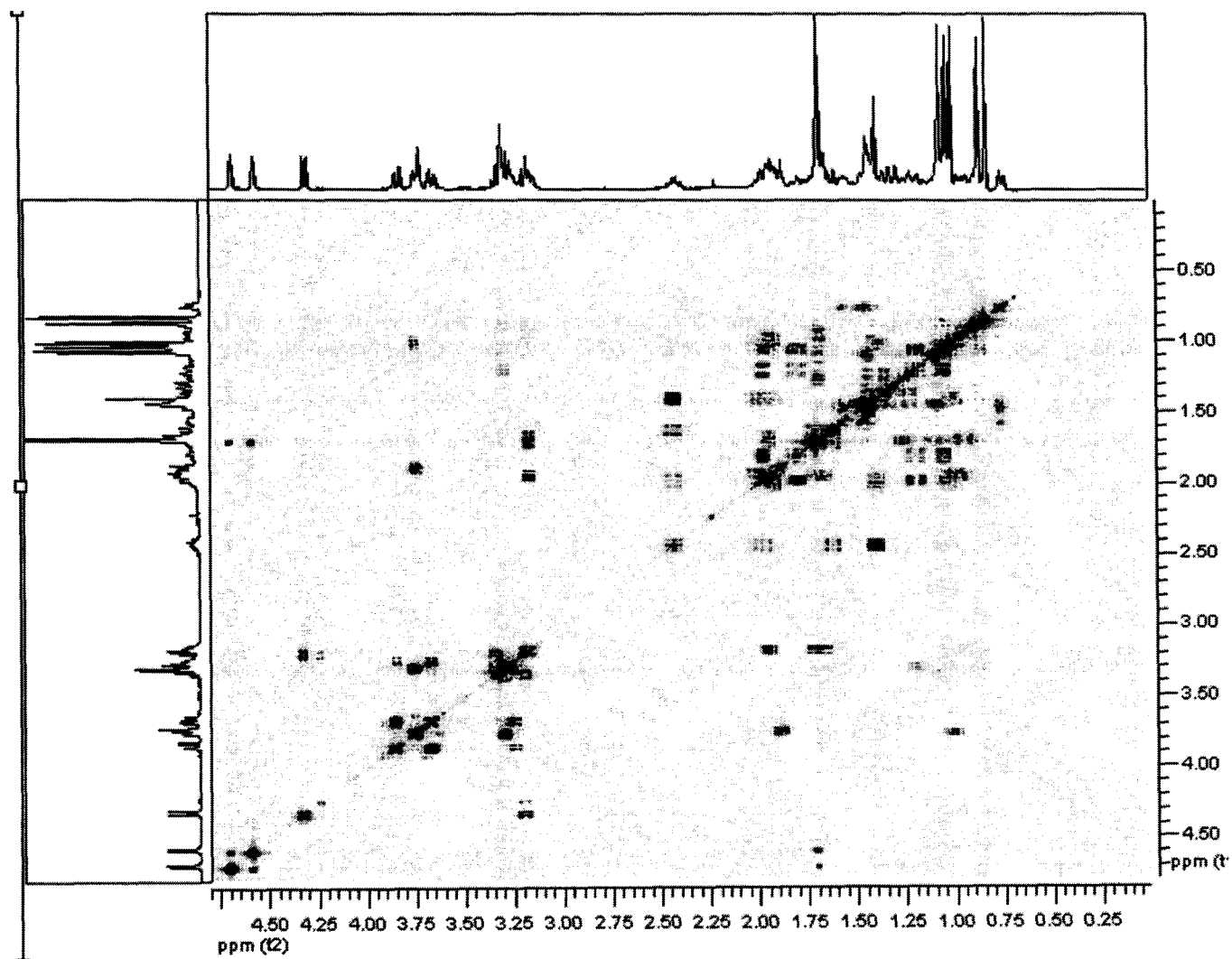
¹H 3-O-β-D-Glucopyranoside de betulinol (12)



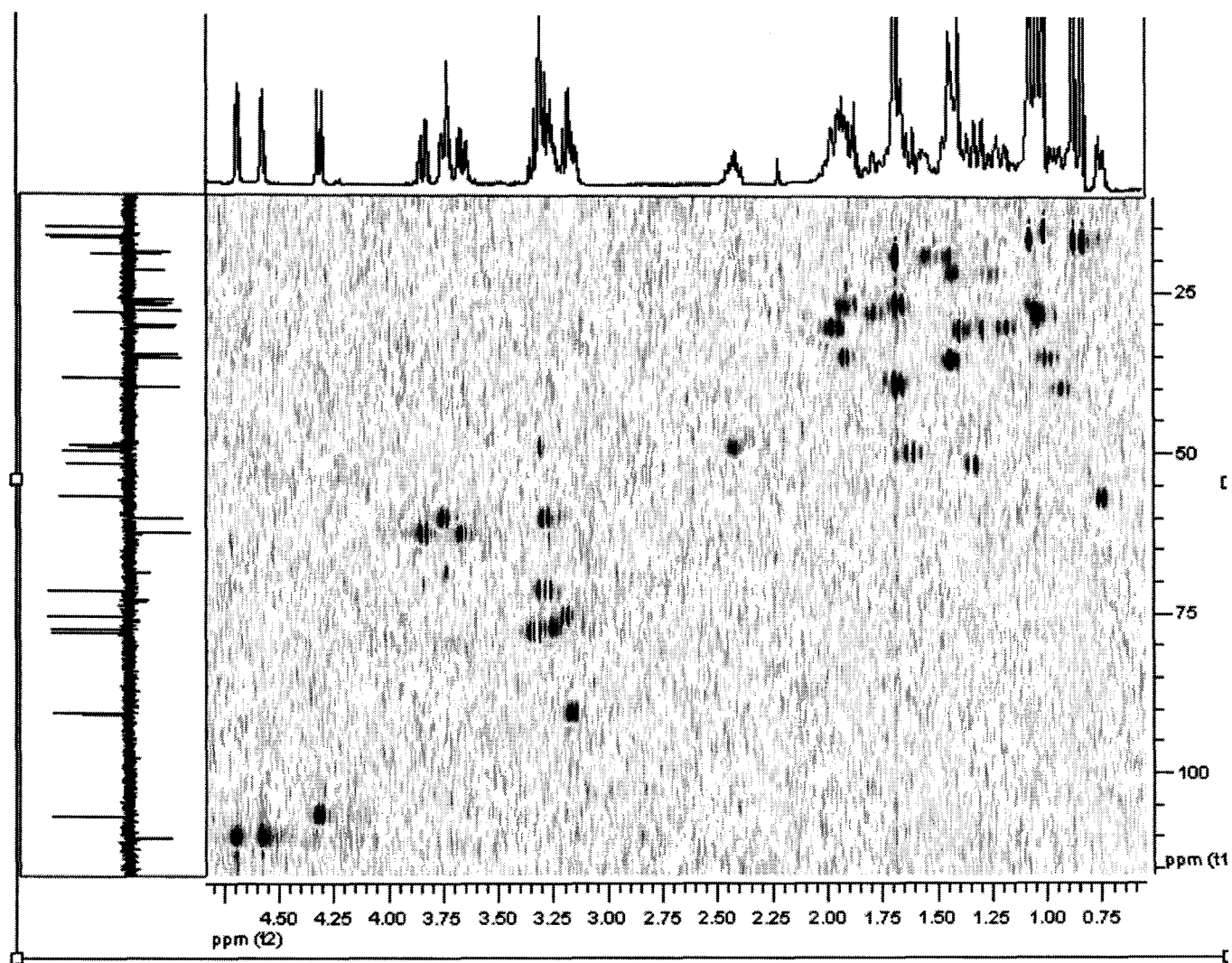
^{13}C 3-O- β -D-Glucopyranoside de bétulinol (12)



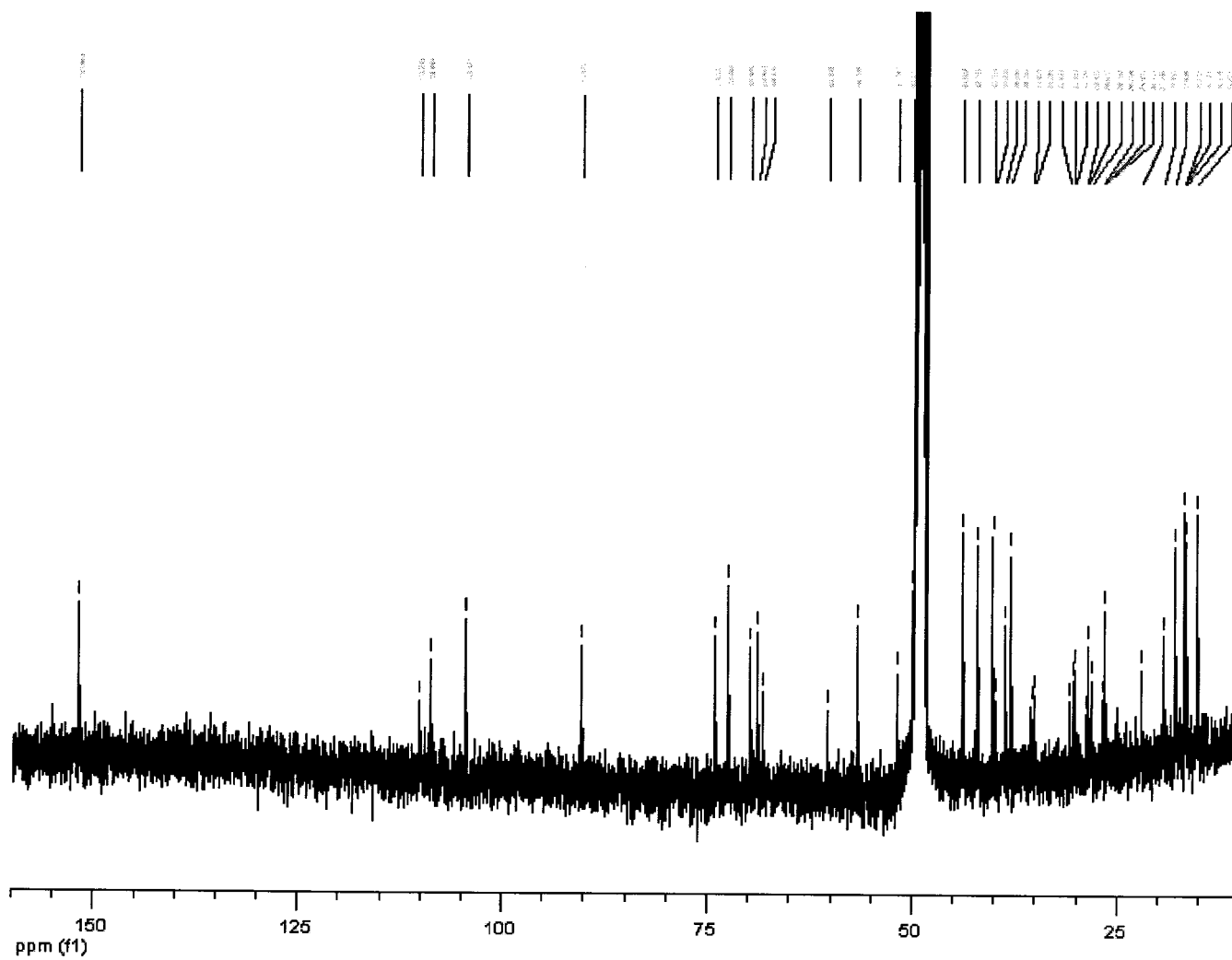
DEPT135 3-O- β -D-Glucopyranoside de bétulinol (12)



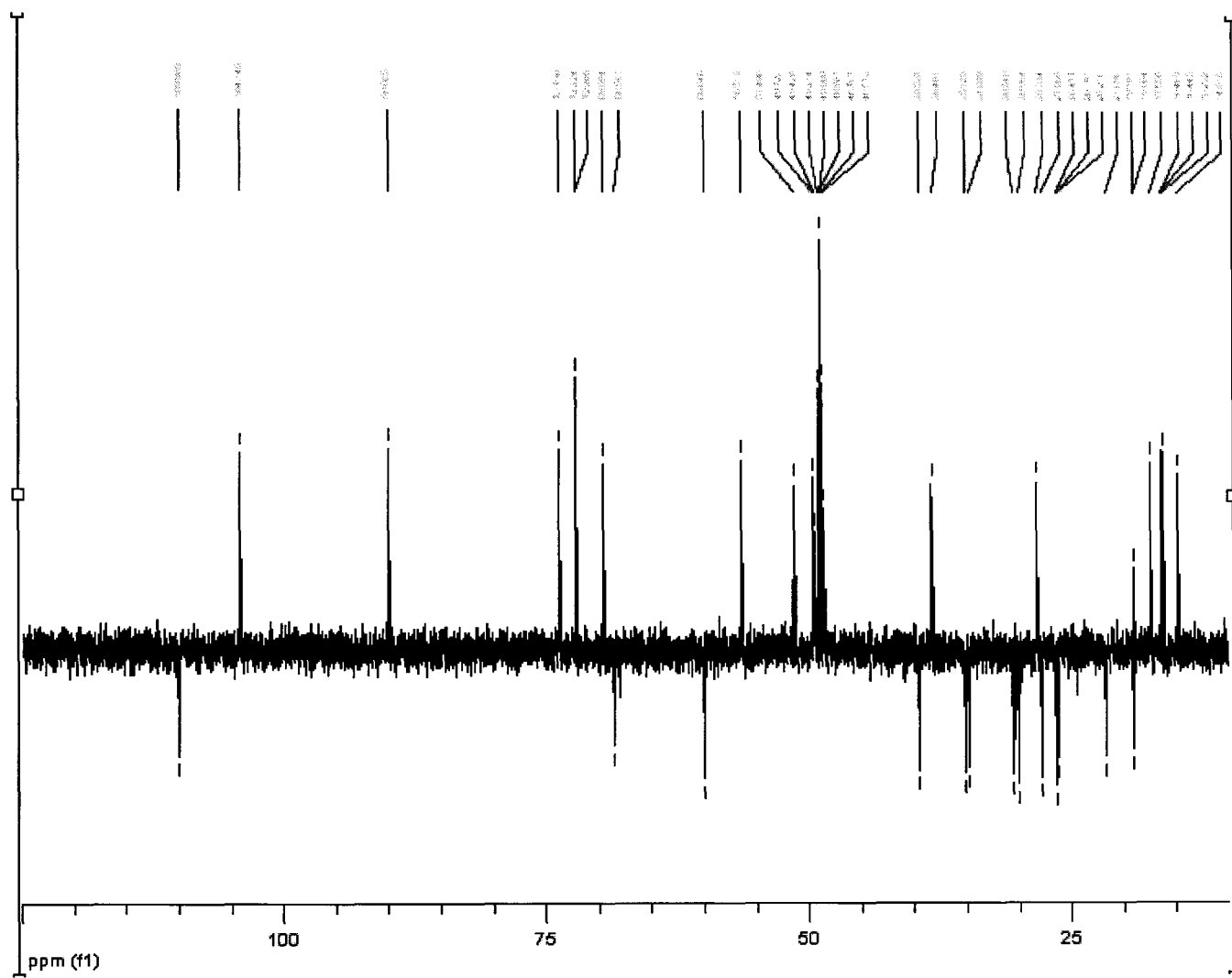
COSY 3-O-β-D-Glucopyranoside de bétulinol (12)



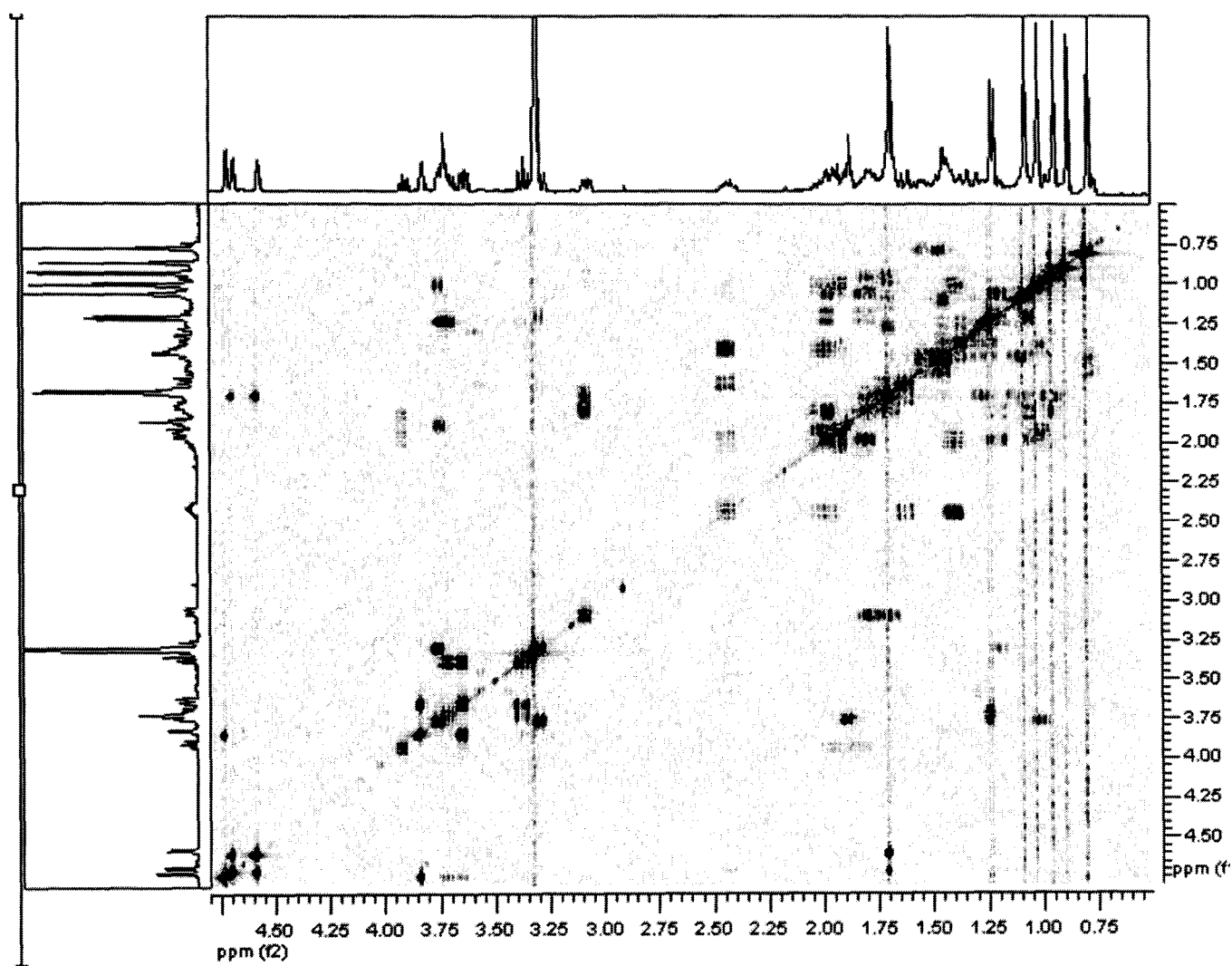
HSQC 3-O-β-D-Glucopyranoside de bétulinol (12)



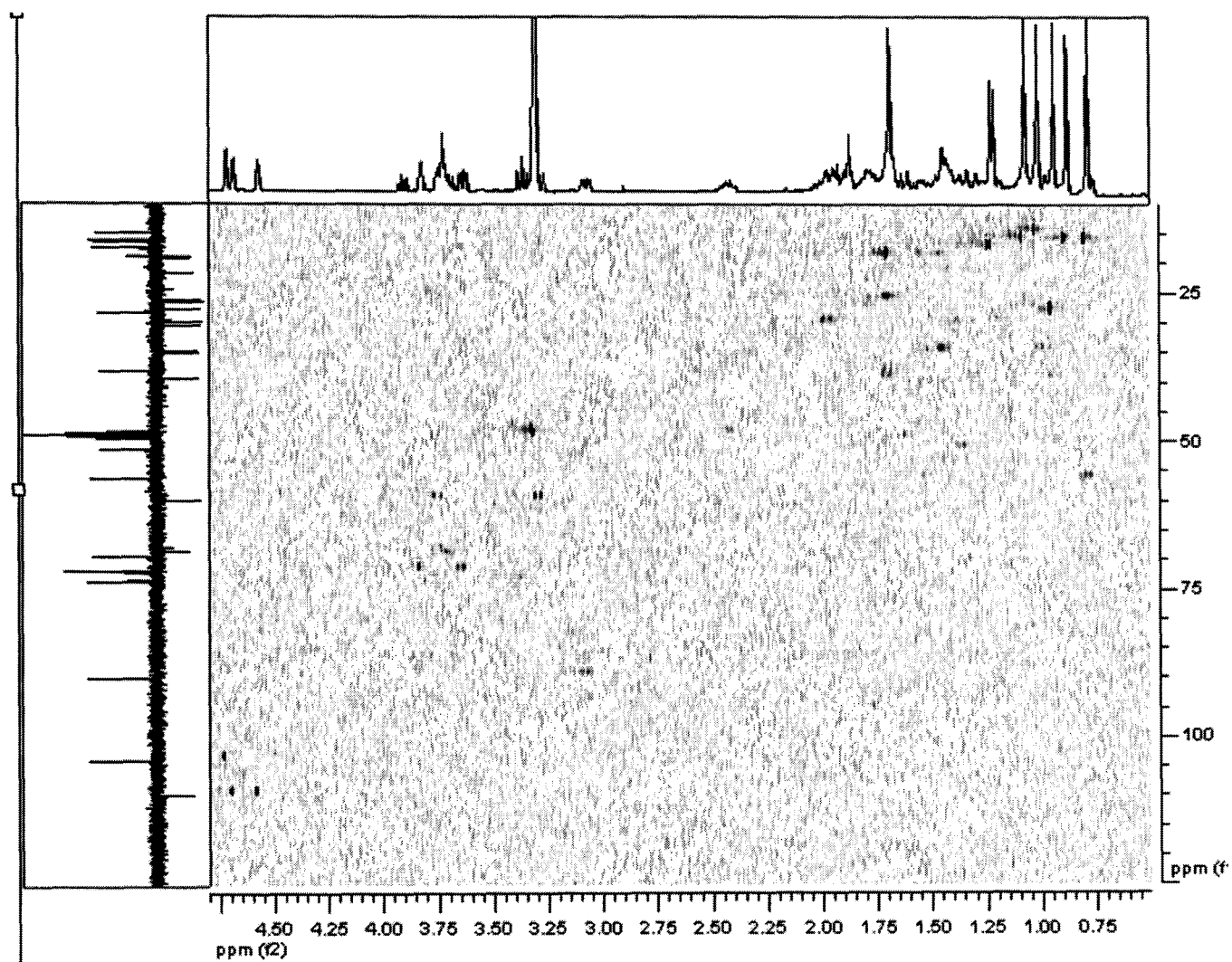
¹³C 3-O-α-L-Rhamnopyranoside de bétulinol (13)



