

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN RESSOURCES RENOUVELABLES

PAR

FLEUR GAGNON

B.Sc (CHIMIE)

FORMATION DE GLYCOSIDE

À PARTIR DE L'ACIDE BÉTULINIQUE

AOUT 2004



### 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 mes parents, Jean-Pierre et Mercédès,  
qui m'ont inculqué le goût du savoir.

## RÉSUMÉ

L'acide bétulinique **1**, un triterpène au squelette de lupane, est connu pour ses activités thérapeutiques. Entre autres, ce composé possède une activité anticancéreuse et antivirale. L'acide bétulinique **1** s'est avéré cytotoxique contre de nombreuses lignées de cellules cancéreuses. De plus, il présente une faible toxicité pour les cellules saines de l'organisme ce qui en fait un traitement potentiel pour certaines tumeurs cancéreuses. Cependant, l'acide bétulinique **1** présente une limite d'application étant donné sa faible biodisponibilité dans l'organisme. La faible biodisponibilité du composé est possiblement due à sa faible hydrophilicité.

Ce projet vise la synthèse d'un analogue glycosidique de l'acide bétulinique **1** pour en augmenter l'hydrosolubilité dans le but d'améliorer la biodisponibilité du composé dans l'organisme tout en conservant une activité anticancéreuse. Pour ce faire, une section polaire et hydrophile, le glucose **4**, est ajoutée à la fonction alcool du composé. L'objectif principal du projet de recherche est l'élaboration de la synthèse d'un dérivé glycosidique bioactif de l'acide bétulinique **1** pour en augmenter l'hydrosolubilité.

La formation de l'acide 3-*O*- $\beta$ -D-glucoopyranosylbétulinique **15** a été réalisée en cinq étapes en utilisant l'activation par les trihalogénoacétimidates. Le couplage de l'acide bétulinique **1** et du 1-trichloroacétimidates-2,3,4,6-tétra-*O*-benzoyl-glucoopyranose **7b** a été

effectuée à l'aide du catalyseur triméthylsilyl trifluorométhanesulfonate (TMSOTf). La synthèse a été réalisée avec un rendement de 32 %.

Le coefficient de partage de l'acide 3-*O*-β-D-glucopyranosylbétulinique **15** a été évalué et montre que l'hydrophilicité de ce dernier est beaucoup plus importante que celle du composé de départ, l'acide bétulinique **1**, ce qui pourrait permettre d'améliorer sa biodisponibilité *in vivo*.

L'ajout d'une section sucre à l'acide bétulinique **1** peut avoir une influence sur l'activité anticancéreuse de la molécule. L'activité anticancéreuse de l'acide 3-*O*-β-D-glucopyranosylbétulinique **15** a été évaluée *in vitro* envers deux lignées de cellules cancéreuses humaines. L'acide 3-*O*-β-D-glucopyranosylbétulinique **15** possède une activité anticancéreuse envers les deux lignées de cellules cancéreuses à l'étude avec une concentration qui inhibe la croissance de 50% des cellules (IC<sub>50</sub>) de 12,73 µg/ml envers les cellules du cancer du poumon (A549) et de 25,13 µg/ml envers celles du cancer du colon.

## REMERCIEMENTS

Puisqu'un travail de recherche demande l'appui de nombreuses personnes, je tiens à remercier, tout d'abord, le Dr André Pichette pour m'avoir permis d'effectuer mon projet au sein de son groupe de recherche et pour son aide précieuse. Je souligne aussi l'aide et les judicieux conseils du Dr. Jean Legault. De plus, je remercie M. Serge Lavoie pour ses conseils et son appui tout au long de mes travaux. Également, je remercie M. André Barrette pour m'avoir fourni le matériel requis, M. Jimmy Bouchard pour les spectres RMN qu'il a effectués et Mlle Angélique Longtin pour les tests d'activité *in vitro* qu'elle a réalisés. Je remercie le laboratoire LaSève pour m'avoir permis d'effectuer mes analyses par GC-MS ainsi que Mme Hélène Gagnon. Sans oublier l'aide des étudiants de premier cycle, je remercie M. Hervé Gauthier et M. François Simard pour leur apport à mes travaux.

Je remercie aussi tous les professeurs du baccalauréat qui m'ont instruite en soulignant l'enseignement de M. François-Xavier Garneau qui a su me faire connaître l'incroyable monde de la chimie organique.

Je remercie M. Nicholas-Alexandre Bouchard et M. Tommy Perron qui m'ont encouragée et épaulée au laboratoire. Plus personnellement, je remercie Mlle Blanche Gagnon et M. Jean-Michaël Perron qui m'ont toujours soutenue.

Merci beaucoup!

**TABLE DES MATIÈRES**

RÉSUMÉ .....	III
REMERCIEMENTS .....	V
TABLE DES MATIÈRES .....	VI
LISTE DES FIGURES .....	XI
LISTE DES TABLEAUX .....	XIII
LISTE DES ÉQUATIONS .....	XIV
LISTE DES ANNEXES .....	XV
CHAPITRE 1 INTRODUCTION .....	1
CHAPITRE 2 SECTION THÉORIQUE .....	6
2.1 Famille des lupanes .....	7
2.2 Extraction des triterpènes .....	7
2.3 Activités biologiques des triterpènes au squelette de lupane .....	9
2.3.1 Activité antitumorale de l'acide bétulinique .....	10
2.3.2 Activité anti-VIH de l'acide bétulinique .....	13
2.4 Problématique .....	14
2.5 Intérêt de l'ajout d'une section glucose .....	15
2.6 Configuration anomérique $\alpha$ ou $\beta$ .....	16
2.7 Choix du site de réaction sur l'acide bétulinique .....	18
2.8 Notion de chimie de la réaction de glycosylation .....	21
2.8.1 Effet anomérique .....	21

2.8.2	Protections sélectives du glucose .....	22
2.8.3	Déprotection du carbone anomérique .....	24
2.8.4	Groupement voisin de la position anomérique de type participant .....	25
2.9	Méthodes de glycosylation .....	27
2.9.1	Activation par les trihalogénoacétimidates .....	27
2.9.2	Méthode Koenigs-Knorr .....	31
2.9.3	Méthode enzymatique .....	33
2.9.4	Méthode activée par les micro-ondes .....	36
2.9.5	Autres méthodes de glycosylation .....	37
2.10	Réactions secondaires de la glycosylation .....	38
2.10.1	Réaction de transestérification .....	38
2.10.2	Formation de l'ortho ester .....	39
2.11	Déprotection; régénération de alcools de la section sucre .....	40
2.12	Sensibilité des triterpènes utilisés .....	41
2.12.1	Réarrangements du bétulinol .....	42
2.12.2	Réarrangement de l'acide bétulinique .....	44
2.13	Autres travaux portant sur la synthèse de dérivés de lupanes .....	44
2.13.1	Ajout d'acides aminés à l'acide bétulinique .....	45
2.13.2	Ajout d'une section sucre à l'acide bétulinique, au bétulinol et au lupéol .....	46
2.13.3	Glycosylation du bétulinol .....	48
2.14	Stratégie de synthèse .....	49

2.15	Évaluation de la biodistribution .....	50
2.16	Évaluation de l'activité anticancéreuse .....	51
CHAPITRE 3 PARTIE EXPÉRIMENTALE .....		54
3.1	Provenance et grade des produits utilisés .....	55
3.2	Conditions générales .....	56
3.3	Conditions de réaction anhydre .....	58
3.4	Précautions pour la manipulation des sucres .....	59
3.5	Extraction des triterpènes de l'écorce du bouleau blanc ou jaune .....	60
3.6	Isolation du bétulinol de l'extrait du bouleau blanc .....	60
3.7	Isolation du lupéol de l'extrait du bouleau jaune .....	62
3.8	Protection de la fonction alcool en position 28 du bétulinol .....	63
3.8.1	Groupements acétates; formation du 28-O-acétyl bétulinol .....	63
3.8.2	Groupements benzoyles; formation du 28-O-benzoylbétulinol .....	65
3.9	Protection des alcools du glucose .....	66
3.9.1	Protection par les groupements acétates; formation du 1,2,3,4,6-penta- <i>O</i> -acétyl-glucopyranose .....	66
3.9.1.1	Acétylation avec l'anhydride acétique / acide acétique .....	66
3.9.1.2	Acétylation avec l'acétate de sodium / anhydride acétique .....	67
3.9.1.3	Acétylation avec l'anhydride acétique par les micro-ondes .....	68
3.9.1.4	Acétylation catalysée par l'acide perchlorique .....	68
3.9.2	Protection par les groupements benzoyles; formation du 1,2,3,4,6-penta- <i>O</i> -benzoyl-glucopyranose .....	71

3.10	Déprotection de la position anomérique du glucose protégé; formation du 1-hydroxy-2,3,4,6-tétra-O-acétylglucopyranose ou du 1-hydroxy-2,3,4,6-tétra-O-benzoylglucopyranose .....	73
3.10.1	Déprotection de la position anomérique avec le $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ .....	73
3.10.2	Déprotection de la position anomérique par la bromation avec $\text{HBr}/\text{HOAc}$ suivie de l'hydrolyse avec $\text{Ag}_2\text{CO}_3$ .....	74
3.10.3	Déprotection de la position anomérique avec le $\text{Bu}_3\text{SnOMe}$ .....	75
3.10.4	Séparation chromatographique du glucose tétra-protégé .....	76
3.11	Activation de la position anomérique par les trifluoroacétimidates; formation du 1-acétimide-2,3,4,6-tétra-O-acétylglucopyranose ou 1-acétimide-2,3,4,6-tétra-O-benzoylglucopyranose .....	78
3.12	Glycosylation .....	81
3.12.1	Glycosylation au four à micro-ondes .....	81
3.12.2	Glycosylation catalysée par le $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ .....	82
3.12.3	Glycosylation catalysée par le $\text{TMSOTf}$ .....	83
3.12.4	Séparation chromatographique des produits de glycosylation .....	83
3.13	Déprotection; régénération des alcools de la section sucre .....	87
3.14	Évaluation du coefficient de partage .....	90
3.15	Évaluation de l'activité cancéreuse .....	92
CHAPITRE 4	RÉSULTATS ET DISCUSSION .....	96
4.1	Extraction du lupéol et du bétulinol .....	97
4.2	Protection de la fonction alcool en position 28 du bétulinol .....	98

4.3	Protection de la section sucre .....	100
4.3.1	Protection du glucose avec des groupements acétates; formation du 1,2,3,4,6-penta- <i>O</i> -acétylglucopyranose .....	100
4.3.2	Protection du glucose par des groupements benzoyles; formation du 1,2,3,4,6-penta- <i>O</i> -benzoylglucopyranose .....	102
4.4	Déprotection du carbone anomérique; formation du 1-hydroxy-2,3,4,6-tétra- <i>O</i> - acétylglucopyranose ou du 1-hydroxy-2,3,4,6-tétra- <i>O</i> -benzoylglucopyranose .....	103
4.5	Activation de la position 1 du glucose tétra-protégé par la formation du glycosyle trichloroacétimide .....	106
4.6	Glycosylation .....	108
4.7	Déprotection; régénération des fonctions alcools de la section sucre .....	113
4.8	Synthèse totale .....	115
4.9	Évaluation du coefficient de partage .....	117
4.10	Évaluation de l'activité anticancéreuse .....	119
CHAPITRE 5 CONCLUSION .....		121
BIBLIOGRAPHIE .....		124
ANNEXE 1 LISTE DES ABBRÉVIATIONS .....		137
ANNEXE 2 SPECTRES DE MASSE .....		144
ANNEXE 3 SPECTRES DE RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE .....		152
ANNEXE 4 RÉSULTATS DES TEST D'ACTIVITÉ ANTICANCÉREUSES <i>IN VITRO</i> .....		160

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure de triterpènes à squelette de lupane .....	7
Figure 2. Structure des triterpènes d'intérêt dans l'écorce externe du bouleau blanc .....	8
Figure 3. Structure des anomères $\alpha$ et $\beta$ du D-glucose; a) présentation de Haworth, b) présentation en forme chaise.....	17
Figure 4. Effet anomérique du glucopyranose substitué en 1 .....	22
Figure 5. Mécanisme de participation du groupement voisin .....	26
Figure 6. Mécanisme proposé pour la formation du glycosyle activé par les trichloroacétimidates selon Schmidt et <i>al</i> .....	28
Figure 7. Réaction générale de la formation d'un glycosyle activé par un groupement trifluoroacétimide selon Yu et Tao .....	29
Figure 8. Mécanisme proposé de la réaction de glycosylation par le glycosyle trichloroacétimide catalysé par le TMSOTf .....	30
Figure 9. Mécanisme proposé de la bromation de la position anomérique du glucose tétra-protégé .....	32
Figure 10. Mécanisme proposé pour la glycosylation par la méthode Koenigs-Knorr avec des groupements protecteurs de type participants .....	33
Figure 11. Réaction générale de glycosylation enzymatique .....	34
Figure 12. Mécanisme de la réaction de glycosylation enzymatique .....	35
Figure 13. Autres types de glycosyles activés utilisés pour la formation de glycosides .....	37
Figure 14. Mécanisme proposé de transestérification .....	39
Figure 15. Mécanisme proposé de formation de l'ortho ester .....	40
Figure 16. Mécanisme du réarrangement du bétulinol en allobétulinol .....	42

Figure 17. Réaction générale du réarrangement de l'allobétulinol en $\alpha$ -allobétulinol I et II .....	43
Figure 18. Réarrangement de l'acide bétulinique en oxyallobétulinol .....	44
Figure 19. Réduction de la resazurine en resorufine par une cellule .....	53
Figure 20. Structure du bisbenzimidazole (Hoechst 33342) .....	53
Figure 21. Structure du bétulinol .....	61
Figure 22. Structure du lupéol .....	62
Figure 23. Réaction générale de protection de la fonction 28 du bétulinol .....	63
Figure 24. Réaction générale de protection du glucose par les groupements acétates .....	66
Figure 25. Structure du 1,2,3,4,6-penta- <i>O</i> -acétylglucopyranose .....	70
Figure 26. Réaction générale de protection du glucose par les groupements benzoyles .....	71
Figure 27. Réaction générale de déprotection de la position anomérique du glucose .....	73
Figure 28. Réaction générale d'activation de la position 1 du glucose tétra-protégé par le groupe trichloroacétimidate .....	78
Figure 29. Réaction générale de glycosylation .....	81
Figure 30. Structure du 28- <i>O</i> -acétyl-[tétra- <i>O</i> -benzylglucopyranosyl]bétulinol .....	85
Figure 31. Structure du tétra- <i>O</i> -acétylglucopyranosyllupéol .....	86
Figure 32. Réaction générale de déprotection des alcools de la section sucre du glycoside .....	87
Figure 33. Structure de l'acide 3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranosylbétulinique .....	89
Figure 34. Schéma de la microplaque de l'évaluation de l'activité anticancéreuse de l'acide bétulinique et de l'acide 3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranosylbétulinique .....	93
Figure 35. Structure du produit final de synthèse : acide 3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranosyl- bétulinique .....	114
Figure 36. Schéma général de la synthèse de glycoside à partir de l'acide bétulinique .....	116

**LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1. Cytotoxicité de triterpènes envers des cellules de mélanome (MEL-2) et envers des cellules de carcinome épidermique humain de la bouche (KB) .....	10
Tableau 2. Cytotoxicité et solubilité dans l'eau de dérivés d'acides aminés conjugués à l'acide bétulinique .....	46
Tableau 3. Provenance et grade des produits utilisés .....	55
Tableau 4. Rendement d'extraction du bétulinol et du lupéol à partir de l'écorce du bouleau blanc et du bouleau jaune .....	97
Tableau 5. Rendement de protection de la fonction 28 du bétulinol .....	98
Tableau 6. Résultats de la protection des fonctions alcools du glucose par des groupements acétates .....	100
Tableau 7. Résultats de la protection des fonctions alcools du glucose par des groupements benzoyles .....	102
Tableau 8. Résultats de la régénération de l'alcool en position anomérique du glucose tétra-protégé .....	103
Tableau 9. Activation du glucose tétra-protégé avec le trichloroacétonitrile .....	106
Tableau 10. Résultats de la glycosylation avec les groupements protecteurs acétates .....	109
Tableau 11. Résultats de la glycosylation avec le catalyseur TMSOTf et le glucose protégé avec des groupements benzyles et benzoyles .....	111
Tableau 12. Résultats de la régénération des alcools de la section sucre .....	113
Tableau 13. Coefficient de partage de l'acide bétulinique, du bétulinol et du glycoside déterminé par analyse HPLC .....	117
Tableau 14. Activité anticancéreuse de l'acide bétulinique .....	120

**LISTE DES ÉQUATIONS**

Équation 1. Calcul du coefficient de partage .....	50
Équation 2. Calcul du coefficient de partage par analyse HPLC .....	91

**LISTE DES ANNEXES**

ANNEXE 1	LISTE DE ABBRÉVIATIONS .....	137
ANNEXE 2	SPECTRES DE MASSE .....	144
ANNEXE 3	SPECTRES DE RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE .....	152
ANNEXE 4	RÉSULTATS DES TESTS D'ACTIVITÉS ANTICANCÉREUSES <i>IN</i> <i>VITRO</i> .....	160

**CHAPITRE 1**  
**INTRODUCTION**

La forêt boréale est constituée de plusieurs essences d'arbres qui contiennent des produits naturels possédant des vertus médicinales telles que des propriétés antivirales, antibiotiques, antitumorales ou autres [Fortin et Lacoursière, 1992 et Der Marderosian et Beutler, 2002]. Le bouleau blanc (*betula papyrifera*) est une essence prometteuse dans le cadre du développement de traitements pour certaines maladies humaines telles que le cancer et le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). En effet, un composé présent, entre autres, dans l'écorce externe du bouleau blanc, l'acide bétulinique **1**, présente des activités biologiques intéressantes. Ce dernier, un triterpène au squelette de lupane, présente des activités antitumorales *in vitro* et *in vivo* envers plusieurs lignées de cellules cancéreuses ainsi que plusieurs autres activités biologiques telle une activité envers le virus d'immunodéficience humaine (VIH) [Cichewicz et Kouzi, 2004]. Malgré que sa teneur soit faible dans les extraits de bouleau blanc, cette molécule peut être synthétisée à partir du bétulinol **2**, un autre triterpène, présent en grande quantité dans l'écorce de cet arbre (22-25%) [Kim et al., 1997, Pezzuto et Kim, 1998, Lavoie (thèse), 2001 et Pichette et al., 2004].

L'acide bétulinique **1** est une molécule prometteuse pour le traitement du cancer et du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Cependant, son utilisation est limitée en raison de sa biodisponibilité limitée dans l'organisme due, en partie, à sa faible hydrophilicité [Jeong et al., 1999 et Nagourney et al., 1996]. En effet, cette molécule contient un nombre limité de fonctions polaires soit une fonction alcool et une fonction acide.

Toutefois, l'hydrosolubilité de la molécule pourrait être augmentée en lui ajoutant une section hydrophile polaire tel un sucre. Les sucres sont des composés qui ont le potentiel d'augmenter l'hydrophilicité de la molécule à laquelle ils sont greffés. En plus d'augmenter le caractère hydrophile de la molécule, cela pourrait probablement permettre d'augmenter sa biodisponibilité *in vivo* [Mizuma, T., 1994 et 1998]. L'augmentation du caractère hydrophile de la molécule devrait améliorer son comportement dans les organismes vivants (augmentation solubilité). Aussi, la présence d'une section sucre pourrait favoriser le transport actif de la molécule par des récepteurs glucidiques [Mizuma, T., 1998]. De plus, les cellules cancéreuses ont un besoin en sucre plus important par rapport aux cellules saines, cela étant dû à leur croissance plus rapide [Smith, 1999]. L'ajout d'une section sucre pourrait permettre de cibler sélectivement les cellules cancéreuses afin d'en induire l'apoptose.

Une meilleure biodistribution du composé pourrait améliorer son efficacité pour le traitement de tumeurs cancéreuses et, possiblement, élargir l'éventail de cancers qui pourraient éventuellement être traités par ce nouveau dérivé glycosidique de l'acide bétulinique 1.

L'objectif principal du projet de recherche est de synthétiser un dérivé glycosidique bioactif de l'acide bétulinique 1 pour en augmenter l'hydrosolubilité.

Les objectifs spécifiques sont les suivants :

- Mettre au point une approche de glycosylation efficace pour synthétiser l'acide 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosylbétulinique **15** à partir de l'acide bétulinique **1** et du glucose **4**.
- Évaluer le gain d'hydrosolubilité du dérivé glycosidique par rapport au triterpène de départ en déterminant les coefficients de partage des composés.
- Évaluer l'activité anticancéreuse de l'acide 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosylbétulinique **15** sur des cultures de cellules.

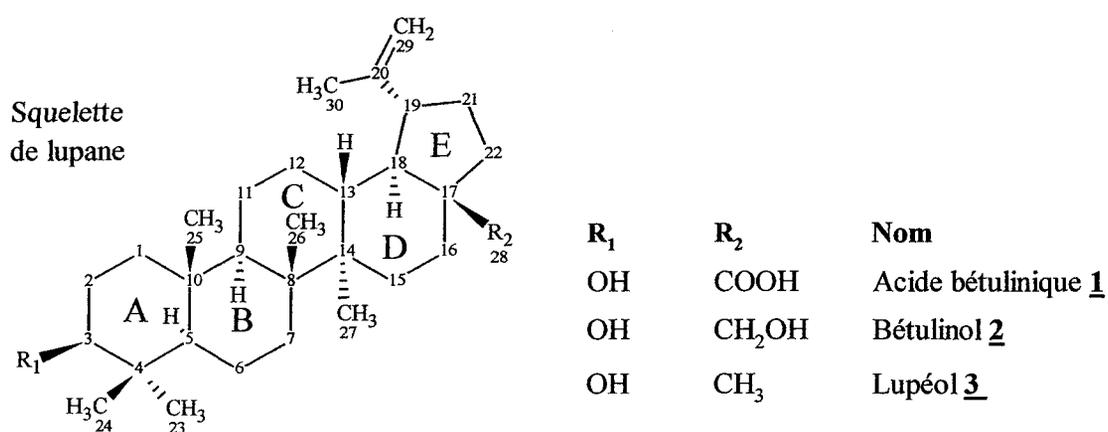
Ce mémoire est divisé en 5 chapitres. Cette introduction représente le premier chapitre. Le second chapitre contient la section théorique du projet. Celle-ci porte sur la théorie relative aux triterpènes à squelette de lupane, à la réactivité de la section sucre, aux différentes réactions générales de glycosylation ainsi qu'à la description des travaux déjà effectués par d'autres chercheurs (revue de littérature). Le troisième chapitre contient la section expérimentale. Il comprend les informations relatives aux travaux en laboratoire telles que la description des différents appareils utilisés, les protocoles des différentes réactions, les manipulations effectuées ainsi que les données spectrales. Le chapitre quatre consiste en la présentation et la discussion des résultats des différentes réactions et des manipulations effectuées. Pour finir, le chapitre cinq consiste en une conclusion de la recherche suivie de l'élaboration des possibilités de développements futurs grâce à cette

technique de glycosylation. Les spectres de masse (MS) et de résonance magnétique nucléaire (RMN) des composés synthétisés sont donnés en annexe. Également, la liste des abréviations utilisées ainsi que les résultats complets des tests d'activités anticancéreuses effectués sur le composé de départ, l'acide bétulinique **1**, et sur l'acide 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosylbétulinique **15**, sont présentés en annexe.

**CHAPITRE 2**  
**SECTION THÉORIQUE**

## 2.1 Famille des lupanes

Les lupanes sont des composés triterpéniques pentacycliques. Tel que le montre la figure 1, ils sont formés de quatre cycles à six membres (A, B, C, D) puis d'un cycle à cinq membres (E). Ce dernier cycle est caractéristique des triterpènes à squelette de lupane.

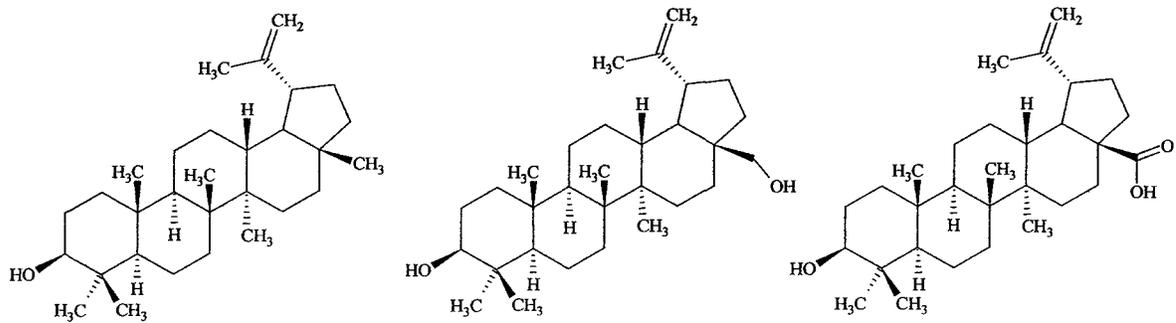


**Figure 1.** Structure de triterpènes à squelette de lupane.

## 2.2 Extraction des triterpènes

L'écorce du bouleau blanc (*betula papyrifera*) contient plusieurs triterpènes à squelette de lupane. Parmi ceux-ci, on dénombre l'acide bétulinique 1, le bétulinol 2 et le lupéol 3. La structure de ces composés est présentée à la figure 2. L'écorce de cet arbre contient une faible quantité d'acide bétulinique 1 (0,025% p/p) [Pezutto et *al.*, 2002]. Le bétulinol 2 y est présent en grande quantité avec un rendement d'extraction de 22% [O'Connell et *al.*, 1988] à 25% p/p [Kim et *al.*, 1998 et Pezutto et *al.*, 2002]. Le lupéol 3,

présent dans l'écorce du bouleau blanc, peut être extrait avec des rendements plus importants de l'écorce externe du bouleau jaune (*Betula alleghaniensis*) plus connu sous le nom populaire de merisier.



**Lupéol 3**

3β-lup-20(29)-ène-3-ol

**Bétulinol 2**

3β-lup-20(29)-ène-3,28-diol

**Acide bétulinique 1**

Acide 3β-hydroxy-lup-20(29)-èn-28-oïque

**Figure 2.** Structure des triterpènes d'intérêt dans l'écorce externe du bouleau blanc.

L'acide bétulinique 1 n'est pas facile à isoler de l'extrait de l'écorce du bouleau blanc car il a un comportement chromatographique similaire au bétulinol 2. Cependant, il est possible de préparer l'acide bétulinique 1 à partir du bétulinol 2 par synthèse organique. Ces deux produits ne diffèrent que par l'état d'oxydation du carbone en position 28 qui est sous forme d'alcool (bétulinol 2) ou sous forme d'acide (acide bétulinique 1). Des synthèses de l'acide bétulinique 1 à partir du bétulinol 2 ont été développées par le groupe de Pezzuto et de Pichette [Kim et *al.*, 1997, Pezzuto et Kim, 1998, Lavoie (thèse), 2001 et Pichette et *al.*, 2004].

### 2.3 Activités biologiques des triterpènes au squelette de lupane

Les triterpènes au squelette de lupane sont intéressants pour le développement d'agents thérapeutiques. L'acide bétulinique **1** possède une bioactivité très intéressante face à des tumeurs cancéreuses (section 2.3.1) et au virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (section 2.3.2). L'acide bétulinique **1** et le bétulinol **2** possèdent d'autres activités telles que une activité antivirale envers le virus de l'herpes simplex HSV-1 [Pavlova et *al.*, 2003] et une activité anti-inflammatoire [Recio et *al.*, 1995]. En plus, l'acide bétulinique **1** possède une activité *in vitro* contre deux lignées de la malaria soit *Plasmodium falciparum* K1 et T9-96 [Steele et *al.* 1999]. Ce dernier possède aussi des propriétés cosmétiques telles que l'atténuation des rides et de la cellulite [Cho et *al.*, 1996].

Parmi les trois triterpènes illustrés à la figure 2, l'acide bétulinique **1** s'avère être la molécule la plus prometteuse pour le développement d'un agent antitumoral ou antiviral. Le tableau 1 montre la cytotoxicité de l'acide bétulinique **1**, du bétulinol **2** et du lupéol **3** envers le mélanome humain MEL-2 et le carcinome épidermique humain de la bouche (KB) [Kim et *al.*, 1998]. L'acide bétulinique **1** est sélectif pour quelques types de cancer notamment les mélanomes et les gliomes. Le lupéol **3** est moins cytotoxique pour ces cellules cancéreuses que l'acide bétulinique **1** tandis que le bétulinol **2** ne présente pas une forte cytotoxicité ( $IC_{50} > 20$ ).

**Tableau 1.** Cytotoxicité de triterpènes envers des cellules de mélanome (MEL-2) et envers des cellules de carcinome épidermique humain de la bouche (KB) [Kim et *al.*, 1998].

Triterpène \ Type de cellules	Activité anticancéreuse IC <sub>50</sub> <sup>1</sup> (µg/ml)	
	MEL-2	KB
Acide bétulinique <u>1</u>	1,2	>20
Bétulinol <u>2</u>	>20	>20
Lupéol <u>3</u>	17,6	>20

<sup>1</sup> IC<sub>50</sub> : concentration qui inhibe la croissance de 50% des cellules.

Les prochaines sections vont approfondir l'activité anticancéreuse (section 2.3.1) ainsi que l'activité anti-VIH (section 2.3.2) de l'acide bétulinique 1.

### 2.3.1 Activité antitumorale de l'acide bétulinique 1

L'acide bétulinique 1 inhibe la croissance des cellules cancéreuses en induisant l'apoptose (mort cellulaire programmée). Sa cytotoxicité a été démontrée pour la première fois envers des lignées de cellules de mélanomes humains de type MEL-1 (IC<sub>50</sub> = 1,1 µg/ml), MEL-2 (IC<sub>50</sub> = 1,2 µg/ml), MEL-3 (IC<sub>50</sub> = 3,3 µg/ml) et MEL-4 (IC<sub>50</sub> = 4,8 µg/ml) [Pisha et *al.*, 1995]. Ces lignées proviennent de patients humains avec des mélanomes métastatiques. Elles ont été prélevées de tissus de nodule lymphatique (MEL-1), de fluide pleural (MEL-2), du foie (MEL-3) et de la peau (MEL-4) [Pisha et *al.*, 1995].

L'acide bétulinique 1 s'est montré sélectif pour quelques types de cancer notamment les mélanomes et les gliomes. En effet, tel que le montre le tableau 1, l'acide bétulinique 1 possède une forte toxicité pour les cellules de type mélanome, par exemple MEL-2 ( $IC_{50} = 1,2 \mu\text{g/ml}$ ) mais ne présente pas une forte toxicité pour les cellules de carcinome épidermique humain de la bouche (KB) ( $IC_{50} > 20 \mu\text{g/ml}$ ) [Pisha et *al.*, 1995].

Des études plus récentes ont démontré que l'acide bétulinique 1 possède une activité anticancéreuse envers d'autres lignées de cellules cancéreuses notamment des neuroblastes ( $IC_{50}$ : 1-10  $\mu\text{g/ml}$ ), des médulloblastomes ( $IC_{50}$ : 3-15  $\mu\text{g/ml}$ ), de glioblastomes ( $IC_{50}$ : 2-17  $\mu\text{g/ml}$ ) et sur des cellules cancéreuses de l'estomac et du sein [Fulda et *al.*, 1999 et Nagourney et *al.*, 1996]. Pour protéger la propriété intellectuelle concernant l'activité antitumorale de l'acide bétulinique 1 et de plusieurs dérivés envers les cellules de leucémie, des lymphomes, des cancers de la prostate, du poumon et des ovaires, un brevet a été déposé par le groupe de Ramadoss [Ramadoss et *al.*, 2000]. Un autre brevet a été déposé par le groupe de Debatin concernant l'activité antitumorale de l'acide bétulinique 1 et de plusieurs dérivés envers les cellules de type neuroblastes (SH-EP), médulloblastomes (Daoy), du sarcome d'Ewing's (A 17/95) et du mélanome A-378 [Debatin et *al.*, 2002]. Récemment, l'étude de Zuco et *al.* a permis d'observer que l'acide bétulinique 1 présente une activité anticancéreuse envers des carcinomes du poumon (H460, POGB et POGB/DX,  $IC_{50} = 1,5-4,2 \mu\text{g/ml}$ ), des ovaires (A2780, OVCAR-5, et IGROV-1,  $IC_{50} = 1,8-4,5 \mu\text{g/ml}$ ), ainsi qu'envers le carcinome cervical A431 ( $IC_{50} = 1,8 \mu\text{g/ml}$ ) [Zuco et *al.*, 2002].

De plus, l'étude de Zuco et *al.* a permis d'observer la cytotoxicité sélective de l'acide bétulinique 1 envers les cellules cancéreuses. Leurs tests *in vitro* montrent que ce composé n'est pas toxique pour les cellules saines. En effet, à mêmes concentrations, les cellules saines, des lymphocytes de sang périphérique humain (PBL), ne sont pas affectées par l'acide bétulinique 1 ( $IC_{50} > 20 \mu\text{g/ml}$ ) tandis que la croissance des cellules cancéreuses est inhibée.

Des tests d'activité antitumorale de l'acide bétulinique 1 *in vivo* ont été réalisés par le groupe de Pezzuto sur des souris athymiques qui ont été injectées sous-cutané par des cellules du mélanome humain MEL-2 [Pisha et *al.*, 1995]. Les souris ont été traitées ou non avec différentes doses d'acide bétulinique 1 et la progression tumorale a été évaluée sur une période de 40 jours. Les résultats indiquent que l'acide bétulinique 1 inhibe significativement la croissance des tumeurs. De plus, les souris témoins dont la tumeur avait beaucoup progressé ont été traitées, 40 jours après le début de l'expérience, avec l'acide bétulinique 1. On observa chez elles la diminution de la grosseur de leurs tumeurs de 80% ce qui permit d'augmenter significativement leur durée de vie. L'expérience a également montré que l'acide bétulinique 1 était faiblement toxique chez la souris. En effet, à toutes les doses testées (50, 250 et 500 mg/kg de poids corporel), aucun signe de toxicité n'a été observé sur l'ensemble des individus [Pisha et *al.*, 1995]. En plus, l'équipe de Zuco a effectué des tests *in vivo* de même nature sur des souris athymiques et aucune souris n'a montré de signe de toxicité apparente ou de perte de poids après le traitement à l'acide bétulinique 1 [Zuco et *al.*, 2002].

### 2.3.2 Activité anti-VIH de l'acide bétulinique 1

L'acide bétulinique 1 a montré une activité antivirale contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) [Fujioka *et al.*, 1994 et Yoshiki *et al.*, 1996]. L'infection par ce virus cause le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). L'acide bétulinique 1 a été utilisé sur des lymphocytes H9 infectés par le VIH afin de déterminer l'activité antivirale de ce composé. Les résultats indiquent un IC<sub>50</sub> de 1,4 µM [Yoshiki *et al.*, 1996]. L'acide bétulinique 1 inhibe la réplication du VIH dans les lymphocytes H9 et bloque l'entrée du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) dans les cellules [Mayaux *et al.*, 1994].

De nombreux dérivés de l'acide bétulinique 1 ont été synthétisés ce qui a permis de découvrir de nombreux composés avec un potentiel intéressant pour le traitement de l'infection au VIH. Plusieurs de ces dérivés ont montré une activité plus importante envers ce virus que les agents anti-VIH présentement utilisés pour le traitement des individus infectés par ce virus [Cichewicz et Kouzi, 2004].

## 2.4 Problématique

L'acide bétulinique **1** présente un intérêt dans le traitement de maladies humaines. En effet, la molécule présente de nombreuses activités *in vitro* envers les cellules cancéreuses (section 2.3.1) et inhibe le développement de virus tels que le virus d'immunodéficience humaine (section 2.3.2). Cependant, l'acide bétulinique **1** présente une limite d'application. En effet, cette molécule a une faible hydrosolubilité ce qui résulte en une biodisponibilité limitée du composé dans l'organisme [Jeong *et al.*, 1999 et Nagourney *et al.*, 1996]. L'acide bétulinique **1** est très peu soluble dans l'eau et, lorsqu'il est solubilisé dans un solvant puis placé en milieu aqueux, il précipite [Jeong *et al.*, 1999 et Cichewicz et Kouzi, 2004].

Une étude montre que la biodistribution de l'acide bétulinique **1**, après injection à des souris, est plus importante dans le gras périnéal. Ensuite, le composé est distribué respectivement dans la vessie, les ovaires, les glandes mammaires et les nœuds lymphatiques. La peau, le cœur et le cerveau ne contenaient que très peu d'acide bétulinique **1** [Udeani *et al.*, 1999].

Plusieurs chercheurs travaillent à l'augmentation de l'hydrosolubilité de l'acide bétulinique **1** afin d'augmenter sa biodisponibilité, d'améliorer sa biodistribution [Jeong *et al.*, 1999] ainsi que de faciliter sa formulation [Burman *et al.*, 2003].

Dans le but de contrer la limite d'application de l'acide bétulinique 1, sa faible biodisponibilité, l'objectif du projet de recherche consiste en la formation d'un dérivé de l'acide bétulinique 1 plus hydrosoluble et conservant une activité anticancéreuse intéressante. L'ajout d'une section hydrosoluble et polaire telle une section sucre pourrait permettre d'augmenter l'hydrosolubilité du composé ainsi qu'améliorer sa biodistribution telle que le présente la section 2.5. La conformation anomérique de la section sucre peut permettre de maximiser l'absorption du glycoside par l'organisme tel que le montre le résumé de l'étude du groupe de Mizuma présenté à la section 2.6.

La synthèse de glycoside doit être effectuée sur une section de l'acide bétulinique 1 qui ne joue pas un rôle essentiel pour l'activité anticancéreuse du composé. La section 2.7 présente un résumé des résultats de différentes études qui ont permis de choisir le site de réaction sur l'acide bétulinique 1.

## **2.5 Intérêt de l'ajout d'une section glucose 4**

L'augmentation de l'hydrosolubilité de l'acide bétulinique 1 est possible par l'ajout d'une section plus polaire voire hydrophile. Les sucres sont des molécules polaires, hydrophiles et disponibles à faible coût. Il est connu que plusieurs cellules cancéreuses ont besoin d'un apport en glucose 4 plus important que les cellules saines [Smith, 1999]. Cette avidité plus grande pour le glucose est due à leur besoin énergétique plus important causé par la croissance rapide et incontrôlée de ces cellules. La présence d'un glucose sur la

molécule pourrait favoriser son absorption par les cellules cancéreuses afin d'induire l'apoptose sélective de ces cellules [Smith, 1999].

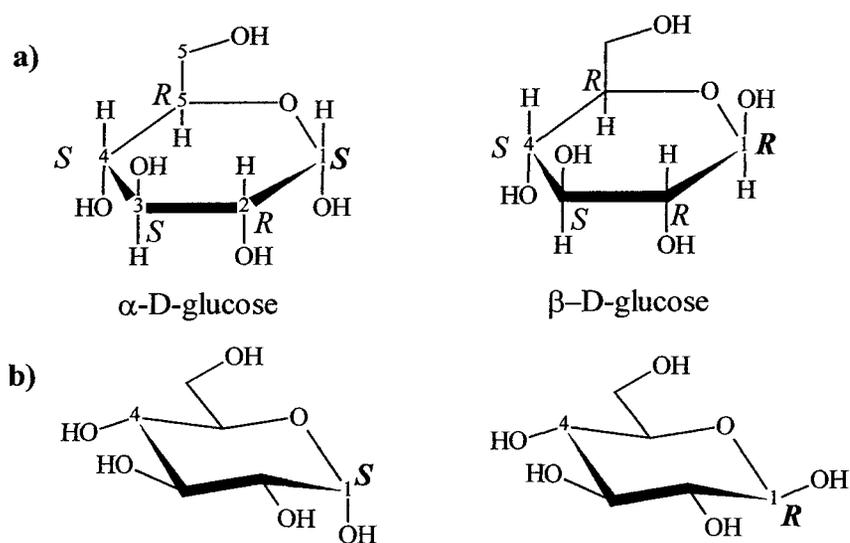
L'équipe de Mizuma a démontré que les glucosides (glycosides dont la section sucre est le glucose **4**) sont absorbés en plus grande quantité par les intestins que les galactosides (glycosides dont la section sucre est le galactose) [Mizuma et *al.*, 1994]. Leurs études sur le transport intestinal de l'acétaminophène sous différentes formes glycosidiques ont été effectuées sur des rats. L'équipe a démontré que les glucosides passent de la muqueuse intestinale au sérum plus facilement que les galactosides à cause de la présence de cotransporteurs Na<sup>+</sup>/glucose (SGLT1) dans l'intestin.

À la lumière de ces informations, l'utilisation du glucose **4** pour former des analogues glycosidiques de l'acide bétulinique **1** est un choix judicieux. En plus, la présence de transporteurs et d'enzymes spécifiques au glucose pourrait permettre d'améliorer sa biodisponibilité et sa biodistribution dans l'organisme.

## 2.6 Configuration anomérique $\alpha$ ou $\beta$

Le glucose **4** peut adopter deux formes qui sont des épimères (diastéréoisomères ne différant que par la configuration d'un seul centre). La différence de configuration se situe au niveau du carbone 1, le carbone anomérique (figure 3). Les épimères, différents de par la

configuration du carbone anomérique, sont également appelés anomères. Selon la nomenclature Cahn-Ingold-Prelog (convention R/S), la forme  $\alpha$  est de configuration SRSSR et la forme  $\beta$  de configuration RRSSR (figure 3a). Cela implique que dans la conformation chaise la plus stable, le groupement hydroxyle de l'anomère  $\alpha$  est en position axiale tandis que celui de l'anomère  $\beta$  est en position équatoriale (figure 3b).



**Figure 3.** Structure des anomères  $\alpha$  et  $\beta$  du D-glucose;

**a)** présentation de Haworth, **b)** présentation en forme chaise.

Le choix de la conformation anomérique ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) du glycoside doit permettre d'obtenir une absorption maximale du composé par l'organisme. Des études effectuées sur les rats ont permis de démontrer que les glycosides dont la section sucre est sous forme  $\beta$  sont plus facilement assimilés que ceux en forme  $\alpha$  [Mizuma et *al.*, 1998]. Cette étude

montre que les  $\beta$ -glucosides et les  $\beta$ -galactosides traversent plus facilement de la muqueuse intestinale au sérum que leurs anomères respectifs, les  $\alpha$ -glucosides et les  $\alpha$ -galactosides. À la lumière de ces informations, on peut croire que les sucres liés sur le triterpène par un lien acétal  $\beta$  seront plus facilement absorbés par l'organisme que ceux liés par un lien acétal  $\alpha$ . De plus, comme vu à la section précédente, le glucose 4 est plus facilement assimilé que le galactose. Donc, les résultats de l'équipe Mizuma indiquent que l'ajout d'un  $\beta$ -glucose 4 à un composé faiblement absorbé par l'organisme pourrait permettre d'augmenter son absorption.

La stratégie de synthèse consistera à la synthèse d'un glucoside de l'acide bétulinique 1 en conformation anomérique  $\beta$  dans le but de maximiser son absorption par l'organisme.

## 2.7 Choix du site de réaction sur l'acide bétulinique 1

Lors de la synthèse d'un dérivé de l'acide bétulinique 1, le choix du site de réaction doit être fait à une position qui permet de conserver l'activité anticancéreuse de l'acide bétulinique 1. Pour faire ce choix, la compréhension de la relation entre la structure du composé et son activité anticancéreuse est primordiale. Plusieurs études ont été faites sur l'activité anticancéreuse de l'acide bétulinique 1 et de ses dérivés afin de comprendre cette relation. Les différents résultats obtenus par différentes études sont présentés ci-dessous. Les sites étudiés pour effectuer une modification chimique telle que l'ajout d'une section

glucose sur l'acide bétulinique 1 sont la fonction hydroxyle en position 3 et la fonction acide carboxylique en position 28.

Quelques dérivés de l'acide bétulinique 1 en position 28 ont été synthétisés et leurs activités anticancéreuses ont été évaluées. Dans la plupart des cas, la fonction acide carboxylique en position 28 s'est avérée importante pour conserver une activité anticancéreuse [Kim et *al.*, 1998; Lee et *al.*, 1998; Chatterjee et *al.*, 1999 et Hata et *al.*, 2002]. Les seuls dérivés effectués en position 28 de l'acide bétulinique 1 qui ont conservé une activité anticancéreuse intéressante sont des dérivés avec différents acides aminés liés à la fonction acide (28) du composé (section 2.13.1) [Jeong et *al.*, 1999]. Les dérivés synthétisés possédaient une activité anticancéreuse envers les mélanomes tout en étant plus hydrosoluble que le composé de départ, l'acide bétulinique 1.

Plusieurs autres études ont démontré que la fonction acide en position 28 est importante dans le mécanisme apoptotique de l'acide bétulinique 1 [Kim et *al.*, 1998; Lee et *al.*, 1998; Chatterjee et *al.*, 1999 et Hata et *al.*, 2002]. La formation de dérivés à cette position rend le composé faiblement toxique envers les cellules cancéreuses. Par exemple, les composés dont la fonction 28 est un méthyle (lupéol 3), un alcool (bétulinol 2) ou une fonction acide méthylée (-COOCH<sub>3</sub>) démontrent peu ou pas d'activité anticancéreuse envers le mélanome MEL-2 [Kim et *al.*, 1998]. De plus, le groupe de Pezzutto a synthétisé l'acide bétulinique 1 avec un glucose 4 lié à la position 28, le 28-O-β-D-glucopyranosyl-3β-hydroxylup-20(29)-en-28-oate. Les résultats d'activités anticancéreuses ont montré que

ce composé ne démontrait pas une forte activité anticancéreuse ( $IC_{50} > 20 \mu\text{g/ml}$ ) envers quatre lignées de mélanomes humains soit MEL-1, MEL-2, MEL-3 et MEL-7 [Chatterjee et *al.*, 1999].

Pour ce qui est de la fonction hydroxyle en position 3, le groupe de Pezzuto ainsi que celui de Hata ont démontré que cette fonction n'est pas essentielle pour l'activité anticancéreuse de l'acide bétulinique 1 [Kim et *al.*, 1998 et Hata et *al.*, 2002]. Les dérivés ayant subi des changements à cette fonction tels que des oxydations ou la formation d'oximes ont conservé une activité anticancéreuse comparable à l'acide bétulinique 1. Cette fonction jouerait plutôt un rôle dans le caractère sélectif du composé envers les mélanomes et certaines autres lignées cancéreuses [Kim et *al.*, 1998]. En effet, les dérivés de l'acide bétulinique 1 effectués en position 3 présentent une activité anticancéreuse envers le carcinome épidermique humain de la bouche (KB), cellules pour laquelle l'acide bétulinique 1 ne présente pas une forte cytotoxicité ( $IC_{50} > 20 \mu\text{g/ml}$ ) [Kim et *al.*, 1998].

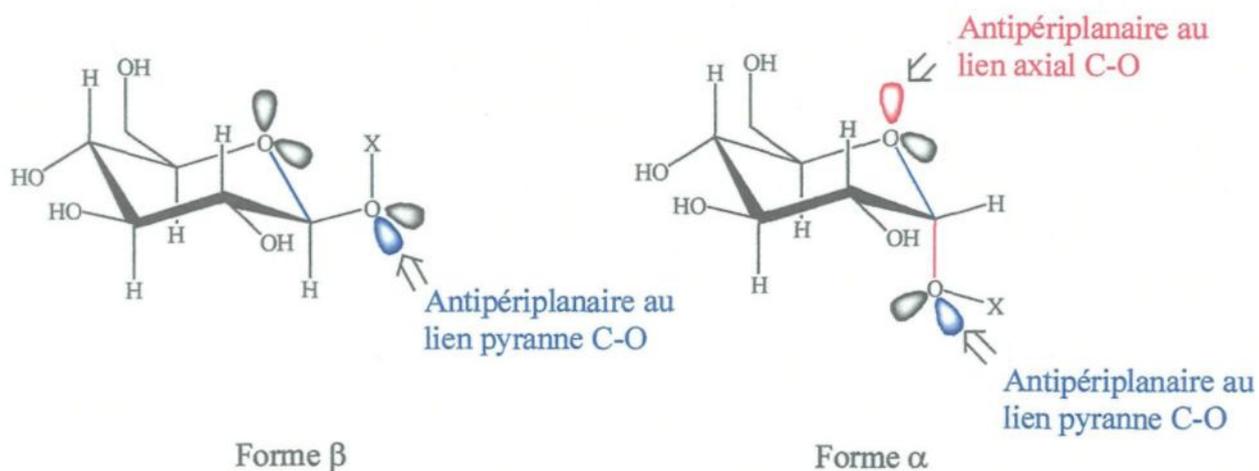
En général, selon ces études, la fonction acide en position 28 s'est avérée importante dans le mécanisme apoptotique de l'acide bétulinique 1. Puisque notre stratégie de synthèse consiste à la synthèse de glycoside et que celle-ci, en position 28, inhibe le caractère cytotoxique du composé [Chatterjee et *al.*, 1999], le site le plus judicieux pour effectuer la synthèse d'un glycoside de l'acide bétulinique 1 est la fonction hydroxyle en position 3.

## 2.8 Notion de chimie de la réaction de glycosylation

Les prochaines sections portent sur les caractéristiques spécifiques des sucres ainsi que sur les particularités de la réaction de formation de glycoside.

### 2.8.1 Effet anomérique

Les sucres subissent un effet dont il est essentiel de tenir compte lors de l'élaboration d'une stratégie de synthèse. Cet effet se produit à cause de la présence de doublets d'électrons libres sur l'oxygène du cycle pyranne et sur le groupement lié à la section sucre en position 1. Ces groupements préfèrent adopter la position axiale plutôt que la position équatoriale en forme chaise; la position équatoriale étant habituellement la plus stable en raison de l'encombrement stérique moins important. Ils subissent l'effet anomérique qui est présenté à la figure 4 [David, 1995]. Dans les deux cas (forme  $\alpha$  et  $\beta$ ), un des doublets d'électrons libres de l'oxygène à la position anomérique est placé de façon antipériplanaire au lien C-O du cycle pyranne. Cependant, à cause de la présence d'électrons libres sur le groupement substituant en position 1, la position axiale est favorisée. Cela s'explique parce qu'une autre stabilisation est possible en position axiale. En effet, un des doublets d'électrons libres de l'oxygène sur le cycle est placé de façon antipériplanaire au lien C1-groupement en forme  $\alpha$ .



**Figure 4.** Effet anomérique du glucopyranose 4 substitué en 1.

À cause de son l'environnement chimique différent de celui des autres carbones du sucre, le carbone anomérique possède une réactivité différentes de celle autres carbones.

### 2.8.2 Protections sélectives du glucose 4

La synthèse avec des sucres nécessite certaines précautions afin d'obtenir une bonne sélectivité. En effet, puisque les sucres contiennent cinq ou six fonctions alcools, celles-ci doivent être partiellement protégées afin d'éviter la formation de plusieurs produits pendant la réaction. Le glucose 4, par exemple, doit être protégé aux positions 2, 3, 4 et 6 afin de former le lien glycosidique à la position anomérique uniquement (position 1). Pour ce faire, toutes les fonctions hydroxyles doivent être protégées pour ensuite régénérer l'alcool en position 1. Aussi, il faut utiliser des groupements protecteurs labiles afin de régénérer les

fonctions alcools de la section sucre après la formation du lien glycosidique tout en conservant ce lien intact.

Les groupements protecteurs doivent permettre de libérer l'alcool en position 1 afin d'y effectuer le couplage. Ceci est possible avec les acétates ( $-C=O-CH_3$ ) et les benzoyles ( $-C=O-Bz$ ). Ceux-ci sont relativement labiles et plusieurs méthodes de déprotection sélective de la position anomérique sont connues (section 2.8.3). Les groupements benzyles ( $-CH_2-Bz$ ) peuvent aussi être utilisés. Ceux-ci ont une réactivité différente de celle des acétate et des benzoyles alors une stratégie différente est utilisée afin de régénérer l'alcool en position anomérique (section 2.8.3).

Les groupements acétates sont facilement générés par différentes méthodes avec des rendements élevés. La plupart des réactions impliquent l'utilisation d'anhydride acétique ( $Ac_2O$ ) [Vogel et Furniss, 1994] ou d'acétate de sodium ( $AcONa$ ) [Masayuki et Tanaka, 1991]. Il est possible d'activer cette réaction en utilisant la chaleur conventionnelle [Vogel et Furniss, 1994] ou les micro-ondes [Limousin et *al.*, 1997 et Cléophax et *al.*, 2000]. Aussi, il est possible d'activer la réaction à l'aide de catalyseurs comme par exemple l'acide perchlorique [Vogel et Furniss, 1994]. Les benzoyles sont générés par le chlorure de benzoyle [Deng et *al.*, 1999] et les benzyles par l'alcool benzylique en présence d'un activant [Greene et Wuts, 1999].

### 2.8.3 Déprotection du carbone anomérique

La régénération du groupement hydroxyle du carbone anomérique est essentielle puisque la réaction de glycosylation doit s'effectuer à cet endroit uniquement. Cette déprotection peut être effectuée de façon sélective puisque le groupement hydroxyle du carbone anomérique est dans un environnement chimique différent des autres groupements hydroxyles du sucre (section 2.8.1).

Plusieurs réactions sont connues pour la régénération de la fonction hydroxyle du carbone anomérique lors de l'utilisation de groupements protecteurs acétate et benzoyle. Ces deux groupements peuvent être déprotégés selon les mêmes conditions. La déprotection de la position anomérique peut se faire entre autres grâce aux acides de Lewis [Greene et Wuts, 1999]. Par contre, ceux-ci ne permettent pas de déprotéger sélectivement la position 1 mais s'attaquent à celle-ci en premier avant de déprotéger les autres. L'obtention du produit voulu est possible uniquement avec des rendements moyens.

La déprotection sélective est possible grâce aux dérivés d'étain tels méthoxide de tributylétain ( $\text{Bu}_3\text{SnOMe}$ ) ou l'oxyde de bis-tributylétain ( $((\text{Bu})_3\text{Sn})_2\text{O}$ ), des composés hautement toxiques et difficiles à neutraliser [Nudelman et *al.*, 1987].

Une autre approche de déprotection sélective à la position 1 consiste à introduire un brome en position 1 et, ensuite, à hydrolyser le dérivé bromé avec le carbonate d'argent

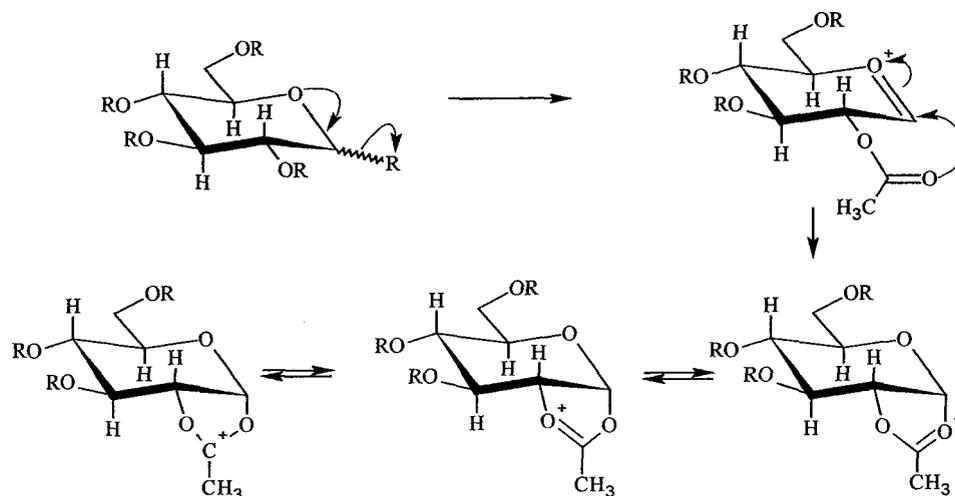
afin de régénérer l'alcool [Deng et *al.*, 1999]. Cette approche permet d'obtenir des rendements élevés.

La régénération de l'alcool du carbone anomérique en utilisant les groupements protecteurs benzyles est plus complexe que lors de l'utilisation des acétates ou des benzoyles. La plupart des chercheurs utilisent comme sucre de départ le 1-méthylglucose. Ils protègent les fonctions alcools (2, 3, 4 et 6) avec des benzyles pour ensuite retirer le groupement méthyle sous certaines conditions telles que l'utilisation de tribromure de bore combiné à l'éther couronne (15-crown-15) [Niwa et *al.*, 1981] ou l'utilisation de l'hydrogénation catalytique [Koto et *al.*, 1976].

#### **2.8.4 Groupement voisin de la position anomérique de type participant**

Comme il a été discuté précédemment à la section 2.6, la glycosylation peut donner deux produits appelés anomères selon la position du groupement sur la position 1 du glucose **4**. L'obtention d'un seul anomère, le  $\beta$ , est possible en utilisant des groupements protecteurs spécifiques à la position 2 du glucose **4**, celle voisine de la position anomérique. En effet, l'utilisation de groupements liés par des fonctions esters (groupement participant) permet d'orienter la réaction afin d'obtenir un seul anomère (figure 5). La formation d'un deuxième cycle entre le groupement participant et le carbone anomérique stabilise la

molécule et permet de rendre la position axiale inaccessible [David, 1995]. Le couplage s'effectue alors seulement en position équatoriale pour obtenir l'anomère  $\beta$  pur.



**Figure 5.** Mécanisme de participation du groupement voisin [Zeng et al., 2002].

La figure 5 présente le mécanisme de participation du groupement voisin avec des groupements acétates. Cette sélectivité peut être obtenue avec d'autres groupements liés au sucre par une fonction ester tels les benzoyles. Le caractère électropositif du carbone du carbonyle du groupement participant peut entraîner la formation d'une réaction secondaire, la formation d'un orthoester, tel que présenté à la section 2.10.2.

L'utilisation de groupements non-participants tels les benzyles entraîne la formation des deux anomères lors de la glycosylation.

## 2.9 Méthodes de glycosylation

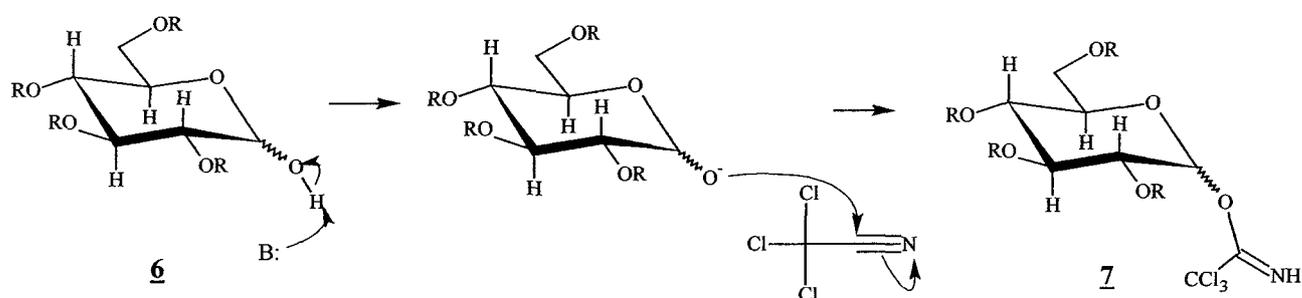
La synthèse de glycoside est aisément effectuée par les enzymes présents dans le monde du vivant. Par contre, la reproduction de cette réaction en laboratoire n'est pas aussi simple. Plusieurs étapes sont nécessaires afin d'obtenir une sélectivité équivalente à celle obtenue par la biosynthèse. Différentes méthodes de synthèse de glycosides ont été élaborées par différents chercheurs. Les plus communes seront résumées dans les prochaines sections.

### 2.9.1 Activation par les trihalogénoacétimidates 7

La glycosylation utilisant les glycosyles trihalogénoacétimidates 7 en tant qu'accepteur, développée par le groupe de Schmidt est dorénavant l'une des plus utilisées [Schmidt et Michel, 1980]. Très stable, le sucre trihalogénoacétimide 7 se conserve facilement et permet l'obtention d'excellents rendements. Plusieurs synthèses utilisant ce type de dérivés de sucres activés en présence de différents catalyseurs ont été rapportées. De nombreuses synthèses utilisant le glycosyle avec différents catalyseurs ont été publiées.

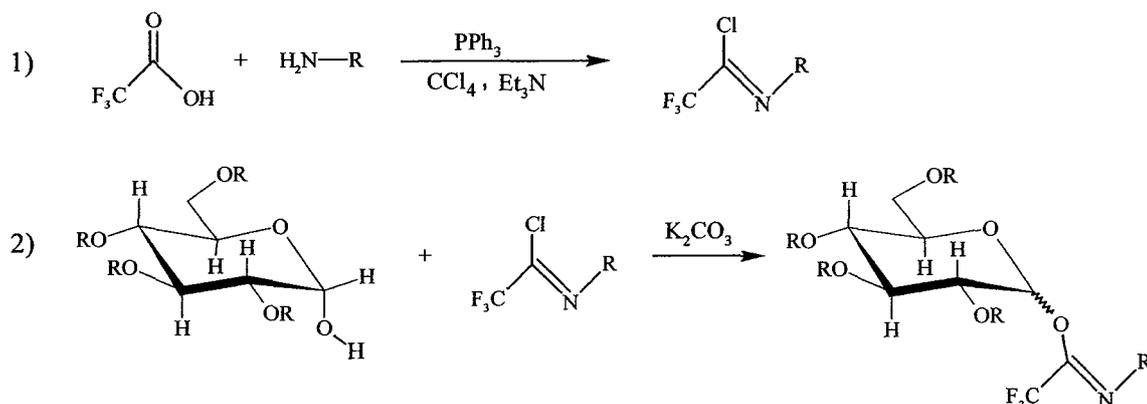
La première voie de préparation du glycosyle est présentée à la figure 6 ci-dessous [Schmidt et Karl-Heinz, 2000]. Le glycosyle trichlororoacétimide 7 est formé en une seule étape à partir de la trichloroacétonitrile. Cette réaction peut se faire à l'aide de différentes bases. L'utilisation de 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-ène (DBU) est fréquente

mais il en résulte en un grand nombre de produits secondaires colorés indésirables [Numata et *al.*, 1987 et Urban et *al.*, 1990]. Ce désagrément est partiellement évité par l'utilisation d'hydrure de sodium (NaH) [Schmidt et Michel, 1985]. La base la plus efficace pour effectuer cette réaction est le carbonate de césium ( $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ). Celui-ci limite la formation de produits secondaires et permet une séparation chromatographique facile [Urban et *al.*, 1990].



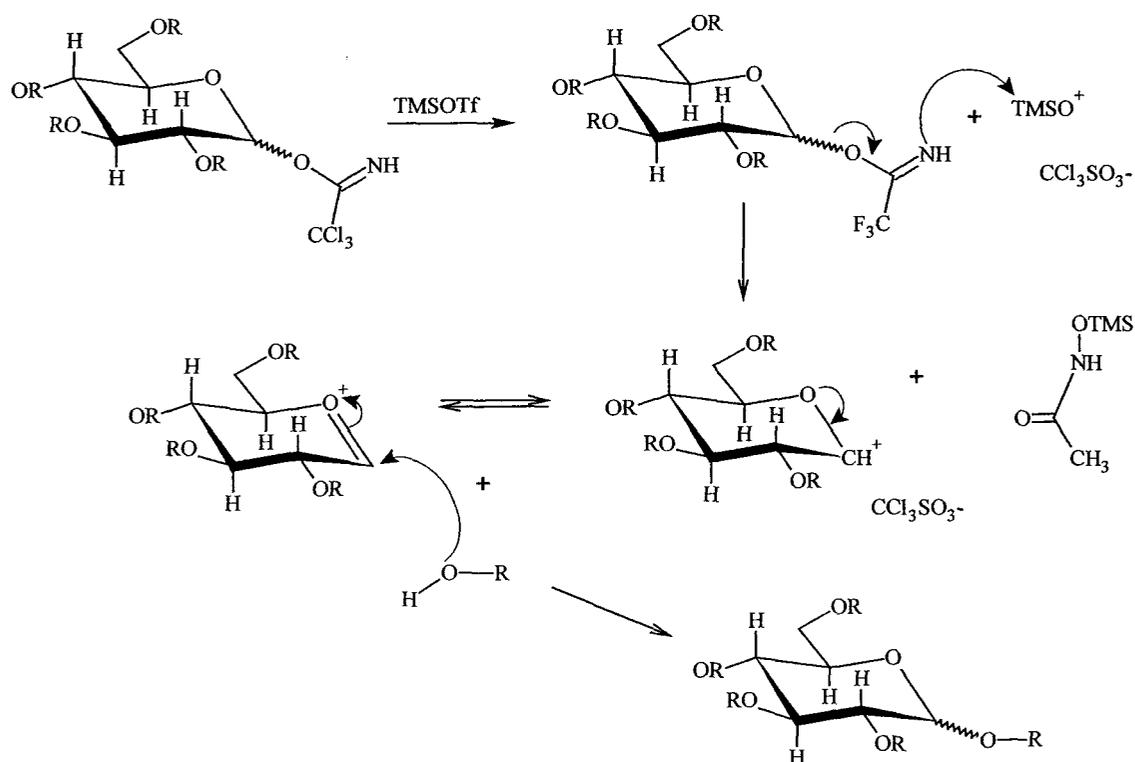
**Figure 6.** Mécanisme proposé pour la formation du glycosyle activé par les trichloroacétimides selon Schmidt et *al.*

La figure 7 ci-dessous présente une autre approche pour l'activation d'un sucre avec un groupement trifluoroacétimide [Yu et Tao, 2001]. La préparation du glycosyle activé s'effectue en deux étapes et nécessite de nombreuses manipulations. Cette approche est longue et les rendements sont plutôt faibles.



**Figure 7.** Réaction générale de la formation d'un glycosyle activé par un groupement trifluoroacétimide selon Yu et Tao.

Lorsque le glycosyle est formé, le couplage du sucre activé avec un alcool peut être effectué en présence d'un catalyseur. La figure 8 présente une proposition de mécanisme de glycosylation en présence d'un glycosyle activé et du catalyseur triméthylsilyltriflate (TMSOTf); ce mécanisme est inspiré de celui de Douglas qui utilise le catalyseur triflate d'argent [Douglas et *al.*, 1993]. Le catalyseur facilite le départ du groupement activant et permet ainsi d'augmenter le caractère électrophile du carbone anomérique. L'intermédiaire formé réagit rapidement avec un nucléophile tel un alcool. Les catalyseurs utilisables sont les acides de Lewis comme le TMSOTf et le trifluorure de bore complexé à l'éther diéthylique ( $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ) ainsi que les générateurs de cations comme le triflate de lithium ( $\text{LiOTf}$ ) [Schmidt et *al.*, 1982, Cook et *al.*, 1984 et Lubineau et Drouillat, 1997]. Les réactions de couplage doivent être effectuées dans des conditions anhydres. Il est indiqué dans la littérature que ces deux classes de catalyseurs permettent d'obtenir des rendements supérieurs à 80%.



**Figure 8.** Mécanisme proposé de la réaction de glycosylation par le glycosyle trichloroacétimide **7** catalysé par le TMSOTf.