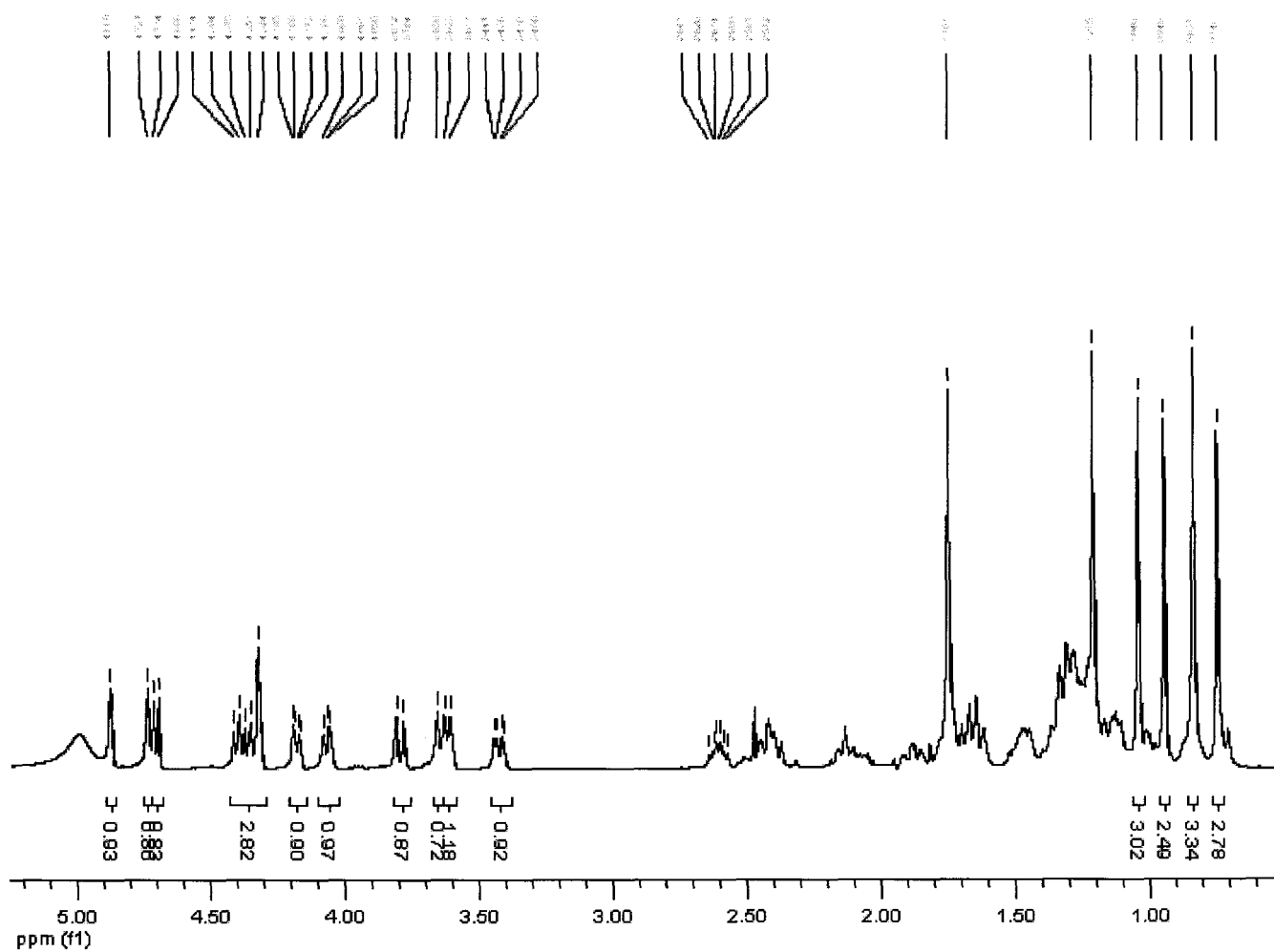
DEPT135 3-O- α -L-Rhamnopyranoside de bétulinol (13)



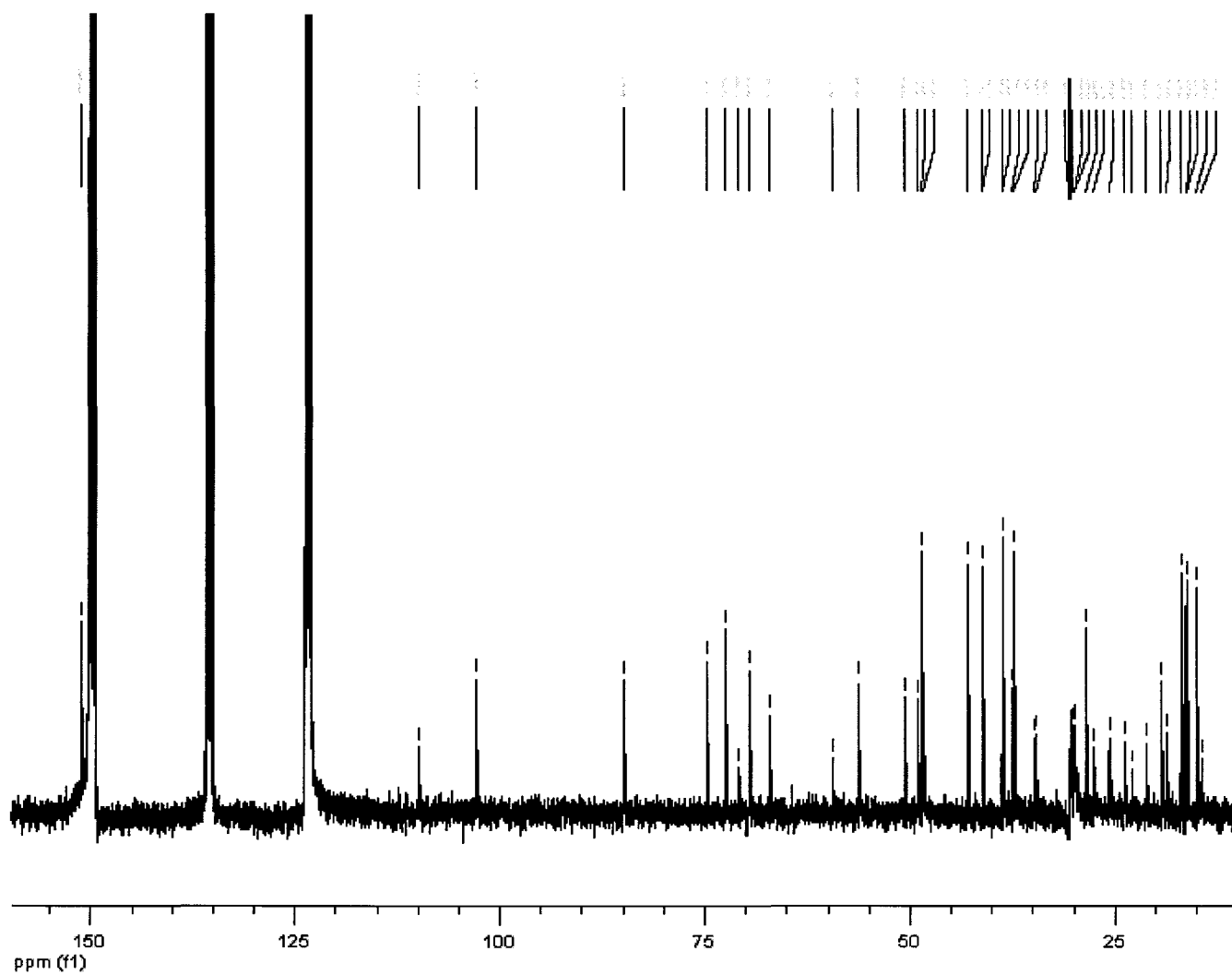
COSY 3-O- α -L-Rhamnopyranoside de bétulinol (13)



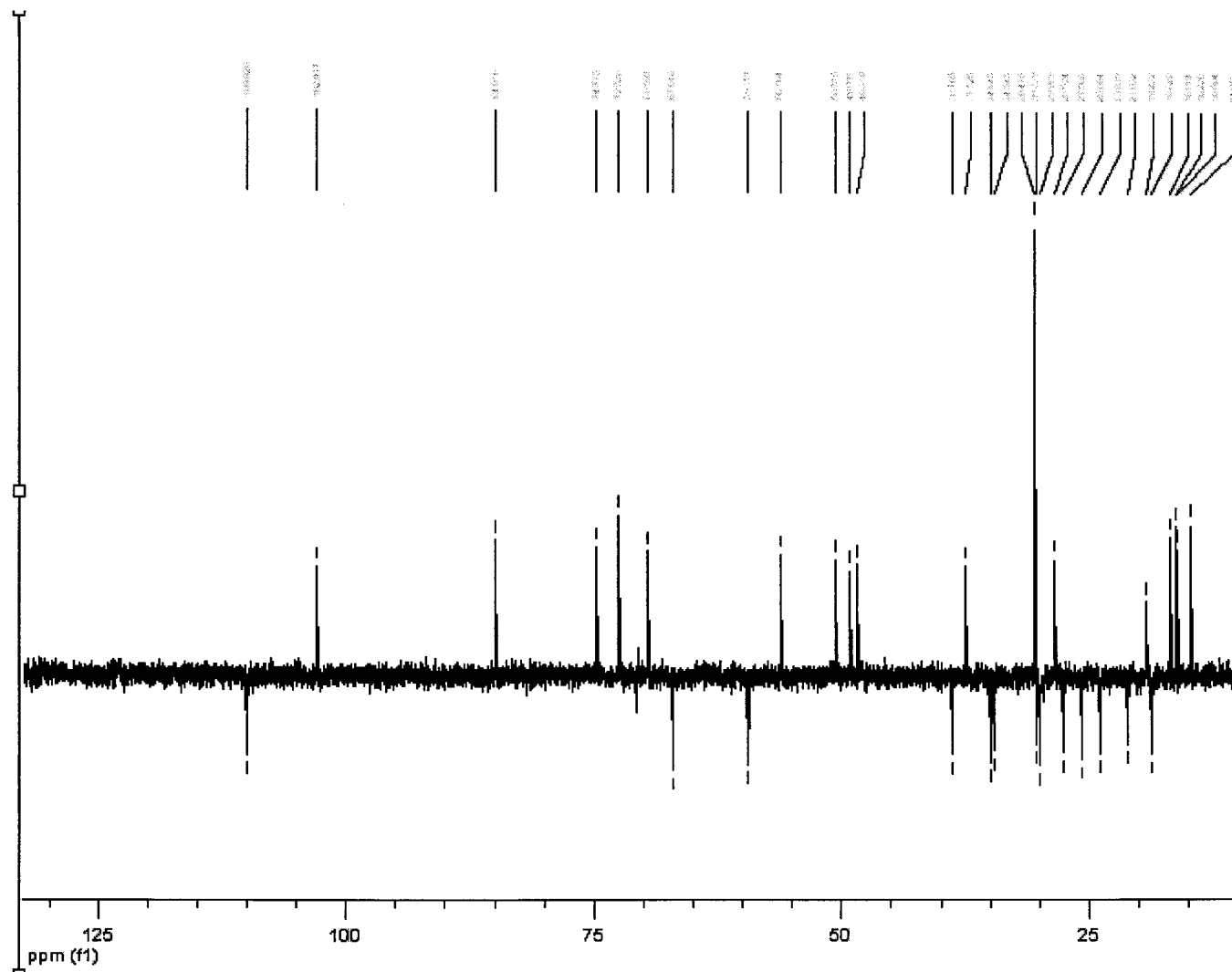
HSQC 3-O- α -L-Rhamnopyranoside de bétulinol (**13**)



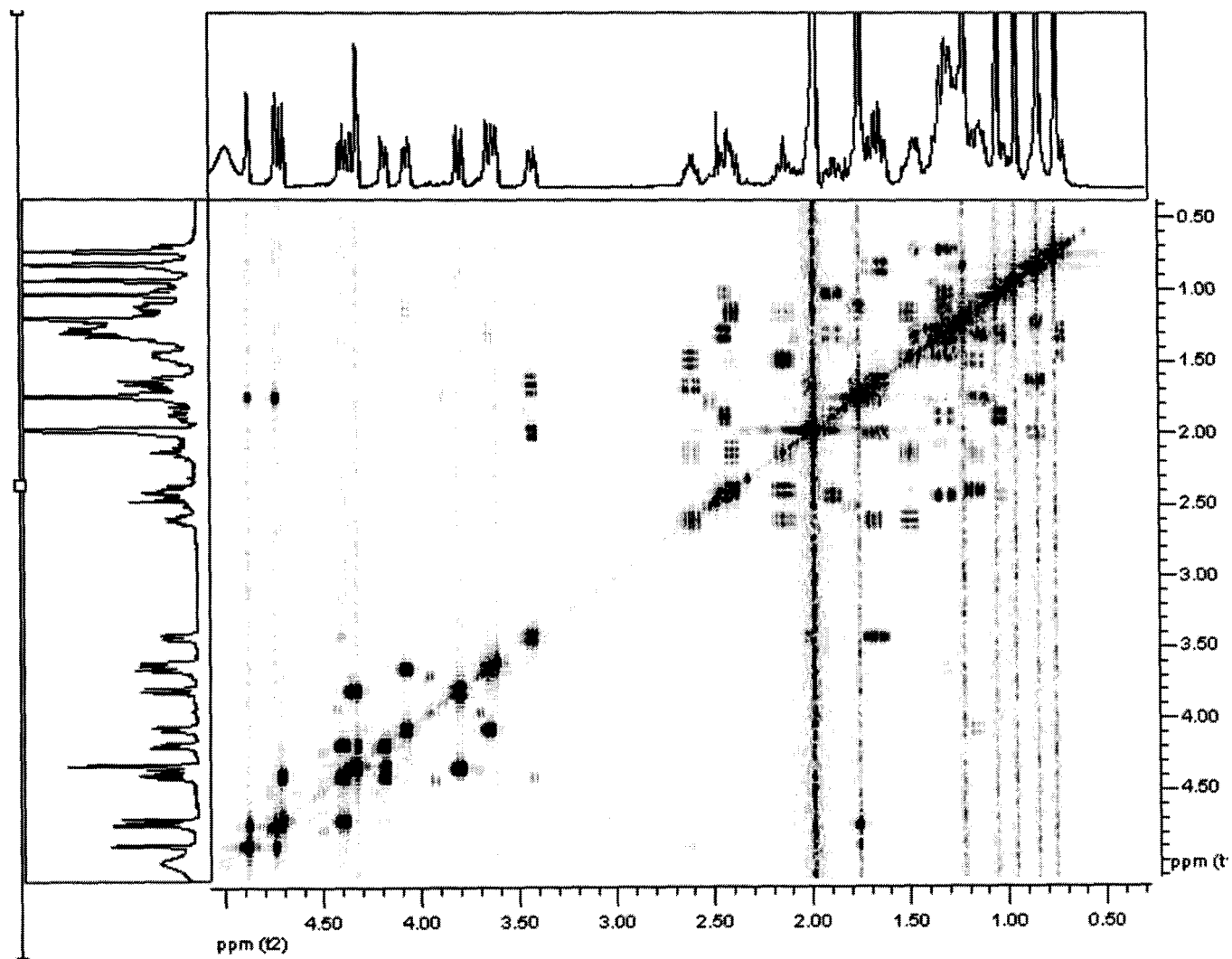
¹H 3-O-β-D-Arabinopyranoside de betulinol (14)



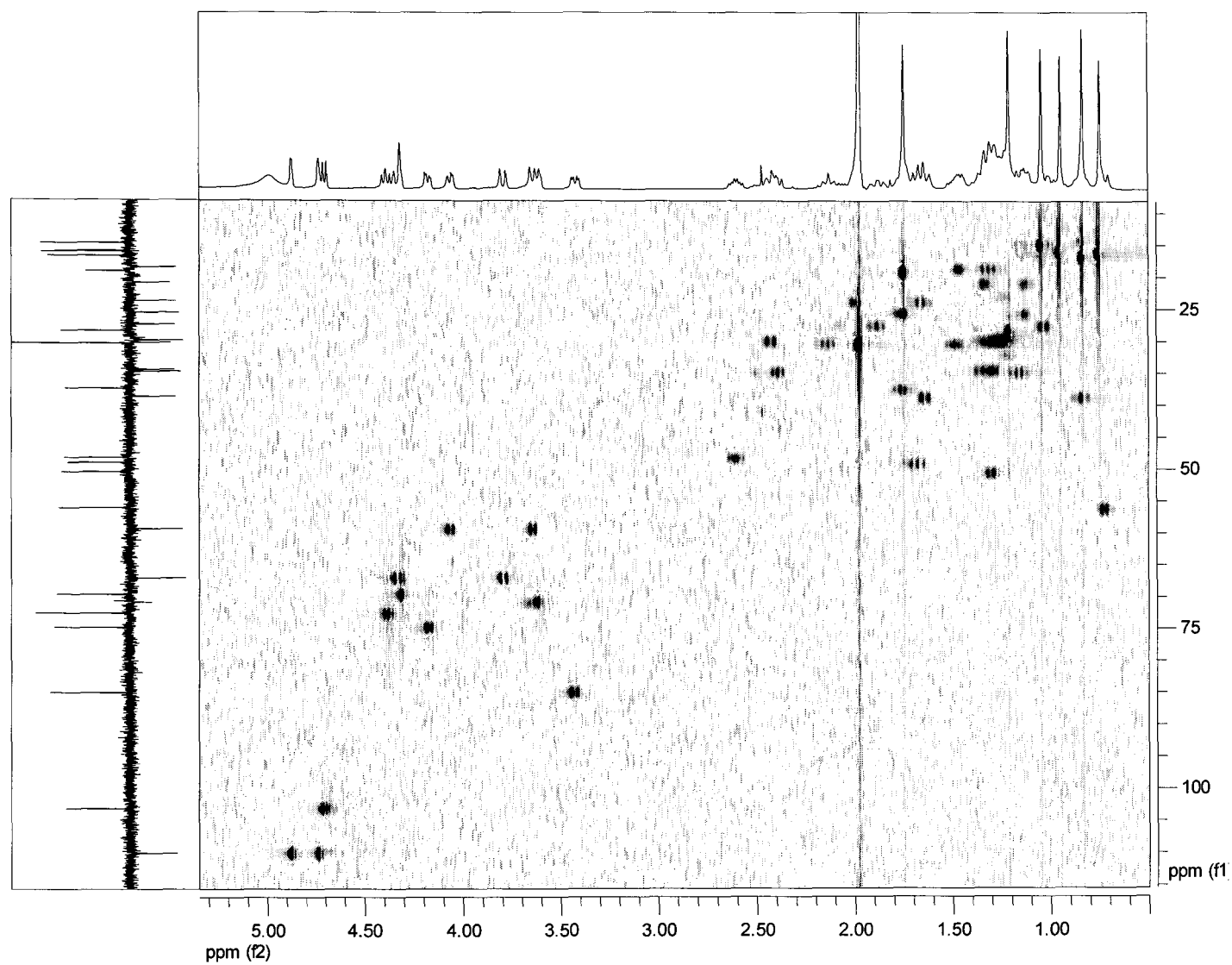
^{13}C 3-O- β -D-Arabinopyranoside de bétulinol (14)



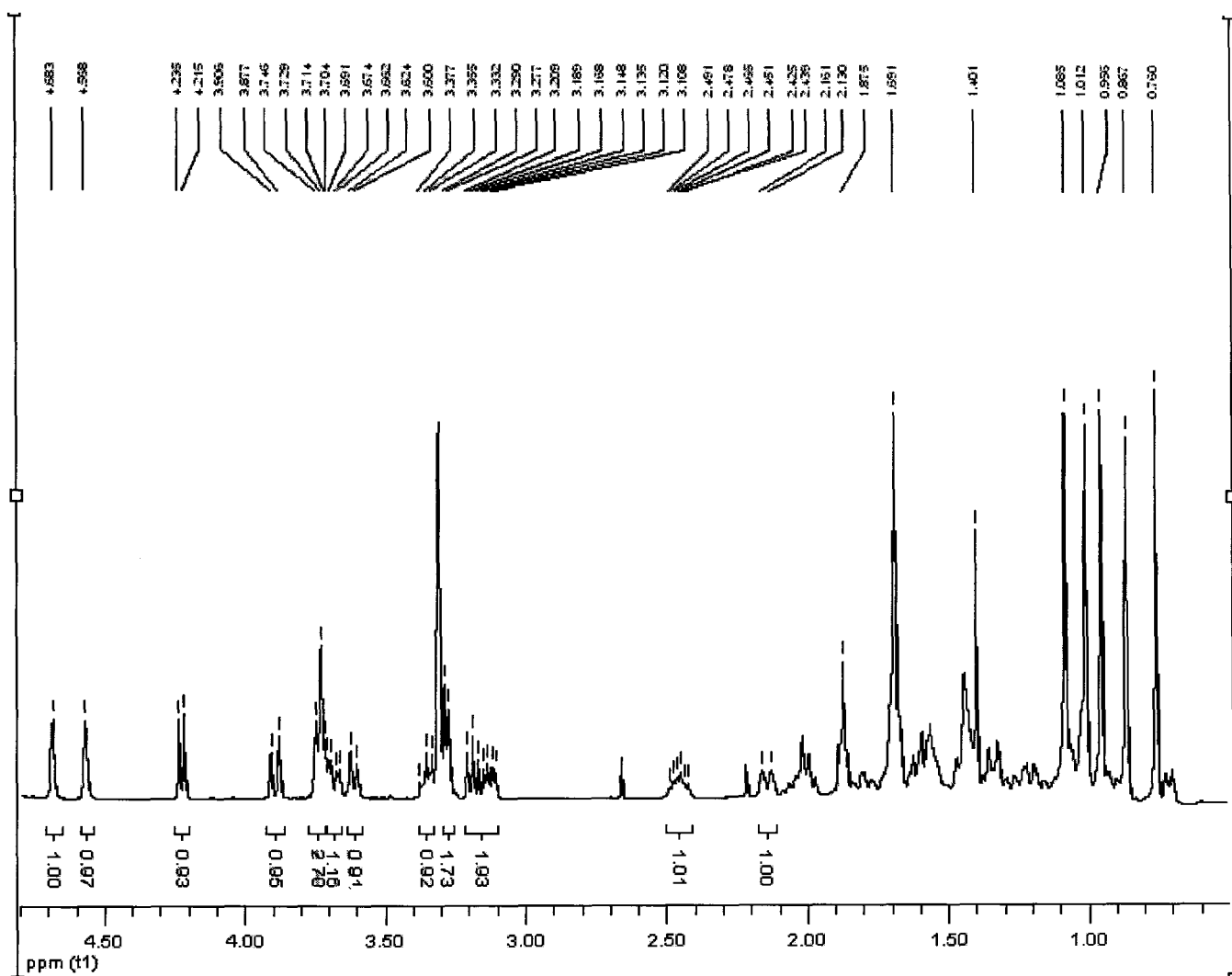
DEPT135 3-O-β-D-Arabinopyranoside de bétulinol (14)