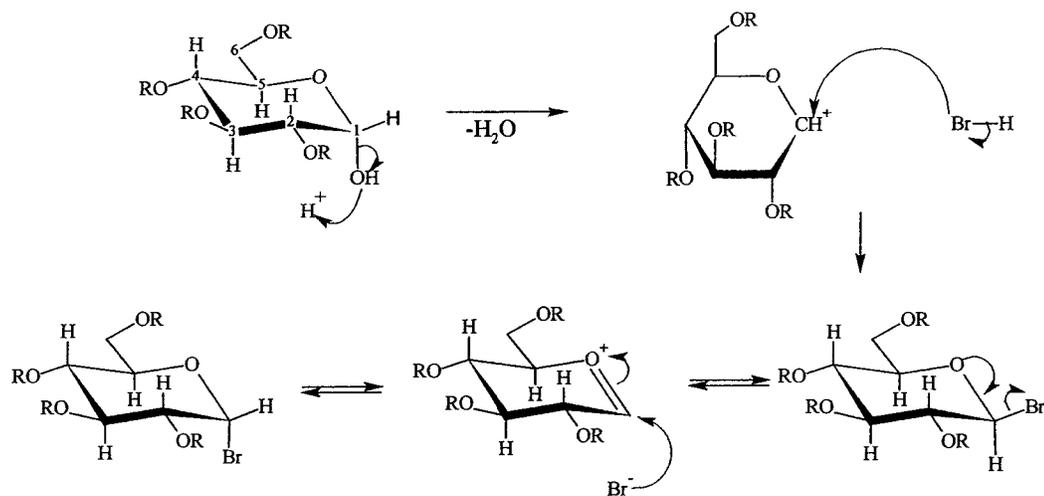
Les acides de Lewis ont fait leurs preuves depuis longtemps comme catalyseur de glycosylation et leur mécanisme est déjà relativement bien connu. Pour ce qui est des générateurs de cations, le mécanisme de couplage n'est pas encore connu mais certaines informations nous indiquent que le mécanisme de cette réaction est différent de celui des acides de Lewis. En effet, la réaction des deux classes de catalyseur envers les mêmes réactifs de couplage est différente dans certains cas. Par exemple, la nature des groupements protecteurs en position 3, 4 et 6 a le potentiel de désactiver la réaction avec le

triflate de lithium tandis qu'elle se produira normalement avec le catalyseur triméthylsilyltriflate [Lubineau et Drouillat, 1997].

L'utilisation d'acides de Lewis lorsque l'alcool accepteur possède une sensibilité aux conditions acides est déconseillée. Dans ce cas, les générateurs de cation tel le triflate de lithium peuvent permettre d'empêcher la formation de réarrangements au sein de la molécule [Lubineau et Drouillat, 1997]. D'autres stratégies peuvent être envisagées pour empêcher la formation de produits secondaires tels que l'utilisation de groupements protecteurs.

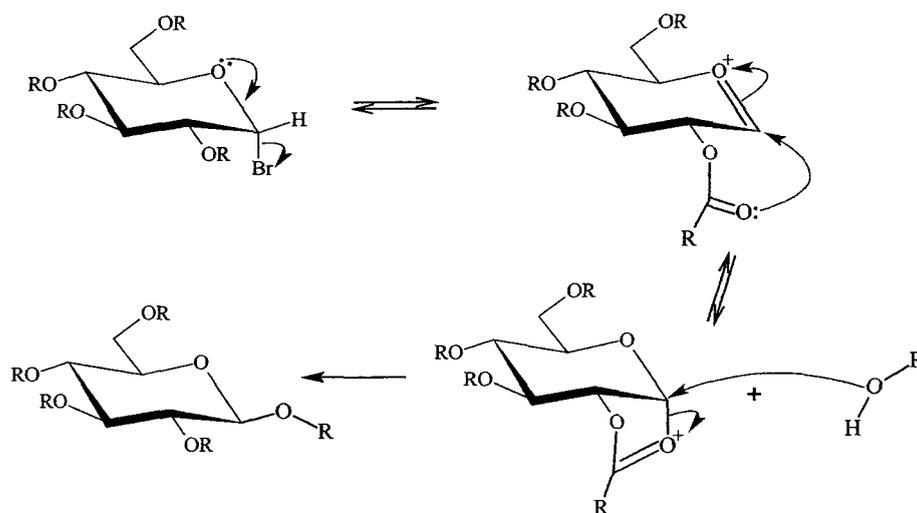
### 2.9.2 Méthode Koenigs-Knorr

Cette méthode, la plus ancienne, a été développée au début du 20<sup>e</sup> siècle par Koenigs et Knorr [Koenigs et Knorr, 1901]. Celle-ci nécessite aussi l'utilisation de sucres préalablement protégés en position 2, 3, 4 et 6 dont la position anomérique est déprotégée. L'activation du sucre se fait en utilisant des composés bromés relativement instables tels l'acide bromique (HBr) ou le brome (Br<sub>2</sub>). À la fin de l'étape de bromation, un réarrangement s'effectue sur la molécule (figure 9). Le brome se place en position  $\alpha$  à cause de l'effet anomérique de la position 1 du glucose **4** [Nukada et *al.*, 1998].



**Figure 9.** Mécanisme proposé de la bromation de la position anomérique du glucose tétra-protégé **6**.

L'activation par un brome permet de rendre le carbone anomérique plus électrophile afin de permettre l'attaque subséquente par l'alcool voulu. En effet, le brome est retiré par le catalyseur, celui-ci étant un électroattracteur, la section sucre devient électrophile ce qui permet au couplage de se produire. La réaction peut être activée, par exemple, par le carbonate d'argent ( $\text{AgCO}_3$ ) et l'oxyde d'argent ( $\text{Ag}_2\text{O}$ ). La figure 10 présente le mécanisme proposé de glycosylation avec l'utilisation d'un groupement participant.



**Figure 10.** Mécanisme proposé pour la glycosylation par la méthode Koenigs-Knorr avec des groupements protecteurs de type participants.

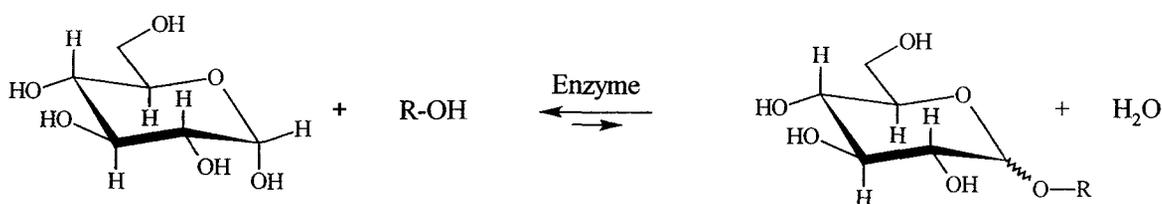
Une autre méthode dérivée de la méthode Koenigs-Knorr, la méthode Helferich, a été développée par le chercheur du même nom [Helferich et Goerdeler, 1940]. L'activant utilisé à la position anomérique du sucre est aussi le brome. Cette méthode diffère de la Koenigs-Knorr par son type de catalyse. Elle est activée par des catalyseurs dont l'atome central est le mercure comme par exemple l'hydroxyde de mercure (II) ( $\text{Hg}(\text{OH})_2$ ), l'acétate de mercure (II) ( $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ ) et le cyanure de mercure (II) ( $\text{Hg}(\text{CN})_2$ ).

### 2.9.3 Méthode enzymatique

La synthèse enzymatique est attrayante puisqu'il n'est pas nécessaire d'effectuer des protections sélectives ni d'activer le sucre impliqué dans la réaction. Le sucre est utilisé tel

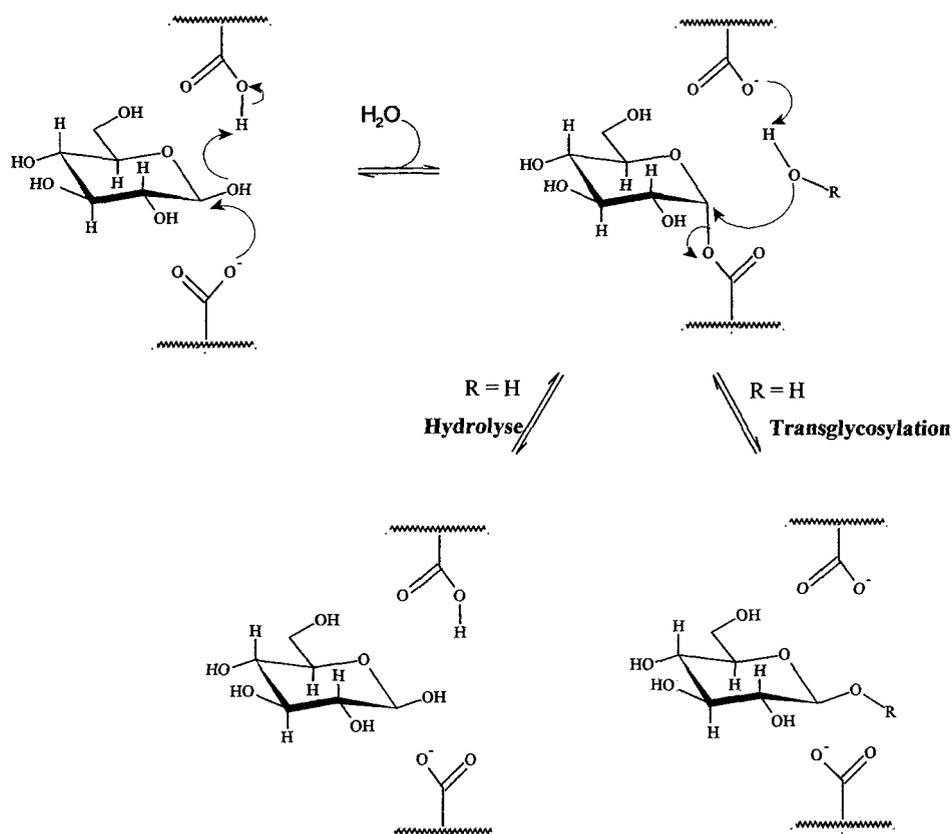
quel avec l'alcool accepteur. De plus, la sélectivité de la réaction est meilleure lorsqu'une enzyme est employée puisque celle-ci forme un lien glycosidique à la position 1 selon une stéréochimie précise. Le coût de l'enzyme elle-même est un facteur important à prendre en compte. Leur synthèse chimique étant trop complexe, plusieurs sont isolées à partir d'organismes vivants ce qui rend leur coût considérable.

La  $\beta$ -D-glucosidase est l'enzyme pour effectuer une glycosylation qui est la moins onéreuse mais aussi la moins efficace. En effet, cette enzyme très abordable est surtout utilisée pour effectuer l'hydrolyse de liens glycosidiques et non pas pour en favoriser la formation. En effet, l'équilibre de la réaction tend vers l'hydrolyse plutôt que vers la glycosylation (figure 11). La figure 12 présente le mécanisme de glycosidation enzymatique.



**Figure 11.** Réaction générale de glycosylation enzymatique.

Par contre, plusieurs moyens peuvent nous permettre de déplacer cet équilibre comme retirer l'eau du milieu réactionnel, travailler à haute concentration de glucose 4 et d'alcool et enlever sélectivement le produit de glycosylation à mesure qu'il se forme [de Rhoode et *al*, 2000].



**Figure 12.** Mécanisme de la réaction de glycosylation enzymatique [Blanchard J. E. et Withers, S. T., 2001].

D'autres chercheurs ont développé des synthèses ayant lieu dans des solvants organiques. En effet, la  $\beta$ -D-glucosidase est une enzyme résistante qui demeure active à des températures plus élevées que la température ambiante ainsi que dans des solvants organiques. Plusieurs chercheurs travaillent sur les réactions en deux phases (acétonitrile: $H_2O$ , benzène: $H_2O$ , 1-octanol: $H_2O$ ) [Vic et *al.*, 1995 et Kobayashi et *al.*,

2000]. Malgré tous ces efforts, les rendements de glycosylation avec l'enzyme  $\beta$ -D-glucosidase sont de l'ordre de 10 à 20%.

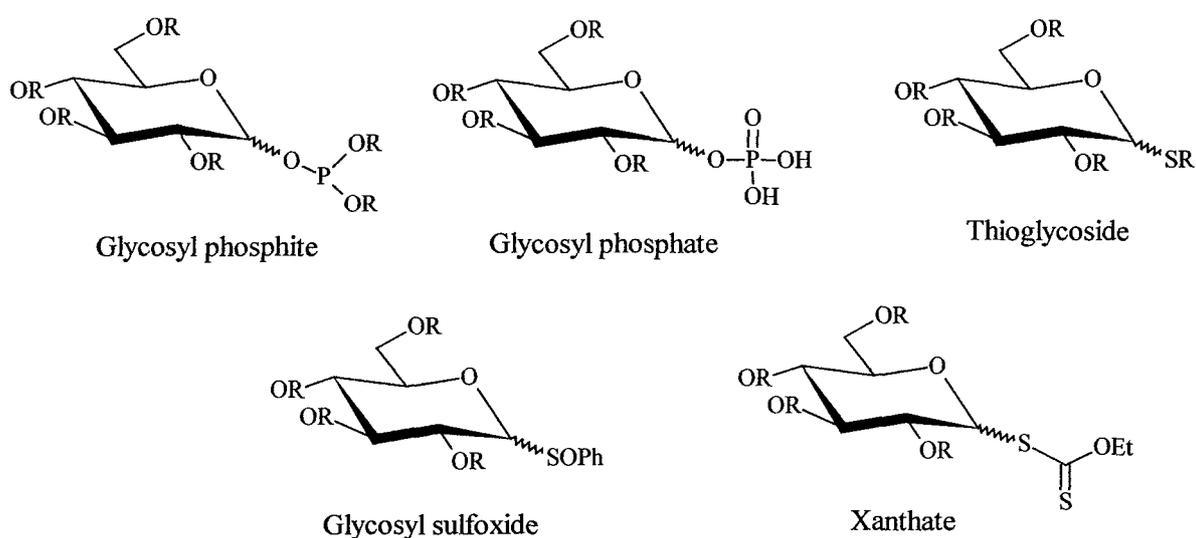
D'autres enzymes sont potentiellement intéressantes mais leur coût très élevé est un obstacle majeur à leur utilisation (3 dollars l'unité comparativement à 0,05 dollars l'unité de  $\beta$ -D-glucosidase). Ces dernières pourraient permettre d'obtenir des rendements comparables à ceux des synthèses chimiques avec une excellente sélectivité en un minimum de temps.

#### 2.9.4 Méthode activée par les micro-ondes

La glycosylation avec les micro-ondes a été rapportée, entre autres, par l'équipe de Limousin [Limousin et *al.*, 1997]. Ces chercheurs ont effectué la synthèse entre le penta-*O*-acétyl-D-glucose **5a** et le 1-décanol en présence de  $ZnCl_2$ ,  $ZnBr_2$  et  $SnCl_2$ . Les réactifs sont adsorbés sur un support solide tel que  $SiO_2$  ou HSC (Hyflo Super cell). Les rendements rapportés sont de 7 à 74% pour des temps de réaction maximaux de 15 minutes. Il est à noter qu'il y a absence de réaction lorsque le milieu réactionnel est chauffé sur plaque chauffante à la place de l'utilisation de micro-ondes. Ces conditions réactionnelles favorisent les réarrangements des molécules sensibles à la chaleur ou aux milieux acides. Malgré cet inconvénient, cette synthèse peut être utile à cause de sa rapidité d'exécution puisque la réaction n'est pas effectuée sous conditions anhydres.

### 2.9.5 Autres méthodes de glycosylation

D'autres groupements activants peuvent être utilisés afin de promouvoir la réaction de glycosylation. Entre autres, les groupements possédant des hétéroatomes sont couramment utilisés. Parmi ceux-ci, on trouve les glycosyles phosphites, les glycosyles phosphates, les thioglycosides, les glycosyles sulfoxydes et les xanthates tel que le montre la figure 13 ci-dessous [Sears et Wong, 2001].



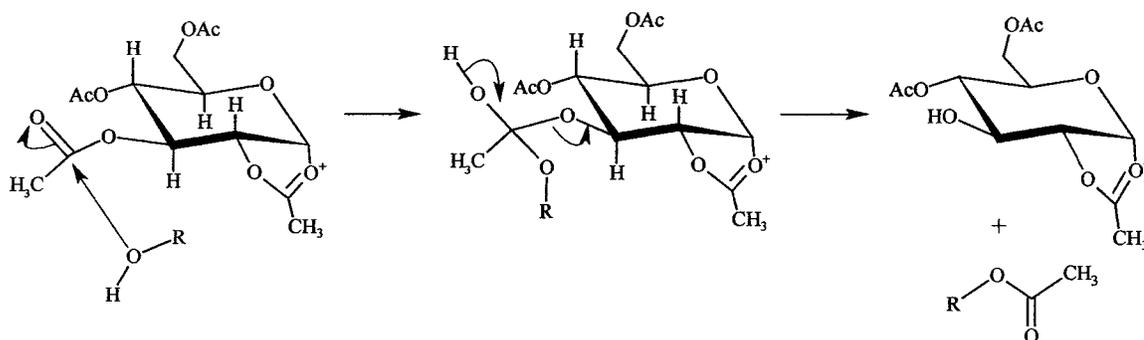
**Figure 13.** Autres types de glycosyles activés utilisés pour la formation de glycosides.

## 2.10 Réactions secondaires de la glycosylation

La glycosylation par les trichloroacétimidates et par la méthode Koenigs-Knorr peut engendrer des produits secondaires à cause de la présence de plusieurs fonctions réactives sur la section sucre. La présence de sites électrophiles sur le sucre activé permet à d'autres réactions de prendre place. Deux réactions secondaires des plus communes seront présentées dans cette section : la transestérification et la formation de l'ortho ester. La formation d'un dimère de l'alcool de départ est aussi rapportée dans la littérature [Uvarova et *al.*, 1980]. Cette réaction n'est pas discutée puisqu'elle est rarement rencontrée.

### 2.10.1 Réaction de transestérification

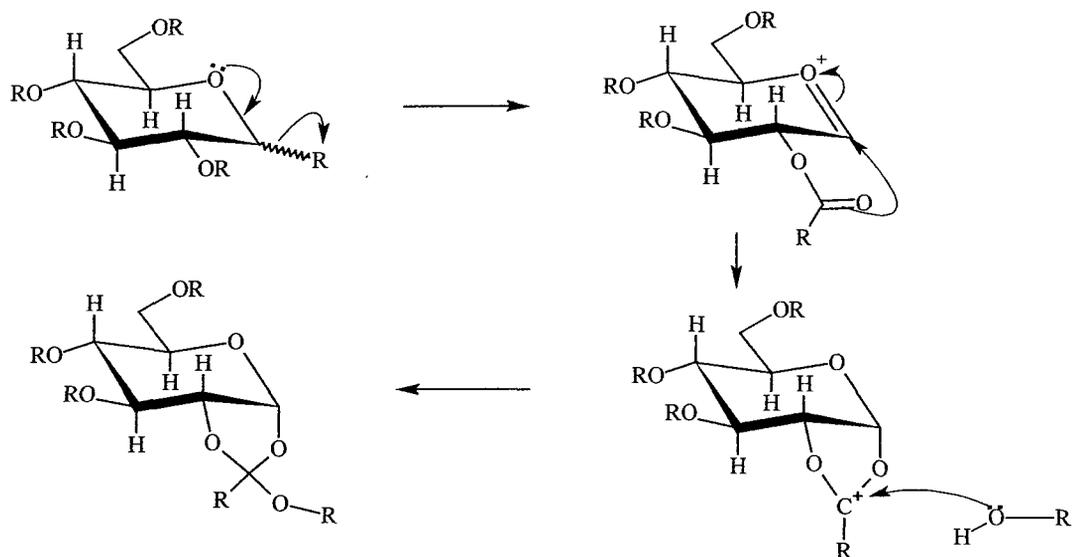
Cette réaction secondaire se produit lors de l'utilisation de groupements protecteurs acétate. L'utilisation de ces groupements pour protéger les alcools du sucre peut engendrer la formation de produits secondaires. L'alcool peut attaquer le carbonyle de l'acétate plutôt que la position 1 du sucre (figure 14) [Uvarova et *al.*, 1980 ; Urban et *al.*, 1990 et Deng et *al.*, 1999]. Cette réaction produit le transfert du groupement acétate sur l'alcool plutôt que le couplage glycosidique. L'utilisation de groupements plus stables et plus stériquement encombrés comme les benzoyles ou des groupements non-participants comme les benzyles peut être envisagée pour empêcher le transfert des groupements acétates.



**Figure 14.** Mécanisme proposé de transestérification.

### 2.10.2 Formation de l'ortho ester

Une autre réaction souvent rencontrée lors du couplage glycosidique est la formation de l'ortho ester. Cette réaction secondaire se produit lors de l'utilisation de groupements participants [Uvarova *et al.*, 1980; Urban *et al.*, 1990 et Deng *et al.*, 1999]. La figure 15 présente le mécanisme de cette réaction. La présence d'une charge positive sur le cycle formé par le groupement participant en position 2 peut rendre la réaction plus facile sur le carbonyle du groupement participant plutôt que sur le carbone anomérique. L'utilisation de groupements benzoyles permet de limiter cette réaction à cause de l'encombrement stérique causé par la présence du cycle benzénique autour du site d'attaque de l'alcool.



**Figure 15.** Mécanisme proposé de formation de l'ortho ester.

La réaction d'ortho ester peut être complètement évitée avec l'utilisation de sucres protégés par des groupements non-participants ou bien sans groupements protecteurs c'est-à-dire avec les alcools libres. Cependant, sans la présence de groupements participants, la glycosylation n'est plus sélective à l'anomère  $\beta$ . La séparation des deux anomères formés ( $\alpha$  et  $\beta$ ) est très difficile car ils ont des polarités similaires.

### 2.11 Déprotection; régénération de alcools de la section sucre

Après l'étape de glycosylation, les fonctions hydroxyles du produit de couplage qui sont protégées par des groupements participants doivent être régénérées afin d'obtenir le produit final. La déprotection des groupements participants tels que les acétates et les

benzoyles s'effectue aisément à l'aide d'une base. Les plus communes sont l'hydroxyde de sodium à faible concentration (0,25 M) [Greene et Wuts, 1999] et le méthoxide de sodium (NaOMe) dans le méthanol [Kwan et *al.*, 2001]. L'utilisation de méthoxide de magnésium (Mg(OMe)<sub>2</sub>) est aussi mentionnée [Xu et *al.*, 1996]. Celui-ci doit être fraîchement préparé à partir de magnésium solide et de méthanol.

L'utilisation de groupements benzyles demande l'utilisation de techniques sélectives comme par exemple l'hydrogénation catalytique [Morzycki et Worjtkielewicz, 2002]. L'hydrogénation catalytique permet de cliver le lien éther entre les groupements benzyles et le sucre tout en conservant le lien glycosidique intact.

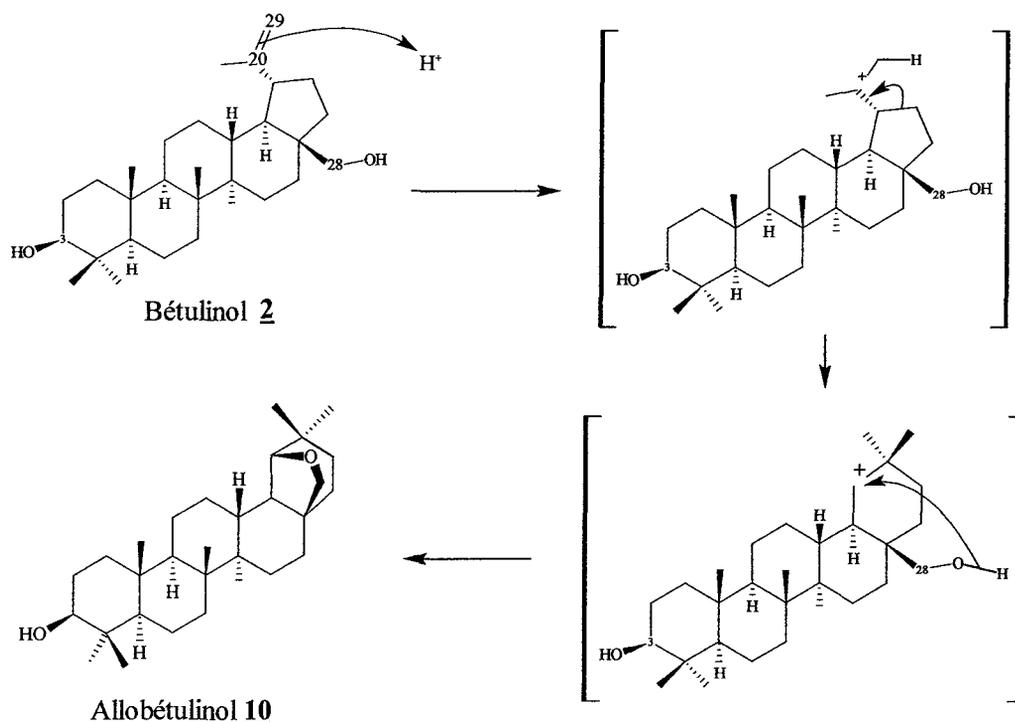
## **2.12 Sensibilité des triterpènes utilisés**

Certains triterpènes au squelette de lupane possèdent une certaine sensibilité aux conditions acides. Ils ont la propriété de se réarranger en triterpène de type oléane avec un lien bicyclo sur le cycle E sous certaines conditions [Lavoie et *al.*, 2001]. Lors du développement de la stratégie de synthèse, il est important de tenir compte de cette possibilité afin de choisir des conditions réactionnelles adéquates.

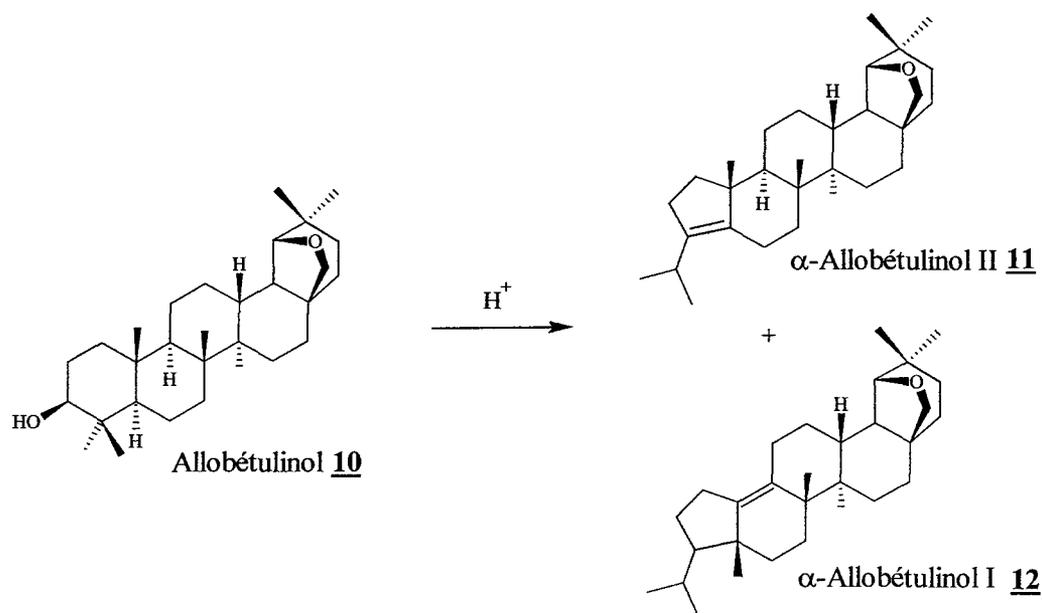
### 2.12.1 Réarrangements du bétulinol 2

Le bétulinol 2, malgré le fait qu'il soit relativement stable, se réarrange lorsqu'il est soumis à certaines conditions acides [Li et *al.*, 1998]. Comme le montre la figure 16, le bétulinol 2 se réarrange en allobétulinol 10 en milieu acide. Le réarrangement consiste en un changement dans le cycle E qui, au départ, contient 5 membres pour donner un cycle à six membres. En plus, l'alcool forme un nouveau lien de type bicyclo.

La nouvelle molécule formée, l'allobétulinol 10, a la possibilité de se réarranger à nouveau en  $\alpha$ -allobétulinol I 11 et II 12 si les conditions d'acidité et de temps sont favorables à ce réarrangement (figure 17).



**Figure 16.** Mécanisme du réarrangement du bétulinol 2 en allobétulinol 10 [Ikan, 1969].

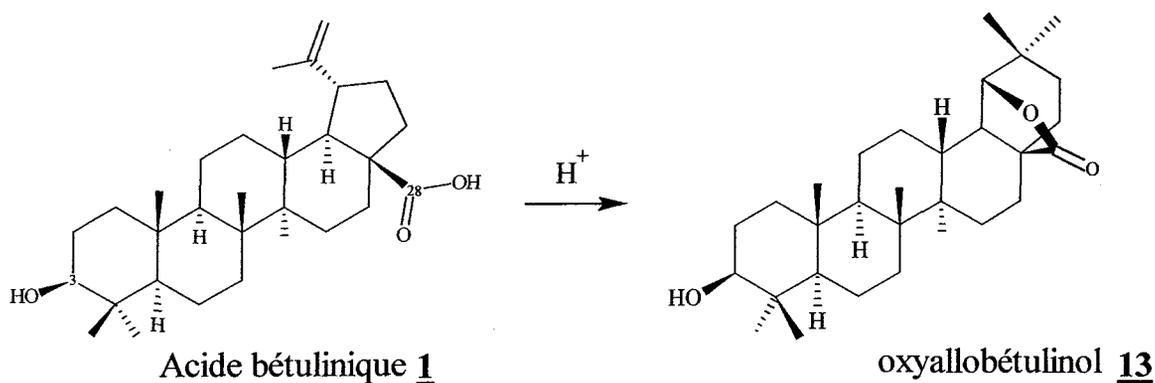


**Figure 17.** Réaction générale du réarrangement de l'allobétulinol **10** en  $\alpha$ -allobétulinol I **11** et II **12**.

Ces réarrangements diminuent le rendement d'une réaction et compliquent l'isolation du produit désiré. L'hydrogénation du lien double en position 20-29 permet d'éviter le réarrangement du bétulinol **2** en allobétulinol **10**. Cependant, cette modification structurale est difficilement réversible. L'autre possibilité afin d'éviter les réarrangements est d'ajouter un groupement protecteur sur la fonction hydroxyle en position 28 du bétulinol **2** afin de bloquer la réaction. L'utilisation de groupements acétates ou benzoyles, facilement retirés par la suite, permettent de régénérer la fonction hydroxyle de la molécule après la réaction.

### 2.12.2 Réarrangement de l'acide bétulinique 1

L'acide bétulinique 1 a la possibilité d'effectuer le même type de réarrangement lorsqu'il est soumis à des conditions acides mis à part que c'est la fonction acide qui réagit pour former le sixième cycle tel que le montre la figure 18. Le cycle formé lors de ce réarrangement est une lactone (ester cyclique) [Li et *al.*, 1998].



**Figure 18.** Réarrangement de l'acide bétulinique 1 en oxyallobétulinol 13.

### 2.13 Autres travaux portant sur la synthèse de dérivés de lupanes

L'activité biologique des triterpènes étant connue depuis un certain temps, de nombreux chercheurs ont tenté d'augmenter leurs activités biologiques et/ou d'améliorer leurs propriétés biopharmaceutiques par la formation de dérivés. Cette section consiste en une revue partielle de ces différentes études.

### 2.13.1 Ajout d'acides aminés à l'acide bétulinique 1

Des dérivés de l'acide bétulinique 1 ont été préparés par l'équipe de Jeong [Jeong et *al.*, 1999]. Les dérivés consistent en l'ajout de différents acides aminés à la fonction acide du composé afin d'augmenter l'hydrosolubilité du composé dans le but d'améliorer sa biodistribution.

L'hydrosolubilité a été évaluée par rapport à l'acide bétulinique 1. Le produit synthétisé a été dissous dans un petit volume de solvant organique et ensuite des volumes précis de cette solution ont été versés dans des volumes d'eau de plus en plus grands jusqu'à ce que la solution aqueuse devienne brouillée lors de l'ajout de la solution organique. Ces concentrations ont été comparées avec la concentration maximale d'acide bétulinique 1 soluble dans l'eau c'est-à-dire qui ne précipite pas selon les conditions énumérées plus haut. La valeur obtenue n'est pas comparable avec les données d'autres composés puisque la valeur est en fonction de la solubilité de l'acide bétulinique 1. Cela permet tout de même d'observer que l'ajout d'une section acide aminé permet d'augmenter significativement l'hydrosolubilité de l'acide bétulinique 1 tout en conservant une activité antitumorale intéressante (tableau 2).

L'acide aminé qui augmente le plus l'hydrosolubilité du composé (100 fois) et qui conserve une cytotoxicité sélective équivalente est la glycine ( $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$ ). Le tableau 2 montre les dérivés synthétisés par le groupe les plus intéressants.

**Tableau 2.** Cytotoxicité et solubilité dans l'eau de dérivés d'acides aminés conjugués à l'acide bétulinique **1** [Jeong et *al.*, 1999].

Dérivé	MEL-2 IC <sub>50</sub> <sup>1</sup> = µg/ml	KB IC <sub>50</sub> <sup>1</sup> = µg/ml	Solubilité dans l'eau par rapport à l'acide bétulinique <b>1</b>
Acide bétulinique <b>1</b>	4,2	>20	1
Acide bétulinique -NH-CH <sub>2</sub> COOH (glycine)	4,2	>20	100 ×
Acide bétulinique -NH-CH <sub>2</sub> -COOCH <sub>3</sub> (méthylglycine)	10,2	>20	50 ×
Acide bétulinique -NH-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> (méthylglutamase)	15,3	>20	20 ×
Acide bétulinique -NH-CH(CH <sub>3</sub> )COOCH <sub>3</sub> (Alanine)	3,5	>20	30 ×

<sup>1</sup> IC<sub>50</sub> : concentration qui inhibe la croissance de 50% des cellules

### 2.13.2 Ajout d'une section sucre à l'acide bétulinique **1**, au bétulinol **2** et au lupéol **3**

L'équipe de Debatin a déposé un brevet en avril 2002 pour le traitement de tumeurs neurodermales tels les neuroblastomes, les medulloblastomes et les tumeurs du sarcome d'Ewing par différents dérivés de l'acide bétulinique **1**, du bétulinol **2** et du lupéol **3**

[Debatin et *al.*, 2002]. Des centaines de dérivés de triterpènes ont été sélectionnés afin de faire l'évaluation de leurs activités envers les tumeurs neuroectodermales. Parmi ceux-ci on retrouve le bétulinol **2** mono **8a** et di-acétyl **9a**, une multitude de composés glycosylés (mono et polysaccharide) dont l'acide 3-*O*-β-D-glucopyranosylbétulinique **15** ainsi que des produits d'oxydation des triterpènes de départ. Leur méthode de glycosylation est la Koenigs-Knorr de type Helferich (section 2.9.2) utilisant la catalyse par le cyanure de mercure (II) (Hg(CN)<sub>2</sub>) [Helferich et Goerdeler, 1940]. Le rendement de la réaction de glycosylation du bétulinol **2** est de 62% pour la formation du 28-acétyl-3-β-D-(2',3',4',6'-tétra-*O*-acétyl)glucopyranosylbétulinol. L'activité anticancéreuse ainsi que l'évaluation de la biodistribution des dérivés ne sont pas rapportées. Le lupéol **3**, le bétulinol **2** et l'acide bétulinique **1** ont été choisis par l'équipe puisque ces substances ont les caractéristiques nécessaires pour pouvoir franchir la barrière sang:cerveau afin de traiter les tumeurs neuroectodermales.