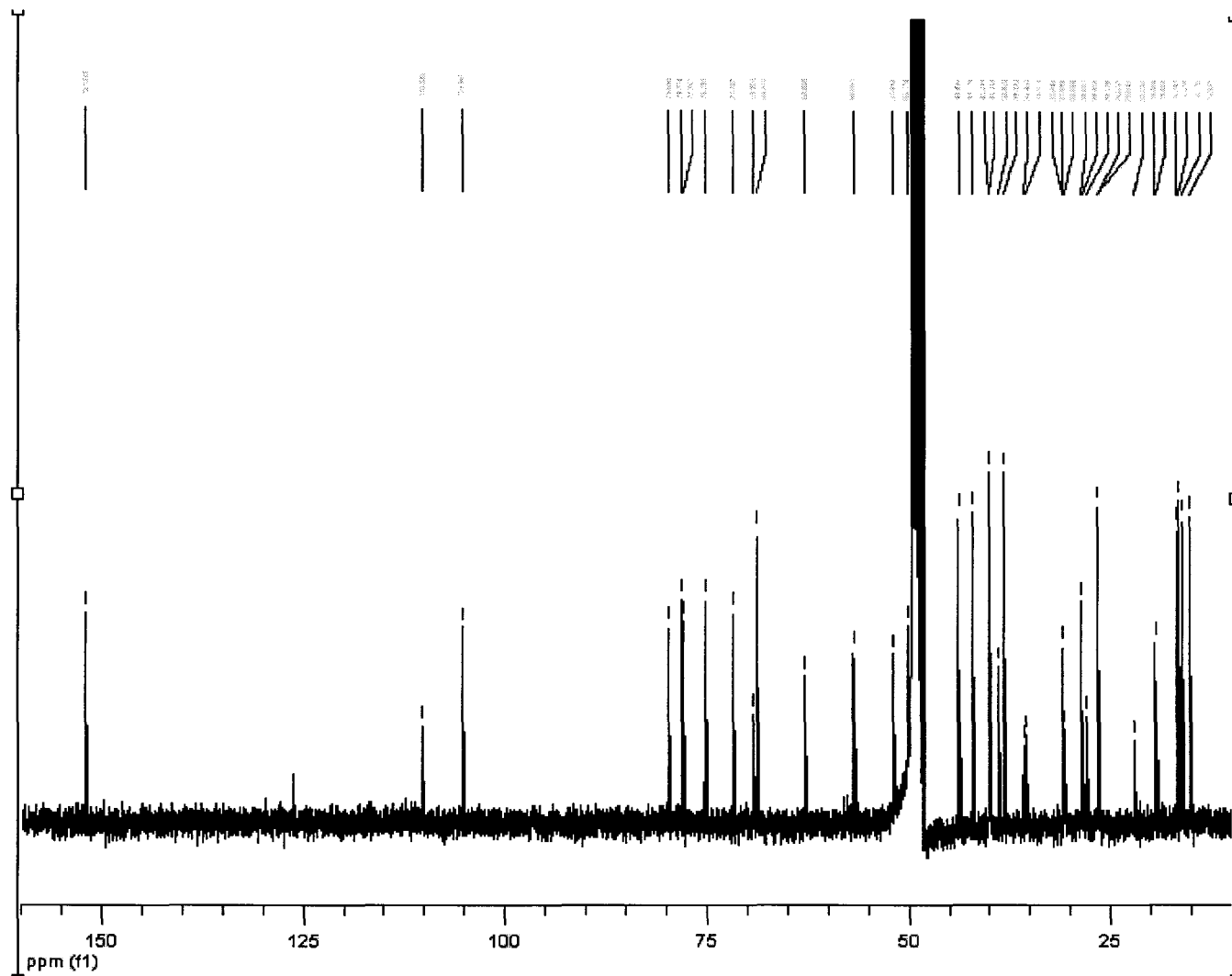
COSY 3-O- β -D-Arabinopyranoside de bétulinol (14)

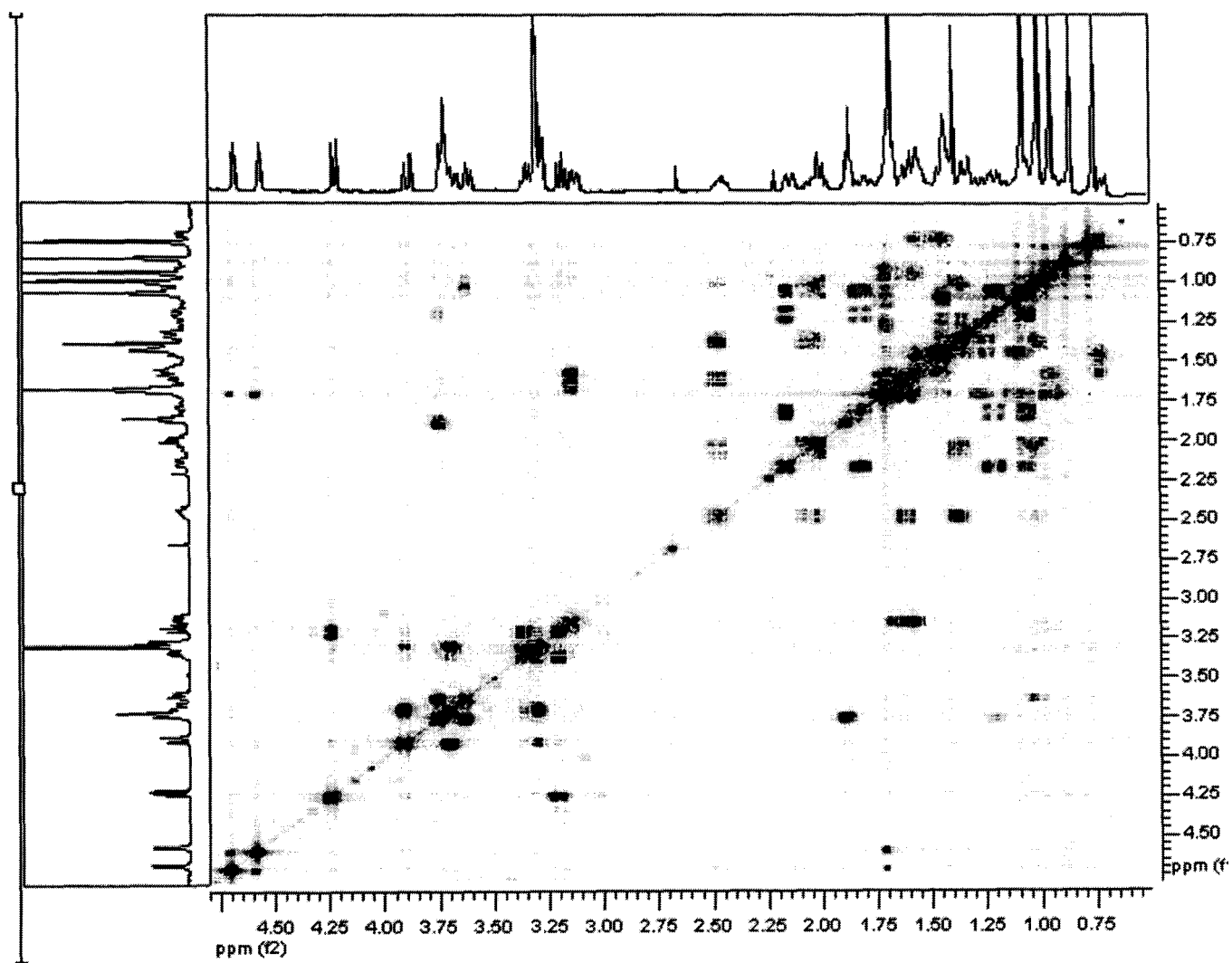


HSQC 3-O-β-D-Arabinopyranoside de bétulinol (14)

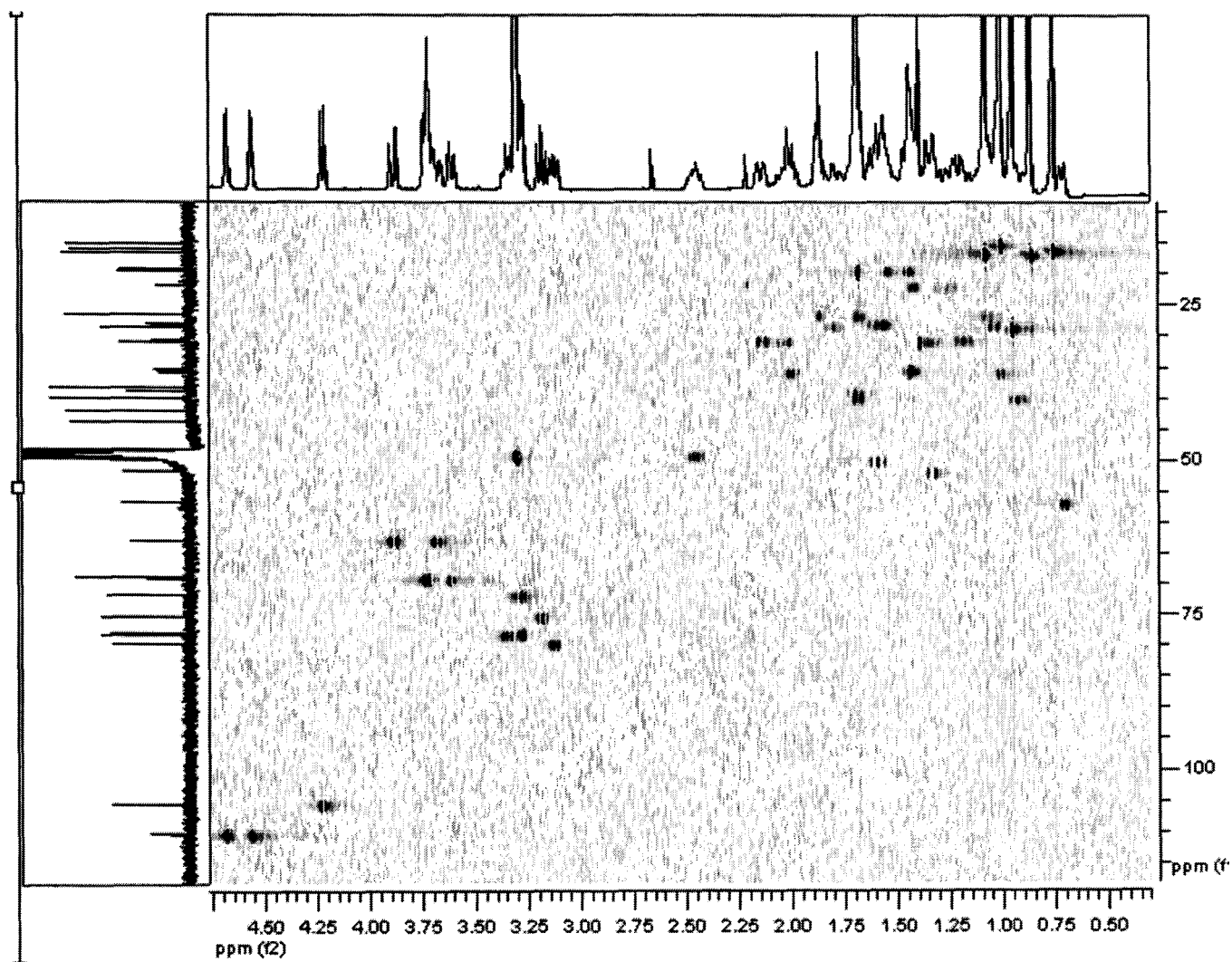


¹H 28-O-β-D-Glucopyranoside de bétulinol (15)

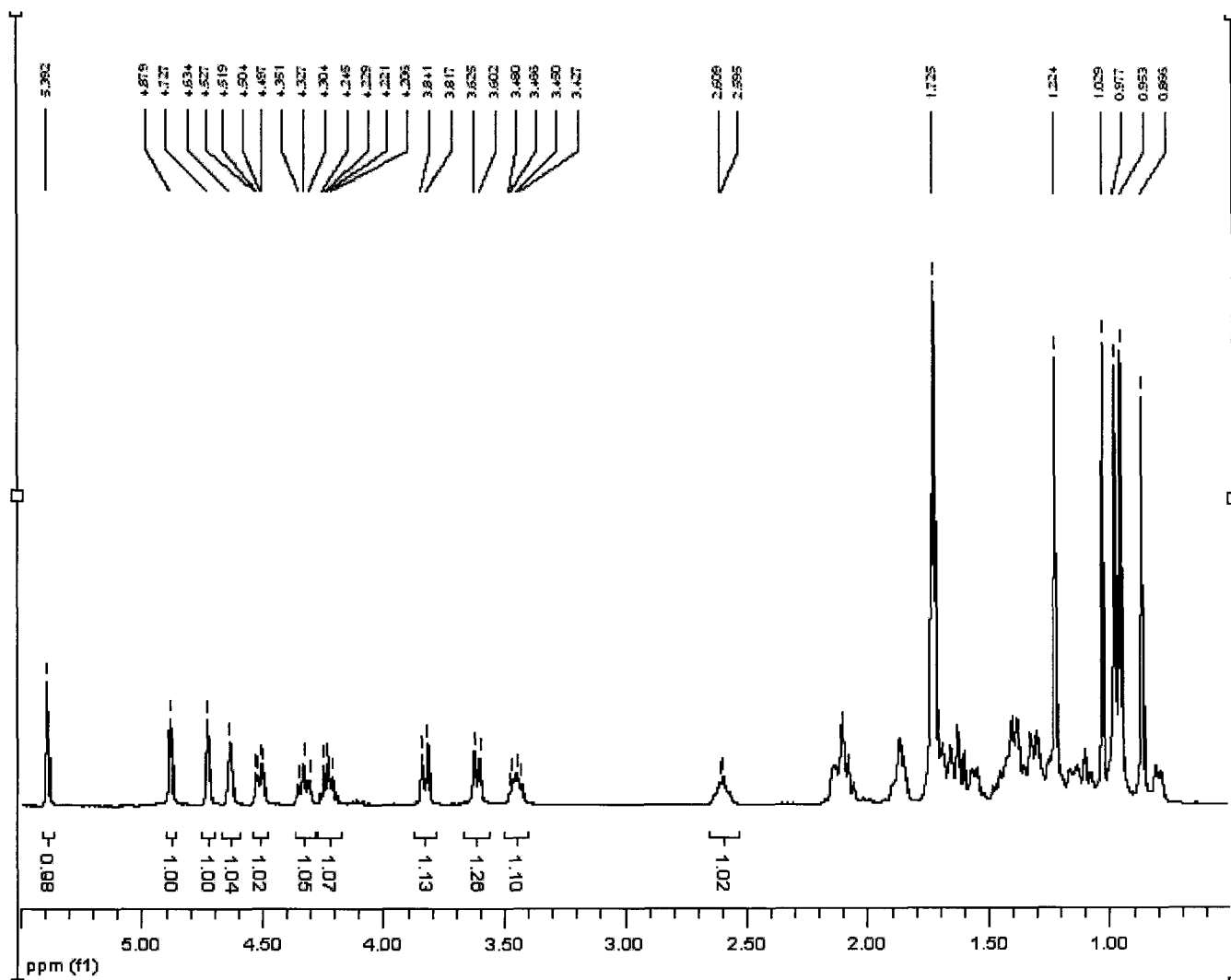




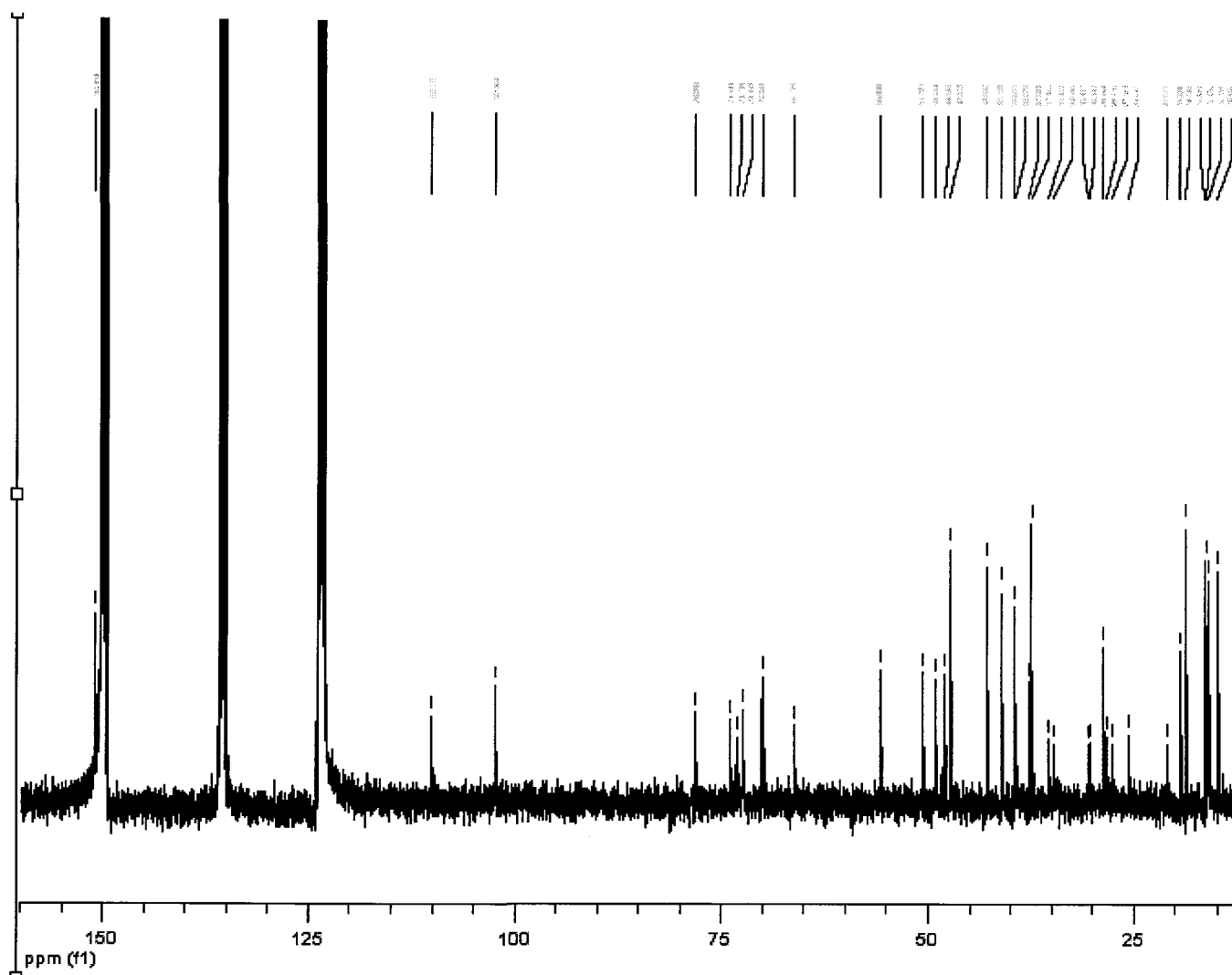
COSY 28-O-β-D-Glucopyranoside de bétulinol (15)



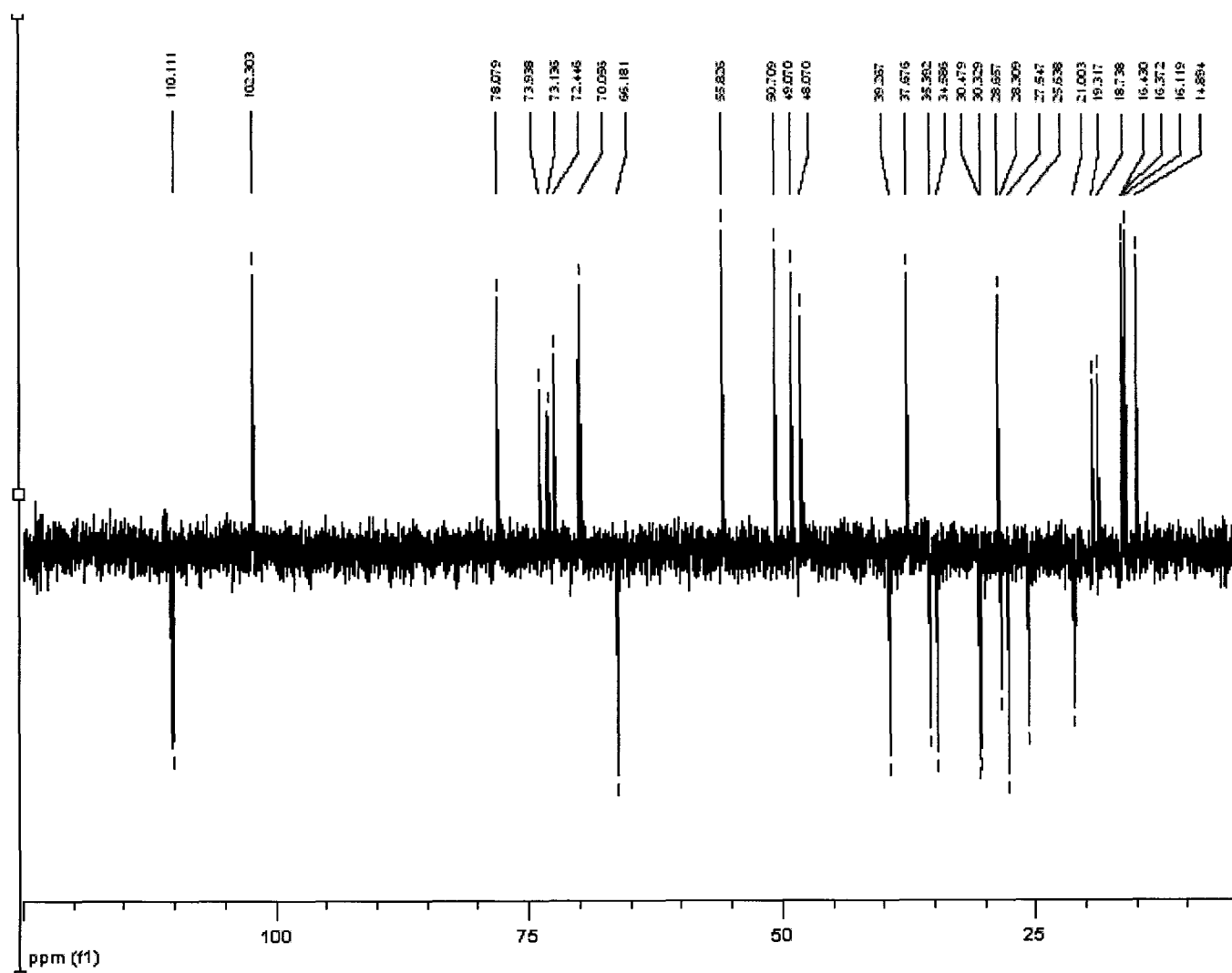
HSQC 28-O-β-D-Glucopyranoside de bétulinol (**15**)



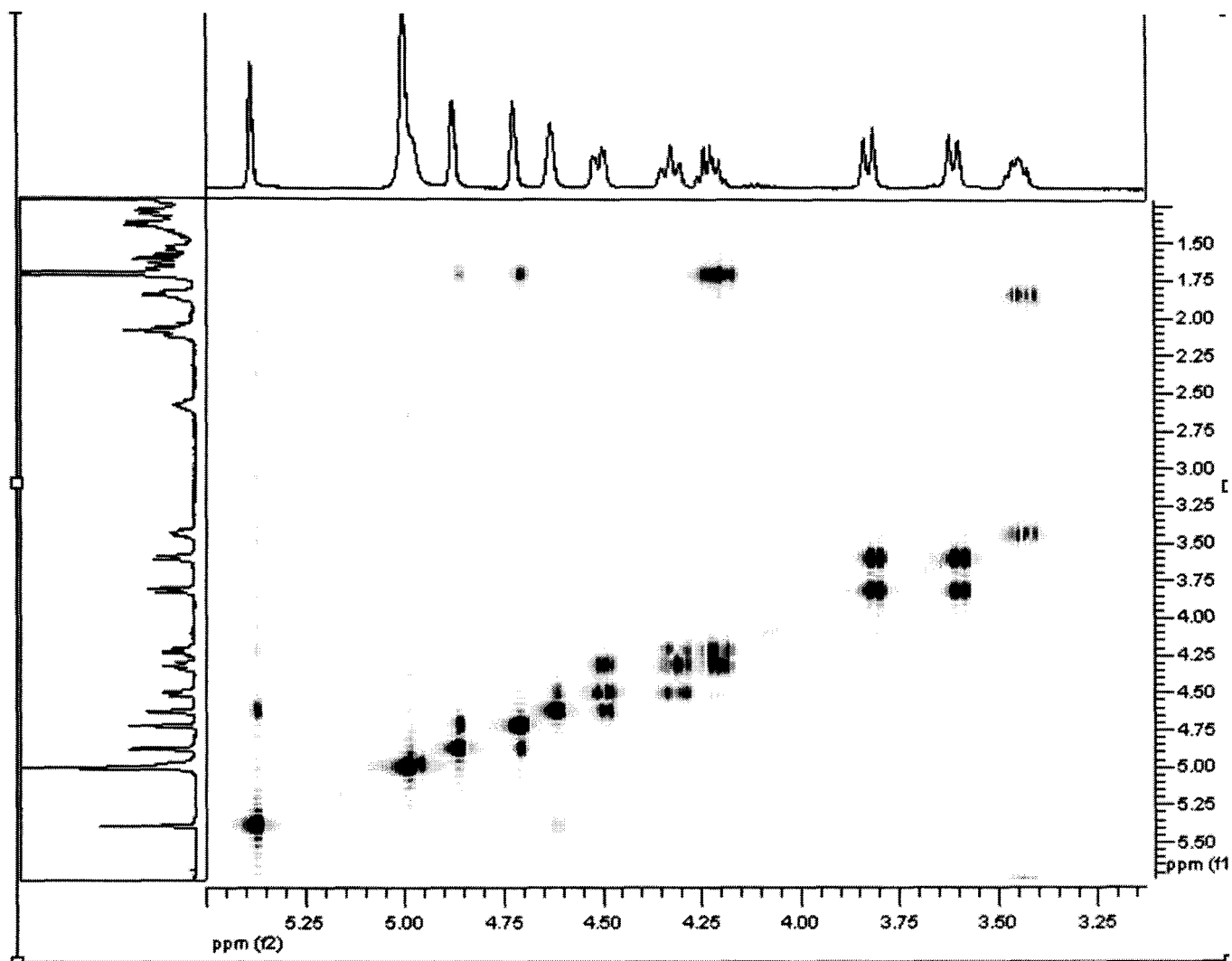
¹H 28-O-α-L-Rhamnopyranoside de bétulinol (**16**)



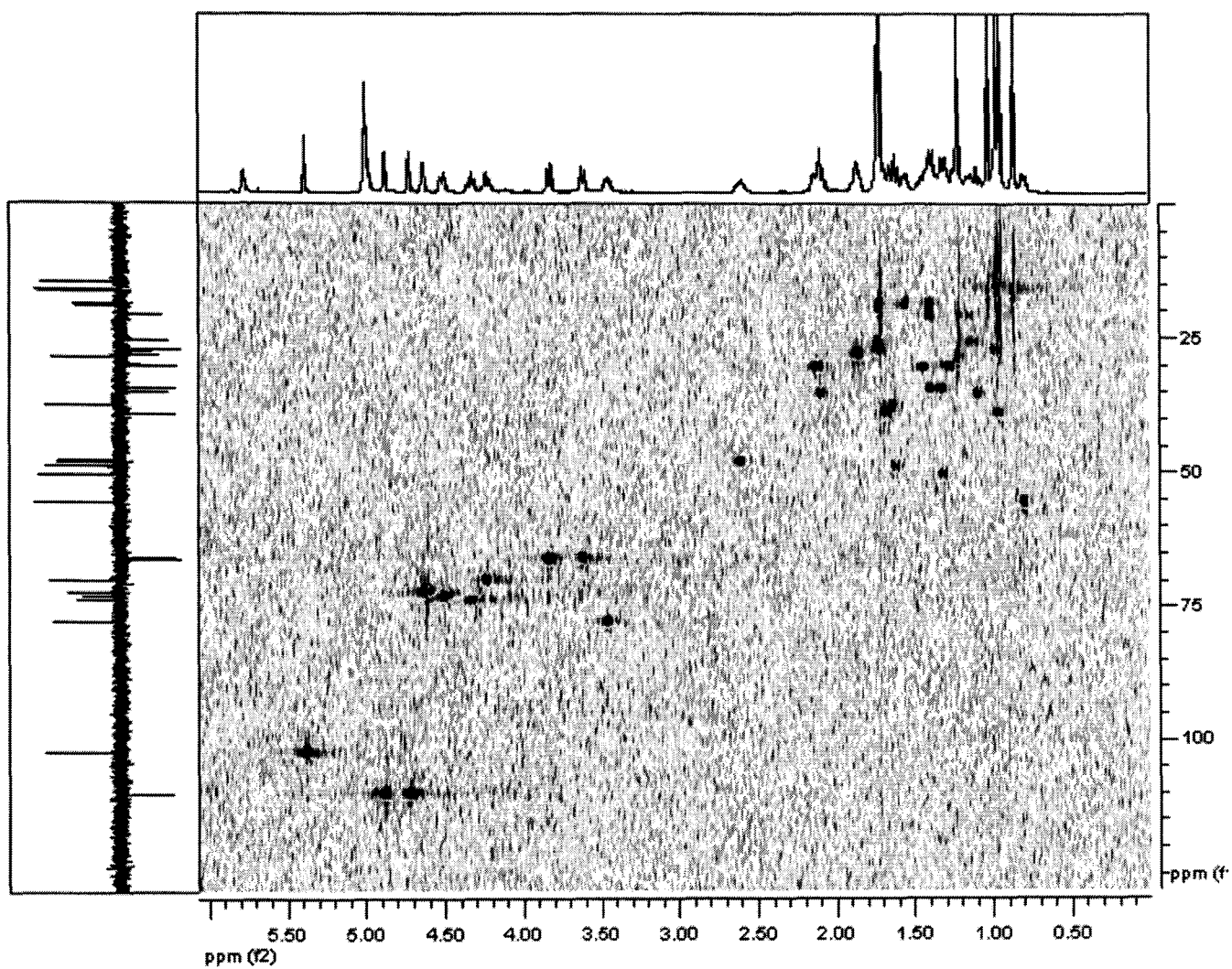
^{13}C 28-O- α -L-Rhamnopyranoside de bétulinol (**16**)



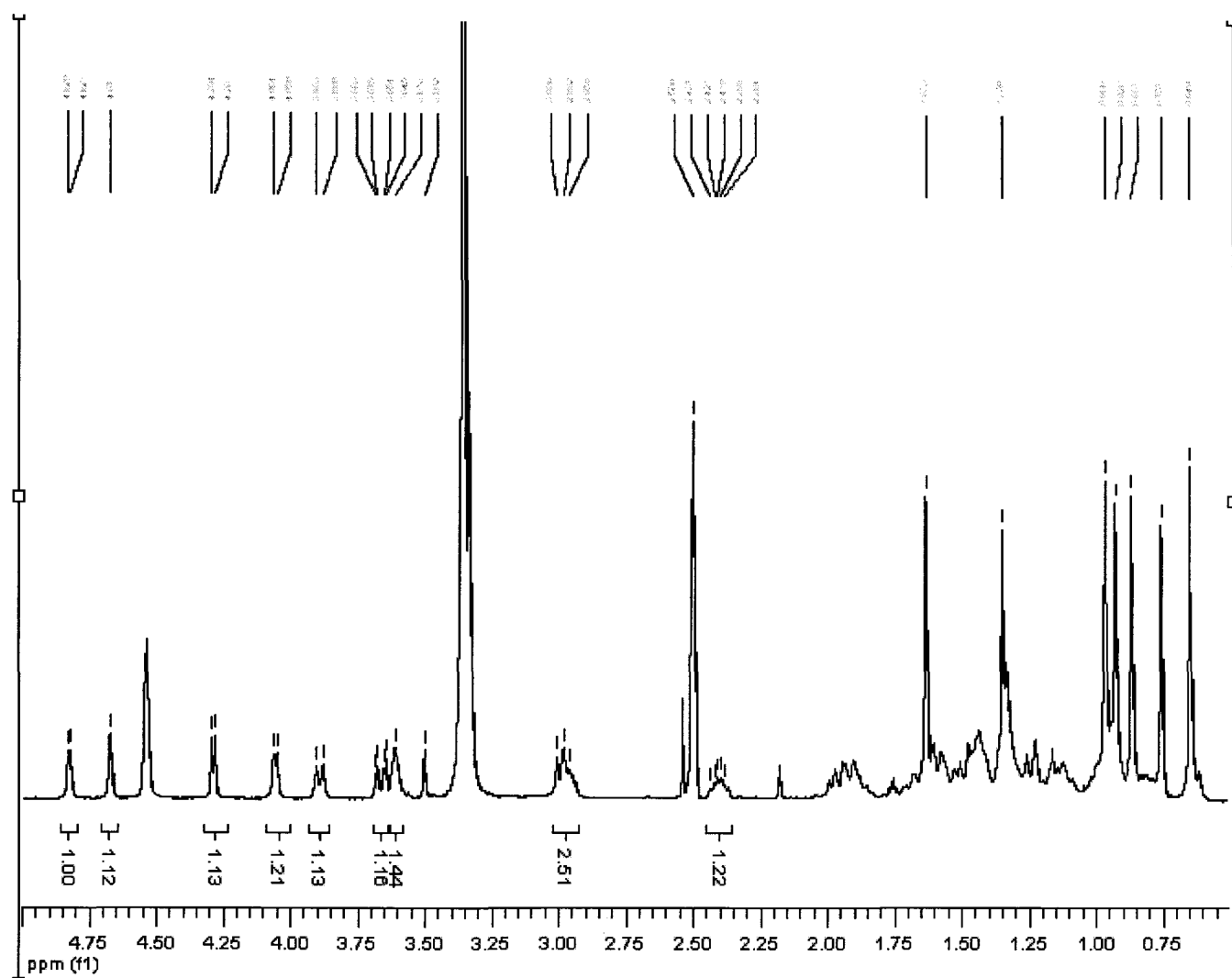
DEPT135 28-O- α -L-Rhamnopyranoside de bétulinol (16)



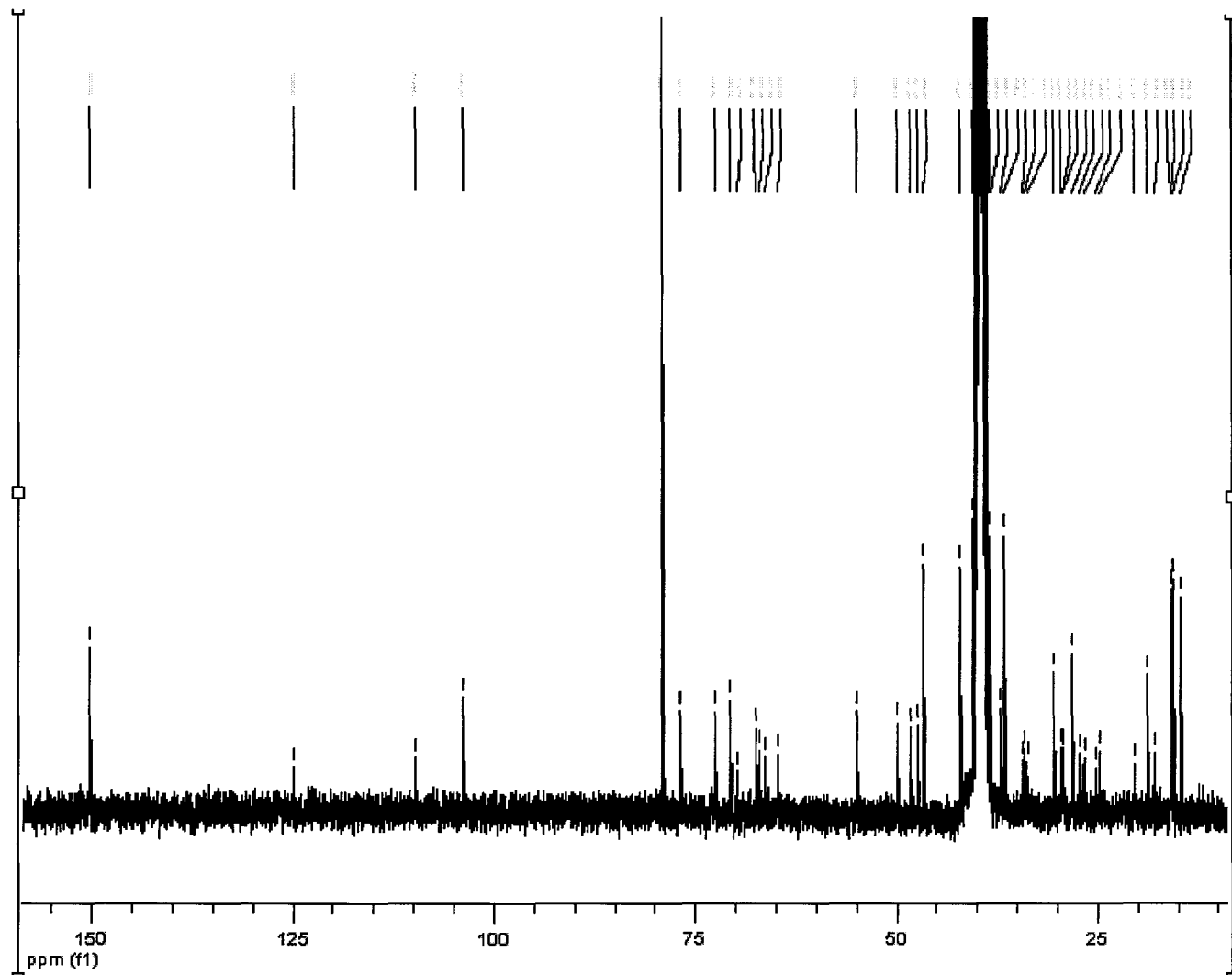
COSY 28-O- α -L-Rhamnopyranoside de bétulinol (16)



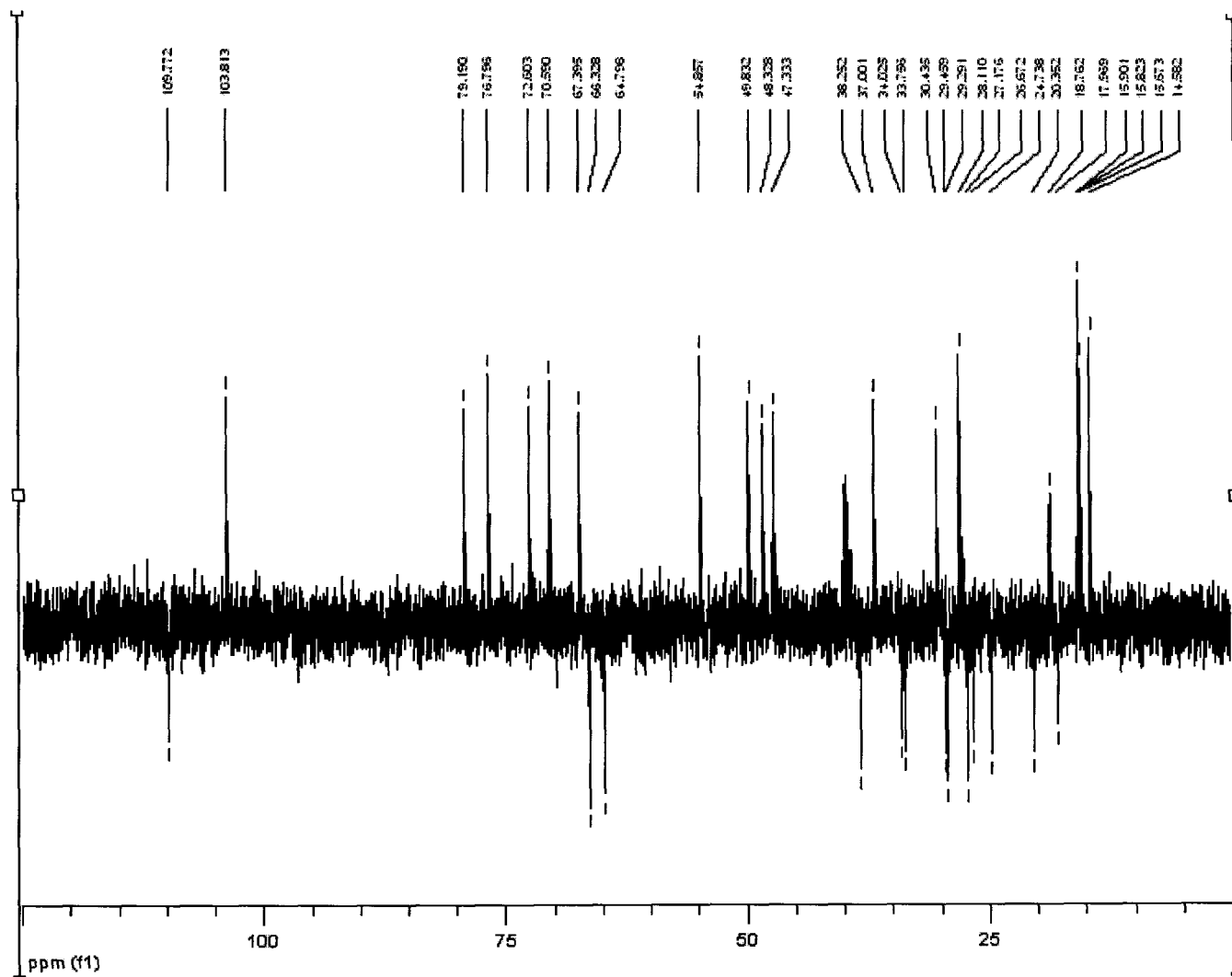
HSQC 28-O- α -L-Rhamnopyranoside de bétulinol (**16**)



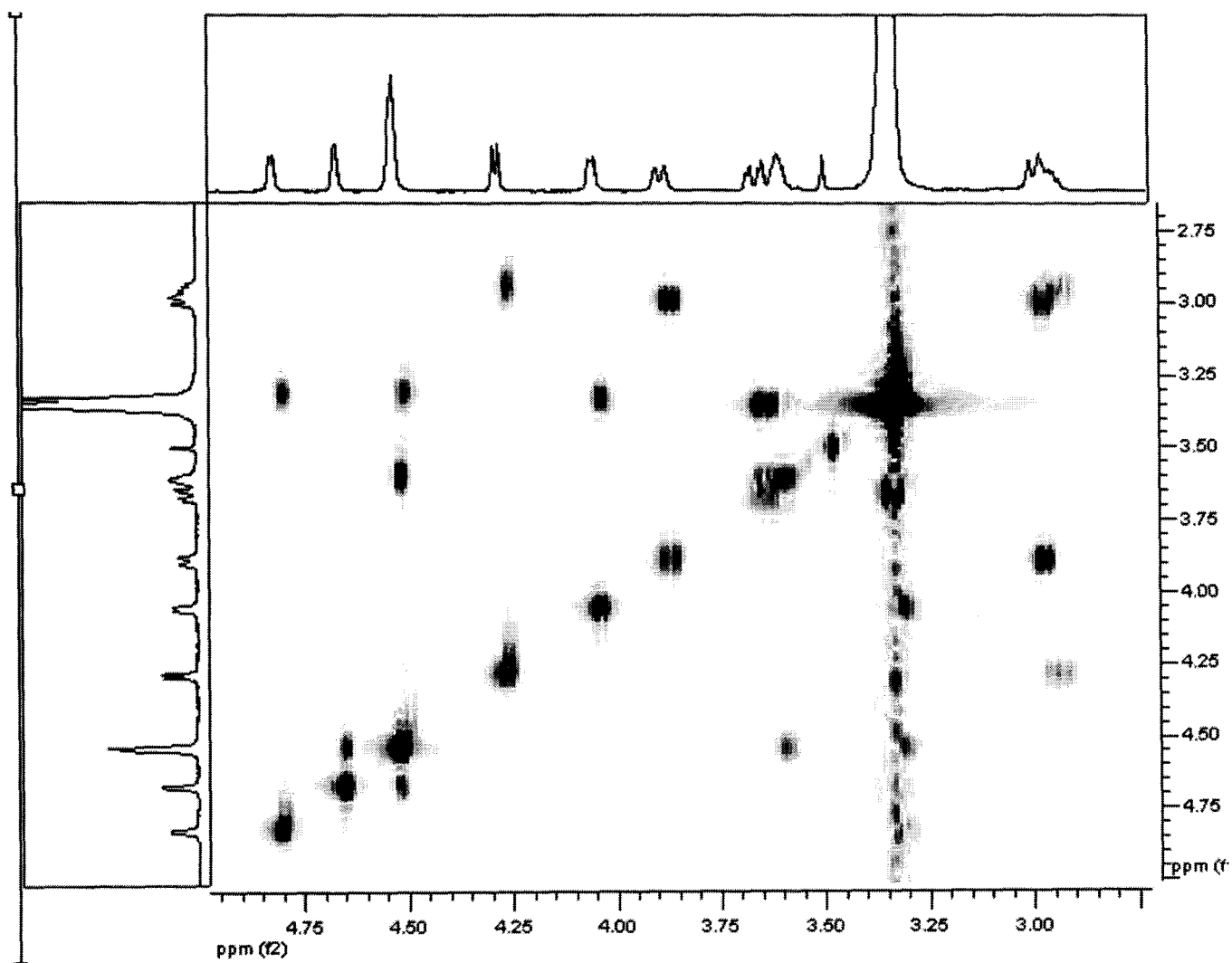
¹H 28-O-β-D-Arabinopyranoside de bétulinol (17)



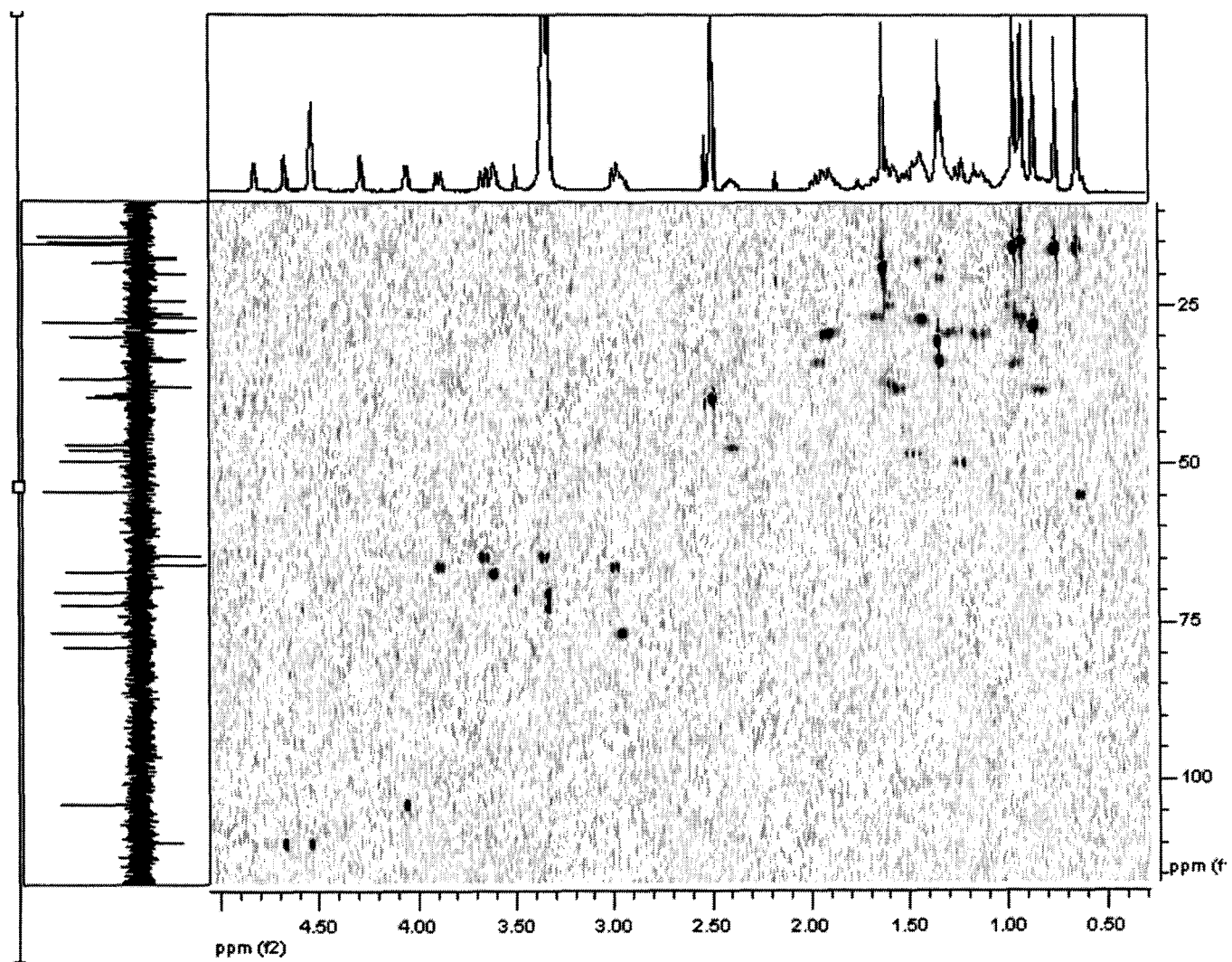
¹³C 28-O-β-D-Arabinopyranoside de betulinol (17)