L'équipe du Dr Pezzuto a aussi réalisé un dérivé glycosidique de l'acide bétulinique **1** comme mentionné à la section 2.3.1 [Chatterjee et *al.*, 1999]. Leur composé consiste en une réaction enzymatique entre l'acide bétulinique **1** et le glucose **4** pour former le 28-*O*-β-D-glucopyranosyl-3-hydroxy-lup-20(29)-en-28-oate soit le glucose **4** lié à la position 28 de l'acide bétulinique **1**. L'étude a été arrêtée puisque, selon les tests *in vitro* du composé, le composé ne possède pas une forte activité anticancéreuse envers les cellules de mélanomes (IC<sub>50</sub> > 20 µg/ml).

### 2.13.3 Glycosylation du bétulinol 2

La glycosylation du bétulinol 2 par la méthode Helferich a été effectuée par le groupe de Uvarova [Uvarova et *al.*, 1980]. Ils ont effectué la synthèse du [ $\alpha,\beta$ ]-D-glucopyranosyl-3-*O*-bétulinol 16 par la réaction entre le 1- $\alpha$ -bromo-2,3,4,6-*O*-acétyl-glucopyranose et le bétulinol-28-*O*-acétate 8a en présence de différents catalyseurs. Des rendements optimaux (40-66%) sont obtenus avec l'acétate de mercure (II) ( $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ ) avec un ratio  $\alpha:\beta$  de 60:40 à 10:90 selon les conditions réactionnelles. Les rendements sont influencés par la présence de produits secondaires tels que les produits de transestérification et les dimères de l'alcool donneur (R-O-R).

L'équipe de Ohara a aussi travaillé sur la synthèse de glycosides à partir du bétulinol 2 [Ohara, S. et Hishiyama, S., 1994]. Ils ont fait la synthèse par la méthode Helferich ainsi que par synthèse enzymatique à l'aide de l'enzyme cyclodextrine glycosyltransférase. Les meilleurs résultats obtenus par la méthode chimique sont de 88% et de 56% par la méthode enzymatique.

## 2.14 Stratégie de synthèse

La stratégie de synthèse employée lors de ce projet pour la synthèse d'un glucoside de l'acide bétulinique **1** est l'activation par les trihalogénoacétimidates [Schmidt et Michel, 1980]. Lors de la première étape, la protection de la section glucose **4** est effectuée par deux types de groupement participants soit les acétates et les benzoyles afin d'obtenir un lien anomérique  $\beta$ . La régénération de la fonction hydroxyle en position anomérique est effectuée selon plusieurs protocoles de réaction et ce avec les deux types de groupements protecteurs. Ensuite, l'activation de la position anomérique du glucose **4** par les trichloroacétimidates est réalisée en utilisant la trichloroacétonitrile [Schmidt et Michel, 1980]. Plusieurs bases différentes ont été utilisées pour la réaction soit le DBU [Numata et *al.*, 1987], le NaH [Schmidt et Michel, 1985] et le Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> [Urban et *al.*, 1990]. Le couplage glycosidique a été tenté à l'aide de plusieurs catalyseurs tels que BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O [Schmidt et *al.*, 1982], le TMSOTf [Cook et *al.*, 1984] ainsi qu'un essai avec le ZnCl<sub>2</sub> et une activation par les micro-ondes [Limousin et *al.*, 1997]. Finalement, la déprotection a été effectuée à l'aide d'hydroxyde de sodium dans différents systèmes de solvants [Kwan et *al.*, 2001].

À cause du coût élevé de l'acide bétulinique **1**, les essais de glycosylation ont été effectués d'abord avec le lupéol **3** ou le 28-*O*-acétylbétulinol **2**. La formation du glycoside, l'acide 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosylbétulinique **15**, a ensuite été effectuée avec l'acide bétulinique **1** selon les conditions de glycosylation les plus efficaces.

## 2.15 Évaluation de la biodistribution

L'augmentation de l'hydrosolubilité de l'acide bétulinique **1** étant un des objectifs principaux de ce projet de recherche, elle a été évaluée par le coefficient de partage. Le coefficient de partage est le rapport de la concentration à l'équilibre de la distribution du composé dans un solvant de type lipidique (chloroforme, benzène, éther, octanol) par rapport à la concentration de celui-ci dans une phase aqueuse maintenue à un pH physiologique (PBS) tel que le montre l'équation 1. Une molécule qui a un coefficient de partage élevé aura une grande affinité avec la membrane cellulaire qui est de type lipoprotéique. D'un autre côté, cette substance aura de la difficulté à demeurer soluble dans le milieu intracellulaire aqueux. Inversement, lorsque le coefficient de partage est près de 0, la substance pourra difficilement traverser la membrane lipidique. À titre d'exemple, le coefficient de partage du glycérol est de 0,0005, de l'éthylène glycol de 0,04, du limonène 4,38 et du (+)- $\alpha$ -pinène 4.44 [Griffin et al., 1999 et Gordiyenko et al., 2004].

$$\text{Coefficient de partage} = \text{Log } P_{o/w} = \log \frac{[\text{composé}] \text{ phase lipidique}}{[\text{composé}] \text{ phase aqueuse}} = \log \frac{[\text{composé}] \text{ octanol}}{[\text{composé}] \text{ eau}}$$

**Équation 1.** Calcul du coefficient de partage [Donovan et Pescatore, 2002].

Une des nombreuses techniques pour déterminer le coefficient de partage consiste à placer une quantité connue du composé à analyser dans un contenant avec 2 liquides immiscibles soit un organique et l'autre aqueux. Ensuite, le contenant est agité pendant un

certain temps suivi d'une période de repos permettant l'atteinte de l'équilibre et l'obtention d'une nette séparation des deux phases. La mesure de la concentration des composés dans les différentes phases peut se faire par la mesure de la masse de composé présent dans chacune des phases après séparation des deux phases. Également, la mesure de la quantité de produit dans chacune des phases peut se faire par HPLC. Le ratio est calculé en utilisant la surface du pic de chaque composé dans chacune des phases [Kobayashi et *al.*, 2000]. En plus d'être très rapide, cette technique est plus précise et demande moins de manipulations. Lors de cette recherche, le coefficient de partage de l'acide bétulinique 1 et du glucoside de l'acide bétulinique 15 est évalué par cette méthode (section 3.14).

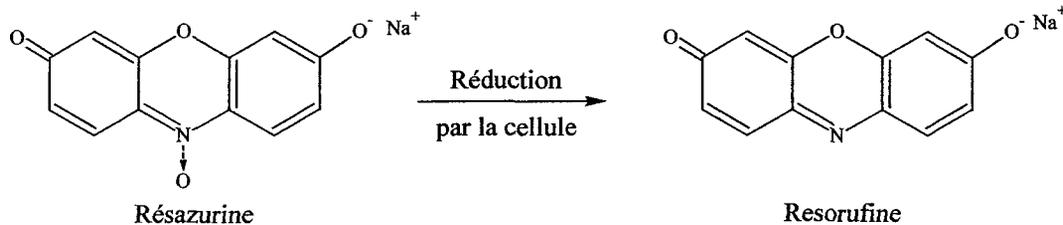
Une autre technique consiste en l'évaluation du coefficient de partage en utilisant les temps de rétention du composé par analyse HPLC dans différents éluants par rapport aux temps de rétention d'un standard connu. L'utilisation de formules mathématiques permet d'évaluer le coefficient de partage par la vitesse d'élution du composé dans différents mélanges de solvants par rapport à la vitesse d'élution du standard [Griffin, 1999 et Donovan et Pescatore, 2002].

## **2.16 Évaluation de l'activité anticancéreuse**

La recherche vise la synthèse d'un dérivé de l'acide bétulinique 1 plus hydrosoluble et qui conserve l'activité anticancéreuse du composé de départ. Pour évaluer l'atteinte des

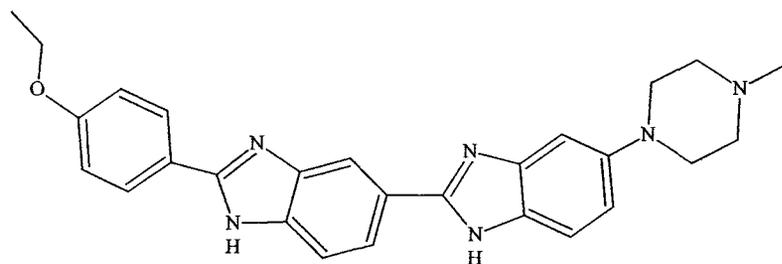
objectifs, une évaluation de l'activité antitumorale du composé *in vitro* doit être faite. Pour ce faire, des cellules cancéreuses doivent être mises en contact avec différentes concentrations du composé à l'étude. Deux lignées de cellules cancéreuses humaines sont utilisées lors des tests de bioactivité, la lignée A-549, un carcinome du poumon, et la lignée DLD-1, un adénocarcinome du colon. Ces deux lignées sont ensemencées dans les puits de microplaque puis, après prolifération de 24 heures, on ajoute des solutions du composé à tester à huit concentrations différentes. Après 48 heures d'incubation, la quantité de cellules vivantes dans chacun des puits est évaluée afin d'obtenir l'IC<sub>50</sub> du composé soit la concentration du composé qui inhibe 50% de la croissance cellulaire.

La quantité de cellules vivantes est évaluée, lors de cette recherche, par deux méthodes soit un test avec la resazurine et un test avec le bisbenzimidazole. Le premier test est effectué par un ajout de resazurine aux puits préalablement lavés pour en retirer les cellules mortes. La resazurine, de couleur bleue, est réduite en resorufine, une molécule fluorescente de couleur rose, de façon directement proportionnelle à la quantité de cellules présentes dans le puit. La réaction générale de réduction de la resazurine en resorufine est présentée à la figure 19. La présence de resorufine est évaluée par un fluorimètre à 590 nm. Les résultats à différentes concentrations permettent de tracer la courbe de survie des cellules et de déterminer la concentration qui inhibe 50% de la croissance cellulaire.



**Figure 19.** Réduction de la resazurine en resorufine par une cellule.

Le test avec la resazurine n'est pas destructif, il permet d'effectuer le deuxième test sur les mêmes puits afin de confirmer le résultat obtenu avec la resazurine. Les microplaques sont vidées, congelées à  $-20^{\circ}\text{C}$ , décongelées, puis du dodécyl sulfate de sodium (SDS) 0,1 %, un détergent, est ajouté aux cellules. Ceci permet de perméabiliser les membranes cellulaires. Une solution de bisbenzimidazole, Hoechst 33342 (2'-(4-Ethoxyphenyl)-5-(4-méthyl-1-piperaziny)-2,5'-bi-1H-benzimidazole) est ajoutée aux puits. La structure du bisbenzimidazole est présentée à la figure 20. Cette molécule devient fluorescente lorsqu'elle se lie à l'ADN ce qui permet, à l'aide de la mesure de la fluorescence, d'évaluer la quantité d'ADN présente dans chaque puits. La courbe de survie des cellules est tracée en fonction de la concentration du composé. Le  $\text{IC}_{50}$  du composé, déterminé à partir de cette courbe, permet de confirmer le résultat obtenu avec la resazurine.



**Figure 20.** Structure du bisbenzimidazole (Hoechst 33342).

**CHAPITRE 3**  
**PARTIE EXPÉRIMENTALE**

### 3.1 Provenance et grade des produits utilisés

**Tableau 3.** Provenance et grade des produits utilisés.

Produit	Provenance	Grade
1-acétimide-2,3,4,6- <i>O</i> -benzylglucopyranose <b>7c</b> 98%	Aldrich	Réactif
Acétate de sodium (AcONa) 99+%	Laboratoire MAT	Réactif A.C.S.
Acides aminés non essentiels (100X)	Mediatech Cellgro®	Biotechnologie
Acide éthylènediamine tétra-acétique (EDTA)	Sigma-Aldrich	Analytique
Acide bétulinique <b>1</b> 90%	Indofine	Réactif
Acide bromique / acide acétique (HBr/HOAc) 30%	Aldrich	Réactif
Acide chlorhydrique (HCl) 36.5-38%	Anachemia	Réactif A.C.S.
Acide trifluoroacétique (TFA) 99,5%	Aldrich	Réactif
Anhydride acétique (Ac <sub>2</sub> O) 98%	Laboratoire MAT	Réactif A.C.S.
Bisbenzimidazole 33342 (Hoechst 33342)	Sigma-Aldrich	Biotechnologie
Chlorure de benzoyle (BzCl) 98+%	J.T.Baker	Réactif A.C.S.
Carbonate de césium (Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ) 99%	Aldrich	Réactif
Cellules de carcinome du poumon (A-549) #CCL-185	American Type Culture Collection	Biotechnologie
Cellules de l'adénocarcinome du colon (DLD-1) #CCL-221	American Type Culture Collection	Biotechnologie
1,8-Diazabicyclo[5,4,0]undéc-7-ène (DBU) 98%	Aldrich	Réactif
Dichlorométhane (DCM) 99,6%	Laboratoire MAT	Réactif
1,2-Dichloroéthane 99+%	Sigma	Réactif A.C.S.
D-(+)-Glucose <b>4</b>	Aldrich	Réactif
Hexanes 98,5%	Laboratoire MAT	Réactif A.C.S.
Méthanol (MeOH) 99,8%	Laboratoire MAT	Réactif A.C.S.
Milieu essentiel minimum (MEM) avec 1X de solution saline de Earle	Mediatech Cellgro®	Biotechnologie
Molybdate d'ammonium 85%	J. T. Baker	Réactif A.C.S.
1-Octanol 99+%	Laboratoire MAT	HPLC
Pénicilline	Mediatech Cellgro®	Biotechnologie
Pyridine 99+%	Laboratoire MAT	Réactif A.C.S.
Pyruvate de sodium	Mediatech Cellgro®	Biotechnologie

**Suite : Tableau 3.** Provenance et grade des produits utilisés.

Produit	Provenance	Grade
Resazurine	Sigma-Aldrich	Biotechnologie
Sérum de veau foetal (SVF)	Hyclone	Biotechnologie
Silice (SiO <sub>2</sub> ) 230-400 mesh, 60 Å	Silicycle	Chromatographie
Solution de vitamines (100X)	Mediatech Cellgro®	Biotechnologie
Streptomycine	Mediatech Cellgro®	Biotechnologie
Sulfate d'ammonium cérique	J.T.Baker	Réactif A.C.S.
Sulfate de magnésium anhydre (MgSO <sub>4</sub> ) 99%	Laboratoire MAT	Réactif
Tamis moléculaire	Aldrich, 4Å	
Tampon phosphate en solution saline (PBS)(1X)	Bio Wittaker	Culture cellulaire
Tétrahydrofurane (THF) 99+%	Laboratoire MAT	Réactif A.C.S.
Trichloroacétonitrile (CCl <sub>3</sub> CN)	Aldrich	Réactif A.C.S.
Triéthylamine (Et <sub>3</sub> N) 99+%	Laboratoire MAT	Réactif
Trifluorure de bore complexé à l'éther diéthylique (BF <sub>3</sub> ·Et <sub>2</sub> O)	Aldrich	Réactif
Triméthylsilyl triflate (TMSOTf) 96%	Sigma	Réactif
Tris-HCl	Sigma-Aldrich	Biotechnologie

### 3.2 Conditions générales

La progression des différentes réactions est contrôlée par chromatographie sur couche mince (CCM). Les plaques utilisées sont des plaques de verre recouvertes de gel de silice d'une épaisseur de 250 µm et dont le diamètre des pores est de 60 Å. Les plaques sont imprégnées d'une substance (F-254) permettant de percevoir les produits contenant un chromophore sous rayons ultraviolets. Les produits qui ne peuvent être observés sous ultraviolets ont été révélés par une solution d'acide molybdate cérique (CAM). Le CAM est

une solution consistant au mélange de 40 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré, 360 ml d'H<sub>2</sub>O, 10 g de molybdate d'ammonium et de 4 g de sulfate d'ammonium cérique.

La chromatographie éclair est faite sur gel de silice (grade technique) ultra pur de 230-400 mesh dont le diamètre des pores est de 60 Å. La composition des fractions recueillies est évaluée par chromatographie sur couche mince.

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton (RMN<sup>1</sup>H) ont été faites sur un appareil Varian avec une résolution de 400 MHz tandis que les spectres RMN au carbone 13 (RMN<sup>13</sup>C) ont été faits sur un appareil Bruker avec une résolution 75 MHz. La référence (0 ppm) utilisée est le TMS et les différents solvants pour effectuer la dissolution des échantillons sont le CDCl<sub>3</sub>, le CD<sub>3</sub>OD et le THF deutéré.

Les analyses par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) sont menées sur un chromatogramme de marque Hewlett Packard modèle 5809 muni d'une colonne DB-5 (longueur : 30 m, I.D. : 0,25 mm, film : 0,25 µm). Le détecteur est un spectromètre de masse quadrupole de marque Hewlett Packard modèle 5972 series. L'ionisation est effectuée avec un faisceau d'électrons à 70 eV (EI).

Les analyses HPLC sont effectuées par un chromatographe de marque Agilent modèle 1100 series. Les produits sont détectés à l'aide d'un détecteur UV (Diode Array Detection).

La colonne utilisée est une colonne C18 (octadécyle silane) de marque SUPELCO (#58298, longueur 25,0 cm, largeur 4,6 mm et tailles de particules de 5  $\mu\text{m}$ ).

À la fin de chaque étape de synthèse, le système d'éluant utilisé pour la séparation chromatographique, les facteurs de rétention des produits synthétisés selon divers systèmes de solvants ainsi que les données spectroscopiques seront présentés.

### **3.3 Conditions de réaction anhydre**

Les réactions sensibles à l'humidité sont conduites sous des conditions anhydres. Elles se sont déroulées sous atmosphère inerte. Afin d'éviter la présence de toute trace d'eau, le séchage préalable de la verrerie s'est fait soit à l'étuve à une température de 120°C pendant un minimum de 6 heures, ou bien en l'exposant, sous vide, à une flamme. Toutes les manipulations se sont faites en évitant le contact avec l'air ambiant. Les réactifs sont préalablement séchés dans un ballon sec soit en leur ajoutant quelques millilitres de toluène fraîchement distillé puis en évaporant le solvant sous pression réduite et ce, à trois reprises ou bien, en les laissant sous vide à l'aide d'une pompe à vide (pression = 90 Pa,  $9,9 \times 10^{-6}$  atm) pendant plusieurs heures. Tous les récipients secs (ballon, seringues, etc.) sont purgés à l'azote avant leur utilisation. Les solvants utilisés sont distillés de façon continue pendant au moins une heure en présence d'hydrure de calcium ( $\text{CaH}_2$ ) et de tamis moléculaires de 4Å.

### 3.4 Précautions pour la manipulation des sucres

Le glucose 4 ainsi que les autres sucres possèdent une certaine sensibilité aux conditions acides ainsi qu'à la chaleur. Sous ces conditions, le glucose 4 subit une dégradation qu'on nomme communément caramélisation. Afin d'éviter cette dégradation, la plupart des réactions sont effectuées à moins de 35°C sauf si la méthode suivie indique une température plus élevée [Amarego et Perrin, 2000]. De plus, les milieux acides sont neutralisés avant l'évaporation des solvants. Les solvants sont évaporés sous vide sur un bain d'eau chaude ne dépassant pas une température de 35°C.

### 3.5 Extraction des triterpènes de l'écorce du bouleau blanc ou jaune

Extraction des triterpènes de l'écorce du bouleau :

- Bétulinol 2 : à partir de l'écorce externe du bouleau blanc; partie la plus blanche.
- Lupéol 3: à partir de l'écorce externe du bouleau jaune; partie jaune et friable.

Une quantité de 40 g de la partie extérieure de l'écorce de bouleau est broyée. Dans un ballon de 1 litre, 700 ml de chloroforme sont ajoutés à l'écorce. Le ballon est chauffé à reflux pour une période de 1 à 1,5 heure. La solution est filtrée sous vide et le solvant est évaporé sous pression réduite.

### 3.6 Isolation du bétulinol 2 de l'extrait du bouleau blanc

L'extrait est soumis à plusieurs recristallisations successives dans un mélange de 2-butanol:eau (73:27) jusqu'à ce que le produit obtenu soit sous la forme de légers cristaux blancs et que son point de fusion soit stable à 251°C [Eckerman et Ekman, 1985]. Le rendement de l'extraction du bétulinol 2 à partir de l'écorce du bouleau blanc est de 24% p/p.

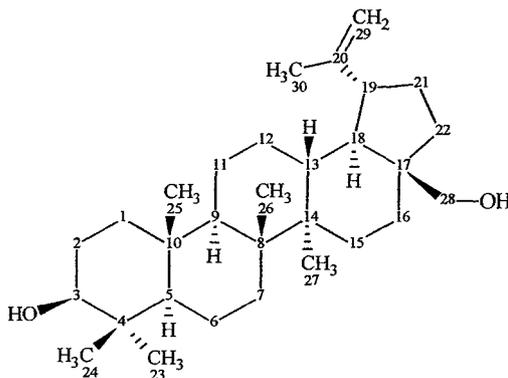
Les facteurs de rétention du bétulinol 2 sont  $R_f = 0,10$  (DCM),  $R_f = 0,27$  (DCM:MeOH; 98:2) et  $R_f = 0,34$  (DCM:MeOH; 95:5).

Les données spectrales du bétulinol **2** sont présentées ci-dessous. La figure 21 présente la structure du composé.

**RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :**  $\delta$  4.68 (1 H, s, H-29), 4.58 (1 H, s, H-29), 3.82 (1 H, d,  $J = 10.9$  Hz, H-28), 3.33 (1 H, d,  $J = 10.9$  Hz, H-28), 3.19 (1 H, dd,  $J = 10.8$  et  $5.2$  Hz, H-3), 2.39 (1 H, td,  $J = 10.4$  et  $5.8$  Hz, H-19), 1.04-2.04 (26 H, c, CH et  $\text{CH}_2$  du squelette), 1.68 (3 H, s,  $\text{CH}_3$ -30), 0.76, 0.82, 0.97, 0.98, 1.02 (tous 3 H, s,  $5 \times \text{CH}_3$ ) [Tinto *et al.*, 1992].

**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :**  $\delta$  150.5 (20), 109.7 (29), 79.0 (3), 60.6 (28), 55.3 (5), 50.4 (9), 48.8 (19), 47.8 (18), 47.8 (17), 42.7 (14), 40.9 (8), 38.9 (4), 38.7 (1), 37.3 (10), 37.2 (13), 34.3 (7), 34.0 (22), 29.8 (21), 29.2 (16), 28.0 (23), 27.4 (2), 27.1 (15), 25.2 (12), 20.8 (11), 19.1 (30), 18.3 (6), 16.1 (25), 16.0 (26), 15.3 (24), 14.8 (27) [Sholichin *et al.*, 1980].

**EIMS  $m/z$  :** 442 ( $\text{M}^+$ , 5%), 43 (100), 95 (96), 55 (96), 81 (95), 69 (84), 41 (81), 67 (79), 93 (79), 189 (76).



**Figure 21.** Structure du bétulinol **2**.

### 3.7 Isolation du lupéol 3 de l'extrait du bouleau jaune

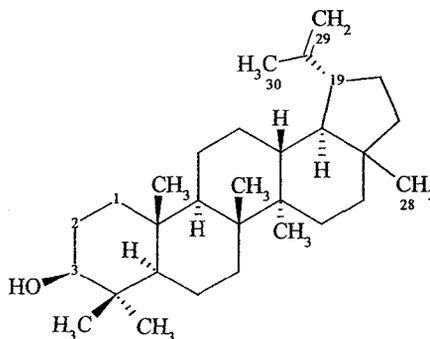
L'extrait est séparé par chromatographie éclair sur gel de silice. Le système de solvant utilisé initialement est un mélange d'hexane:EtOAc (98:2). La polarité du mélange est augmentée graduellement jusqu'au mélange hexane:EtOAc (95:5). Le rendement de l'extraction du lupéol 3 à partir de l'écorce du bouleau jaune est de 4% p/p.

Les facteurs de rétention du lupéol 3 sont :  $R_f = 0,54$  (DCM:MeOH; 98:2),  $R_f = 0,76$  (DCM:MeOH; 95:5) et  $R_f = 0,81$  (DCM:MeOH; 90:10).

Les données spectrales du lupéol 3 sont présentées ci-dessous. La figure 22 présente la structure du composé.

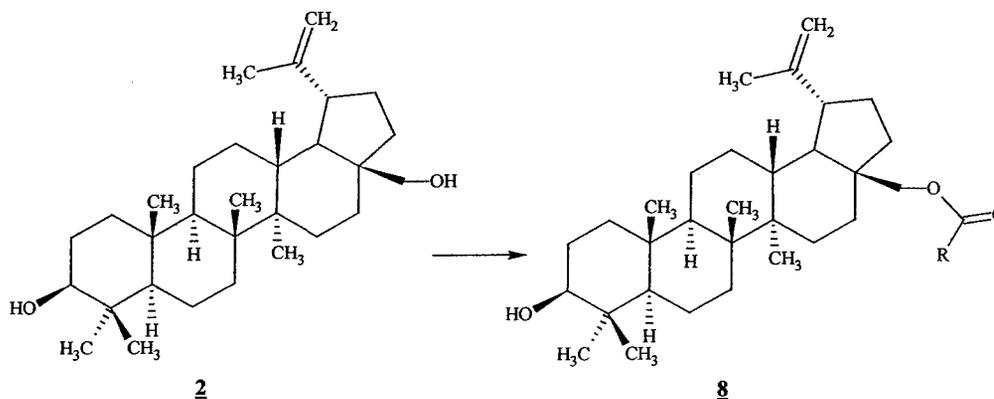
**RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :**  $\delta$  4.70 (1H, s, H-29), 4.57 (1H, s, H-29), 3.19 (1H, dd,  $J = 10.6$  et  $5.4$  Hz, H-3), 2.38 (1H, td,  $J = 10.6$  et  $5.8$  Hz, H-19), 1.02-1.95 (26H, c, CH et CH<sub>2</sub> du squelette), 1.68 (3H, s, CH<sub>3</sub>-30), 0.76, 0.80, 0.83, 0.95, 0.98, 1.03 (6  $\times$  3H, s, 6  $\times$  CH<sub>3</sub>).

**EIMS m/z :** 426 (M<sup>+</sup>, 14%), 95 (100), 81 (97), 55 (86), 109 (83), 41 (77), 121 (74), 135 (74), 189 (62), 207 (59).



**Figure 22.** Structure du lupéol 3.

### 3.8 Protection de la fonction alcool en position 28 du bétulinol 2



**Figure 23.** Réaction générale de protection de la fonction 28 du bétulinol 2.

#### 3.8.1 Groupements acétates; formation du 28-*O*-acétyl bétulinol 8a

Une quantité de 500 mg de bétulinol 2 est dissoute dans 50 ml de  $\text{CHCl}_3$ . Un volume de 7 ml d'anhydride acétique est ajouté et la solution est agitée à température de la pièce. La progression de la réaction est suivie par chromatographie sur couche mince en utilisant le DCM comme éluant. La réaction est arrêtée lorsque le 3,28-diacétyl-*O*-bétulinol 9a commence à se former. Le milieu réactionnel est versé lentement dans 100 ml d'eau en agitant. Après 30 minutes d'agitation, la phase organique est lavée à trois reprises avec une solution aqueuse saturée de  $\text{NaHCO}_3$  puis avec une solution aqueuse saturée de  $\text{NaCl}$ . La phase organique est lavée, séchée avec du sulfate de magnésium anhydre ( $\text{MgSO}_4$ ) puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est soumis à une séparation par chromatographie éclair. Le système d'élution utilisé est un mélange hexane:EtOAc. On

élue initialement avec l'hexane:EtOAc (95:5) ensuite, la polarité du mélange est augmentée graduellement jusqu'au mélange hexane:EtOAc (80:20).

Les facteurs de rétention du 28-*O*-acétylbétulinol **8a** sont :  $R_f = 0,17$  (DCM) et  $R_f = 0,59$  (DCM:MeOH; 97:3). Le facteur de rétention du 3,28-*O*-diacétylbétulinol **9a** est :  $R_f = 0,70$  (DCM).

Les données spectrales du 3-*O*-acétylbétulinol **8a** sont :

**EIMS m/z** : 43 (100), 91 (41), 55 (40), 81 (35), 105 (84), 68 (33), 121 (30), 189 (16).  
(L'ion moléculaire n'est pas détecté en EIMS. Ceci est probablement causé par la fragmentation rapide des groupements protecteurs acétates.)

Les données spectrales du 3,28-*O*-diacétylbétulinol **9a** sont :

**RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** :  $\delta$  4.66 (1H, s, H-29), 4.56 (1H, s, H-29), 4.44 (1H, dd,  $J=10.4$  et  $5.6$  Hz, H-3), 4.22 (1H, d,  $J=11.2$  Hz, H-28), 3.82 (1H, d,  $J=11.1$  Hz, H-28), 2.41 (1H, td,  $J=11.1$  et  $5.5$  Hz, H-19), 2.04 (3H, s, CH<sub>3</sub>-Acétate), 2.01 (3H, s, CH<sub>3</sub>-Acétate), 1.02-2.95 (26 H, c, CH et CH<sub>2</sub> du squelette du lupane), 1.65 (3H, s, CH<sub>3</sub>-30), 1.0, 0.93, 0.82, 0.81, 0.80 (5  $\times$  3H, s, 5  $\times$  CH<sub>3</sub>).

**EIMS m/z** : 526 (M<sup>+</sup>, 1%), 43 (100), 189 (26), 93 (23), 81 (20), 69 (19), 107 (16), 121 (16), 135 (14).

### 3.8.2 Groupements benzoyles; formation du 28-*O*-benzoylbétulinol **8b**

Une quantité de 1,0 g de bétulinol **2** (2,26 mmol) est dissoute dans 4,5 ml de pyridine anhydre. Le milieu réactionnel est refroidi à 0°C dans un bain de glace et 1 ml de chlorure de benzoyle est ajouté. La progression de la réaction est suivie par chromatographie sur couche mince en utilisant le DCM:MeOH (97:3) comme éluant. La réaction est arrêtée lorsque le bétulinol 3,28-*O*-dibenzoyle **9b** commence à se former. Le milieu réactionnel est lavé à trois reprises avec une solution de HCl 10% puis à deux reprises avec une solution aqueuse saturée de NaHCO<sub>3</sub> et finalement, avec une solution aqueuse saturée en NaCl. La phase organique est séchée avec du MgSO<sub>4</sub> anhydre, filtrée et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est soumis à une chromatographie éclair en utilisant l'hexane:EtOAc (95:5), ensuite, la polarité du mélange est augmentée graduellement jusqu'au mélange hexane:EtOAc (85:15).

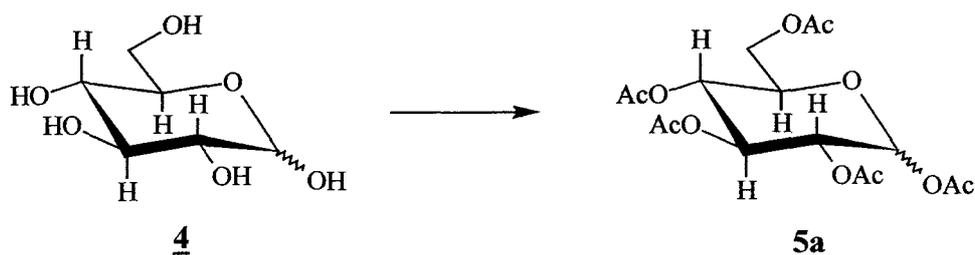
Le facteur de rétention du 28-*O*-benzoylbétulinol **8b** est :  $R_f = 0,48$  (DCM:MeOH; 97:3) et le facteur de rétention du 3,28-*O*-dibenzoylbétulinol **9b** est :  $R_f = 0,8$  (DCM:MeOH; 97:3).

Les données spectrales du 28-*O*-benzoylbétulinol **9b** sont présentées ci-dessous.

**EIMS m/z** : 546 ( $M^+$ , 13%), 105 (100), 122 (77), 77 (77), 189 (58), 203 (40), 528 (33), 424 (25), (Formule moléculaire : C<sub>37</sub>H<sub>54</sub>O<sub>3</sub>). Analyse spectrale effectuée par l'Université de Sherbrooke.

### 3.9 Protection des alcools du glucose 4

#### 3.9.1 Protection par les groupements acétates; formation du 1,2,3,4,6-penta-*O*-acétyl-glucopyranose 5a



**Figure 24.** Réaction générale de protection du glucose 4 par les groupements acétates.

##### 3.9.1.1 Acétylation avec l'anhydride acétique / acide acétique

Une quantité de 5,0 g de D-(+)-glucose 4 (0,0278 mol) est dissoute dans 200 ml d'anhydride acétique et 50 ml de pyridine. La solution est chauffée à 40°C en agitant jusqu'à ce que tout le glucose 4 soit dissous ( $\approx$  1 heure). La réaction est agitée à cette température pendant 30 minutes. Le milieu réactionnel est versé lentement dans 150 ml d'eau puis, 100 ml de DCM sont ajoutés. On sépare les deux phases et la phase aqueuse est extraite avec deux portions supplémentaires de 75 ml de DCM. La phase organique est lavée avec une solution de HCl 10%, ensuite, avec une solution aqueuse saturée en  $\text{NaHCO}_3$  puis finalement une solution aqueuse saturée en NaCl. La phase organique est séchée avec du  $\text{MgSO}_4$  anhydre, filtrée, puis le solvant est évaporé sous pression réduite.

On obtient un liquide visqueux translucide qui cristallise sous forme de cristaux blancs après quelques heures à température ambiante.

### 3.9.1.2 Acétylation avec l'acétate de sodium / anhydride acétique

Une quantité de 4,0 g d'acétate de sodium anhydre et de 5,0 g (0,028 mol) de D-(+)-glucose **4** sont broyées dans un mortier. Dans un ballon de 200 ml, le glucose **4** et l'acétate de sodium sont dissous dans 50 ml (54 g, 0,52 mol) d'anhydride acétique. Le ballon, muni d'un condensateur, est placé dans un bain d'eau bouillante et est agité jusqu'à l'obtention d'une solution limpide ( $\approx$  1,5 heure). La réaction est chauffée pendant deux heures supplémentaires. Ensuite, la réaction est versée très lentement dans un bécher contenant un mélange de 250 ml d'eau et de glace concassée en agitant vigoureusement. Cette solution est laissée au repos pendant 1 heure et agitée à l'occasion afin d'éviter que les cristaux ne s'agglomèrent. Ensuite, la solution hétérogène est filtrée sous vide et le produit est lavé à l'eau froide. Le produit est dissous dans l'acétate d'éthyle et lavé au HCl 10% puis à l'eau saturée en NaCl. La phase organique est séchée avec du  $\text{MgSO}_4$  anhydre, filtrée, puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Le sucre peracétylé est recristallisé dans l'éthanol. Le point de fusion du produit est de 110-112°C.

### 3.9.1.3 Acétylation avec l'anhydride acétique par les micro-ondes

Une quantité de 1,0 g de D-(+)-glucose **4** (5,6 mmol) est dissoute dans 4,7 ml d'anhydride acétique (5g, 50 mmol, 9 éq.) puis une quantité de 0,505 g d'acétate de sodium anhydre (6,2 mmol, 1,1 éq.) est ajoutée à la solution. La réaction est soumise aux irradiations de micro-ondes pendant 3 minutes. La température finale du milieu réactionnel est de 110°C. Un volume de 40 ml d'acétate d'éthyle est ajouté à la réaction et cette solution est lavée trois fois avec une solution de HCl 10% puis avec une solution aqueuse saturée en NaCl. La phase organique est séchée avec du MgSO<sub>4</sub> anhydre, filtrée puis le solvant est évaporé sous pression réduite.

### 3.9.1.4 Acétylation catalysée par l'acide perchlorique

Une solution de 16,3 g (15,0 ml, 0,16 mmol) d'anhydride acétique et 25 ml d'acide acétique glacial est préparée dans un erlenmeyer de 125 ml. Une quantité de 5,0 g (0,028 mmol) de D-(+)-glucose **4** en poudre est ajoutée à cette solution préalablement placée dans un bain de glace. Un volume de 1 ml de catalyseur d'acide perchlorique-acide acétique\* (0,1 éq.) est ajouté goutte à goutte à la pipette pasteur en agitant le milieu réactionnel. La vitesse d'addition est contrôlée par la température de la réaction qui doit être maintenue sous 35°C. Le temps de la réaction est de 30 minutes à la température de la pièce. Le milieu réactionnel est extrait avec deux portions de 100 ml de DCM. Ensuite, la phase organique

est lavée avec trois portions de 75 ml d'une solution aqueuse saturée en  $\text{NaHCO}_3$  puis avec une portion d'une solution aqueuse saturée de  $\text{NaCl}$ . La phase organique est séchée avec du  $\text{MgSO}_4$  anhydre, filtrée, puis le solvant est évaporé sous pression réduite.

\*Catalyseur : Dans une hotte à acide perchlorique, ajouter 1,0 g (0,6 ml) d'acide perchlorique 60% à 2,3 g (2,05 ml) d'anhydride acétique maintenu à  $0^\circ\text{C}$ .

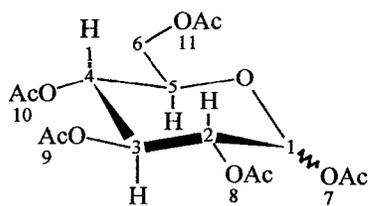
Les facteurs de rétention pour le 1,2,3,4,6-penta-*O*-acétylglucopyranose **5a** sont :  $R_f = 0,73$  (DCM:MeOH; 97:3) et  $R_f = 0,85$  (DCM:MeOH; 95:5).

Les données spectrales du 1,2,3,4,6-penta-*O*-acétylglucopyranose **5a** sont présentées ci-dessous. La figure 25 présente la structure du composé.

**RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** :  $\delta$  5.73 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz, H-1), 5.26 (1H, t,  $J = 9.4$  Hz, H-2), 5.15 (1H, m, H-3), 5.12 (1H, m, H-4), 4.30 (1H, dd,  $J = 12.6$  et  $4.5$  Hz, H-6), 4.12 (1H,  $J = 12.4$  et  $2.2$  Hz, H-6), 3.86 (1H, m, H-5), 2.12 (3H, s, 3H-7), 2.10 (3H, s, 3H-11), 2.04 (6H, s, 3H-8 et 3H-10), 2.02 (3H, s, 3H-9).

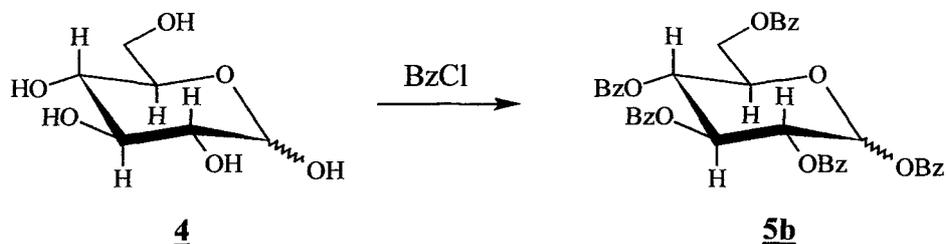
**EIMS m/z** : 43 (100%), 115 (23), 98 (16), 157 (12), 140 (7), 169 (6), 200 (5), 242 (3).

(L'ion moléculaire n'est pas détecté en EIMS. Ceci est probablement causé par la fragmentation rapide des groupements protecteurs acétates.)



**Figure 25.** Structure du 1,2,3,4,6-penta-*O*-acétylglucopyranose **5a**.

**3.9.2 Protection par les groupements benzyles; formation du 1,2,3,4,6-penta-*O*-benzoyl-glucopyranose 5b**



**Figure 26.** Réaction générale de protection du glucose **4** par les groupements benzyles.

Dans un ballon de 250 ml, une quantité de 5,0 g de D-(+)-glucose **4** (27,7 mmol) est dissoute dans 175 ml d'une solution de chloroforme:pyridine (50:50) (dissolution très lente  $\cong$  1 heure). Une solution de 12 ml de chlorure de benzoyle (140 mmol, 5,05 éq.) dans 10 ml de dichlorométhane (DCM) est ajoutée par petites portions en maintenant la température sous 35°C à l'aide d'un bain de glace. La réaction est agitée à température ambiante pendant 2 heures. Le milieu réactionnel est lavé en utilisant deux portions de 150 ml d'une solution aqueuse de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2N), suivies de deux portions d'une solution aqueuse saturée en NaHCO<sub>3</sub> puis, finalement, d'une portion d'une solution aqueuse saturée en NaCl. La phase organique est séchée avec du MgSO<sub>4</sub> anhydre et filtrée. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est purifié par filtration sur gel de silice. Pour effectuer cette filtration, un entonnoir de verre fritté (7 cm de diamètre) est rempli avec 4 cm de gel de silice compacté. Le résidu est dissous dans le DCM puis adsorbé sur le gel. On fait ensuite passer 600 ml de DCM à travers le gel afin d'éluer le produit. Le solvant est évaporé sous

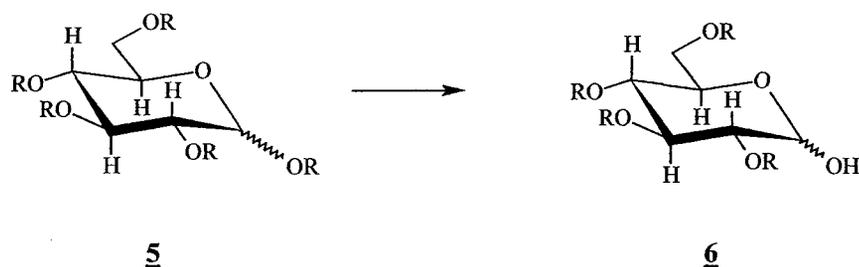
pression réduite à 30°C. On obtient un liquide très visqueux qui se solidifie à température de la pièce.

Les facteurs de rétention du 1,2,3,4,6-penta-*O*-benzoylglucopyranose **5b** sont :  $R_f = 0,86$  (DCM: MeOH; 98:2),  $R_f = 0,63$  (DCM) et  $R_f = 0,48$  (DCM:hexane; 75:25).

Les données spectrales du 1,2,3,4,6-penta-*O*-benzoylglucopyranose **5b** sont présentées ci-dessous.

**RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** :  $\delta$  7.25–8.17 (15 H, protons aromatiques des benzoyles), 3.6 – 6.77, 7H sur le cycle : [6.77 (1H, d,  $J = 3.7$  Hz), 5.97 (1H, t,  $J = 9.7$  Hz), 5.57 (1H, m), 4.93 (1H, dd,  $J = 12.2$  et 3.4 Hz), 4.53 (1H, dd,  $J = 13$  et 2.2 Hz), 4.30 (1H, td,  $J = 9.7$  et 2.2 Hz), 3.98 (1H, t,  $J = 9.6$  Hz), 3.60 (1H, d,  $J = 3.7$  Hz)].

**3.10 Déprotection de la position anomérique du glucose protégé; formation du 1-hydroxy-2,3,4,6-tétra-*O*-acétylglucopyranose 6a ou du 1-hydroxy-2,3,4,6-tétra-*O*-benzoylglucopyranose 6b**



**Figure 27.** Réaction générale de déprotection de la position anomérique du glucose 4.

**3.10.1 Déprotection de la position anomérique avec le  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$**

La réaction est conduite en prenant les précautions nécessaires afin d'obtenir un milieu réactionnel anhydre (section 3.3). Dans un ballon sec de 100 ml muni d'un agitateur magnétique, on ajoute soit 1,0 g de 1,2,3,4,6-penta-*O*-acétylglucopyranose 5a (2,56 mmol) ou bien 1,80 g de 1,2,3,4,6-penta-*O*-benzoylglucopyranose 5b (2,56 mmol). On dissout le sucre protégé dans 25 ml d'acétonitrile. Un volume de 0,5 ml de  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (0,56 g, 3,95 mmol) est ajouté goutte à goutte tout en agitant sur une période d'environ 30 minutes. La réaction est agitée à température ambiante en suivant l'évolution de la réaction par chromatographie sur couche mince (CCM) en éluant les plaques avec DCM:MeOH (95:5) pour le glucose protégé par des acétates et DCM:MeOH (98:2) pour le glucose protégé par

des benzoyles. La progression de la réaction est arrêtée lorsque le glucose tri-protégé commence à se former. Pour ce faire, le milieu réactionnel est versé lentement dans une solution aqueuse de  $\text{NaHCO}_3$  saturée. Un volume de 30 ml de DCM est ajouté et la phase aqueuse est extraite avec deux nouvelles portions de DCM. La solution organique est lavée deux fois consécutives avec une solution aqueuse saturée en  $\text{NaHCO}_3$  puis à l'eau. La phase organique est séchée avec du  $\text{MgSO}_4$  anhydre, filtrée, puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice. Le système de solvant utilisé est présenté à la section 3.10.4.

### **3.10.2 Déprotection de la position anomérique par la bromation avec HBr/HOAc suivie de l'hydrolyse avec $\text{Ag}_2\text{CO}_3$**

La réaction est conduite en prenant les précautions nécessaires afin d'obtenir un milieu réactionnel anhydre (section 3.3). Un volume de 2,75 ml de HBr/HOAc 33% (9 mmol, 2 éq.) est ajouté à une solution de 2,11 g de penta-*O*-acétylglucopyranose **5a** (5,43 mmol) ou 3,80 g de penta-*O*-benzoylglucopyranose **5b** (5,43 mmol) solubilisé dans 15 ml de DCM fraîchement distillé contenant 500 mg de tamis moléculaire de 4Å. Après 2 heures d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel est lavé deux fois avec une solution aqueuse saturée de  $\text{NaHCO}_3$  puis avec une solution aqueuse saturée en NaCl. La phase organique est séchée avec du  $\text{MgSO}_4$ , filtrée, puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Ensuite, le résidu est soumis à une hydrolyse selon les conditions

suivantes. Le résidu est dissous dans 25 ml d'acétone et 1 ml d'eau. Une quantité de 2,0 g de  $\text{Ag}_2\text{CO}_3$  (7,25 mmol, 1.3 éq.) est ajoutée au milieu réactionnel par petites portions. Après 45 minutes de réaction, la suspension est filtrée sur 3 cm de célite. Le filtrat est concentré sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice tel que présenté à la section 3.10.4.

### 3.10.3 Déprotection de la position anomérique avec le $\text{Bu}_3\text{SnOMe}$

Une quantité de 1,0 g de penta-*O*-acétylglucopyranose **5a** (2,56 mmol) ou de 1,8 g de penta-*O*-benzoylglucopyranose **5b** (2,56 mmol) est dissoute dans 30 ml de 1,2-dichloroéthane. Un volume de 0,70 ml de  $\text{Bu}_3\text{SnOMe}$  (0,78 g, 1 éq.) est ajouté à la réaction. Le milieu réactionnel est chauffé à reflux. La progression de la réaction est suivie en effectuant des CCM en éluant les plaques avec DCM:MeOH (95:5) pour le glucose protégé par des acétates et avec DCM:MeOH (98:2) pour le glucose protégé par des benzoyles. La réaction est arrêtée lorsque le glucose penta-protégé **5** est consommé entièrement sur la CCM (entre 2 et 3 heures). Le milieu réactionnel est lavé quatre à cinq fois avec une solution de KOH 5% puis trois fois à l'eau. La phase organique est séchée avec du  $\text{MgSO}_4$  anhydre, filtrée, puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice tel que présenté à la section 3.10.4.

### 3.10.4 Séparation chromatographique du glucose tétra-protégé 6

La séparation par chromatographie éclair sur gel de silice pour le sucre tétra-acétylé et tétra-benzoylé est menée selon le système d'éluant dichlorométhane:méthanol. Pour la séparation du sucre acétylé, on utilise initialement du DCM. On ajoute du méthanol afin d'augmenter graduellement la polarité de l'éluant jusqu'au mélange DCM:MeOH (97:3). Pour la séparation chromatographique du sucre protégé par des benzoyles, on utilise initialement du DCM. Ensuite, on ajoute du méthanol pour augmenter graduellement la polarité de l'éluant jusqu'au mélange DCM:MeOH (98:2).

Les facteurs de rétention du 1-hydroxy-2,3,4,6-tétra-*O*-acétylglucopyranose 6a sont :  $R_f = 0,28$  (DCM:MeOH; 97:3) et  $R_f = 0,41$  (DCM:MeOH; 95:5). Le facteur de rétention du 1-hydroxy-2,3,4,6-tétra-*O*-benzoylglucopyranose 6b est :  $R_f = 0,88$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH; 97:3).

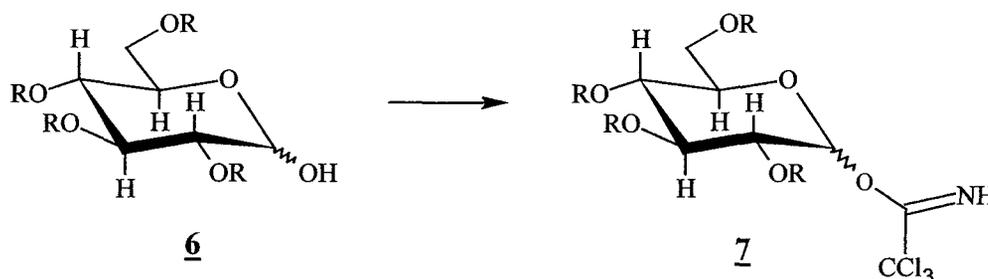
Les données spectrales du 1-hydroxy-2,3,4,6-tétra-*O*-acétylglucopyranose 6a sont :

**EIMS m/z** : 43 (100), 81 (9), 98 (6), 102 (6), 115 (6), 69 (5), 145 (4), 157 (4), 127 (3), 169 (2), 243 (1). (L'ion moléculaire n'est pas détecté en EIMS. Ceci est probablement causé par la fragmentation rapide des groupements protecteurs acétates.)

Les données spectrales du 1-hydroxy-2,3,4,6-tétra-*O*-benzoylglucopyranose **6b** sont :

**EIMS m/z** : 595 ( $M^+$ , 1%), 105 (100), 77 (92), 122 (78), 281 (36), 202 (28), 323 (27), 177 (20), 138 (15), 428 (12), 475 (8).

**3.11 Activation de la position anomérique par les trifluoroacétimides ; formation du 1-acétimide-2,3,4,6-tétra-*O*-acétylglucopyranose 7a ou 1-acétimide-2,3,4,6-tétra-*O*-benzoylglucopyranose 7b**



**Figure 28.** Réaction générale d'activation de la position 1 du glucose tétra-protégé 6 par le groupement trichloroacétimide.

La réaction est conduite en prenant les précautions nécessaires afin d'obtenir un milieu réactionnel anhydre (section 3.3). Une quantité de 318 mg de 1-hydroxy-2,3,4,6-tétra-*O*-acétylglucopyranose 6a (0,913 mmol) ou de 544 mg de 1-hydroxy-2,3,4,6-tétra-*O*-benzoylglucopyranose 6b (0,913 mmol) est dissoute dans le DCM fraîchement distillé contenant 500 mg de tamis moléculaire de 4 Å. Le milieu réactionnel est refroidi à 0°C puis 0,5 ml de trichloroacétonitrile (CCl<sub>3</sub>CN, 0,72g, 4,99 mmol, 5,5 éq.) et 29,6 mg de Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,091 mmol, 0,1 éq.) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité pendant 2 heures à température ambiante. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice en éluant initialement avec de l'hexane puis en augmentant graduellement la polarité en ajoutant de l'EtOAc jusqu'à l'obtention du

mélange hexane:EtOAc (80:20). Le produit obtenu est sous forme d'un liquide très visqueux. Un volume de 1 ml de DCM est ajouté pour dissoudre le résidu, suivi de 25 ml d'hexane afin de faire précipiter le sucre activé. Le DCM est évaporé sous pression réduite. La solution (glycosyle/hexane) est refroidie à  $-40^{\circ}\text{C}$  puis filtrée sous vide. Le produit est obtenu sous forme d'une légère mousse blanche.

Des essais ont été effectués avec les bases suivantes en remplacement du  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  :

- 0,014 ml de 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-ène (DBU) (14 mg, 0,091 mmol, 0,1 éq.)
- 2 mg d'hydrure de sodium (NaH) (0,091 mmol, 0,1 éq.)

Note : Les réactions utilisant ces bases (DBU et NaH) ont donné comme résultat un produit final contenant plusieurs impuretés. Une séparation chromatographique supplémentaire des composés a été nécessaire afin de purifier le produit.

Le facteur de rétention du 1-acétimide-2,3,4,6-tétra-*O*-acétylglucopyranose **7a** est :  $R_f = 0,45$  (DCM:MeOH; 95:5). Les facteurs de rétention du 1-acétimide-2,3,4,6-tétra-*O*-benzoylglucopyranose **7b** sont :  $R_f = 0,4$  (DCM) et  $R_f = 0,64$  (DCM:MeOH; 98:2).

Les données spectrales du 1-acétimide-2,3,4,6-tétra-*O*-acétylglucopyranose **7a** sont :

**EIMS m/z :** 203 (100), 43 (92), 262 (41), 69 (33), 189 (31), 105 (22), 119 (22), 133 (21), 81 (20). (L'ion moléculaire n'est pas détecté en EIMS. Ceci est probablement causé par la fragmentation rapide des groupements protecteurs acétates.)

Les données spectrales du 1-acétimidate-2,3,4,6-tétra-*O*-benzoylglucopyranose **7b** sont :

**RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :**  $\delta$  8.30 (1H, s, H sur l'azote), 7.99 (8H, c, H des cycles benzéniques en méta du CO), 7.54 (8H, c, H en ortho), 7.26 (4H, c, H en para), 4.46-6.81 : 7 H sur le cycle : [6.81 (1H, d,  $J = 3.5$  Hz), 6.22 (1H, t,  $J = 8.7$  Hz), 5.78 (1H, t,  $J = 8.7$  Hz), 5.59 (1H, dd,  $J = 10.4$  et  $3.5$  Hz), 4.62 (2H, m, H en 6'), 4.46 (1H, m)].

### 3.12 Glycosylation

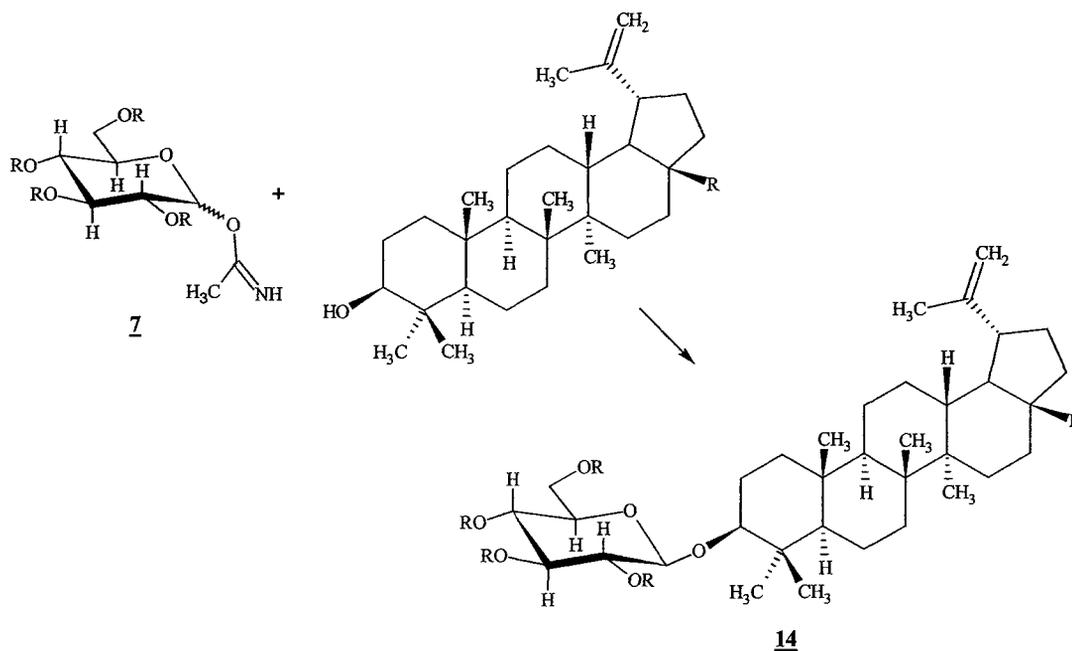


Figure 29. Réaction générale de glycosylation.

#### 3.12.1 Glycosylation au four à micro-ondes

Une quantité de 0,2 g de glucose penta-acétyle **5a** ou 0,36 g de glucose penta-benzoyle **5b** (0,51 mmol) est placée dans un erlenmeyer de 125 ml avec 0,33 g de bétulinol **2** (0,75 mmol, 1,5 éq.) et 0,12 g de ZnCl<sub>2</sub> (1 éq.). Le mélange est chauffé six fois 1 minute au four à micro-ondes à intensité maximale. L'erlenmeyer est agité entre chaque arrêt de chauffage car aucun mécanisme d'agitation mécanique n'est disponible. Le milieu réactionnel est adsorbé sur un minimum de silice (dry pack) et séparé par chromatographie

éclair sur gel de silice en éluant avec hexane:Et<sub>2</sub>O (90:10) puis en augmentant la polarité jusqu'à hexane:Et<sub>2</sub>O (70:30).

### 3.12.2 Glycosylation catalysée par le BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O

La réaction est effectuée en prenant les précautions nécessaires afin d'obtenir un milieu réactionnel anhydre (section 3.3). Une quantité de 1,14 g de 1-trichloroacétimidate-2,3,4,6-tétra-*O*-acétylglucopyranose **7a** (2,24 mmol) ou de 2,11 g de 1-trichloroacétimidate-2,3,4,6-tétra-*O*-benzoylglucopyranose **7b** (2,24 mmol) et de 1,02 g d'acide bétulinique **1** (2,24 mmol) sont dissoutes dans 25 ml de DCM à 0°C. Un volume de 114 µl de BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O (128 mg, 0,896 mmol, 0,4 éq.) est ajouté tout en agitant. La réaction est amenée à la température de la pièce. La progression de la réaction est arrêtée après une période de 2 heures en ajoutant 20 ml de solution aqueuse saturée en NaHCO<sub>3</sub>. La phase organique est extraite avec une portion de 25 ml de DCM puis, cette phase est lavée deux fois avec une solution aqueuse saturée de NaHCO<sub>3</sub> et deux fois avec une solution aqueuse saturée de NaCl. La phase organique est séchée avec du MgSO<sub>4</sub> anhydre, filtrée puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Les produits sont séparés par chromatographie éclair sur gel de silice tel qu'indiqué à la section 3.12.4.

### 3.12.3 Glycosylation catalysée par le TMSOTf

La réaction est conduite en prenant les précautions nécessaires pour obtenir un milieu réactionnel anhydre (section 3.3). Une quantité de 120 mg de 1-acétimidate-2,3,4,6-tétra-*O*-acétylglucopyranose **7a** (0,3 mmol) ou de 222 mg de 1-acétimidate-2,3,4,6-tétra-*O*-benzoyl-glucopyranose **7b** (0,3 mmol) ou de 1-acétimidate-2,3,4,6-tétra-*O*-benzyl-glucopyranose **7c** (0,3 mmol, produit commercial, Aldrich) et de 92 mg d'acide bétulinique **1** (0,20 mmol) sont dissoutes dans 4 ml de THF et 6 ml de DCM contenant 500 mg de tamis moléculaires de 4Å. La solution est placée dans un bain de glace et d'acétone afin d'obtenir une température de -20°C. Une solution de 5,4 µl de TMSOTf (0,15 éq, 0,03 mmol, 6,7 mg) dans 1 ml de DCM (0,0276 M) est ajoutée au milieu réactionnel à l'aide d'une seringue. La réaction est agitée pendant 120 minutes puis 0,05 ml de Et<sub>3</sub>N sont ajoutés (0,036 g, 0,36 mmol) afin d'arrêter la progression de la réaction. Celle-ci est filtrée et le solvant est évaporé sous pression réduite. Les produits sont séparés par chromatographie éclair sur gel de silice tel qu'indiqué à la section 3.12.4.

### 3.12.4 Séparation chromatographique des produits de glycosylation

Les produits de la réaction conduite avec un sucre protégé par des groupements acétates sont isolés par chromatographie éclair sur gel de silice en éluant initialement avec le dichlorométhane (DCM). La polarité de l'éluant est augmentée graduellement en ajoutant

du MeOH jusqu'à l'obtention du mélange DCM:MeOH (90:10). Les produits de la réaction avec les groupements protecteurs benzoyles et benzyles sont isolés par chromatographie éclair sur gel de silice en éluant initialement avec DCM puis en augmentant la polarité de l'éluant en ajoutant du MeOH jusqu'à l'obtention du mélange DCM:MeOH (94:6). Pour ce qui est du glycoside protégé par des groupement benzoyle **14b**, la séparation est effectuée grossièrement à cause des produits de polarité semblables qui éluent à la même vitesse. Toutes les fractions recueillies qui contiennent du penta-*O*-benzoylglycoside **14b** sont évaporées ensemble et le résidu est soumis directement à la déprotection (section 3.13).

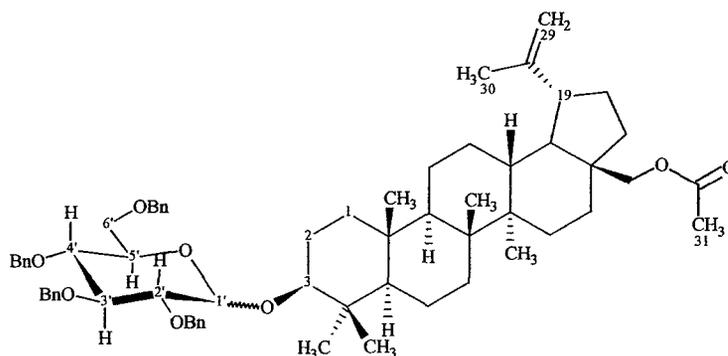
Les facteurs de rétention pour l'acide bétulinique **1** sont :  $R_f = 0,24$  (DCM:MeOH; 97:3),  $R_f = 0,42$  (DCM :MeOH; 95:5) et  $R_f = 0,99$  (DCM:MeOH; 75:25). Les facteurs de rétention pour l'acide tétra-*O*-benzoyl- $\beta$ -D-glucopyranosylbétulinique **14b** sont :  $R_f = 0,33$  (DCM:MeOH; 97:3) et  $R_f = 0,38$  (DCM:MeOH; 95:5).

L'acide tétra-*O*-benzoyl- $\beta$ -D-glucopyranosylbétulinique **14b** étant très difficile à isoler à cause de sa polarité similaire aux réactifs de départ de la réaction, le spectre RMN de ce dérivé n'a pas été effectué. En effet, la réaction suivante, la déprotection, a été effectuée sur le résidu grossièrement purifié.

Toutefois, il a été possible d'isoler le 28-*O*-acétyl-[tétra-*O*-benzylgluco pyranosyl]bétulinol **16c** et le tri-*O*-acétylglucopyranosyllupéol **17a**. Les données du spectre

RMN du 28-*O*-acétyl-[tétra-*O*-benzylglucopyranosyl]bétulinol **14c** sont présentées ci-dessous. La figure 30 présente la structure du composé.

RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  7.29, 7.23 et 7.11 (20H, c, H des cycles aromatiques), 4.4-5.0 (11H, c, 4 CH<sub>2</sub> groupement benzyle, 2H en 29 et H-1'), 4.22-3.5 (6H, c, H-2', 3', 4', 5', 6'a et b), 3.15 (1H, td, H-3), 2.27 (1H, td, H-19), 2.04 (3H, s, CH<sub>3</sub> de l'acétate-31), 1.65 (3H, s, CH<sub>3</sub>-30), 1.95-1.02 (26 H, c, CH et CH<sub>2</sub> du squelette du lupane), 0.98, 0.92, 0.83, 0.78, 0.71 (5  $\times$  3H, s, 5  $\times$  CH<sub>3</sub>).

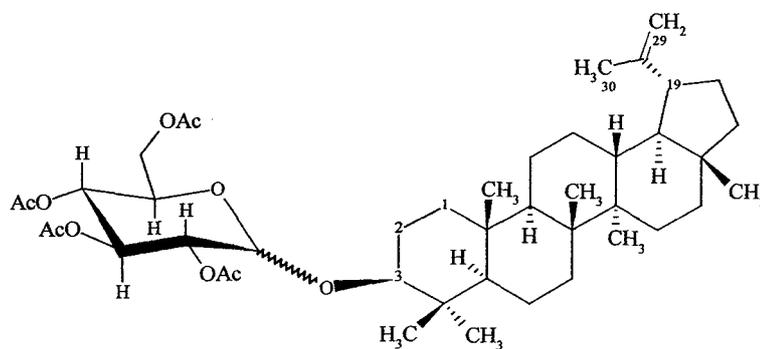


**Figure 30.** Structure du 28-*O*-acétyl-[tétra-*O*-benzylglucopyranosyl]bétulinol **14c**.

Les données du spectre de masse du 3-*O*-triacétylglucopyranosyllupéol **17a** sont présentées ci-dessous. La figure 31 présente la structure du composé.

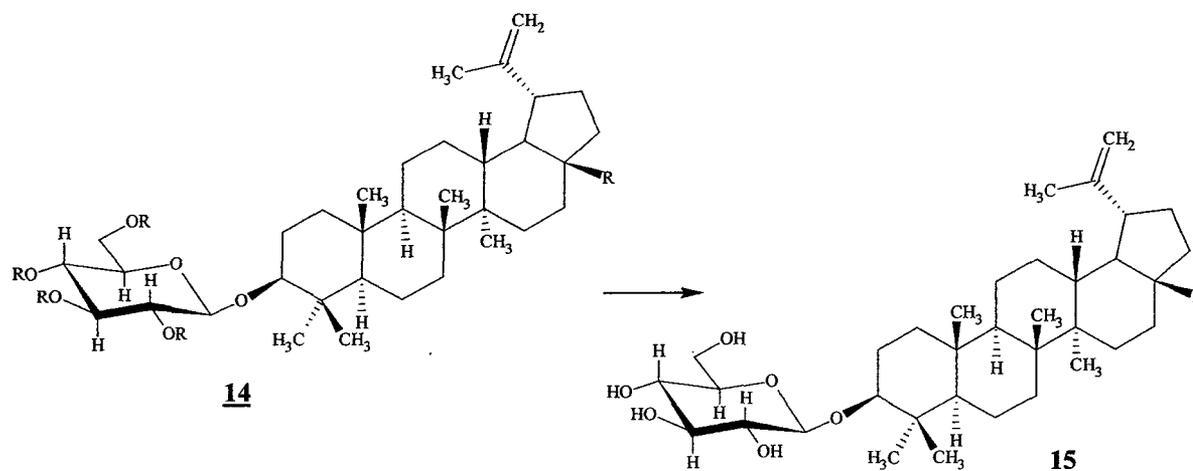
EIMS *m/z* : 714 (M<sup>+</sup>, 2%), 119 (100), 109 (99), 218 (82), 203 (82), 189 (75), 135 (75), 147 (52), 229 (44), 257 (31), 411 (28), 426 (23). (Le spectre nous permet d'observer que le glycoside est sous forme tri-acétylée. Par contre, à cause de la fragmentation rapide des

groupements protecteurs acétates, il est possible que l'on n'observe pas le pic moléculaire et que le glycoside soit sous forme tétra-acétylée.)