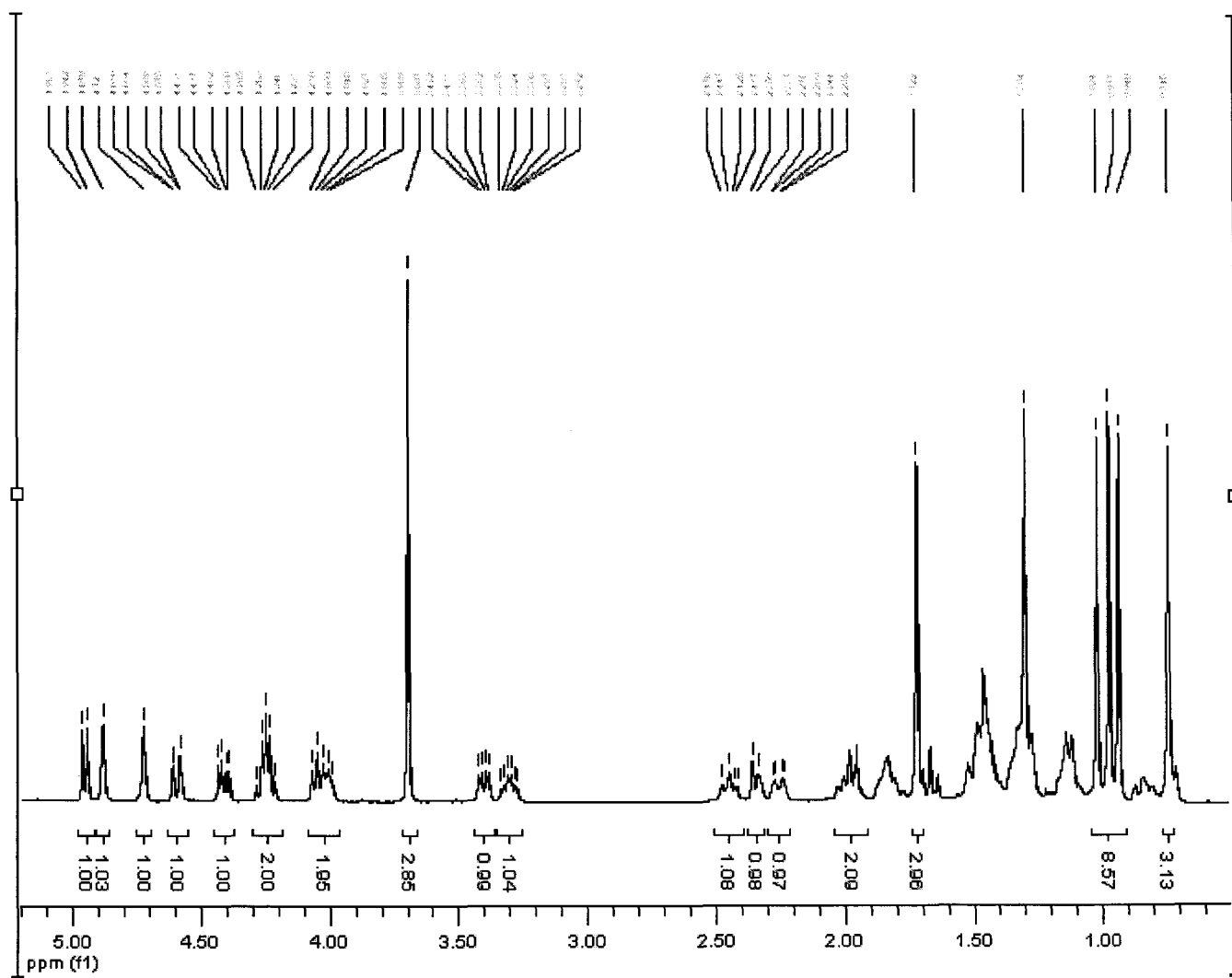
DEPT135 28-O-β-D-Arabinopyranoside de bétulinol (17)



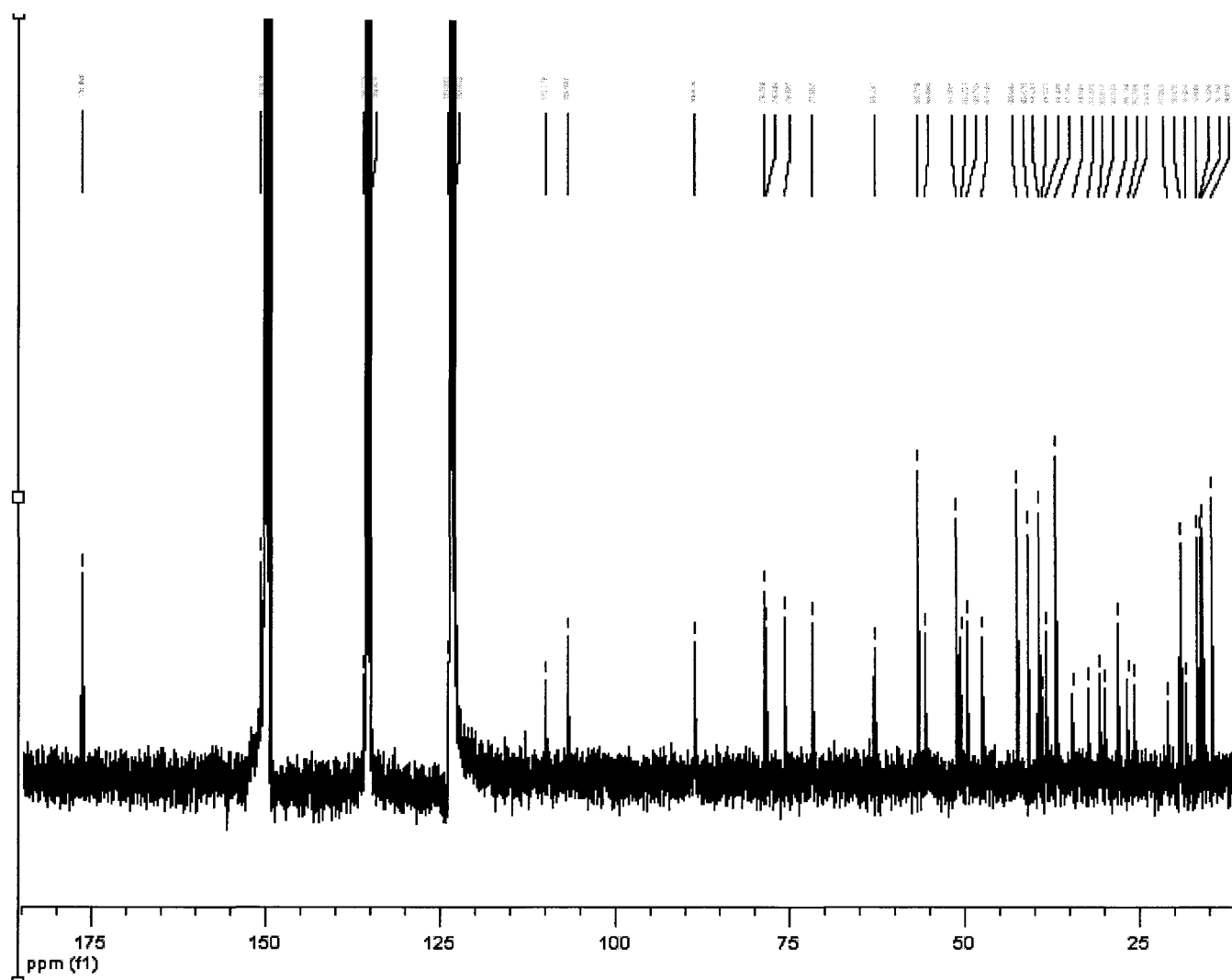
COSY 28-O-β-D-Arabinopyranoside de bétulinol (17)



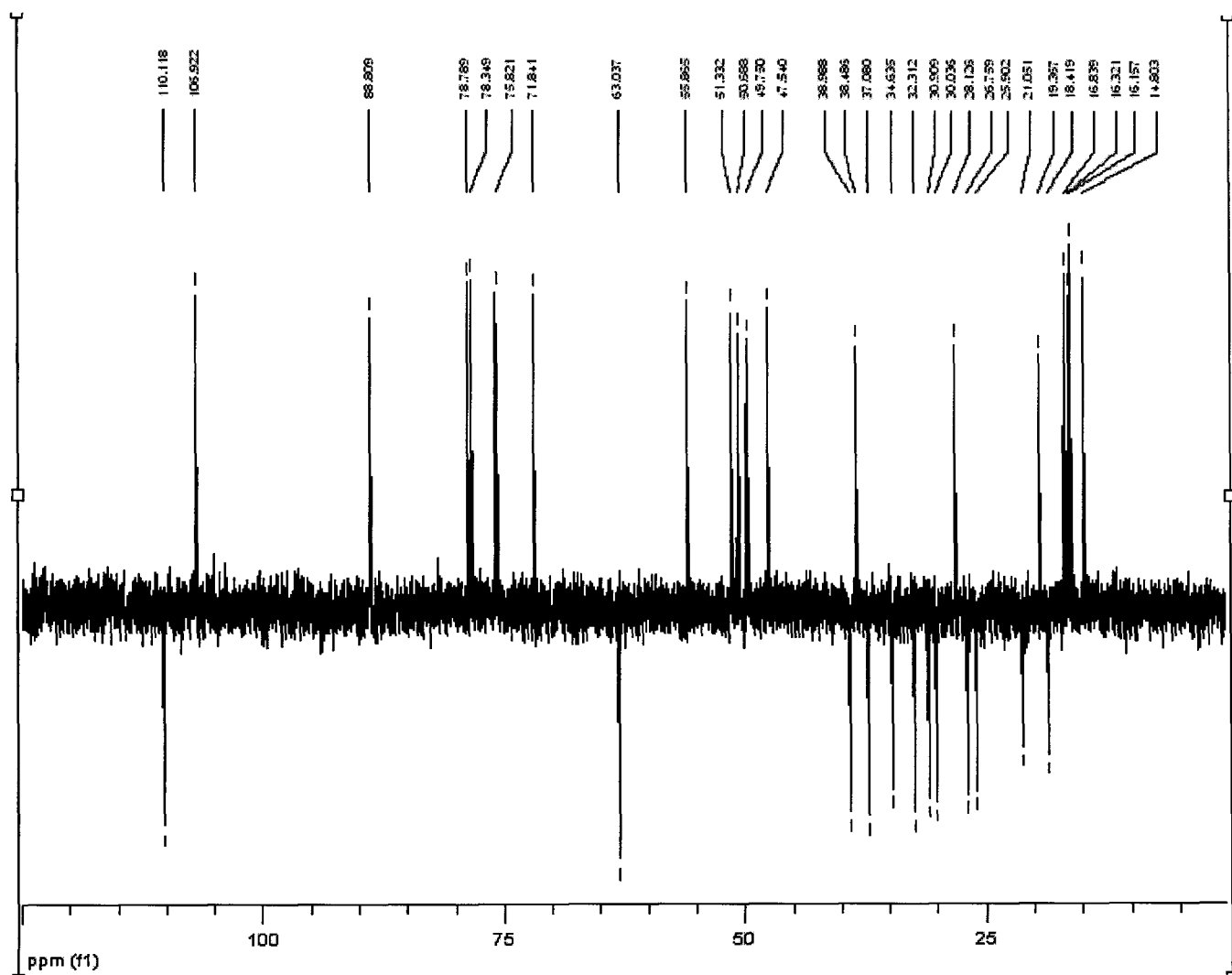
HSQC 28-O-β-D-Arabinopyranoside de bétulinol (17)



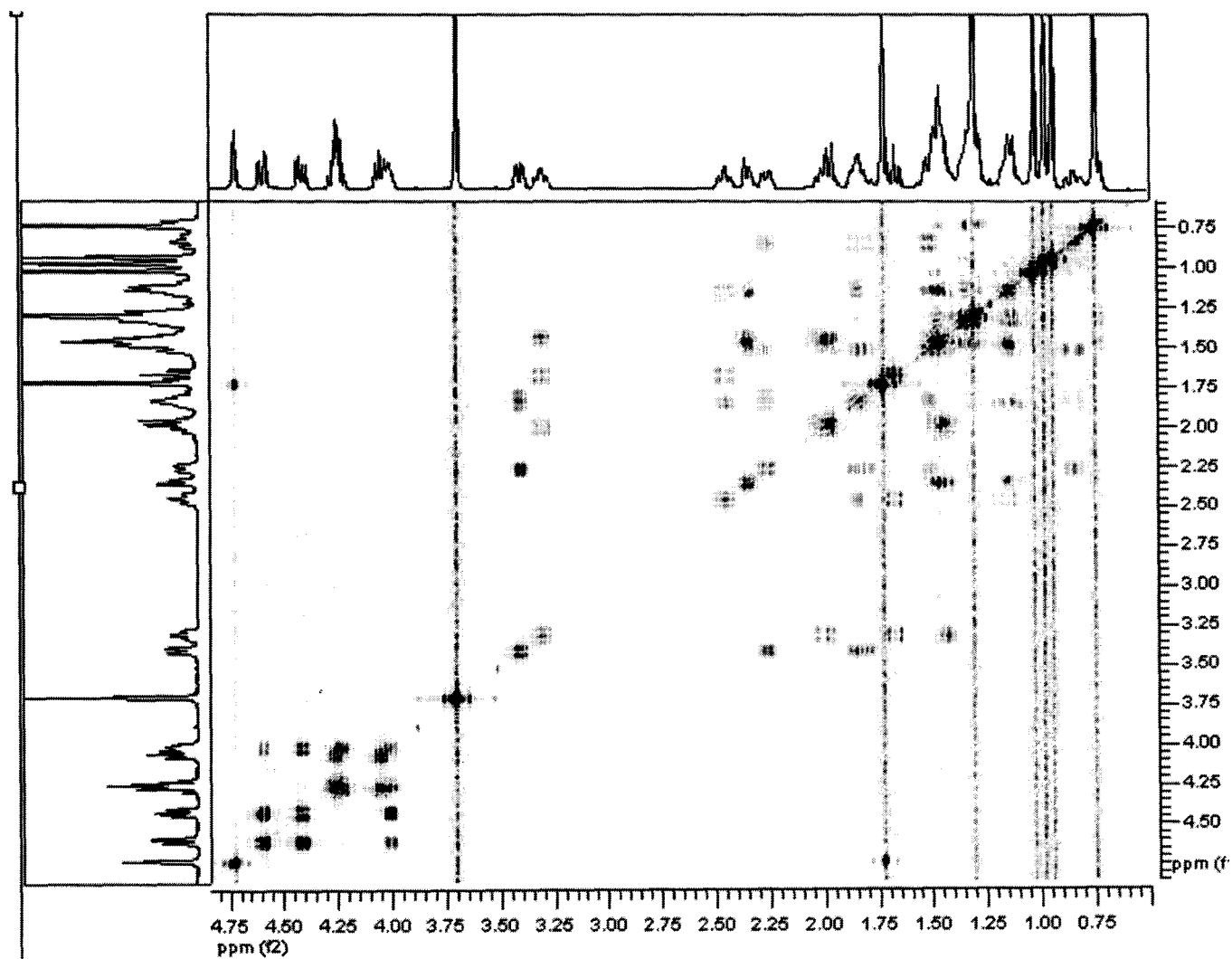
¹H 3-O-β-D-Glucopyranoside de bétulinate de méthyle (**18**)



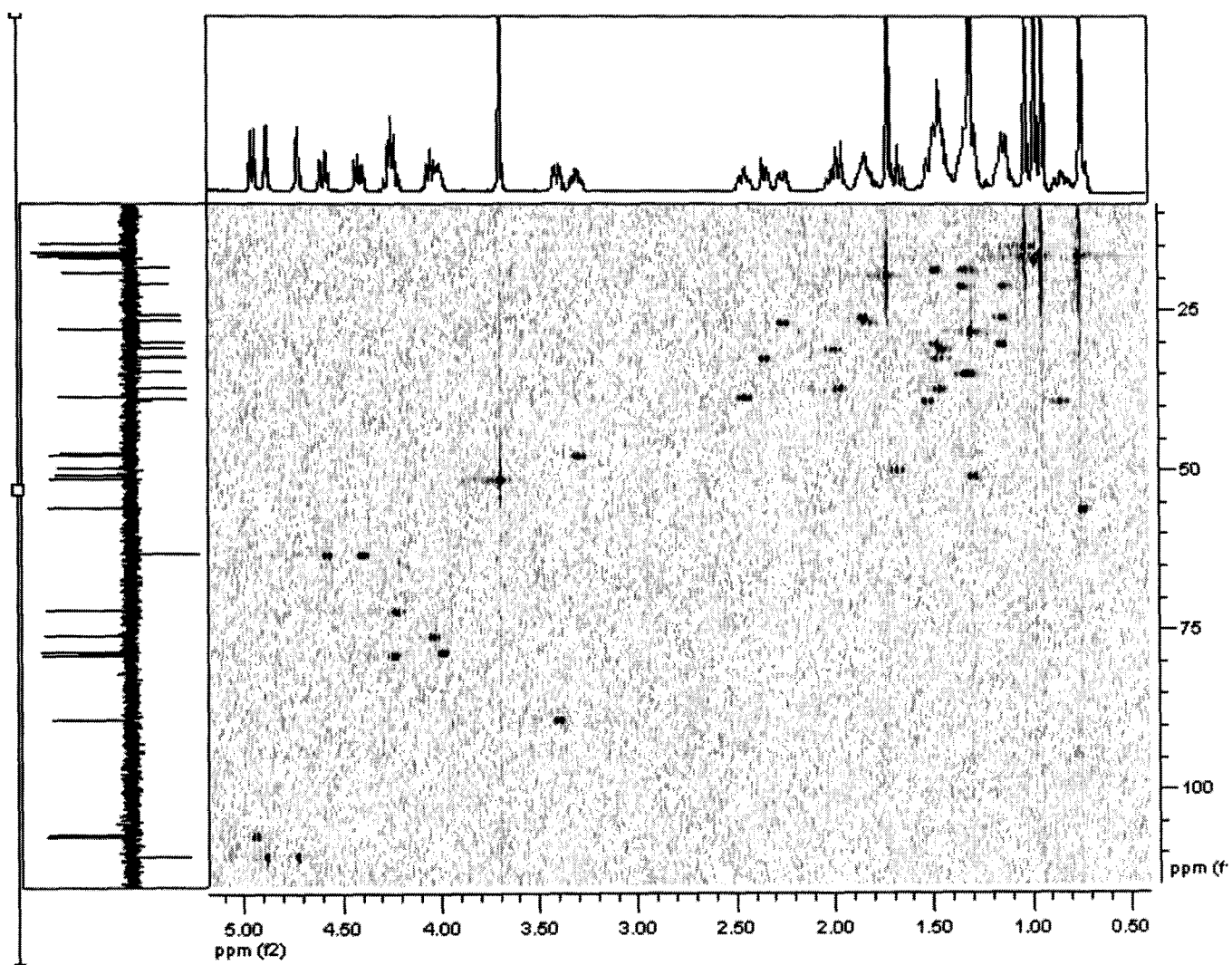
¹³C 3-O-β-D-Glucopyranoside de bétulinate de méthyle (18)



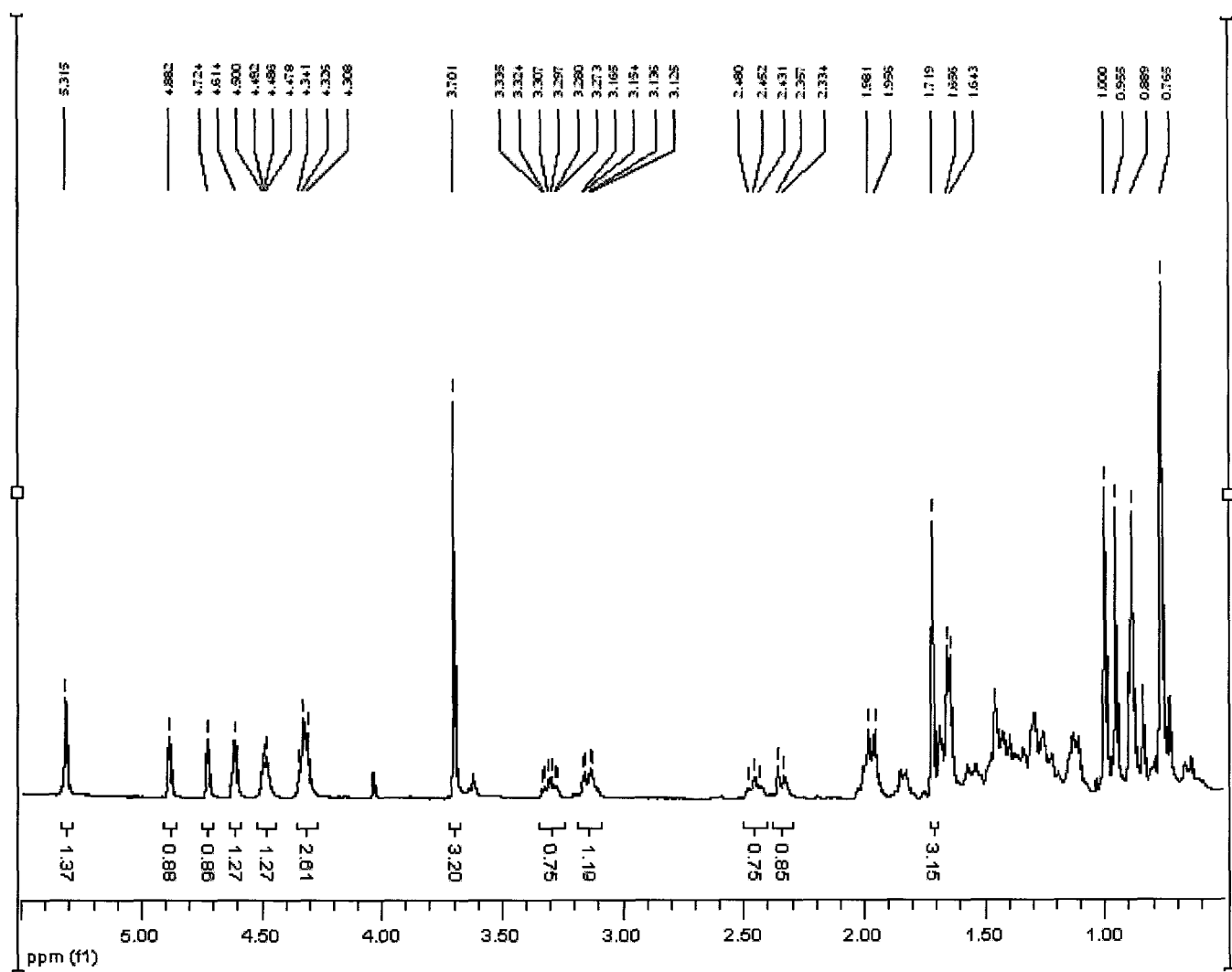
DEPT135 3-O- β -D-Glucopyranoside de bétulinate de méthyle (**18**)