**Figure 31.** Structure du tétra-*O*-acétylglucopyranosyllupéol **17a**.

### 3.13 Déprotection; régénération des alcools de la section sucre



**Figure 32.** Réaction générale de déprotection des alcools de la section sucre du glycoside **15**.

Le résidu de la réaction de glycosylation est soumis à la déprotection après une séparation grossière (plusieurs produits sont difficiles à séparer car ils ont un comportement chromatographique semblable). La quantité de glycoside **14** à déprotéger n'est pas connue avec précision. La quantité de NaOH requise pour l'hydrolyse est établie à partir de la quantité de sucre activé **7** impliquée dans la réaction de glycosylation (section 3.12.3).

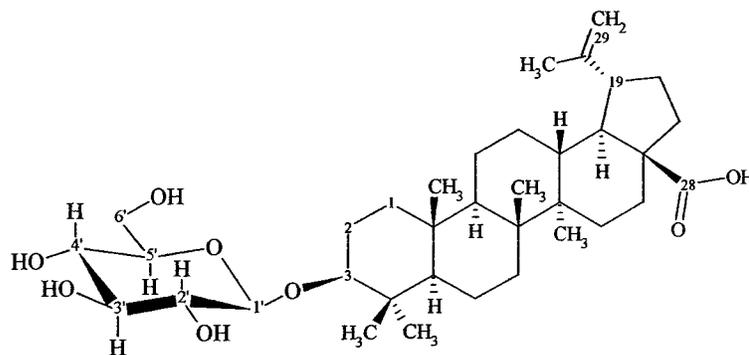
Le résidu grossièrement séparé provenant de la réaction de glycosylation est dissous dans 10 ml d'une solution de MeOH:THF (1:1) ou MeOH:DCM (1:1) dans un ballon de 100 ml. Le milieu réactionnel est agité à température pièce tandis que 4,8 ml de NaOH aqueux (0,25 M, 1,2 mmol, 4 éq.) sont ajoutés sur une période de 1 heure. Après 3 heures,

50 ml de DCM sont ajoutés à la réaction. Le milieu réactionnel est lavé à deux reprises avec une solution de HCl 10% puis à deux reprises avec une solution aqueuse saturée en NaCl. La phase organique est séchée avec du MgSO<sub>4</sub> anhydre et filtrée. Une quantité de 1g de SiO<sub>2</sub> est ajoutée au ballon contenant la phase organique et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu adsorbé sur silice (dry pack) est soumis à une chromatographie éclair sur gel de silice préparée dans le DCM. On élue ensuite avec DCM:MeOH (98:2) afin d'éluer le glucose tétra-benzoylé activé **7b**, ensuite avec le DCM:MeOH (96:4) pour éluer l'acide bétulinique **1** et finalement, le DCM:MeOH (92:8) pour éluer le glycoside **15**.

Les facteurs de rétention du glycoside **15** sont : R<sub>f</sub> = 0 (DCM:MeOH; 97:3), 0,58 (DCM:MeOH; 80:20) et 0,68 (DCM:MeOH; 75:25).

Les données spectrales de l'acide 3-O-β-D-glucoopyranosylbétulinique **15** sont présentées ci-dessous. La figure 33 présente la structure du composé.

**RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) :** δ 4.67 (1H, s, H-29), 4.55 (1H, s, H-29), 4.27 (1H, d, J = 8 Hz, H-1' pour β), 3.80 (1H, dd, J = 12 et 2.2 Hz, H-6'), 3.63 (1H, dd, J = 12.0 et 5.3 Hz, H-6'), 3.41 (1H, m, H-5'), 3.28 (1H, t, J = 10.5 Hz, H-4'), 3.20 (1H, m, H-3'), 3.14 (1H, dd, H-2'), 2.98 (1H, td, J = 11 et 3.7 Hz, H-3), 2.73 (1H, dd, J = 4.1 et 12, H-2), 2.25 (1H, m, H-19), 1.65 (3H, CH<sub>3</sub>-30), 1.95-1.02 (26 H, c, CH et CH<sub>2</sub> du squelette du lupane), 0.98, 0.92, 0.83, 0.78, 0.71 (5 × 3H, s, 5 × CH<sub>3</sub>) [Curatolo et al., 1983].



**Figure 33.** Structure de l'acide 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosylbétulinique 15.

### 3.14 Évaluation du coefficient de partage

Le coefficient de partage des différents produits est évalué en déterminant sa distribution dans deux phases liquides soit une phase organique (octanol) et une phase aqueuse tamponnée au pH physiologique (solution PBS). Le test est effectué dans des fioles HPLC pouvant contenir 2 ml. Une quantité de 0,008 mM de chacun des produits est pesée précisément soit, 5,0 mg d'acide 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosylbétulinique **15**, 3,6 mg d'acide bétulinique **1** et 3,5 mg de bétulinol **2**. Un volume de 800  $\mu$ l d'octanol et de 800  $\mu$ l de PBS sont placés dans chacune des fioles. Les fioles sont agitées 3 fois pendant 1 min à température pièce en utilisant un vortex. L'analyse HPLC est effectuée après 1 heure de repos des fioles afin d'observer une séparation nette des deux phases. Chacune des expériences a été effectuée en duplicata.

L'analyse de la distribution par HPLC se fait à même les fioles en programmant l'injection à 2,5 mm du fond de la fiole afin d'analyser la phase aqueuse et à 15,0 mm du fond de la fiole afin d'analyser la phase organique. Le coefficient de partage est évalué en effectuant le logarithme du ratio de la concentration du composé dans la phase organique sur la concentration dans la phase aqueuse selon l'équation 2. La distribution du composé est évaluée par l'aire du pic détecté dans chacune des phases. Chaque analyse est effectuée sur le même échantillon 2 fois non-consécutives. La première analyse est effectuée dans la

phase aqueuse puis dans l'octanol et ensuite l'inverse pour éviter la perte d'équilibre due à la différence de volume entre les deux phases créée par le volume prélevé pour l'injection.

$$\text{Coefficient de partage} = \text{Log } P_{o/w} = \log \frac{[\text{composé}] \text{ octanol}}{[\text{composé}] \text{ eau}} = \log \frac{\% \text{ aire octanol}}{\% \text{ aire eau}}$$

**Équation 2.** Calcul du coefficient de partage par analyse HPLC

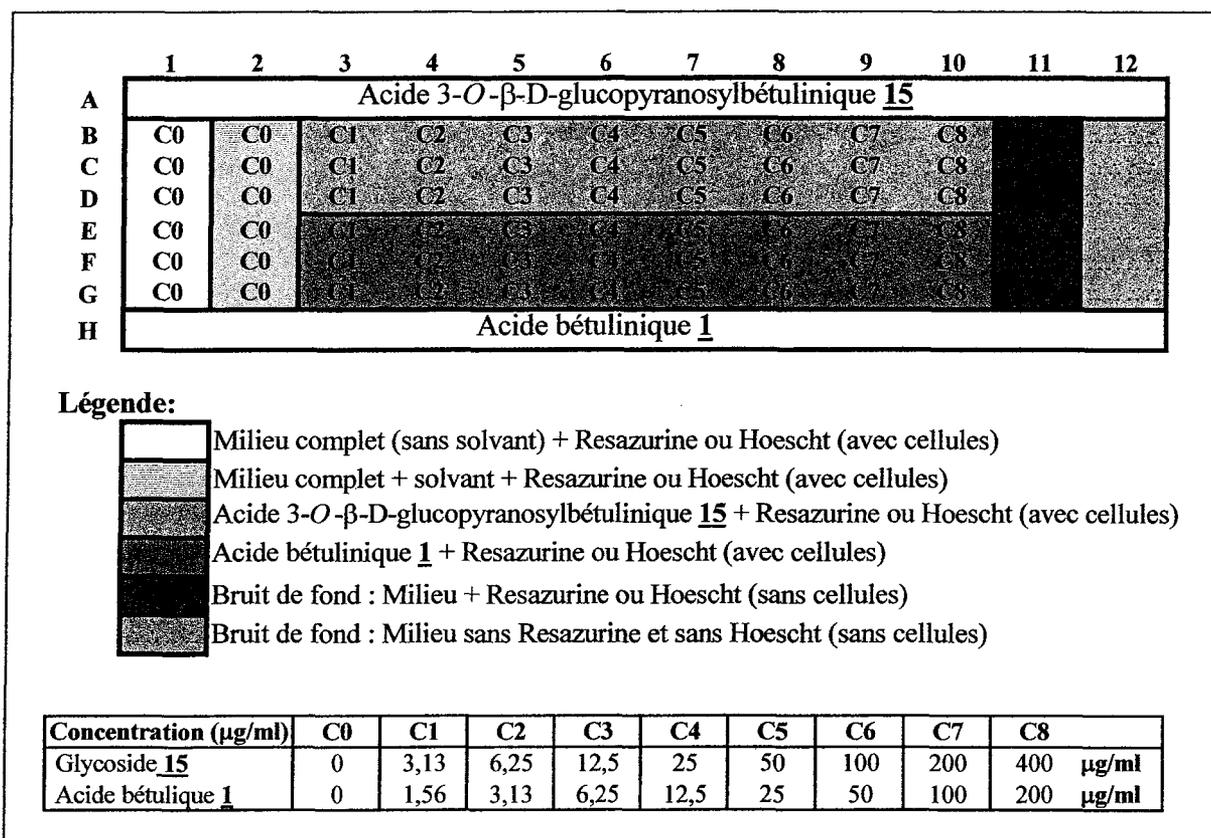
L'analyse par HPLC se fait de façon isocratique. Le glycoside 15 est analysé avec un mélange de 84% d'eau et 16% de méthanol et 0,2% d'acide acétique. L'acide bétulinique 1 et le bétulinol 2 sont analysés avec 80% de méthanol, 20% d'eau et 0,2% d'acide acétique. La vitesse d'élution est de 1,5 ml/min. La température de la colonne est de 28°C. Le glycoside 15 est détecté à l'aide du détecteur UV à 254 nm avec une largeur de bande de 16 nm. L'acide bétulinique 1 et le bétulinol 2 sont détectés à 208 nm avec une largeur de bande de 16 nm. La référence utilisée est 360 nm. Les temps de rétention sont établis au préalable par l'injection de standard de chacun des produits analysés. On utilise le ratio de l'aire du pic pour effectuer le calcul du coefficient de partage à l'aide de l'équation 2.

### 3.15 Évaluation de l'activité cancéreuse

L'activité antitumorale de l'acide 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosylbétulinique **15** et de l'acide bétulinique **1** est évaluée sur deux lignées de cellules cancéreuses humaines. La lignée A-549, un carcinome du poumon, et la lignée DLD-1, un adénocarcinome du colon. Des règles strictes sont suivies afin d'effectuer les analyses dans un milieu stérile. La vaisselle est lavée au lave-vaisselle, rincée abondamment à l'eau distillée, les bouteilles vides (pyrex) sont refermées et envoyées à l'autoclave (15 min à 121°C). Le milieu essentiel minimum (MEM) est filtré avec filtres 0,22 microns et envoyé directement dans les bouteilles stériles. Toutes les manipulations sont effectuées sous la hotte biologique à flux laminaire (environnement stérile). La hotte est décontaminée à l'éthanol 70% avant et après les manipulations. Tout ce qui entre sous la hotte est décontaminé à l'éthanol 70% avant d'y entrer.

Les lignées de cellules cancéreuses du carcinome du poumon A-549 (#CCL-185) et de l'adénocarcinome du colon DLD-1 (#CCL-221) ont été obtenues de l'American Type Culture Collection (ATCC). Les cellules sont cultivées dans le milieu essentiel minimum (MEM) avec une solution saline de Earle 1X et contenant 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), une solution de vitamines 1X, du pyruvate de sodium 1X, une solution d'acides aminés non essentiels 1X, 100 IU de pénicilline et 100  $\mu$ g/ml de streptomycine. Les cellules sont maintenues dans une atmosphère humide à 5 % de CO<sub>2</sub> et à 37 °C.

Les cellules sontensemencées dans des microplaques de 96 puits (5000 cellules dans 100 µl de milieu complet), puis incubées 24 heures. Une microplaque de chacune des lignées de cellule est préparée. Un volume de 100 µl de solution de chacun des composés sont ajoutés, et ce, à huit concentrations différentes afin d'obtenir une courbe de mortalité cellulaire en fonction de la concentration. La valeur des différentes concentrations est présentée à la figure 34. L'acide 3-*O*-β-D-glucopyranosylbétulinique **15** est solubilisé dans un mélange d'éthanol et de THF. L'acide bétulinique **1** est solubilisé dans le THF. Les tests, pour chacune des concentrations de composé, sont effectués en triplicata.



**Figure 34.** Schéma de la microplaque de l'évaluation de l'activité anticancéreuse de l'acide bétulinique **1** et de l'acide 3-*O*-β-D-glucopyranosylbétulinique **15**.

La plaque est subdivisée de façon à éliminer les biais de lecture qui pourraient être causés par le solvant de dilution des composés ainsi que le bruit de fond. La figure 34 montre la subdivision de cellules. Des puits sont utilisés afin d'évaluer la croissance normale des cellules (B1 à G1) ainsi que l'effet du solvant sur les cellules (B2 à G2). Les puits B11 à G11 et B12 à G12 servent à évaluer le bruit de fond.

Les plaques sont incubées avec les extraits pendant 48 heures à 37°C dans une atmosphère contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. Une observation visuelle des cellules est effectuée au microscope après 24 heures et 48 heures. Après 48 heures, les puits sont vidés et lavés. Les cellules mortes décollent au lavage. Un volume de 150 µl de milieu minimum essentiel (MEM) sans sérum de veau foetal (SVF) et 150 µl de resazurine 2 % v/v sont ajoutés. Les plaques sont incubées à 37°C dans une atmosphère contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. La resazurine est réduite en resorufine par les cellules vivantes. La présence de resorufine est détectée par un fluorimètre à 530/590 nm. Des mesures sont prises après 60, 120 et 180 minutes d'incubation.

Les microplaques sont vidées, 100 µl de dodécyl sulfate de sodium (SDS) 0,01 % sont ajoutés à chacun des puits. Les plaques sont incubées à -20°C pendant la nuit. Les plaques sont décongelées à température de la pièce puis, un volume de 100 µl de la solution de 30 µg/ml de bisbenzimidazole (Hoechst 33342) dans le TNE 2X est ajouté. Le TNE 2X consiste en une solution de 10 mM tris-HCl (1.210 g/L), 1 mM d'acide éthylènediamine-

tétra-acétique (EDTA) (0.3725 g/L) et 4 M de chlorure de sodium (NaCl) (233.76 g). Les plaques sont incubées en agitant pendant 2 heures à température de la pièce à l'abri de la lumière. Le bisbenzimidazole devient fluorescent lorsqu'il se lie à l'ADN. La fluorescence est mesurée par le fluorimètre (360/460 nm). La valeur de la fluorescence est directement proportionnelle avec la quantité d'ADN présente dans chaque puits.

Les résultats de ces deux tests permettent de tracer une courbe du taux de survie des cellules en fonction de la concentration du composé. La concentration du composé inhibant 50 % de la croissance cellulaire ( $IC_{50}$ ) est déterminée à partir de cette courbe.

**CHAPITRE 4**  
**RÉSULTATS ET DISCUSSION**

#### 4.1 Extraction du lupéol 3 et du bétulinol 2

Le bétulinol 2 et le lupéol 3 ont été extraits et isolés à partir de l'écorce du bouleau blanc et du bouleau jaune. Les résultats d'extraction sont présentés au tableau 4. L'extraction du lupéol 3 à partir de bouleau jaune donne un rendement de 4%. L'extraction est plus efficace à partir de l'écorce de ce bouleau qu'à partir de celle du bouleau blanc (0,8%). L'isolation à partir de l'extrait de l'écorce du bouleau jaune et blanc est faite par chromatographie éclair. Le bétulinol 2 est facilement isolable de l'extrait de l'écorce du bouleau blanc par des recristallisations successives. Cela permet d'isoler une grande quantité de produit à la fois avec un excellent rendement d'isolation (24%). L'isolation du bétulinol 2 à partir de l'extrait de l'écorce du bouleau jaune doit être faite par chromatographie éclair et donne un rendement de 5%.

**Tableau 4.** Rendement d'extraction du bétulinol 2 et du lupéol 3 à partir de l'écorce du bouleau blanc et du bouleau jaune.

Triterpène	Rendement	
	Lupéol <u>3</u> (% p/p)	Bétulinol <u>2</u> (% p/p)
<b>Bouleau blanc</b> <i>(betula papyrifera)</i>	0,8 %	24 %
<b>Bouleau jaune</b> <i>(betula alleghaniensis)</i>	4 %	5 %

Les triterpènes ont été identifiés par spectrométrie de masse (annexe 2) ainsi que par RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  (annexe 3).

#### 4.2 Protection de la fonction alcool en position 28 du bétulinol 2

Les rendements de la protection du bétulinol 2 avec des groupements acétates et benzoyles sont présentés au tableau 5. Les rendements obtenus sont très bons étant donné que la réaction de protection n'est pas exclusivement sélective à l'alcool en position 28. En effet, l'acétylation et la benzylation se produisent à la position 28, ensuite elles se produisent sur l'alcool en position 3. La réactivité plus grande de l'alcool en 28 est due au fait que celui-ci est primaire tandis que l'alcool en 3 est secondaire. Les meilleurs rendements obtenus sont de 62% pour les groupements benzoyles et de 67% pour les groupements acétates. La progression de la réaction doit être suivie par CCM afin qu'elle soit arrêtée dès que le bétulinol 3,28-diprotégé 9 commence à se former. Ces réactions de protection de la fonction hydroxyle en position 28 se produisent rapidement (environ 30 minutes).

**Tableau 5.** Rendement de protection de la fonction 28 du bétulinol 2.

<b>Produit formé</b>	<b>Réactif</b>	<b>Rendement</b>
28- <i>O</i> -acétylbétulinol <u>8a</u>	Ac <sub>2</sub> O	67%
28- <i>O</i> -benzoylbétulinol <u>8b</u>	BzCl	62%

Le 3-acétyl 8a et le 3,28-diacétylbétulinol 9a ont été identifiés par leur spectre de masse caractéristique (annexe 2) [Uvarova et *al.*, 1980]. Le spectre de masse exacte du 3-

*O*-benzoylbétulinol **8b** permet de l'identifier et la formule moléculaire proposée est juste ( $C_{37}H_{54}O_3$ ). De plus, le 3-*O*-benzoylbétulinol **8b** ainsi que le 3,28-dibenzoylbétulinol **9b** sont facilement identifiables par CCM grâce à l'exposition à la lumière UV. La polarité caractéristique de chacun des produits permet de les identifier facilement.

### 4.3 Protection de la section sucre

#### 4.3.1 Protection du glucose 4 avec des groupements acétates; formation du 1,2,3,4,6-penta-*O*-acétylglucopyranose 5a

La réaction d'acétylation des fonctions alcools du glucose 4 a été effectuée selon plusieurs conditions. Le tableau 6 présente les conditions et les résultats des différents essais.

**Tableau 6.** Résultats de la protection des fonctions alcools du glucose 4 par des groupements acétates.

Essai	Activation ou catalyseur	Générateur du groupement	Température	Temps	Rendement
1	Chaleur	Anhydride acétique	40°C	2 h	34%
2	Chaleur	Acétate de sodium	100°C	2 h	41%
3	Micro-ondes	Acétate de sodium	110°C	3 min	60%
4	Acide perchlorique	Anhydride acétique	35°C	0,5 h	85%

Les essais 1 et 2 impliquent l'activation grâce à un chauffage conventionnel. L'essai 1 utilise l'anhydride acétique pour générer le groupement acétate et est chauffé à 40°C. Ces

conditions ne permettent pas l'obtention de bons rendements (34%). Pour ce qui est de l'essai 2, on utilise l'acétate de sodium afin de générer le groupement. La température de cette réaction est élevée (100°C), ce qui a résulté en une solution finale couleur caramel qui semble indiquer la présence de produits de décomposition du sucre (caramélisation). Le rendement est faible (41%) après une recristallisation du résidu dans l'éthanol.

L'essai 3 consiste en une acétylation en exposant le milieu réactionnel aux micro-ondes. Le rendement de cette réaction dans ces conditions est bon (60%) et la durée de la réaction est avantageuse. Comme pour l'essai 2, la couleur caramel du milieu réactionnel nous indique qu'il y a possiblement eu décomposition du sucre par la chaleur.

Finalement, les conditions de l'essai 4 permettent d'obtenir de très bons rendements (85%). Ces conditions impliquent l'utilisation d'un catalyseur à base d'acide perchlorique. Malgré le besoin de manipuler cet acide avec beaucoup de précautions, cette réaction est très efficace en un temps assez court et permet d'éviter la formation de produits de décomposition.

Le 1,2,3,4,6-penta-*O*-acétylglucopyranose **5a** a été identifié par spectrométrie de masse (annexe 2). L'ion moléculaire n'est pas détecté à cause de la fragmentation rapide des groupements acétates en ionisation électronique (EI) mais la comparaison avec des banques de spectres permet d'identifier le composé [SDBS, 2003]. De plus, le spectre RMN du composé permet de confirmer sa structure (annexe 3).

### 4.3.2 Protection du glucose 4 par des groupements benzoyles; formation du 1,2,3,4,6-penta-*O*-benzoylglucopyranose 5b

La réaction de benzylation demande un temps assez long à cause de la dissolution lente du sucre dans le solvant (environ 1 heure dans un mélange pyridine:DCM). La réaction s'effectue avec un rendement satisfaisant (75%) tel que présenté au tableau 7. Le rendement est affecté par la caramélisation du glucose 4 causée par l'ajout du chlorure de benzoyle au milieu réactionnel. Étant donné que l'addition est très exothermique, il est difficile de maintenir la température sous 35°C tout en ajoutant le réactif sur une période d'environ 30 minutes.

**Tableau 7.** Résultats de la protection des fonctions alcools du glucose 4 par des groupements benzoyles.

Réactif	Solvant	Température	Temps	Rendement
BzCl	Pyridine:DCM 50:50	25-35 °C	4 h	75%

Le glucose penta-benzoyle 5b a été caractérisé par spectroscopie RMN (annexe 3). Le produit n'est pas assez volatil pour permettre son analyse par spectrométrie de masse puisque l'appareil est couplé à un chromatographe en phase gazeuse.

**4.4 Déprotection du carbone anomérique; formation du 1-hydroxy-2,3,4,6-tétra-*O*-acétylglucopyranose 6a ou du 1-hydroxy-2,3,4,6-tétra-*O*-benzoylglucopyranose 6b**

La régénération de l'alcool anomérique a été tentée avec plusieurs réactifs. Les résultats sont présentés au tableau 8 ci-dessous. Les mêmes conditions sont efficaces pour déprotéger les deux types de groupements protecteurs soit les acétates ou les benzoyles. Les rendements du clivage de ces deux types de groupements sont comparables.

**Tableau 8.** Résultats de la régénération de l'alcool en position anomérique du glucose tétra-protégé 6

Essai	Réactif	Groupement protecteur	Rendement	Note
1	<b>BF<sub>3</sub>·MeOH</b>	Acétate	18%	Peu réactif
2	<b>BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O</b>	Acétate	<b>A</b> 61%	Non sélectif à la position anomérique
		Benzoyle	<b>B</b> 63%	
3	<b>Bu<sub>3</sub>SnOMe</b>	Acétate	<b>A</b> 49%	Sélectif à la position anomérique
		Benzoyle	<b>B</b> nd	
4	1) HBr/AcOH 33% 2) AgCO <sub>3</sub>	Acétate	<b>A</b> 68%	Sélectif à la position anomérique
		Benzoyle	<b>B</b> 89%	

Le rendement de l'essai 1, la réaction de déprotection des acétates avec le trifluorure de bore complexé au méthanol, est très faible. Cette méthode n'a même pas été expérimentée avec les groupements benzoyles étant donné sa faible réactivité avec les groupements acétates.

Le clivage par le trifluorure de bore complexé à l'éther diéthylique ( $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ) permet d'obtenir des rendements beaucoup plus intéressants. Pour cette réaction, le  $\text{BF}_3$  complexé à l'éther est beaucoup plus réactif que lorsque complexé au méthanol. Cependant, le  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  n'est pas sélectif à l'alcool anomérique. Lorsque la déprotection est effectuée en position 1, elle s'effectue ensuite en position 2 et ainsi de suite. La réaction doit être suivie dans le temps par CCM afin de l'arrêter dès que le glucose tri-protégé commence à se former. Puisque la progression de la réaction doit être arrêtée à un moment précis, le rendement est très variable. Un mélange de glucose tri, tétra 6 et penta-protégé 5 est obtenu. Le glucose tétra-protégé 6 doit être séparé par chromatographie éclair.

L'utilisation de dérivé d'étain, tel que le méthoxide de tributyle étain ( $\text{Bu}_3\text{SnOMe}$ ) (essai 3) permet d'obtenir une sélectivité à la position anomérique. Par contre, les dérivés d'étain comportent un inconvénient puisqu'ils sont très difficiles à neutraliser. En effet, leur neutralisation nécessite de nombreux lavages consécutifs. Le rendement de la réaction avec les groupements acétates est faible (49%) et celui avec les groupements benzoyles n'a pas été obtenu avec précision étant donné la présence de  $\text{Bu}_3\text{SnOMe}$  après huit lavages

consécutifs de la phase organique. Aussi, la grande toxicité et les effets dommageables à la santé du manipulateur imposent des conditions de travail très strictes, ce qui rallonge le temps nécessaire pour procéder à la manipulation.

La réaction de bromation suivie de l'hydrolyse permet l'obtention d'un rendement de 68% pour les groupements acétates et 89% pour les groupements benzoyles (essai 4). Étant donné que cette méthode permet la déprotection sélective de la position 1, la séparation chromatographique du produit tétra-protégé est simple et rapide. L'utilisation de l'acide bromique lors de la première réaction requiert de travailler dans un milieu réactionnel anhydre à cause de la sensibilité de l'acide à l'humidité. La manipulation de cet acide est hasardeuse donc plusieurs précautions doivent être prises. De plus, les manipulations sont longues puisque deux réactions successives, la bromation et l'hydrolyse, sont nécessaires. Même si cette réaction est plus longue en terme de manipulation que les autres essais, c'est celle qui permet d'obtenir le meilleur rendement ainsi que la meilleure sélectivité à la position anomérique.

Les composés tétra-protégés sont identifiés par spectrométrie de masse (annexe 2). L'ion moléculaire du sucre tétra-acétate **6a** n'est pas détecté à cause de la fragmentation rapide d'un des groupements acétates mais le temps de rétention du composé de l'analyse de chromatographie en phase gazeuse par rapport au glucose penta-acétate **5a** ainsi que sa comparaison avec des banques de spectres permet d'identifier le composé [SDBS, 2003].

#### 4.5 Activation de la position 1 du glucose tétra-protégé 6 par la formation du glycosyle trichloroacétimide 7

La méthode développée par Schmidt, l'activation par les trihalogénoacétimides, permet l'obtention d'excellents rendements tel que le montre le tableau 9 [Schmidt et *al.*, 1985 et 2000]. La formation de produits secondaires a été réduite par l'utilisation de carbonate de césium ( $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ) en tant que base (essai 3). Le  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  a permis, en faisant précipiter le produit dans l'hexane, d'obtenir un produit blanc floconneux. L'utilisation de 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-ène (DBU) (essai 1) ou d'hydrure de sodium (NaH) (essai 2) comme base rendait la réaction très colorée et la séparation du produit formé, le glycosyle, devait être faite par deux chromatographie éclair successives. Après la séparation chromatographique, on obtenait une huile jaunâtre qui contenait beaucoup d'impuretés.

**Tableau 9.** Activation du glucose tétra-protégé 6 avec le trichloroacétonitrile.

Essai	Produit de départ	Base	Rendement	Coloration du milieu réactionnel
1	1-hydroxy-tétra- <i>O</i> -acétylglucose <u>6a</u>	DBU	80%	Coloration violette (Formation de produits secondaires)
2	1-hydroxy-tétra- <i>O</i> -benzoylglucose <u>6b</u>	NaH	85%	Coloration brun-orangé (Formation de produits secondaires)
3		$\text{Cs}_2\text{CO}_3$	85%	Coloration jaunâtre

Le 1-acétimidate-2,3,4,6-tétra-*O*-acétylglucopyranose **7a** a été caractérisé par spectrométrie de masse (annexe 2). L'ion moléculaire n'est pas détecté à cause de la fragmentation rapide des groupements acétates. Le 1-acétimidate-2,3,4,6-tétra-*O*-benzoylglucopyranose **7b** a été caractérisé par spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  (annexe 3) et chaque pic a été assigné à un proton de la molécule. L'assignation des pics est appuyée par les données spectroscopiques Cook et *al.* [Cook et *al.*, 1984].

## 4.6 Glycosylation

La réaction de glycosylation a été effectuée avec des sucres activés protégés par différents groupements ainsi qu'avec l'utilisation de différents catalyseurs. Le tableau 10 montre les essais réalisés avec le glucose protégé par des groupements acétates (1-acétimidate-2,3,4,6-tétra-*O*-acétylglucopyranose **7a**). Tout d'abord, lors des essais 1, 2 et 3, le couplage a été tenté respectivement avec les acides de Lewis  $ZnCl_4$ ,  $SnCl_4$  et  $BF_3 \cdot Et_2O$ . Les produits majoritaires formés furent l' $\alpha$ -allobétulinol I **11** et II **12**. Les produits ont été identifiés par spectrométrie de masse (annexe 2). Comme mentionné dans la section 2.12.1, l'utilisation de bétulinol **2** dans des conditions acides donne lieu au réarrangement du composé en allobétulinol **10** puis en  $\alpha$ -allobétulinol I **11** et II **12**. Le bétulinol **2**, en raison de sa sensibilité aux conditions acides, ne peut être utilisé sous ces conditions à moins que la fonction alcool en position 28 ne soit protégée. Cependant, les acides de Lewis utilisés comme catalyseur ( $SnCl_4$  et  $BF_3 \cdot Et_2O$ ) occasionnant la déprotection des acétates, l' $\alpha$ -allobétulinol I **11** et II **12** ont été tout de même formés lors de l'utilisation de bétulinol 28-*O*-acétate **8a** (essai 2 et 3).

Le couplage a été tenté dans les essais 4 et 5 en utilisant le catalyseur TMSOTf. L'utilisation de ce catalyseur en quantité catalytique (0,2 équivalents) a permis d'éviter la déprotection de l'acétate en position 28 du bétulinol **2**. Cependant, la réaction de glycosylation ne s'est pas (essai 4) ou peu produite (essai 5 : rendement 10%). La faible

formation de glycoside s'explique par la réaction de transestérification des groupements acétates sur l'alcool du triterpène utilisé (section 2.10.1). Dans ces conditions réactionnelles, la transestérification est favorisée par rapport à la glycosylation. Ceci est confirmé par l'analyse des composés formés par la spectrométrie de masse (annexe 2) et la spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  (annexe 3). Le 3,28-*O*-diacétylbétulinol **9a** a été formé lors de l'essai 4 et le 3-*O*-acétyllupéol **18a** a été formé en majorité lors de l'essai 5.

**Tableau 10.** Résultats de la glycosylation avec les groupements protecteurs acétates.

Essai	Alcool terpénique	Catalyseur	Température	Produit obtenu	Rendement
1	Bétulinol <b>2</b>	ZnCl <sub>2</sub> (0,1 éq.)	Micro-ondes 6min. 110°C	Formation $\alpha$ -Allobétulinol I <b>11</b> et II <b>12</b>	Produit majoritaire
2	28- <i>O</i> -acétyl-Bétulinol <b>8a</b>	SnCl <sub>4</sub> (1 éq.)	24°C	Formation $\alpha$ -Allobétulinol I <b>11</b> et II <b>12</b>	82%
3	28- <i>O</i> -acétyl-Bétulinol <b>8a</b>	BF <sub>3</sub> ·Et <sub>2</sub> O (0,15 éq.)	24°C	Formation $\alpha$ -Allobétulinol I <b>11</b> et II <b>12</b>	80%
4	28- <i>O</i> -acétyl-Bétulinol <b>8a</b>	TMSOTf (0,2 éq.)	0°C	3,28- <i>O</i> -diacétyl-bétulinol <b>9a</b>	Produit majoritaire
5	Lupéol <b>3</b>	TMSOTf (0,2 éq.)	24°C	1. 3- <i>O</i> -acétyl-lupéol <b>18a</b> 2. tri- <i>O</i> -acétyl-glucopyranosyl lupéol <b>17a</b>	1. 40% 2. 10%

Le produit de glycosylation de l'essai 5, le tri-*O*-acétyl-glucopyranosyllupéol **17a**, a pu être isolé malgré sa faible quantité. Il a été identifié par le spectromètre de masse (annexe 2). Le spectre de masse indique que la section sucre est sous forme tri-acétylée. Cependant, à cause de la fragmentation rapide des groupements protecteurs acétates en ionisation électronique (EI), le produit pourrait être sous forme tétra-acétylé mais que l'on ne détecte pas l'ion moléculaire. Cela aurait pu être vérifié par l'étude du spectre RMN du composé. Cependant, le produit de glycosylation n'a pas pu être identifié par spectroscopie RMN à cause de la faible quantité isolée.

La réaction a ensuite été effectuée avec le glucose activé protégé par des groupements benzyles **7c** (essai 6) et benzoyles **7b** (essais 7, 8 et 9). Les résultats sont présentés au tableau 11. Lors de l'essai 6, la possibilité de transestérification est nulle puisque les groupements benzyles sont de type non-participants ( $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_6$ ). La glycosylation se produit avec un rendement de 50%. Pour ce qui est des essais 7, 8 et 9, l'encombrement stérique produit par la présence de cycles benzéniques sur le groupement protecteur diminue grandement les possibilités d'une attaque nucléophile sur le carbonyle du groupement protecteur. En effet, la transestérification a été complètement évitée et la glycosylation a pu être effectuée avec des rendements intéressants.

**Tableau 11.** Résultats de la glycosylation avec le catalyseur TMSOTf et le glucose protégé avec des groupements benzyles **7c** et benzoyles **7b**.