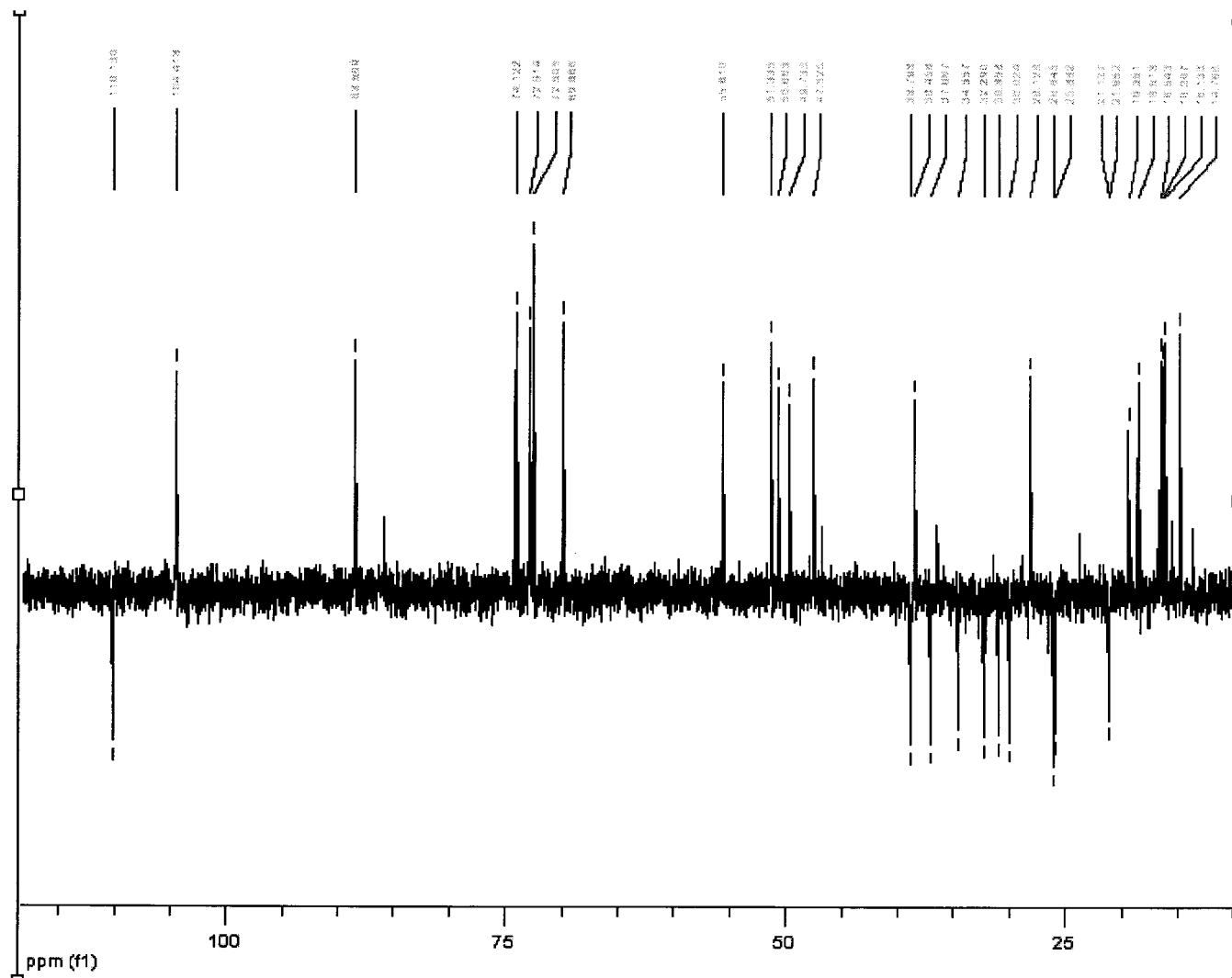
COSY 3-O- β -D-Glucopyranoside de bétulinate de méthyle (18)



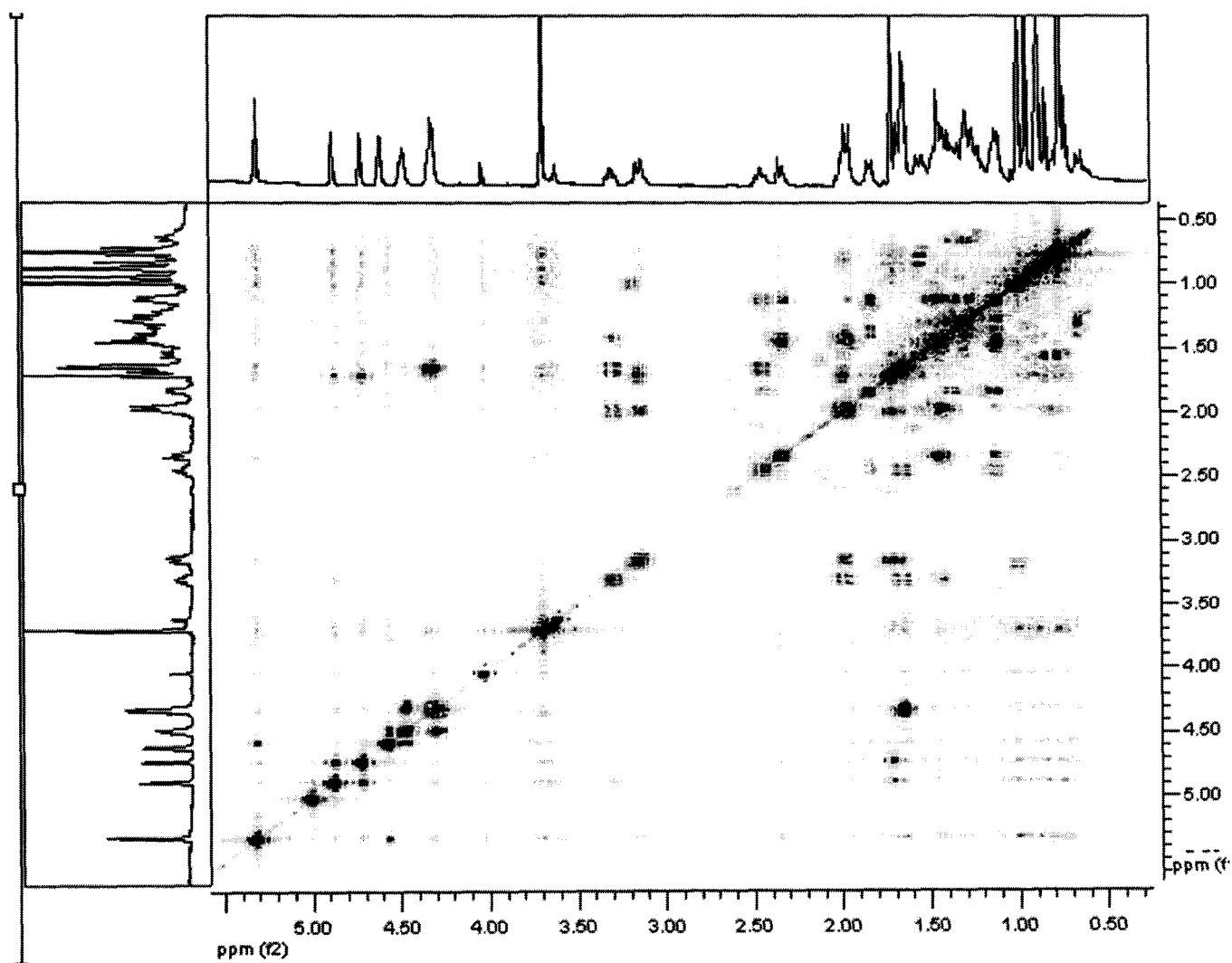
HSQC 3-O- β -D-Glucopyranoside de bétulinate de méthyle (18)



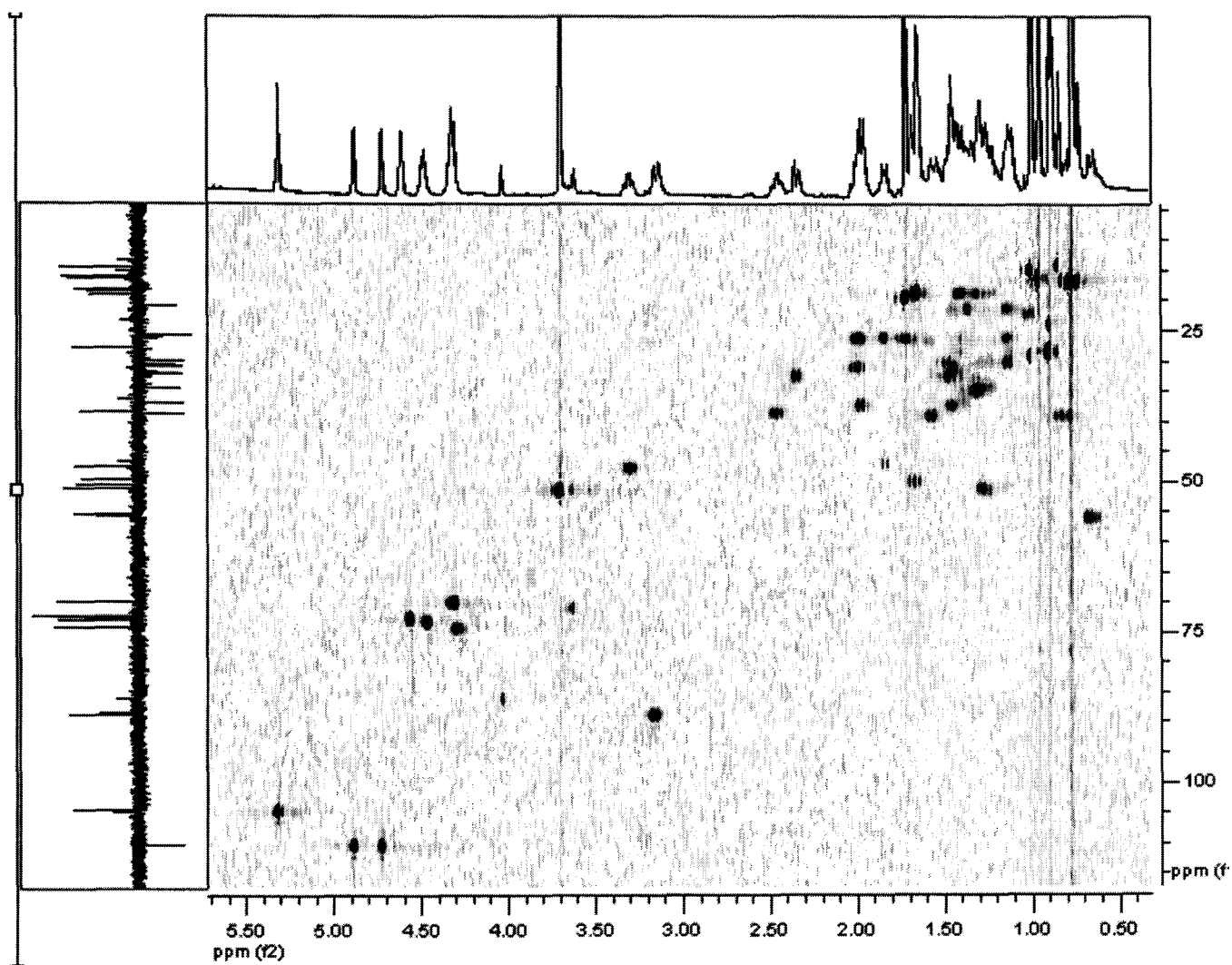
¹H 3-O-α-L-Rhamnopyranoside de bétulinate de méthyle (19)



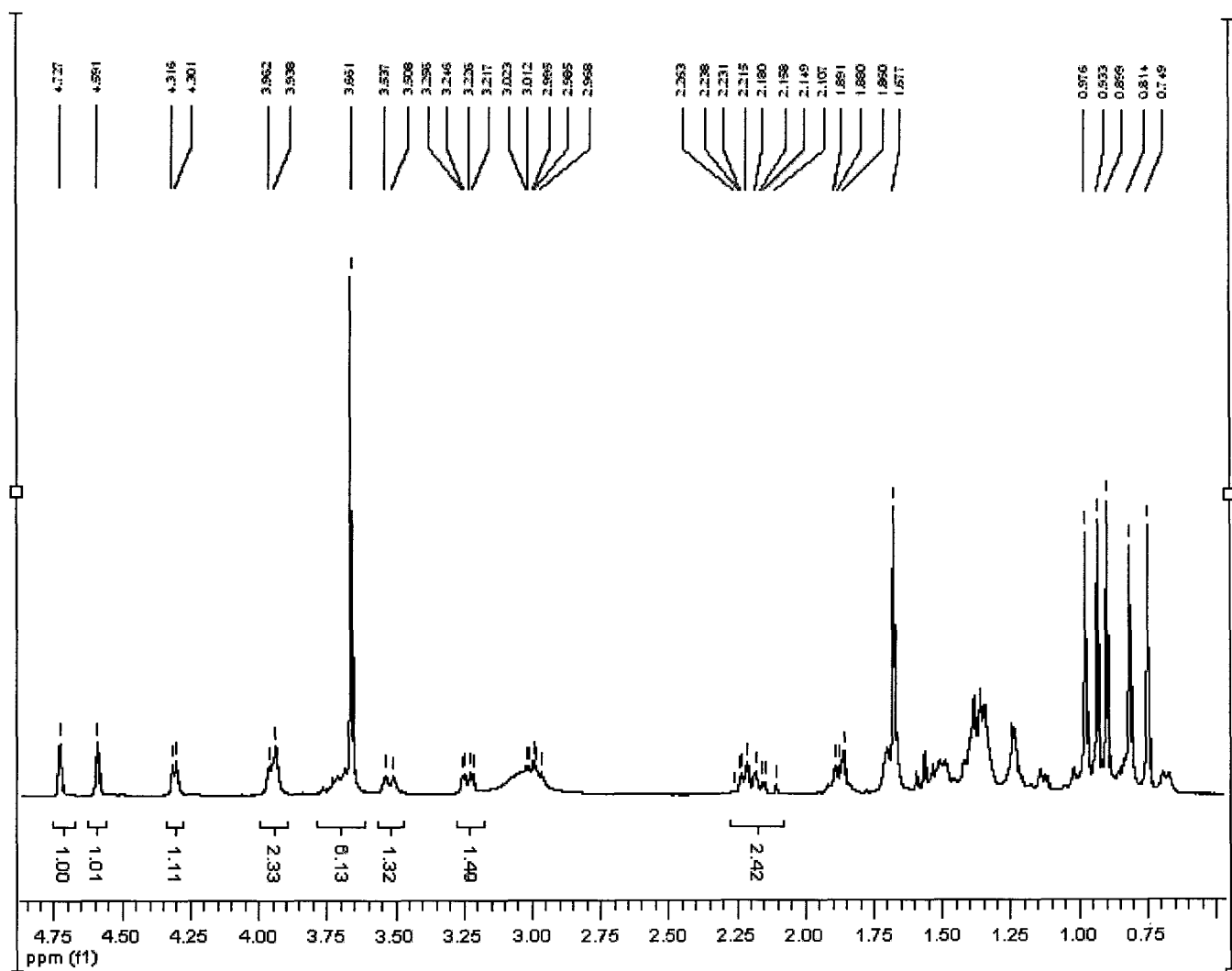
DEPT135 3-O- α -L-Rhamnopyranoside de bétulinate de méthyle (19)



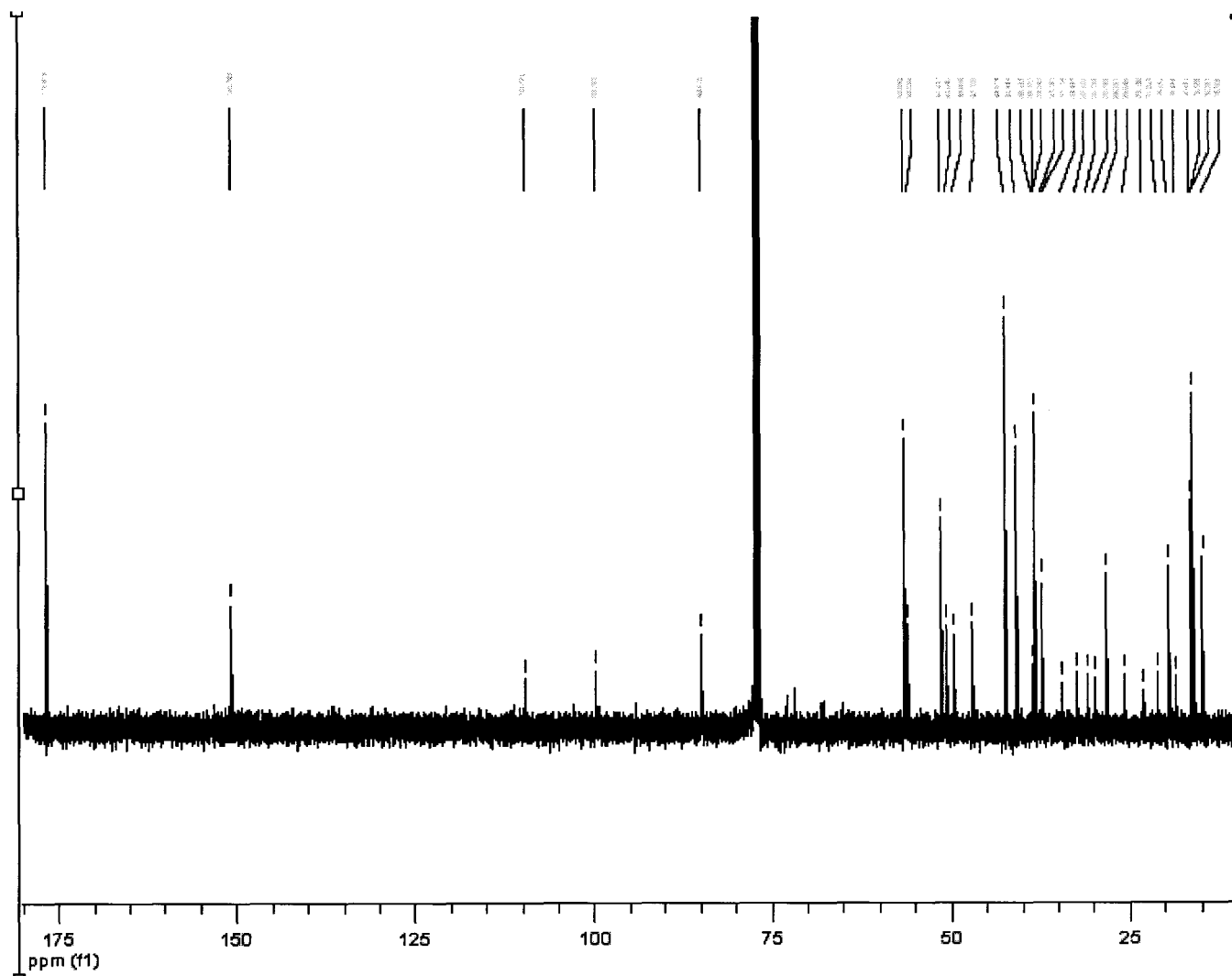
COSY 3-O- α -L-Rhamnopyranoside de bétulinate de méthyle (19)



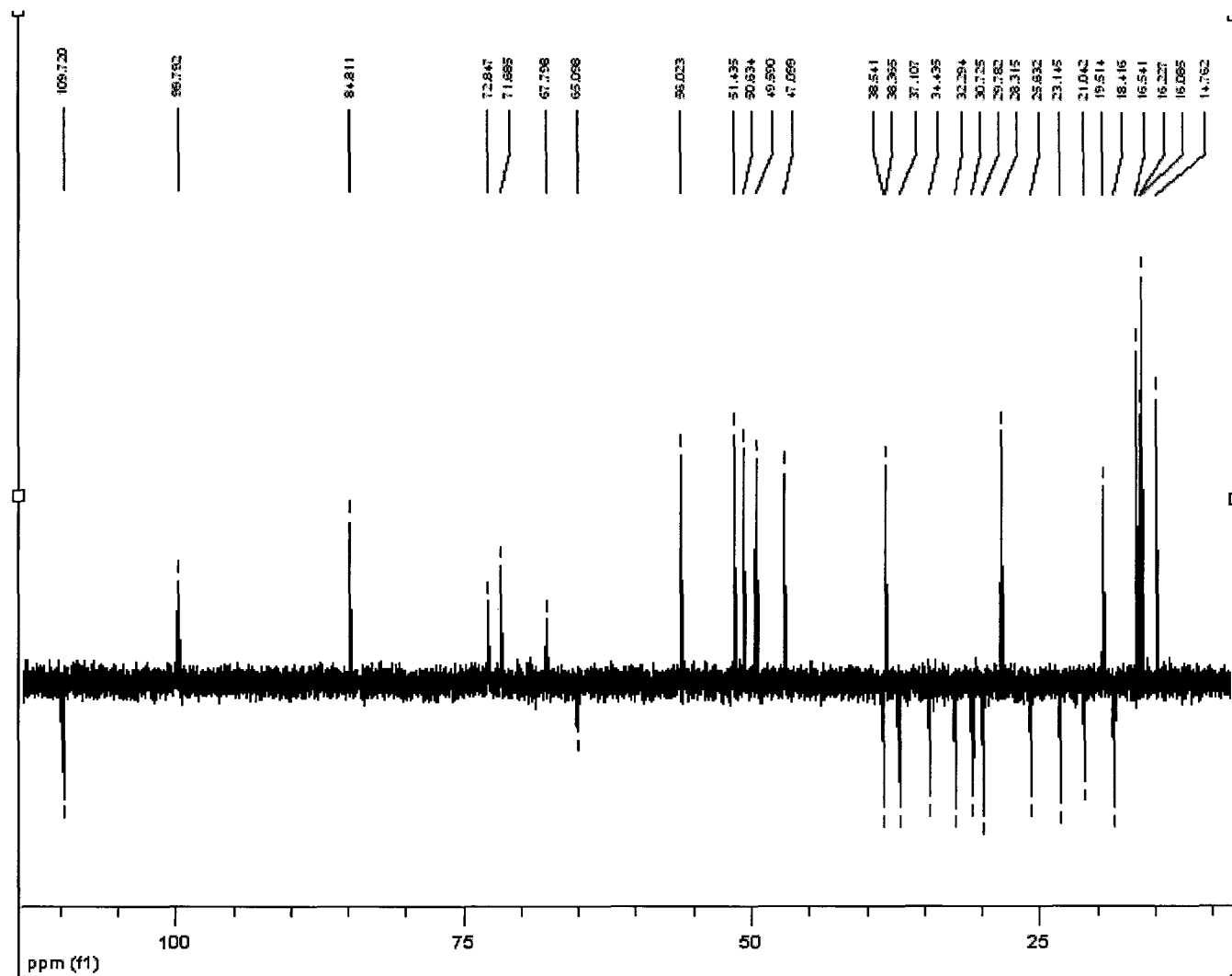
HSQC 3-O- α -L-Rhamnopyranoside de bétulinate de méthyle (19)



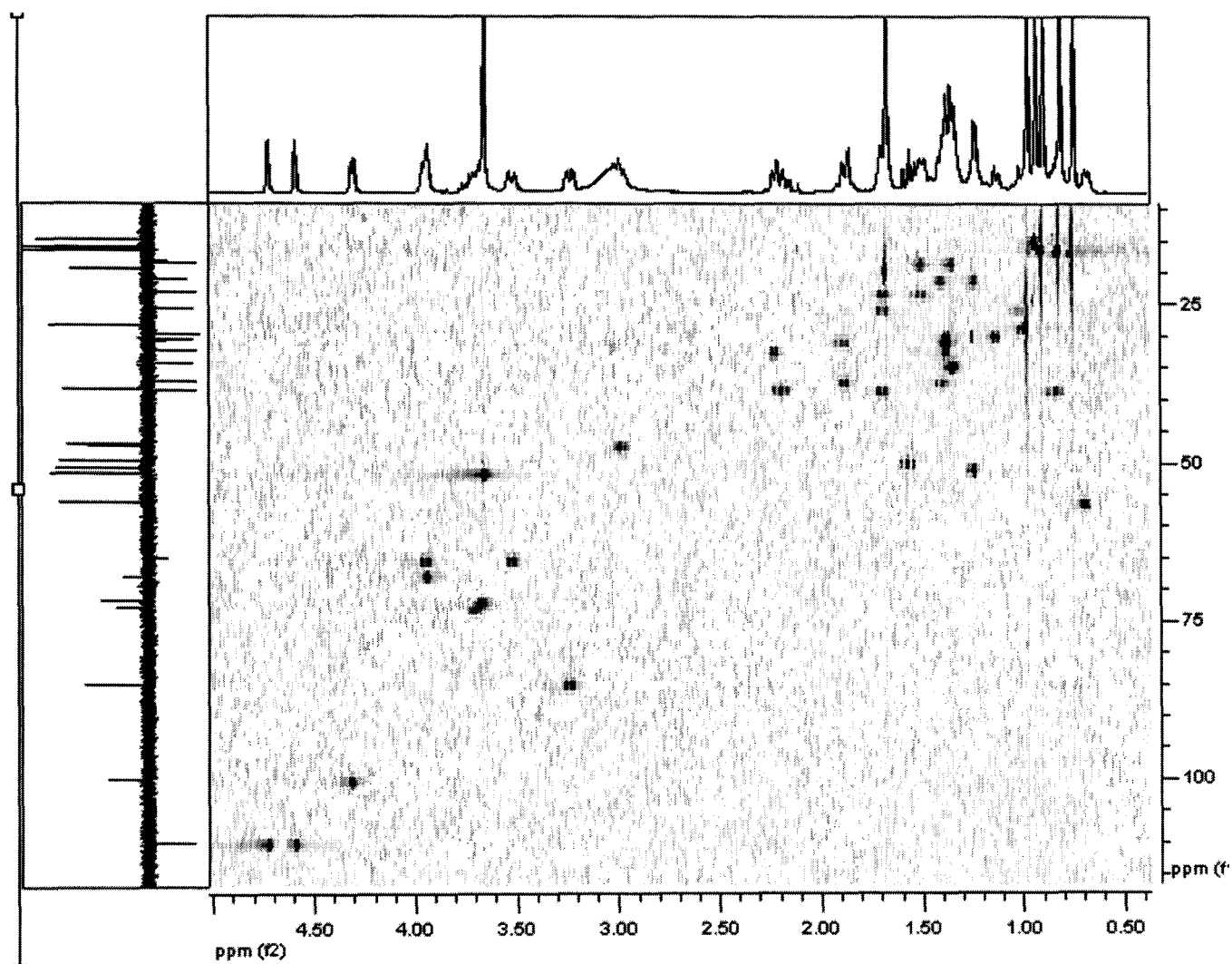
¹H 3-O-β-D-Arabinopyranoside de bétulinate de méthyle (20)



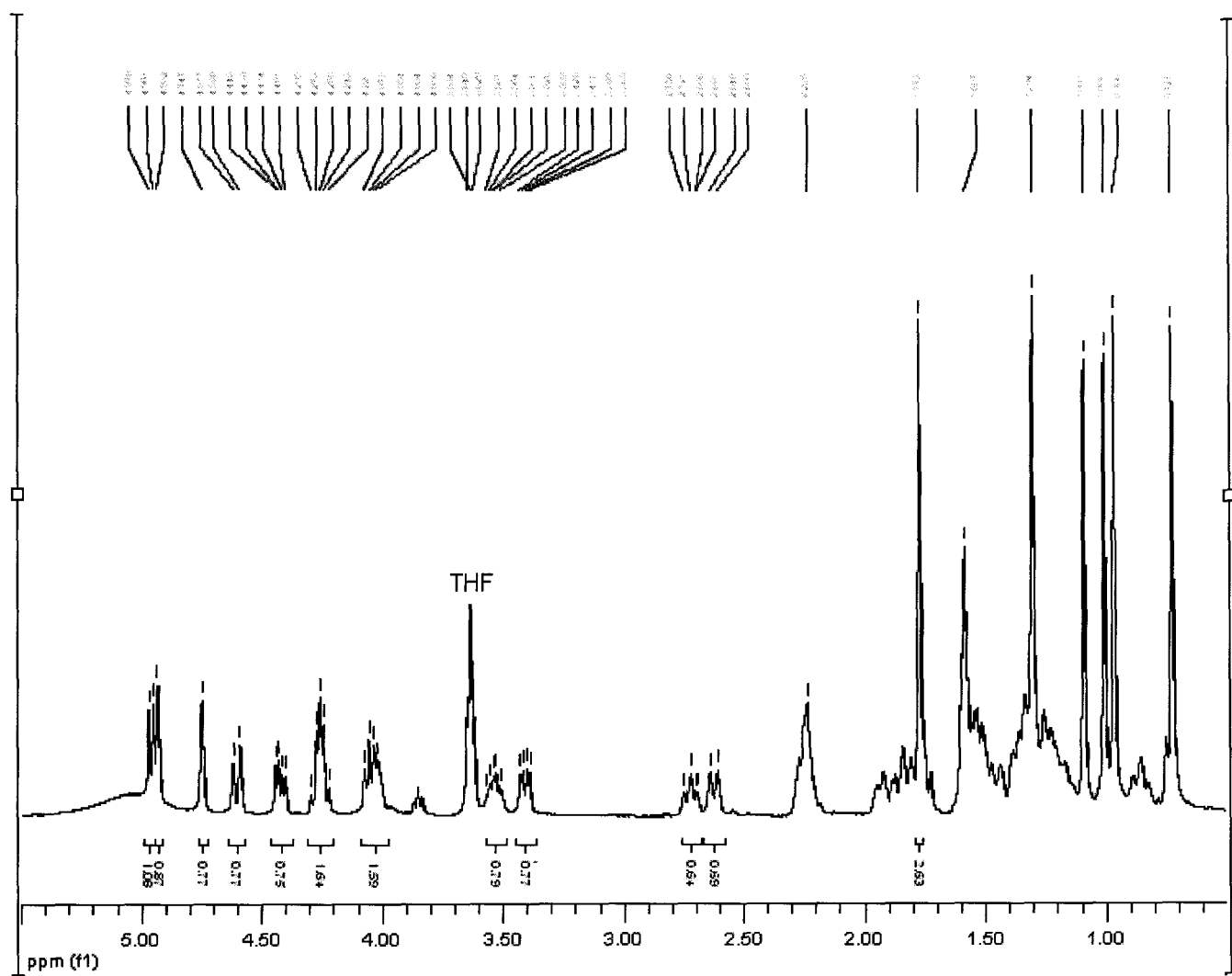
¹³C 3-O-β-D-Arabinopyranoside de betulinate de méthyle (20)

DEPT135 3-O- β -D-Arabinopyranoside de bétulinate de méthyle (20)

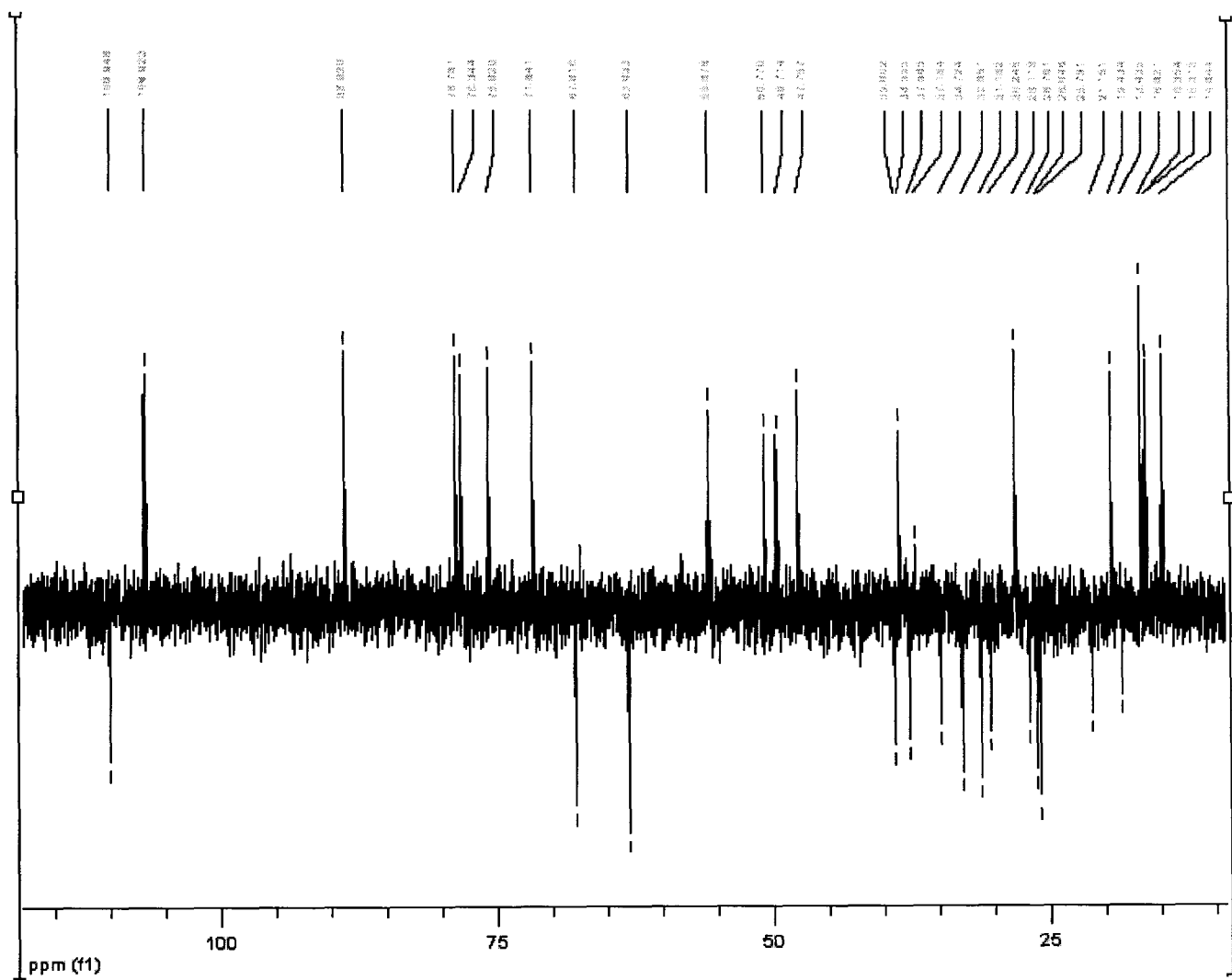
COSY 3-O-β-D-Arabinopyranoside de bétulinate de méthyle (20)



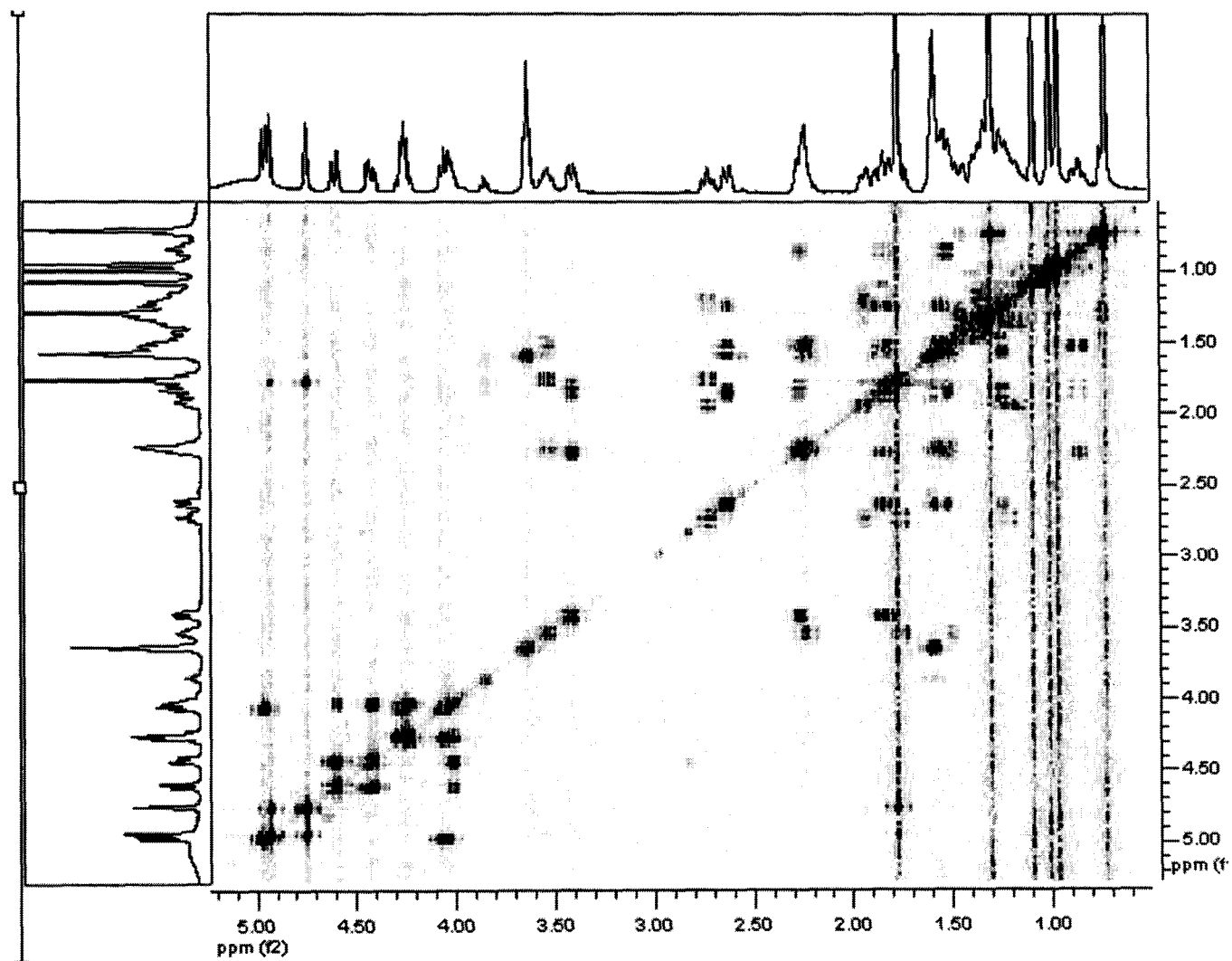
HSQC 3-O- β -D-Arabinopyranoside de bétulinate de méthyle (20)



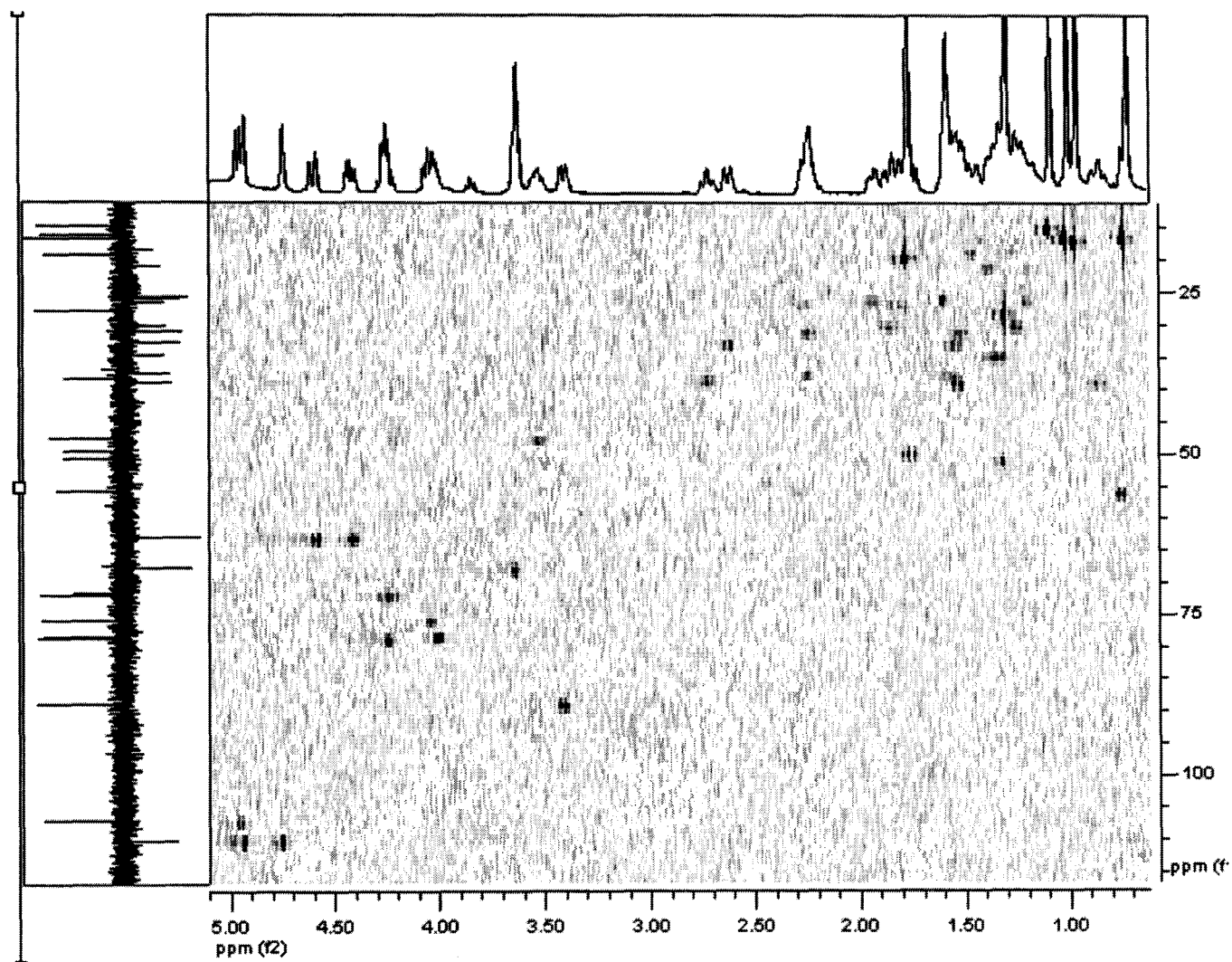
¹H Acide 3-O-β-D-glucopyranoside bétulinique (21)



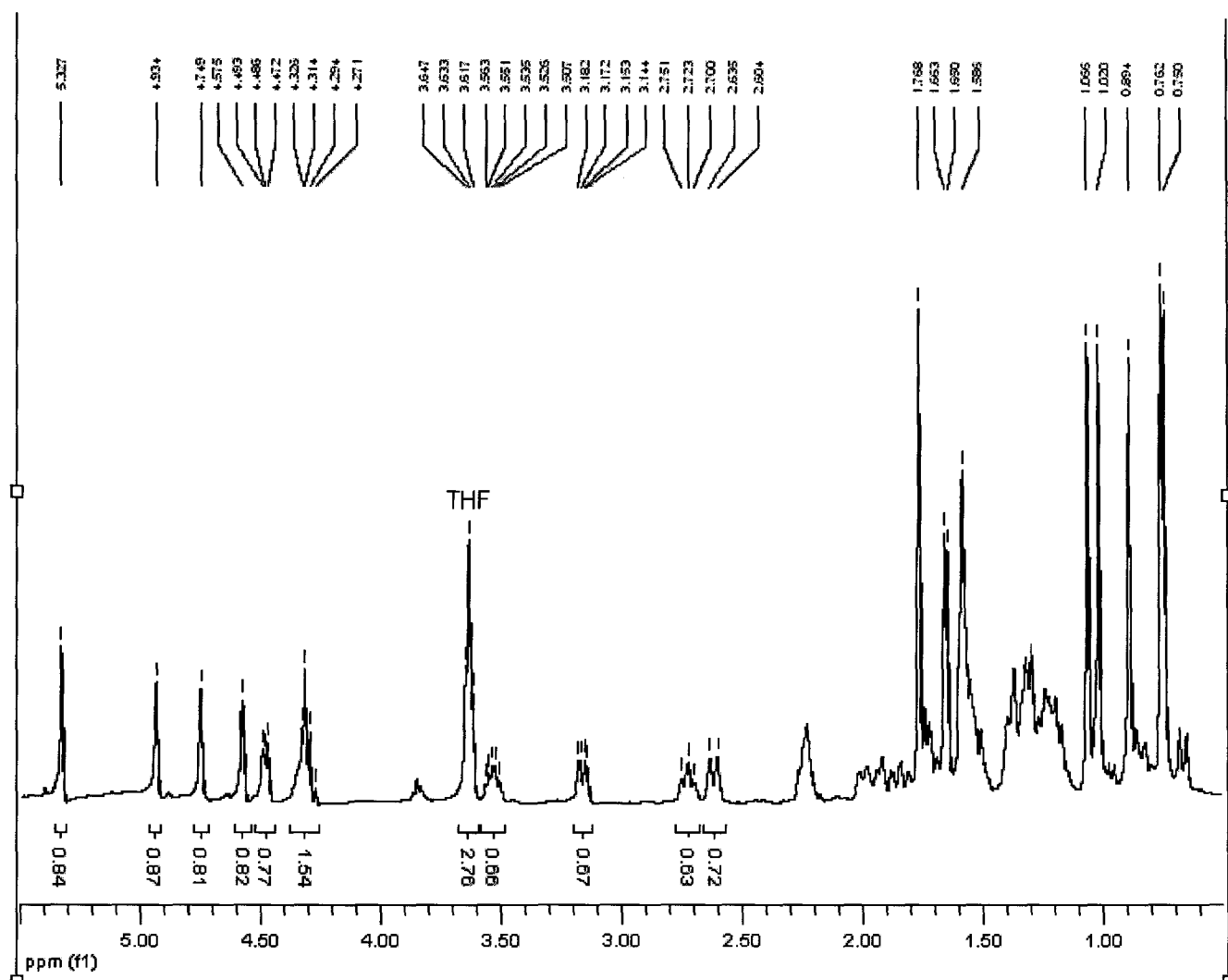
DEPT135 Acide 3-O-β-D-glucopyranoside bétulinique (21)