Essai	Group. Protecteur	Alcool terpénique	Catalyseur (Quantité)	Temps	Solvant	Produit obtenu	Rendement
6	Benzyle	28- <i>O</i> -acétyl-Bétulinol <b>8a</b>	TMSOTf (0,1 éq.)	1,5 h	DCM	2,3,4,6-tétra- <i>O</i> -benzyl-glucopyranosyl-28- <i>O</i> -acétylbétulinol <b>16c</b>	50%
7	Benzoyle	Lupéol <b>3</b>	TMSOTf (0,1 éq.)	1,5 h	DCM	2,3,4,6-tétra- <i>O</i> -benzoyl-glucopyranosyllupéol <b>17b</b>	57%
8		Acide bétulinique <b>1</b>	TMSOTf (0,1 éq.)	1,5 h	DCM: THF 1:1	Acide 3- <i>O</i> -β-[2,3,4,6-tétra- <i>O</i> -benzoyl-glucopyranosyl] bétulinique <b>14b</b>	59%
9		Acide bétulinique <b>1</b>	TMSOTf (0,1 éq.) Après 1 heure, + 0,15 éq.	3 h	DCM: THF 1:1	Acide glucopyranosyl-bétulinique <b>15</b>  Acide mono-di tri et tétra- <i>O</i> -benzoyl-glucopyranosyl bétulinique	nd

Pour l'essai 9, une optimisation de la réaction de glycosylation a été tentée en augmentant le temps de réaction ainsi que la quantité de catalyseur ajouté. Selon les CCM effectuées, le rendement semble plafonner vers 60%. À la fin de la réaction (3h), la quantité d'acide bétulinique **1** n'ayant pas réagi demeure toujours la même sur CCM que la quantité après 1,5 heure tandis que le glycoside est présent sous forme tétra, tri, di et mono-benzoyle

ainsi que sous forme déprotégée. L'ajout d'une quantité supplémentaire de catalyseur pendant la réaction ne permet pas d'augmenter le rendement car il semble plutôt favoriser l'hydrolyse des groupements protecteurs benzoyles sur les alcools du sucre. L'isolation du glycoside devient complexe étant donné qu'il se retrouve sous ses formes déprotégées. La présence de glycoside sous ces nombreuses formes n'a pas permis le calcul du rendement en glycoside protégé à l'essai 9.

La réaction de glycosylation entre le glycosyle acétimidate **7** et un triterpène semble bien se dérouler lorsque le TMSOTf est utilisé en quantité catalytique (0,1 éq.). Le rendement optimal, évalué par CCM, est obtenu après une période de 1,5 heure. À cause de la présence de produits de polarité semblables qui éluent à la même vitesse (glycoside tétra-benzoyle **14b** et acide bétulinique **1**) une séparation grossière de cette réaction est faite. Après la déprotection, la différence marquée entre la polarité du glycoside déprotégé **15** et celle des réactifs de la glycosylation permet la purification facile du produit glycosidique. Toutefois, le rendement de la réaction des essais 6, 7 et 8 a été calculé à partir d'une séparation exhaustive du glycoside tétra-protégé **14**.

Le glycoside protégé par des groupements benzoyle **14b** n'a pu être isolé avec assez de pureté pour effectuer une analyse par RMN. Le glycoside a été caractérisé après la régénération des alcools de la section sucre (section 4.7). Par contre, le spectre RMN du glycoside tétra-benzyle **14c** est présenté à l'annexe 3. Ce composé a été isolé étant donné son comportement chromatographique différent des réactifs.

#### 4.7 Déprotection; régénération des fonctions alcools de la section sucre

La réaction de déprotection des benzoyles est quantitative. En effet, le rendement obtenu est supérieur à 95%. Les conditions réactionnelles et les résultats sont présentés au tableau 12. La présence d'acide benzoïque formé par le bris des groupements benzoyles est observable par CCM sous exposition à la lumière UV.

**Tableau 12.** Résultats de la régénération des alcools de la section sucre.

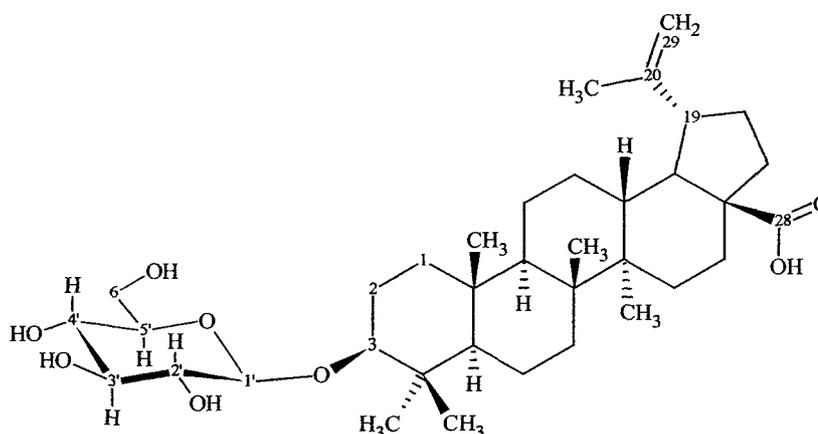
Produit de départ	Solvant	Réactif	Rendement
Acide 2,3,4,6-tétra- <i>O</i> -benzoyl 3- <i>O</i> -β-glucopyranosyl bétulinique <b>14b</b>	MeOH : DCM	NaOH 0,25 M aqueux	Quantitatif
	MeOH : THF		Quantitatif

L'utilisation de NaOH permet de conserver le lien glycosidique intact. L'utilisation d'acide de Lewis au lieu d'une base n'a pas été tentée à cause de la sensibilité des triterpènes aux conditions acides.

Le spectre RMN du proton du produit final confirme l'identité du produit isolé (annexe 3) dont la structure est présentée à la figure 35. Chaque pic a été assigné et permet de confirmer que le produit obtenu est bel et bien l'acide 3-*O*-β-D-

glucopyranosylbétulinique 15. L'assignation des pics est appuyée par les données spectroscopiques de Nunziatina et Pizza [Nunziatina et Pizza, 1997].

Le spectre RMN permet d'observer la pureté anomérique grâce à l'analyse du pic à 4,27 ppm assigné au proton en position 1' de la section sucre. La constante de couplage du pic permet de confirmer la présence de l'anomère  $\beta$  du glycoside 15. En effet, la constante de couplage de 8 Hz entre le proton 1' et 2' est caractéristique de l'anomère  $\beta$  [Curatolo et *al.*, 1983 et Mizuma et *al.*, 1998]. Lorsque le glycoside 15 est sous forme  $\beta$ , les protons en 1' et en 2' sont de type axial-axial. La constante de couplage des protons sous forme axial-axial typique est de 8-10 Hz [Silverstein et Webster, 1998]. Si le glycoside 15 est sous forme  $\alpha$ , le proton en 2' est de type axial et celui en 1' est de type équatorial. La constante de couplage typique pour ces protons (axial-équatorial) est plutôt de 2-3 Hz. Le glucoside formé 15 est donc en conformation  $\beta$ .



**Figure 35.** Structure du produit final de synthèse :

acide 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosylbétulinique 15.

## 4.8 Synthèse totale

L'élaboration d'une voie de synthèse de glycoside entre la partie sucre et le triterpène a été effectuée avec un rendement total de 32%. La figure 36 présente les réactions qui ont été les plus fructueuses pour effectuer la glucosylation de l'acide bétulinique **1**.

Cette synthèse s'effectue en 5 étapes dont la première est la protection des fonctions alcools du glucose **4** par des groupements benzoyles avec le chlorure de benzoyle (75%). Suivie de la régénération de l'alcool en position 1 du glucose penta-benzoyle **5b** qui s'effectue en deux étapes soit la bromation de la position anomérique par le HBr suivie de l'hydrolyse du brome par AgCO<sub>3</sub> (84%). Ensuite, l'activation du glucose tétra-benzoyle **6b** en position 1 avec un groupement trichloroacétimide est générée par la trichloroacétonitrile (85%). Puis, le couplage du sucre activé **7b** avec l'acide bétulinique **1**, est catalysé par le TMSOTf (59%). Finalement, la régénération des alcools de la section sucre de l'acide 3-*O*-β-[2,3,4,6-tétra-*O*-benzoyl-β-glucopyranosyl]bétulinique **14b** par le NaOH afin d'obtenir l'acide 3-*O*-β-D-glucopyranosylbétulinique **15**; étape dont le rendement est quantitatif. Le produit obtenu est de conformation β. La pureté anomérique est obtenue grâce à l'utilisation de groupements voisins participants sur la section sucre.

L'étape limitante c'est-à-dire celle dont le rendement est le plus faible est le couplage des deux parties pour former le glycoside **15** avec un rendement de 59%. Par contre, le triterpène n'ayant pas réagi peut être récupéré ce qui limite les coûts de la synthèse.

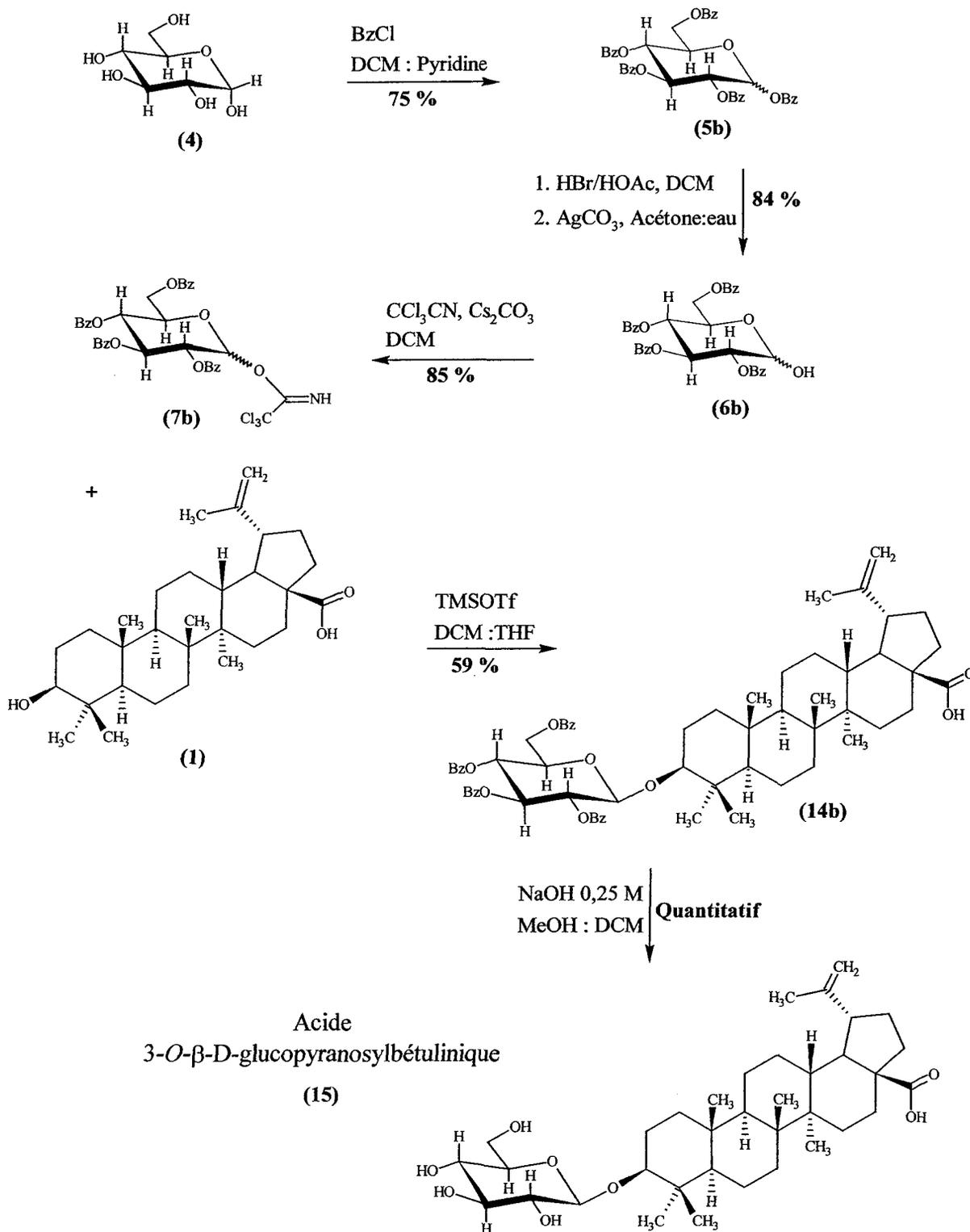


Figure 36. Schéma général de la synthèse de glycoside à partir de l'acide bétulinique **1**.

#### 4.9 Évaluation du coefficient de partage

L'objectif de la recherche étant la synthèse d'un dérivé glycosidique de l'acide bétulinique 1 avec une meilleure hydrosolubilité que le triterpène de départ, l'hydrosolubilité du glycoside a été évaluée par le coefficient de partage. L'évaluation de la distribution de l'acide bétulinique 1, du bétulinol 2 et de l'acide 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosylbétulinique 15 entre deux phases immiscibles (aqueuse-organique) a été faite par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Les résultats du tableau 13 montrent que l'acide bétulinique 1 et le bétulinol 2 ont été retrouvés dans la phase organique tandis que l'acide 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosylbétulinique 15 a été retrouvé dans la phase aqueuse. Ces résultats indiquent que l'ajout d'une section glucose 4 en position 3 de l'acide bétulinique 1 augmente son hydrosolubilité.

**Tableau 13.** Coefficient de partage de l'acide bétulinique 1, du bétulinol 2 et du glycoside 15 déterminé par analyse HPLC.

Produit	Phase octanol [composé] en %	Phase PBS [composé] en %	Coefficient de partage
Acide bétulinique <u>1</u>	100	0	--
Bétulinol <u>2</u>	100	0	--
Glycoside <u>15</u>	0	100	--

Le coefficient de partage n'a pas pu être défini avec précision puisque les produits se sont distribués dans une seule phase. Un essai avec les produits solubilisés à saturation aurait peut être permis de retrouver une quantité de chacun des produits dans les deux phases.

L'analyse du coefficient de partage de l'acide 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosylbétulinique **15** permet de confirmer l'atteinte de l'objectif de la recherche qui consistait en la formation d'un dérivé de l'acide bétulinique **1** avec une meilleure hydrosolubilité que celle du triterpène de départ.

#### 4.10 Évaluation de l'activité anticancéreuse

L'objectif principal de la recherche était de synthétiser un dérivé de l'acide bétulinique **1** avec une meilleure hydrosolubilité qui possède une activité anticancéreuse aussi intéressante que celle du composé de départ. Selon la littérature, la fonction acide en position 28 joue un rôle essentiel dans le mécanisme apoptotique de l'acide bétulinique **1** [Kim et *al.*, 1998; Lee et *al.*, 1998; Chatterjee et *al.*, 1999 et Hata et *al.*, 2002]. Selon ces études, la formation de dérivés à la position 3 de l'acide bétulinique **1** permet de conserver une activité anticancéreuse intéressante. La section 2.7 présente un résumé de ces différentes études. À la lumière de ces informations, la glycosidation a été effectuée sur la fonction hydroxyle en position 3 afin de conserver une activité envers les cellules cancéreuses tout en augmentant l'hydrosolubilité du composé.

L'activité anticancéreuse du glycoside de l'acide bétulinique **1** en position 3 a été testée sur des lignées de cellules cancéreuses du poumon (A549) et du colon (DLD1). Les résultats présentés dans le tableau 14 montrent que l'acide bétulinique **1** et l'acide 3-O- $\beta$ -D-glucoopyranosylbétulinique **15** sont actifs envers les deux lignées cancéreuses. Les cellules A549 sont plus sensibles que les cellules DLD1.

**Tableau 14.** Activité anticancéreuse de l'acide bétulinique **1**  
et de son analogue glycosilé **15**.

Produit	Type de cellule	
	Cancer du poumon (A549) IC <sub>50</sub> <sup>1</sup> (µg/ml) (± erreur standard)	Cancer du colon (DLD1) IC <sub>50</sub> <sup>1</sup> (µg/ml) (± erreur standard)
Acide bétulinique <b>1</b>	6,57 ± 1,22	30,15 ± 24,13
Acide 3-O-β-D-glucopyranosylbétulinique <b>15</b>	12,73 ± 2,54	25,13 ± 4,90

<sup>1</sup> IC<sub>50</sub> : concentration qui inhibe la croissance de 50% des cellules.

Les résultats des tests d'activité anticancéreuse permettent d'affirmer que l'objectif de la recherche a été atteint. En effet, l'acide 3-O-β-D-glucopyranosylbétulinique **15**, plus hydrosoluble que l'acide bétulinique **1**, possède une activité anticancéreuse.

**CHAPITRE 5**  
**CONCLUSION**

L'objectif du projet de recherche était la préparation d'un analogue glycosidique de l'acide bétulinique 1 bioactif afin d'augmenter son hydrosolubilité. La formation d'un dérivé plus hydrosoluble que l'acide bétulinique 1 a été effectuée dans le but d'augmenter la biodisponibilité du composé et d'améliorer sa biodistribution *in vivo*. La synthèse consistait en l'ajout d'une section hydrosoluble et polaire, le glucose 4, à la position 3 de l'acide bétulinique 1 pour former l'acide 3-O-β-D-glucopyranosyl-bétulinique 15. La synthèse a été effectuée en cinq étapes avec un rendement final de 32%.

La formation d'un glycoside de l'acide bétulinique 1 a été effectuée afin d'augmenter l'hydrosolubilité du triterpène de départ. Le gain d'hydrosolubilité du dérivé glycosidique par rapport au triterpène de départ a été évalué en déterminant le coefficient de partage des composés. L'évaluation du coefficient de partage du glycoside, l'acide 3-O-β-D-glucopyranosylbétulinique 15 et de l'acide bétulinique 1, a permis de montrer que le glycoside est beaucoup plus hydrosoluble que le triterpène de départ.

L'activité anticancéreuse du glucoside de l'acide bétulinique 1, l'acide 3-O-β-D-glucopyranosylbétulinique 15, a été évaluée sur des cultures de cellules cancéreuses. Le produit formé, l'acide 3-O-β-D-glucopyranosylbétulinique 15, présente une activité anticancéreuse *in vitro* envers les deux lignées de cellules cancéreuses testées soit celles du cancer du poumon (A549) et du colon (DLD1).

Ces résultats permettent d'envisager que l'acide 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosylbétulinique **15** aurait une biodisponibilité plus grande et une meilleure biodistribution dans un organisme que le composé de départ, l'acide bétulinique **1** et ce, avec une activité anticancéreuse intéressante.

L'utilisation de dérivés glycosidiques de l'acide bétulinique **1** pour le traitement de cancers présente un intérêt. Plusieurs autres études doivent être menées à bien afin de déterminer sa possibilité d'utilisation future. Dans un avenir rapproché, il serait intéressant d'évaluer l'activité anticancéreuse sur d'autres types de cellules cancéreuses ainsi que sur des cellules saines. Ensuite, des analyses de biodistribution *in vivo* du produit pourront être faites afin d'évaluer l'absorption, la distribution du composé dans l'organisme et bien sûr, son activité anticancéreuse *in vivo*.

Également, la voie de synthèse développée lors de cette recherche va permettre la synthèse de glycosides entre l'acide bétulinique **1** et plusieurs autres saccharides et disaccharides. Sans oublier que la synthèse de glycoside pourra être appliquée à d'autres substances qui, malgré leurs activités anticancéreuses intéressantes, montrent une faible hydrosolubilité et/ou biodisponibilité.

## **BIBLIOGRAPHIE**

Amarego, W. L. F. et Perrin, P. L.; Purification of laboratory chemical, Oxford (2000).

Blanchard, J. E. et Withers, S. T.; Rapid screening of the aglycone specificity of glycosidases: applications to enzymatic synthesis of oligosaccharides, *Chemistry & Biology* (2001), 8 (7), 627-633.

Burman, A. C.; Mukherjee, R.; Bala, H. et Khattar, D.; Method and composition for solubilization of pentacyclic triterpenes, (2003), U.S. Patent 6,656,970.

Chatterjee, P.; Pezzuto, J.M. et Samir, A. K.; Glucosidation of betulinic acid by cunninghamella species, *Journal of Natural Products* (1999), 62 (5), 761-763.

Cho, S. H.; Gottlieb, K. et Santhanam, U.; Cosmetic composition containing betulinic acid, (1996), U. S. Patent 5,529,769.

Cichewicz, R. H. et Kouzi, S. A. ; Chemistry, biological activity and chemiotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection, *Medicinal research reviews* (2004), 24 (1), 90-114

Cléophax, J.; Liagre, M.; Loupy, A. et Petit, A.; Application of focused microwaves to the scale-up of solvent free organic reactions, *Organic Process Research & Development* (2000), 4 (6), 498-504.

Cook, S. T.; Khan, R. et Brown, J. M.; A simple route to  $\beta,\beta$ -tetrahalose via trichloroacetimidates, *Journal of Carbohydrate Chemistry* (1984), 3 (2), 343-348.

Curatolo, W.; Neuringer, L. J.; Ruben, D. et Haberkorn, R.; Two-dimensional J-resolved  $^1\text{H}$ -nuclear magnetic resonance spectroscopy of  $\alpha,\beta$ -D-glucose at 500 MHz, *Carbohydrate Research* (1983), 112 (2), 297-300.

Das Gupta, T. K. et Pezzuto, J. M.; Method and composition for selectively inhibiting melanoma using betulinic acid, (1997), U.S. Patent 5,658,947.

David, S. ; Chimie moléculaire et supramoléculaire des sucres, Inter Éditions (1995).

Debatin, K. M.; Fulda, S.; Wiessler, M.; Los, M. et Mier W.; Betulinic acid and derivatives thereof useful for the treatment of neuroectodermal tumor, (2002), U.S. Patent 6,369,109.

Deng, S.; Yu, B.; Xie, J. et Hui, Y.; Highly efficient glycosylation of sapogenins, *Journal of Organic Chemistry* (1999), 64 (19), 7265-7266.

De Rhoode, B. M.; Zuilhof, H.; Franssen, M. C. R.; van der Padt, A. et de Groot, A.; Why are some alcohols easy to glucosylate with  $\beta$ -D-glucosidase while others are not? A computational approach, *Journal of Chemical Society, Perkin translations 2* (2000), 2000 (11), 2217-2224.

Der Marderosian, A. H. et Beutler, J. A.; The review of natural products : the most complete source of natural product information 3<sup>rd</sup> edition, Facts and Comparisons (2002).

Donovan, S. F. et Pescatore, M. C.; Method for measuring the logarithm of the octanol-water partition coefficient by using short octadecyl-poly(vinyl alcohol) high-performance liquid chromatography columns, *Journal of Chromatography A* (2002), 952 (1), 47-61.

Douglas, S. P.; Whitfield, D. M. et Krepinsky, J. J.; Silver trifluoromethanesulfonate (triflate) activation of trichloroacetimidates in glycosylation reactions, *Journal of Carbohydrate Chemistry* (1993), 12 (1), 131-136.

Eckerman, C. et Ekman, R.; Comparison of solvents for extraction and crystallisation of betulinol from birch bark waste, *Paperi ja Puu* (1985), (3), 100-106.

Fortin, D. et Lacoursière, E.; L'herbier médicinal : album d'ethnobotanique québécoise, Série Québec Science Nature, Québec Science (1992).

Fujioka, T.; Kashiwada, Y.; Kilkuskie, R. E.; Cosentino, L. M.; Ballas, L. M.; Jiang, J. B.; Janzen, W. P.; Chen, I.-S. et Lee, K.-H.; Anti-Aids Agents, 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV from *Syzigium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids, *Journal of Natural Products* (1994), 57 (2), 243-247.

Fulda, S.; Jeremias, I.; Pietsch, T. et Debatin, K.-M.; Betulinic acid: a new chemotherapeutic agent in the treatment of neurodermal tumors, *Klinische Paediatric* (1999), 211 (4), 319-322.

Greene, T. W. et Wuts, P. G.; Protective groups in organic synthesis, 3<sup>e</sup> édition, John Wiley & Sons (1999).

Gordiyenko, O. I.; Linnik, T. P. et Gordiyenko, E. O.; Erythrocyte membrane permeability for a series of diols, *Bioelectrochemistry* (2004), 62 (2), 115-118.

Hata, K.; Hori, K. et Takahashi, S.; Differentiation- and Apoptosis-inducing activities by pentacyclic triterpenes on a mouse melanoma cell line, *Journal of natural products* (2002), 65 (5), 645-648.

Helferich, B. et Goerdeler, J.; Zur Synthese von  $\beta$ -D-Glucosiden, *Berichte Deutsche Chemische Gesellschaft* (1940), 75, 532.

Ikan, R.; Natural product : a laboratory guide, Academic Press (1969).

Jeong, H.-J.; Chai, H.-B.; Park, S.-Y. et Kim, D. S. H. L.; Preparation of amino acid conjugates of betulinic acid with activity against human melanoma, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (1999), 9 (8), 1201-1204.

Kim, D. S. H. L.; Pezzuto, J. M. et Pisha, E.; Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (1998), 8 (13), 1707-1712.

Kim, D. S. H. L.; Chen, Z.; Nguyen, T.; Pezzuto, J. M.; Qiu, S. et Lu, Z.-Z.; A concise semi-synthetic approach to betulinic acid from betulin, *Synthetic Communications* (1997), 27 (9), 1607-1612.

Kobayashi, T.; Adachi, S.; Nakanishi, K. et Matsuno, R. ; Synthesis of alkyl glycoside through  $\beta$ -glucosidase-catalysed condensation in an aqueous-organic biphasic system and estimation of the equilibrium constants for their formation, *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic* (2000), 11 (1), 13-21.

Koenigs, W. et Knorr, E.; Ueber einige Derivate des Traubenzuckers und der Galaktose, *Chemische Berichte* (1901), 34, 957-981.

Koto, S.; Morishima, N.; Miyata, Y. et Zen, S.; Preparation of 2,3,4,6-tetra-O-benzyl-D-mannose, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* (1976), 49 (9), 2639-2640.

Lavoie, S. ; Contribution à la synthèse de dérivés de l'acide bétulinique à partir du bétulinol extrait de l'écorce du bouleau blanc (betula papyrifera), UQAC (2001), thèse de maîtrise.

Lavoie, S.; Pichette, A.; Garneau, F.-X.; Girard, M. et Gaudet, D.; Synthesis of betulin derivatives with solid supported reagents, *Synthetic communication* (2001), 31 (10), 1565-1572.

Lee, S.-S.; Chen, W.-C.; Huang, C.-F. et Su, Y.; Preparation and cytotoxic effect of ceanothic acid derivatives, *Journal of Natural Products* (1998), 61 (11), 1343-1347.

Li, T.-S.; Wang, J.-X. et Zheng, X.-J.; Simple synthesis of allobetulin, 28-oxyallobetulin and related biomarkers from betulin and betulinic acid catalysed by solid acids, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I* (1998), 1998 (23), 3957-3965.

Limousin, C.; Cléophax, J.; Petit, A.; Loupy, A. et Lukacs, G.; Solvent-free synthesis of decyl D-glucopyranosides under focused microwave irradiation, *Journal of Carbohydrate Research* (1997), 16 (3), 327-342.

Lubineau, A. et Drouillat, B.; Lithium triflate as a new promoter of glycosylation under neutral conditions, *Journal of Carbohydrate Chemistry* (1997), 16 (7), 1179-1186.

Mayaux, J.-F.; Bousseau, A.; Pauwels, R.; Huet, T.; Hénin, Y.; Dereu, N.; Evers, M.; Soler, F.; Poujade, C.; De Clercq, E. et Le Pecq, J.-B.; Triterpene derivatives that block entry of human immunodeficiency virus type 1 into cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1994), 91 (9), 3564-3568.

Masayuki, T. et Tanaka, Y.; Structure-activity relationship of synthetic diosgenyl monoglycosides, *Phytochemistry* (1991), 30 (8), 2557-2558.

Mizuma, T.; Ohta, K. et Awazu, S.; The  $\beta$ -anomeric and glucose preference of glucose transport carrier for intestinal active absorption of monosaccharide conjugates, *Biochimica et Biophysica Acta* (1994), 1200 (2), 117-122.

Mizuma, T.; Nagamine, Y.; Dobashi, A. et Awazu, S.; Factors that cause the  $\beta$ -anomeric preference of Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter for intestinal transport of monosaccharide conjugates, *Biochimica et Biophysica Acta* (1998), 1381 (3), 340-346.

Morzycki, J. W. et Worjtkielewicz, A.; Synthesis of a cholestane glycoside OSW-1 with potent cytostatic activity, *Carbohydrate Research* (2002), 337 (14), 1269-1274.

Nagourney, R. A.; Su, Y. Z.; Makalinao, A. J.; Ciarolla, A. et Evans, S. S.; Preliminary analysis of betulinic acid in human tumor primary cultures, *Proceedings of the American Association for Cancer Research* (1996), 37 (399), 2724.

Niwa, H.; Hida, T. et Yamada, K.; A new method for cleavage of aliphatic methyl ethers, *Tetrahedron Letters* (1981), 22 (42), 4239-4240.

Nudelman, A.; Herzig, J. et Gottlieb, E. H.; Selective deacetylation of anomeric sugar acetates with tin alkoxides, *Carbohydrate Research* (1987), 162 (1), 145-152.

Nukada, T.; Berces, A.; Zgierski, M. Z. et Whitfield, D. M.; Exploring the mechanism of neighboring group assisted glycosylation reactions, *Journal of American Chemical Society* (1998), 120 (51), 13291-13295.

Nunziatina, D. T. et Pizza, C.; Triterpenoid saponins from Schefflera divaricata, *Journal of Natural Product* (1997), 60 (7), 663-668.

O'Connel, M. M.; Bentley, M. D.; Campbell, C. S. et Cole, B. J. W.; Betulin and lupeol in bark from four white barked birches, *Phytochemistry* (1988), 27 (7), 2175-2176.

Ohara, S. et Hishiyama, S.; Utilization of Triterpenoids I. Synthesis of betulin glycosides by cyclodextrin glycosyltransferase, *Mokuzai Gakkaishi* (1994), 40 (4), 444-451.

Pavlova, N. I.; Savinova, O. V. ; Nikolaeva, S. N.; Boreko, E. I.; Flekhter, O. B.; Antiviral activity of betulin, betulinic and betulonic acids against some enveloped and non-enveloped viruses, *Fitoterapia* (2003), 74 (5), 489-492.

Pezzuto, J. M. et Kim, D. S. H. L.; Methods of manufacturing betulinic acid, (1998), US Patent 5,804,575.

Pichette, A.; Liu, H.; Roy, C.; Tanguay, S.; Simard, F. et Lavoie, S.; Selective oxidation of betulin for the preparation of betulinic acid, an antitumoral compound, accepté en 2004 par *Synthetic Communications*.

Pisha, E.; Chai, H.; Lee, I.-S.; Chagwedera, T. E.; Farnsworth, N.; 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.; Gupta, D. et Pezzuto, J. M.; Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis, *Nature Medecine* (1995), 1 (10), 1046-1051.

Ramadoss, S. S.; Jaggi, M. et Siddiqui, M. J. A.; Use of betulinic acid and its derivatives for inhibiting cancer growth and a method of monitoring this, (2000), US Patent 6,048,847.

Recio, M. C.; Giner, R. M.; Manez, S.; Gueho, J.; Julien, H. R.; Hostettmann, K.; Rios, J. L.; Investigations on the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from *Diospyros leucomelas*, *Planta Medica* (1995), 61 (1), 9-12.

Schmidt, R. R. et Michel, J.; Facile synthesis of  $\alpha$ - and  $\beta$ -O-glycosyl imidates ; preparation of glycosides and disaccharides, *Angewandte Chemie, International edition in english* (1980), 19 (9), 731-732.

Schmidt, R. R.; Stumpp, M. et Michel, J.;  $\alpha$ - and  $\beta$ -D-glucopyranosyl phosphates from O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl trichloroacetimidates, *Tetrahedron Letters* (1982), 23 (4), 405-408.

Schmidt, R. R. et Michel, J.; O-( $\alpha$ -D-glucopyranosyl)trichloroacetimidate as glucosyl donor, *Journal of carbohydrate chemistry* (1985), 4 (2), 141-169.

Schmidt, R. R. et Karl-Heinz J.; Trichloroacetimidates, *Carbohydrate Chemistry and Biology* (2000), 1 (1), 5-59.

SDBS; Integrated Spectral Data Base System for Organic Compounds, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tsukuba, Ibaraki, Japan, <http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/menu-e.html>.

Sears, P. et Wong, C.-H.; Toward automated synthesis of oligosaccharides and glycoproteins, *Science* (2001), 291 (5512), 2344-2350.

Silverstein, R. M. et Webster, F. X.; Spectrometric identification of organic compounds, 6<sup>e</sup> édition, John Wiley & Sons (1998).

Smith, T. A. D.; Facilitative glucose transporter expression in human cancer tissue, *British Journal of Biomedical Science* (1999), 56 (4), 285-292.

Steele, J. C. P.; Warhurst, D. C.; Kirby, G. C. et Simmonds, M. S. J.; In vitro and in vivo evaluation of betulinic acid as an antimalarial, *Phytotherapy Research* (1999), 13 (2), 115-119.

Udeani, G. O.; Zhao, G.-M.; Shin, Y. G.; Cooke, B. P.; Graham, J.; Beecher, C. W. W.; Kinghorn, A. D. et Pezzuto, J. M.; Pharmacokinetics and tissue distribution of betulinic acid in CD-1 mice, *Biopharmaceutics & Drug Disposition* (1999), 20 (8), 379-383.

Urban, F. J.; Moore, B. S. et Breitenbach, R.; Synthesis of tigogenyl  $\beta$ -O-cellobiose-heptaacetate and glycoside tetraacetate via Schmidt's trichloroacetimidate method; some new observations, *Tetrahedron Letters* (1990), 31 (31), 4421-4424.

Uvarova, N. I.; Atopkina, L. N. et Elyakov, G. B.; Synthesis of triterpene and steroid glycosides, *Carbohydrate Research* (1980), 83 (1), 33-42.