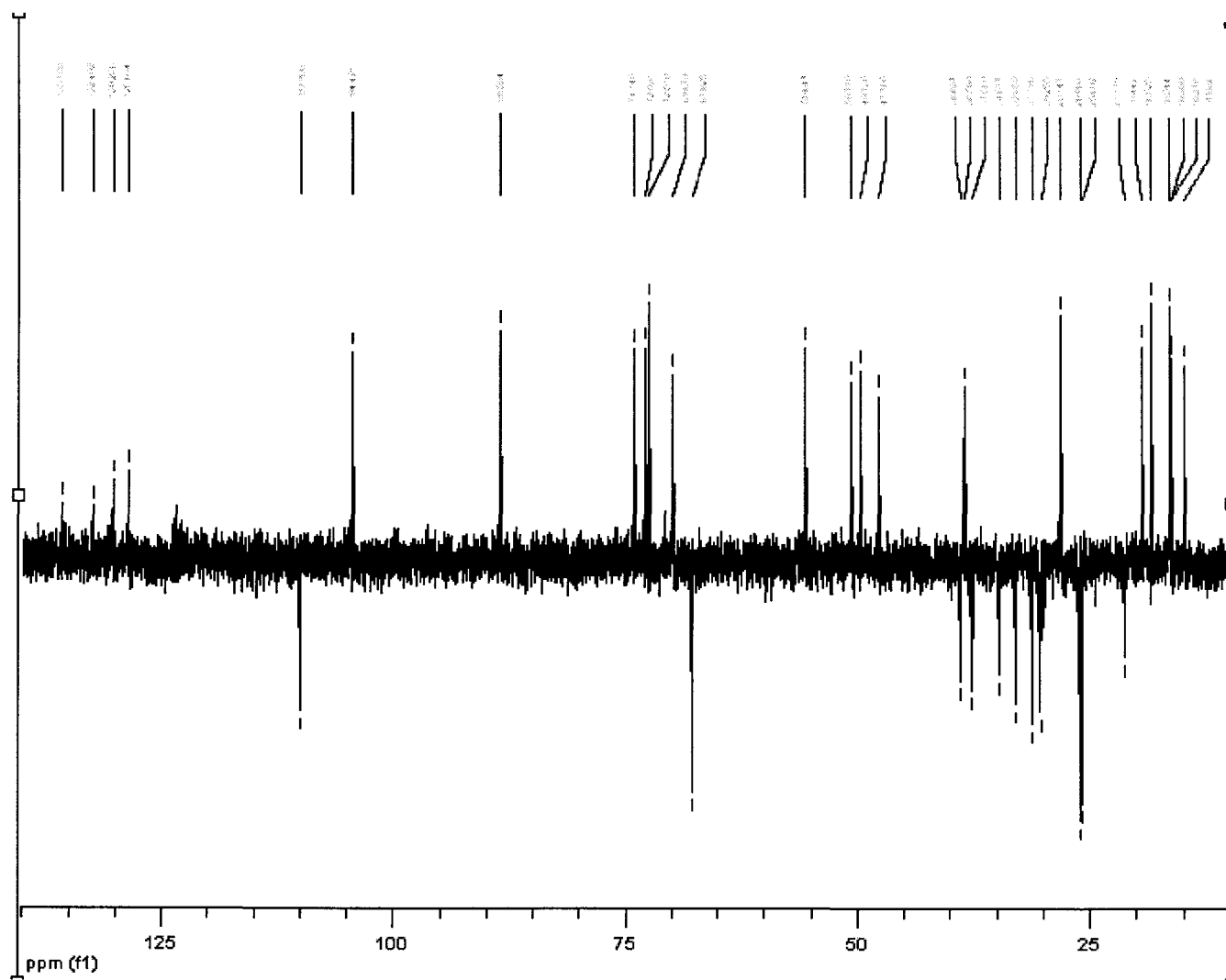
COSY Acide 3-O-β-D-glucopyranoside bétulinique (21)



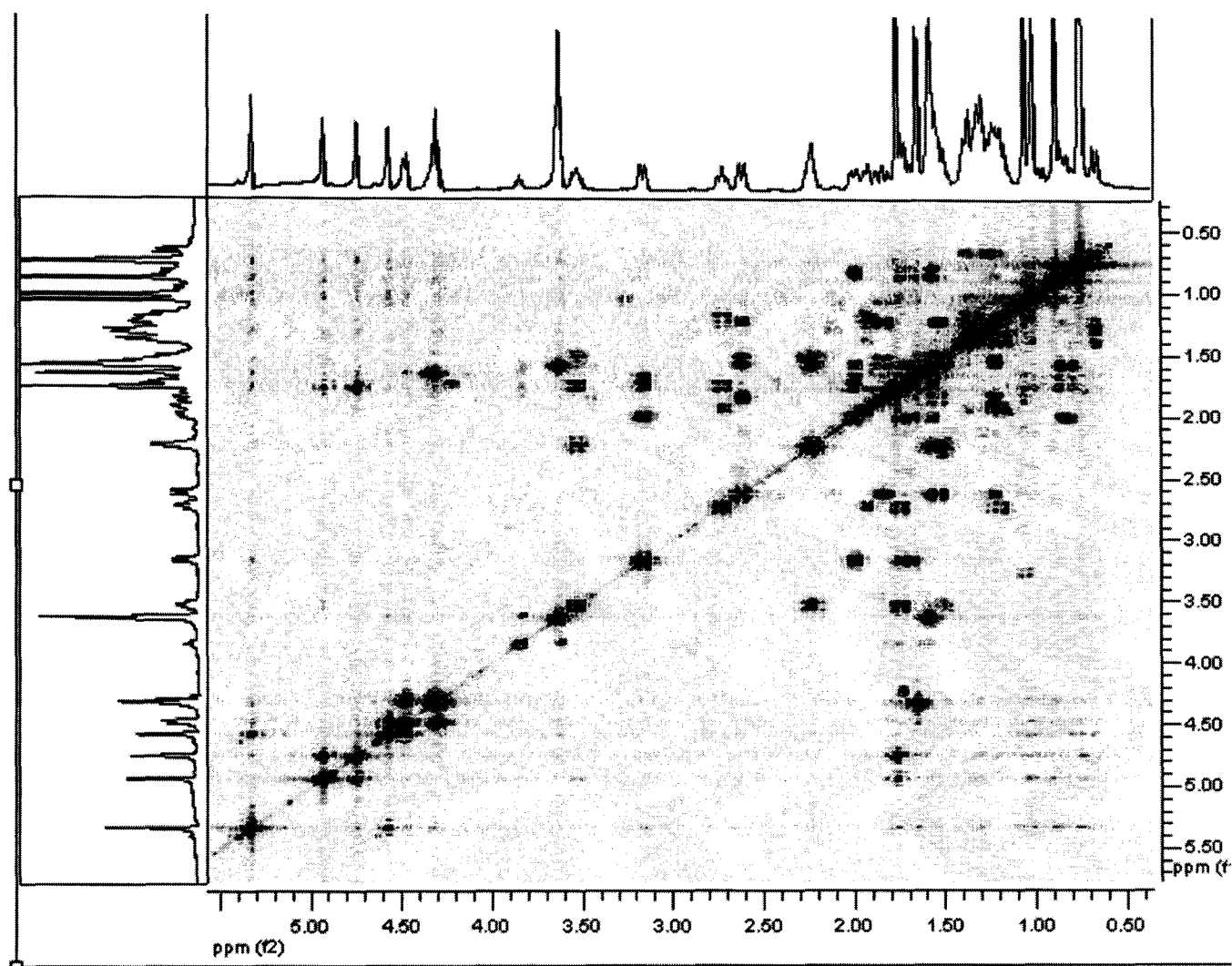
HSQC Acide 3-O-β-D-glucopyranoside bétulinique (21)



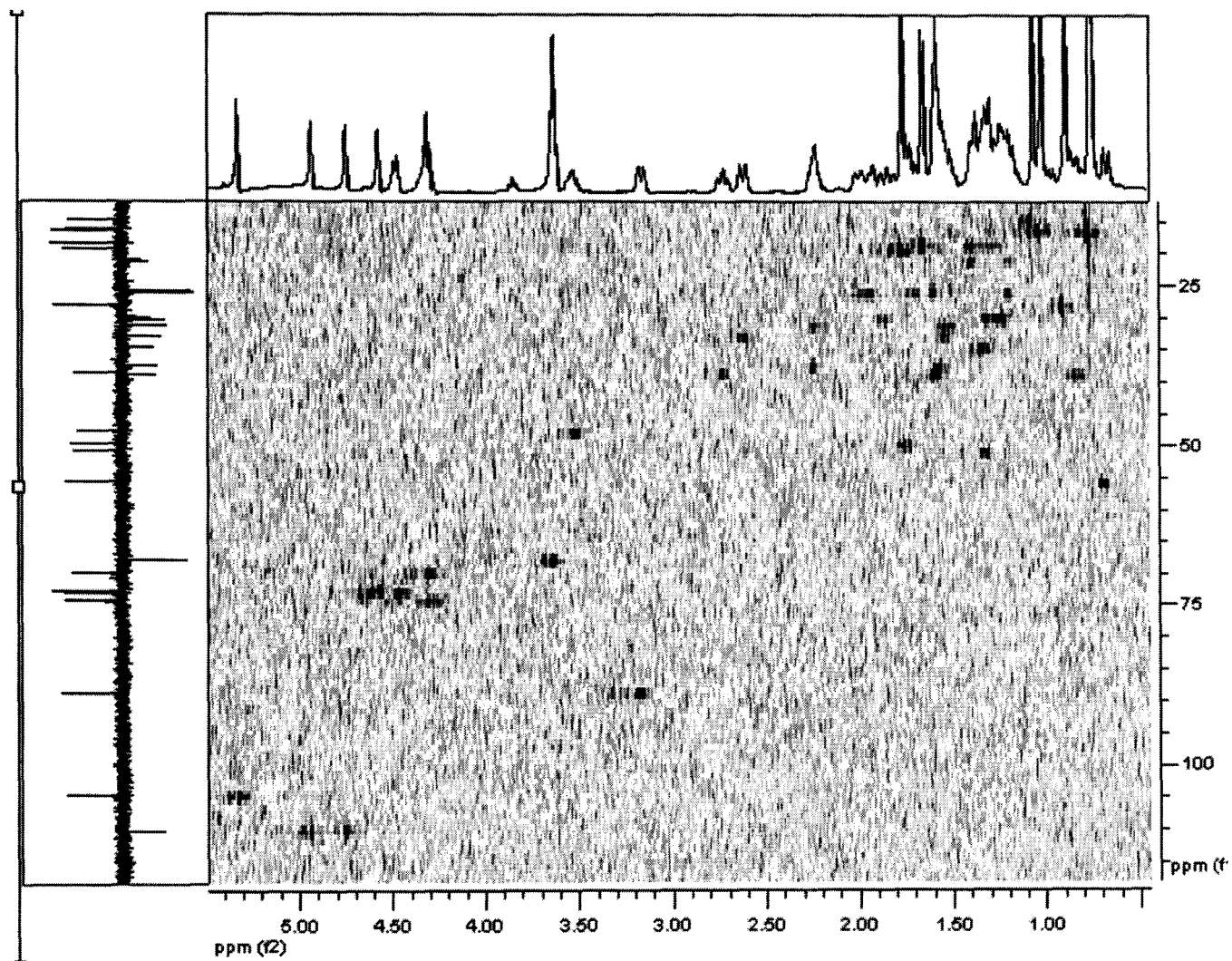
¹H Acide 3-O-α-L-rhamnopyranoside bétulinique (22)



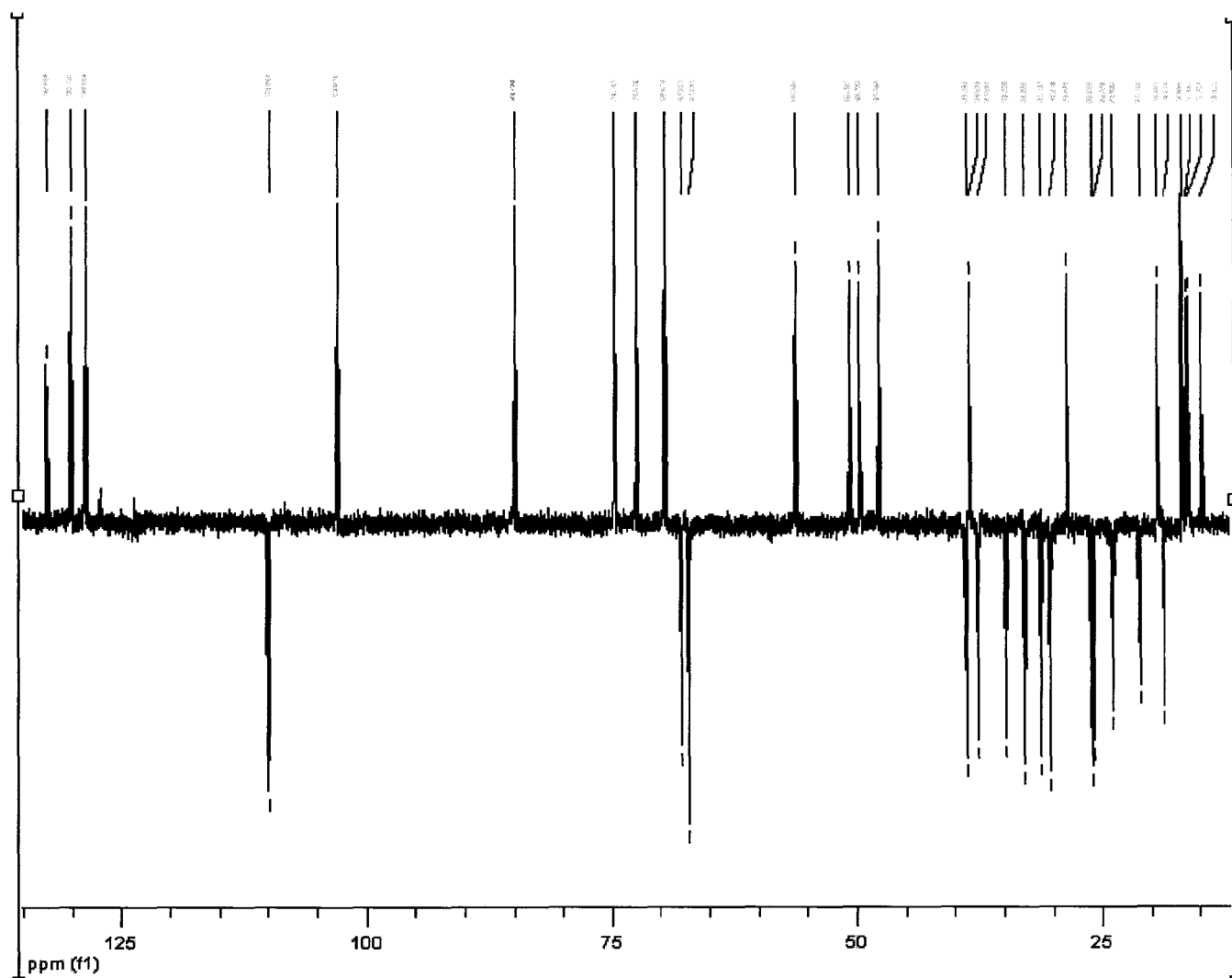
DEPT135 Acide 3-O- α -L-rhamnopyranoside bétulinique (**22**)

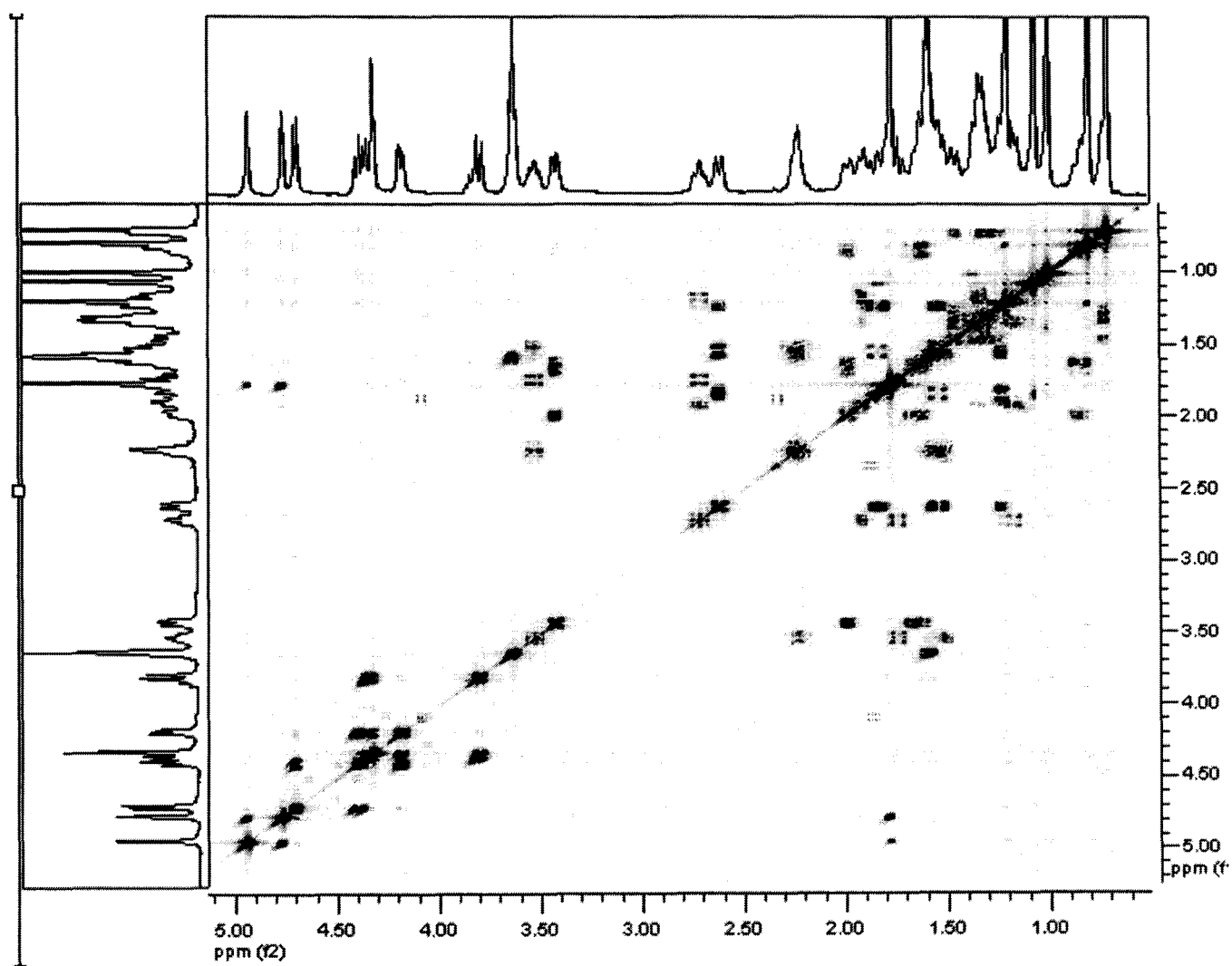


COSY Acide 3-O- α -L-rhamnopyranoside bétulinique (22)

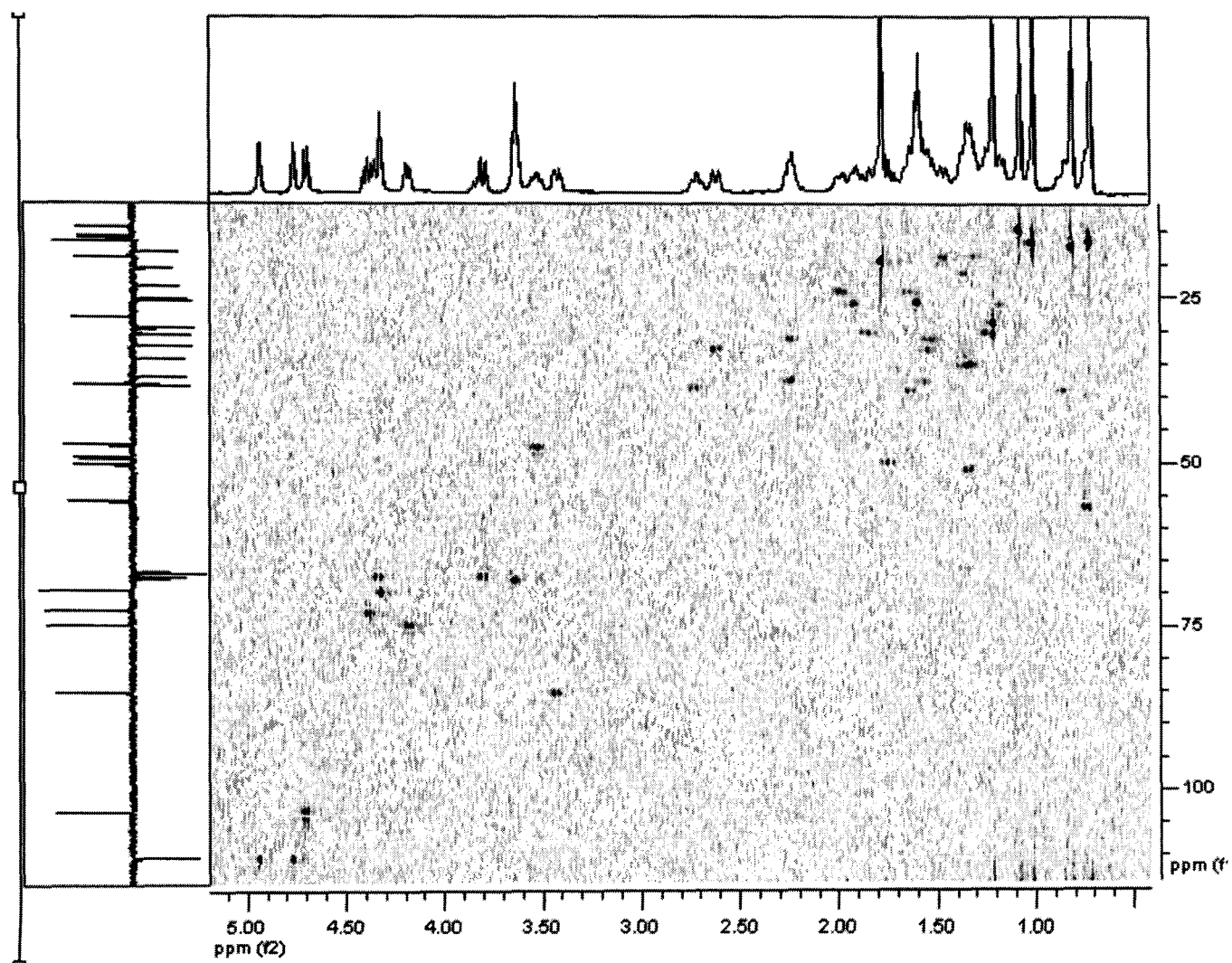


HSQC Acide 3-O- α -L-rhamnopyranoside bétulinique (**22**)

DEPT135 3-O- β -D-arabinopyranoside bétulinique (**23**)



COSY 3-O-β-D-arabinopyranoside bétulinique (23)



HSQC 3-O- β -D-arabinopyranoside betulonique (23)