Vic, G.; Biton, J.; Le Beller, D.; Michel, J.-M. et Thomas, D.; Enzymatic glucosylation of hydrophobic alcohols in organic medium by the reverse hydrolysis using almond- $\beta$ -D-glucosidase, *Biotechnology and Bioengineering* (1995), 46 (2), 109-116.

Vogel, A. I. et Furniss, B. S.; Vogel's, Textbook of Practical Organic Chemistry, Experiment 5.106, 1,2,3,4,6-penta-O-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranose, Méthode A et B, John Wiley & Sons (1994), 644-645.

Xu, Y.-C.; Bizuneh, A. et Walker, C.; A reagent for selective deprotection of alkyl acetates, *Journal of Organic Chemistry* (1996), 61 (26), 9086-9089.

Yoshiki, K.; Hashimoto, F. H.; Mark, C. L.; Chin-Ho, C.; Patricia E. G. et Kuo-Hsiunget, L.; 1) Betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives as potent anti-HIV agents, *Journal of Medicinal Chemistry* (1996), 39 (5), 1016-1017.

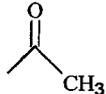
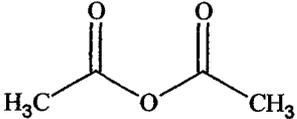
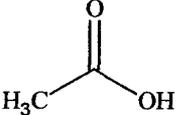
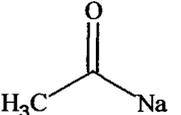
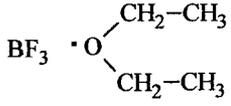
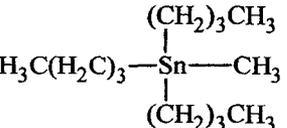
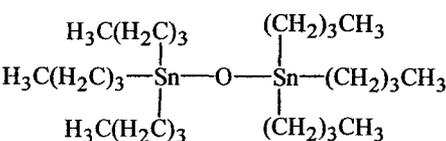
Yu, B. et Tao, H.; Glycosyl trifluoroacetimidates. Part 1 : preparation and application as a new glycosyl donors, *Tetrahedron Letters* (2001), 42 (12), 2405-2407.

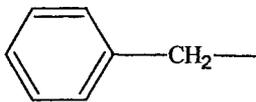
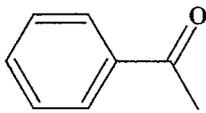
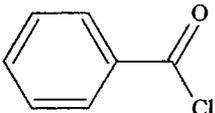
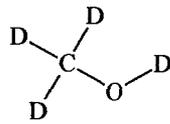
Zeng, Y.; Ning, J. et Kong, F.; Pure  $\alpha$ -linked products can be obtained in high yields in glycosylation with glucosyl trichloroacetimidate donors with a C2 ester capable of neighboring group participation, *Tetrahedron Letters* (2002), 43 (20), 3729-3733.

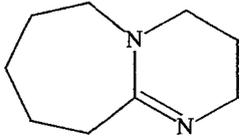
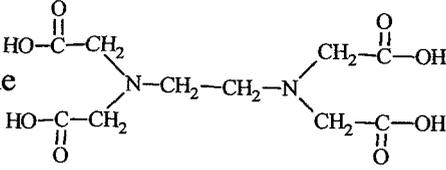
Zuco, V.; Supino, R.; Righetti, S. C.; Cleris, L.; Marchesi, E.; Gambacorti-Passerini, C. et Formelli, F.; Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal - cells, *Cancer Letters* (2002), 175 (1), 17-25.

**ANNEXE 1**

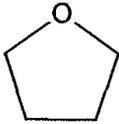
**LISTE DES ABBRÉVIATIONS**

ABBREVIATION	NOM	STRUCTURE
Ac	Acétate	
Ac <sub>2</sub> O	Anhydride acétique	
ACN	Acétonitrile	$\text{H}_3\text{C}-\text{C}\equiv\text{N}$
AcOH	Acide acétique	
AcONa	Acétate de sodium	
AgCO <sub>3</sub>	Carbonate d'argent	
Ag <sub>2</sub> O	Oxyde d'argent	
BF <sub>3</sub> ·Et <sub>2</sub> O	Trifluorure de bore complexé à l'éther diéthylique	
Bu <sub>3</sub> SnOMe	Méthoxide de tributylétain	
((Bu) <sub>3</sub> Sn) <sub>2</sub> O	Oxyde de bis-tributylétain	

Bn	Benzyle	
Bz	Benzoyle	
BzCl	Chlorure de benzoyle	
CaH <sub>2</sub>	Hydruure de calcium	
CAM	Molybdate d'ammonium cérique	
CCM	Chromatographie sur couche mince	
Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonate de césium	Cs <sub>2</sub> —CO <sub>3</sub>
CDCl <sub>3</sub>	Chloroforme deutéré	CDCl <sub>3</sub>
CD <sub>3</sub> OD	Méthanol deutéré	
CHCl <sub>3</sub>	Chloroforme	CHCl <sub>3</sub>
CN-CCl <sub>3</sub>	Trichloroacétonitrile	Cl <sub>3</sub> C—C≡N

DBU	1,8-Diazabicyclo[5,4,0]undec-7-ène	
DCM	Dichlorométhane	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique	
EI	Ionisation Électronique	
$\text{Et}_3\text{N}$	Triéthylamine	
GC-MS	Chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse	
HBr	Acide bromique	
HCl	Acide chlorhydrique	
$\text{HClO}_4$	Acide perchlorique	
$\text{Hg}(\text{CN})_2$	Cyanure de mercure (II)	
$\text{Hg}(\text{OAc})_2$	Acétate de mercure (II)	

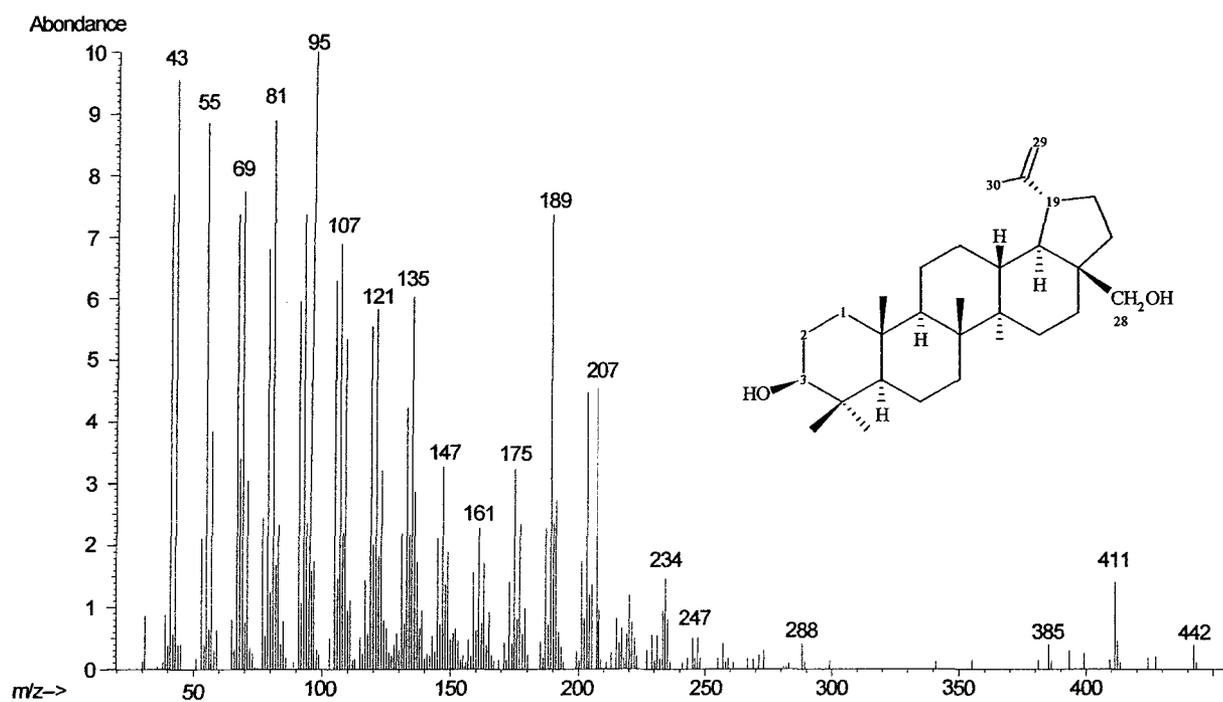
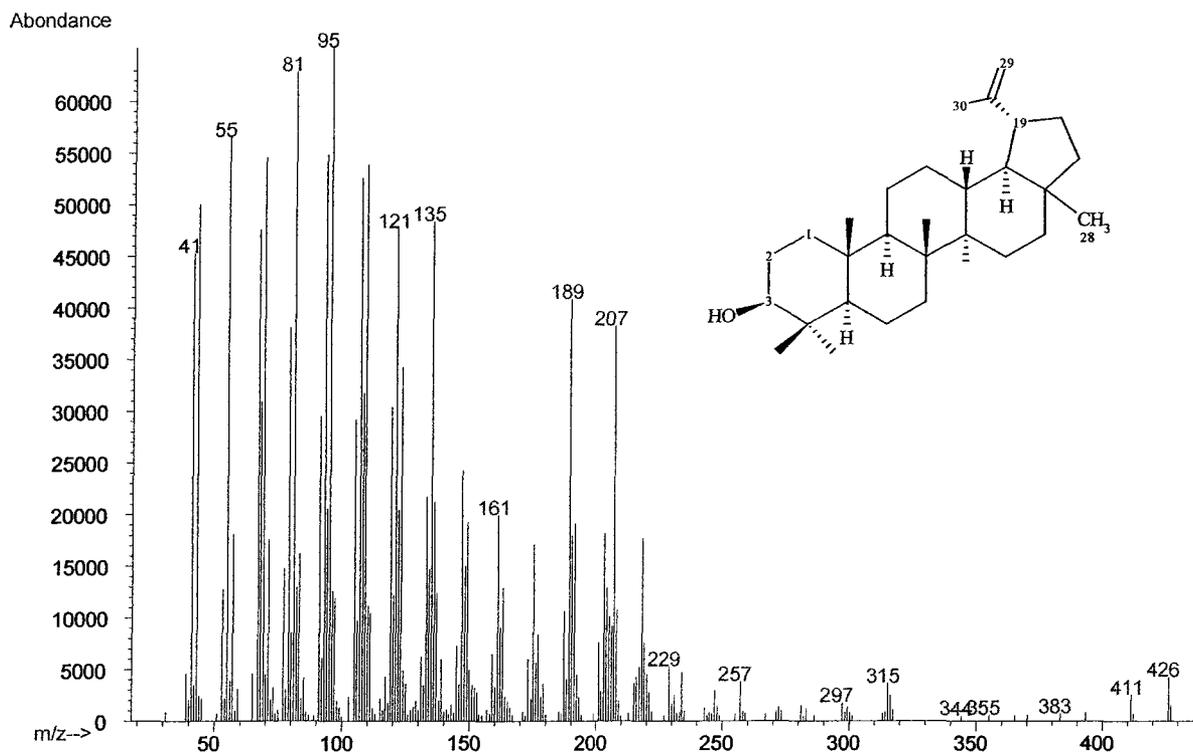
Hg(OH) <sub>2</sub>	Hydroxyde de mercure (II)	
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance	
IC <sub>50</sub>	Concentration inhibant 50% de la croissance des cellules	
LiOTf	Triflate de lithium (Trifluorométhanesulfonate de lithium)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{H}_3\text{C}-\text{Si}-\text{O}-\text{Li} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$
MEM	Milieu essentiel minimum	
MeOH	Méthanol	
Mg(OMe) <sub>2</sub>	Méthoxide de magnésium	
MgSO <sub>4</sub>	Sulfate de magnésium	
MS	Spectromètre de Masse	
NaCl	Chlorure de sodium	
NaH	Hydruure de sodium	

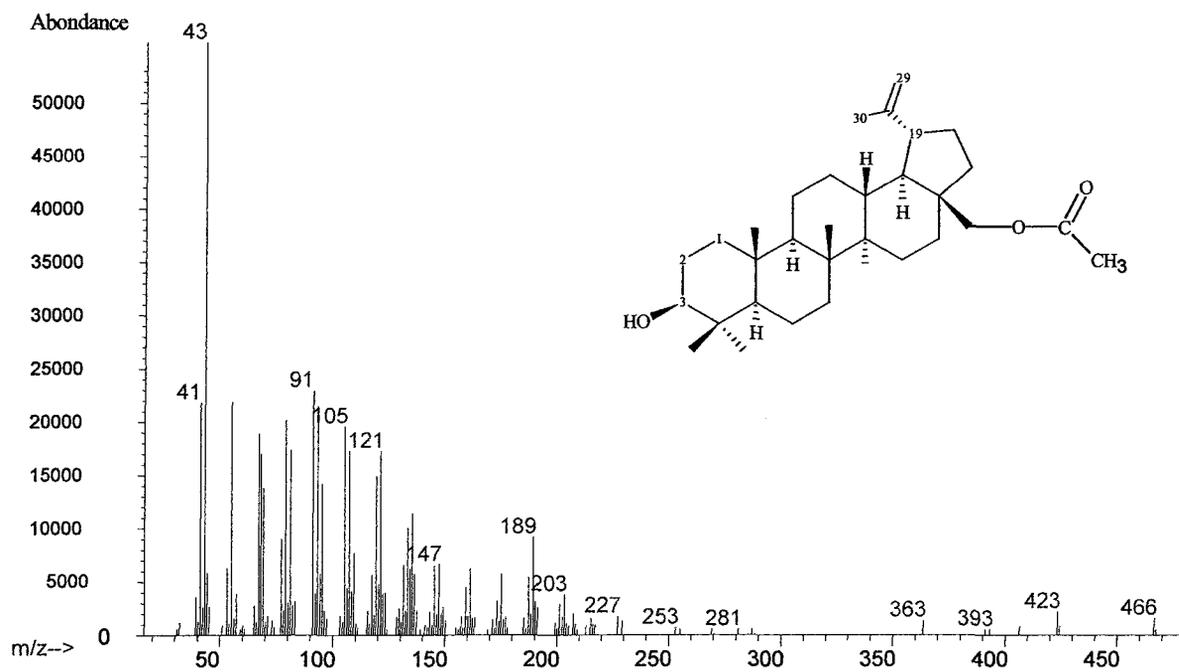
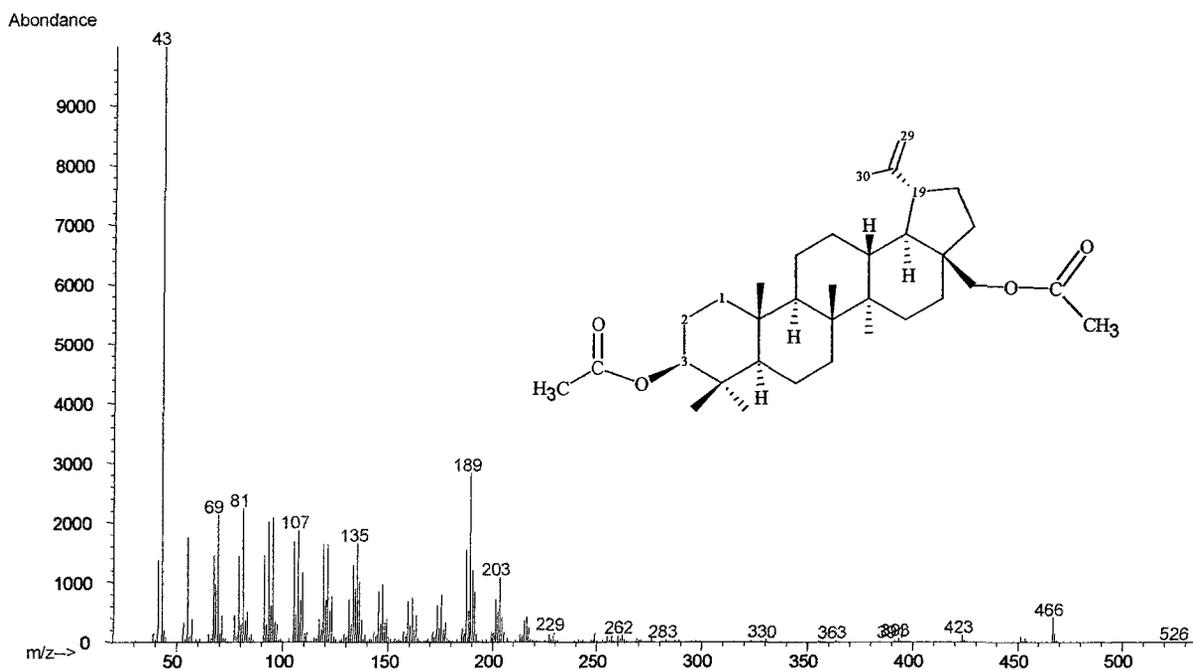
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonate de sodium	
NaOMe	Méthoxide de sodium	
PBS	Solution saline tamponnée avec phosphate (pH = 7,2)	
RMN	Résonance magnétique nucléaire	
SDS	Dodecyl sulfate de sodium	$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{S}(=\text{O})_2-\text{ONa}$
SVF	Sérum de veau foetal	
THF	Tétrahydrofuran	
TMS	Tétraméthylsilane	
TMSOTf	Triméthylsilyl triflate (Triméthylsilyl trifluorométhanesulfonate)	$\text{H}_3\text{C}-\text{Si}(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{S}(=\text{O})_2-\text{CF}_3$
UV	Ultraviolet	

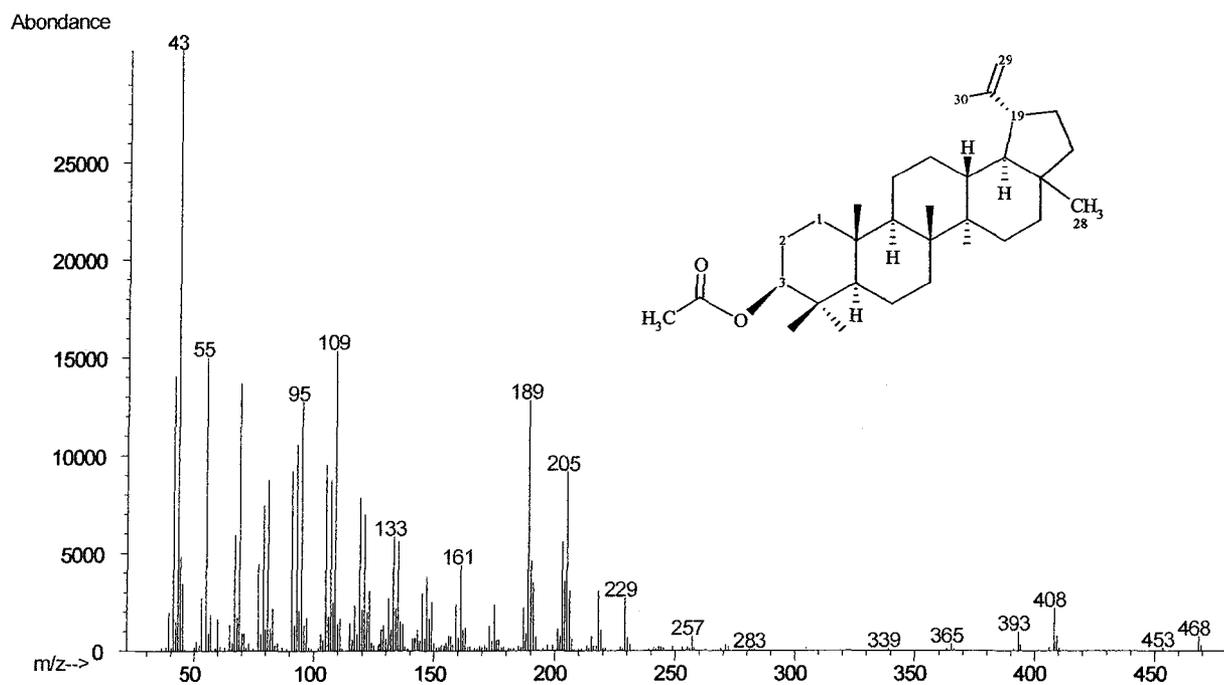
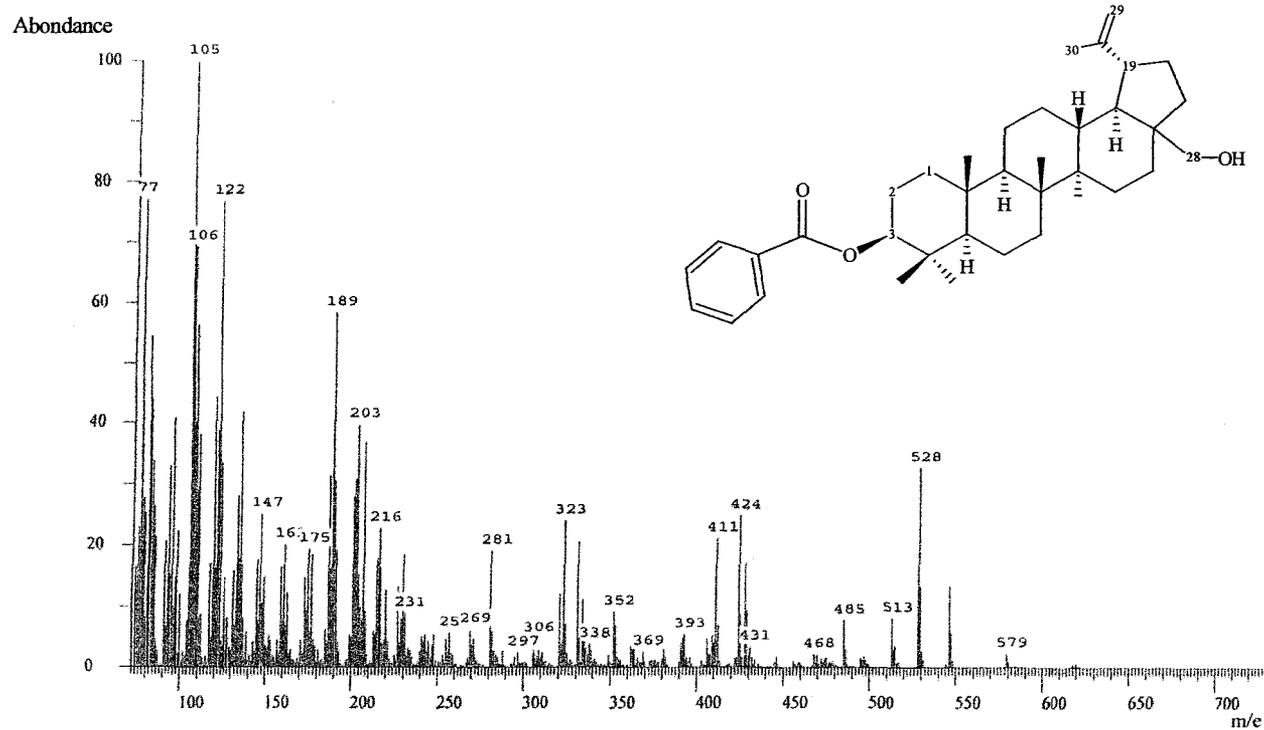
**LISTE DES ABRÉVIATIONS POUR LA SPECTROSCOPIE RMN**

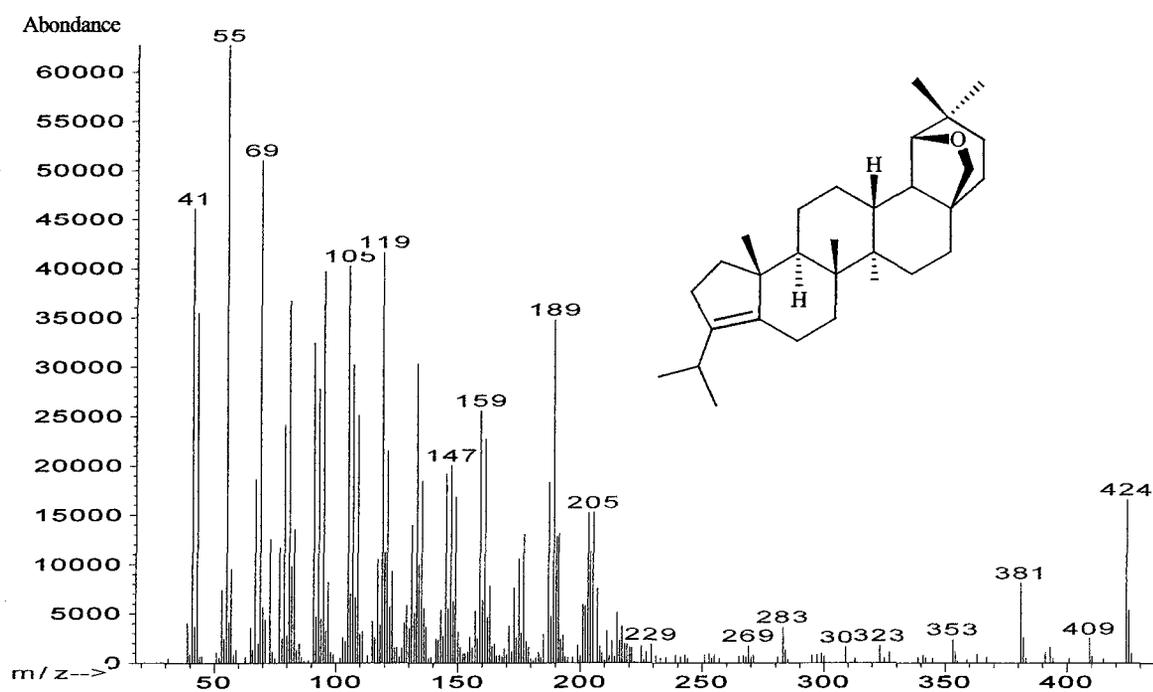
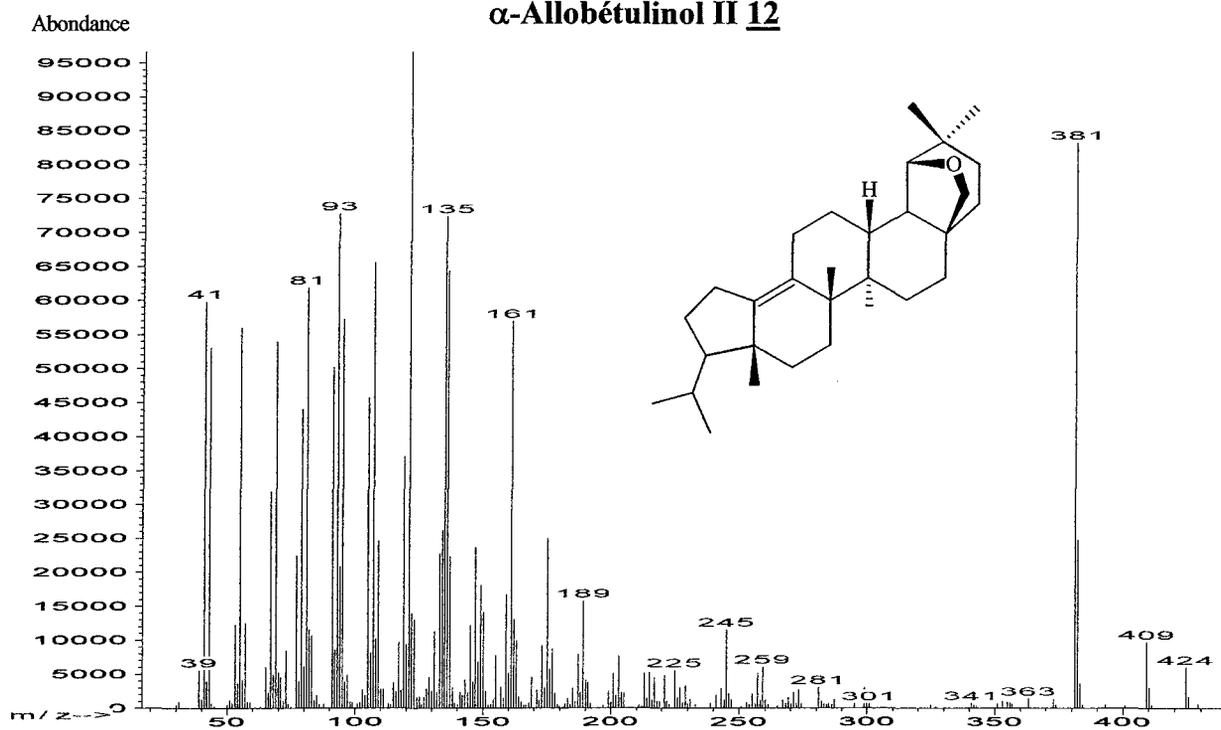
$\delta$	Déplacement chimique
ppm	Parties par million
J	Constante de couplage (Hertz)
Hz	Hertz
s	Singulet
d	Doublet
t	Triplet
m	Multiplet
c	pics complexes

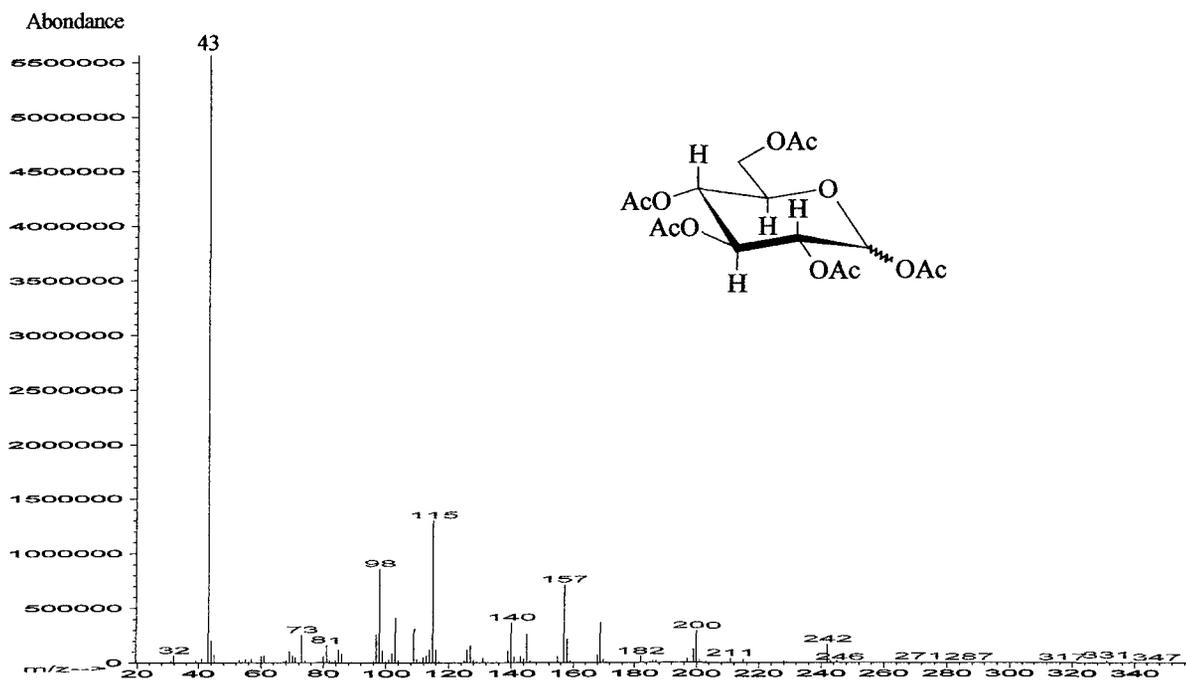
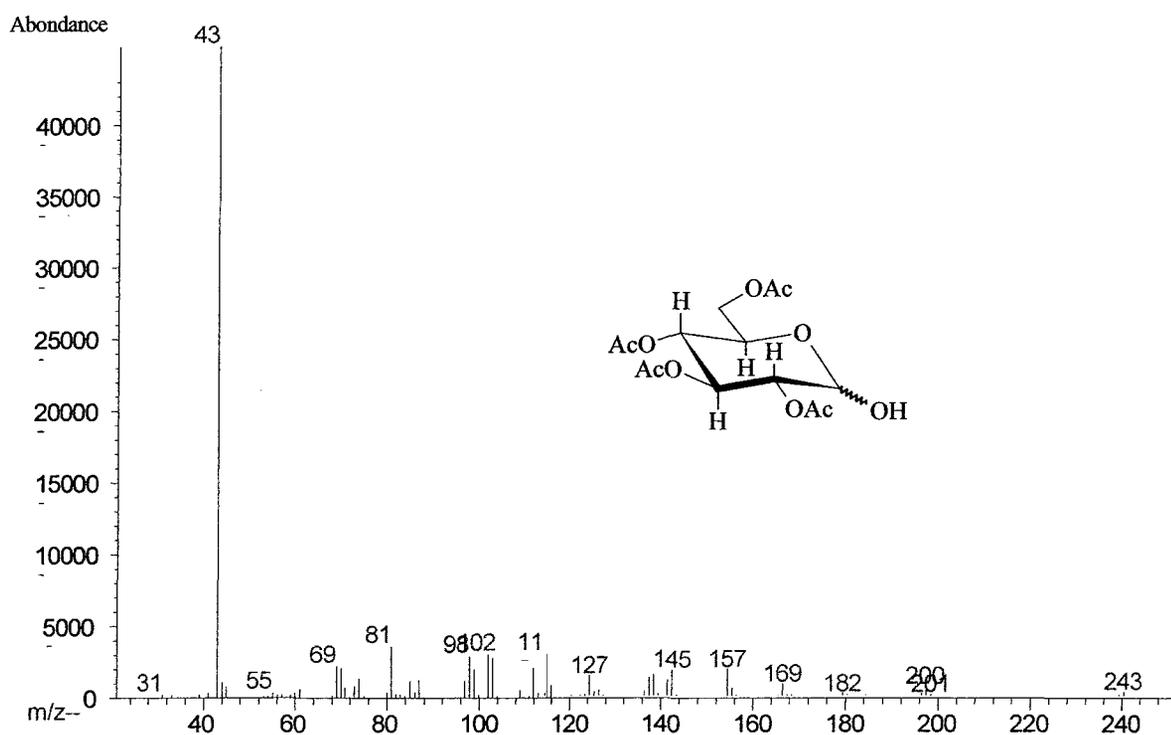
**ANNEXE 2**  
**SPECTRES DE MASSE**

**Bétulinol 2****Lupéol 3**

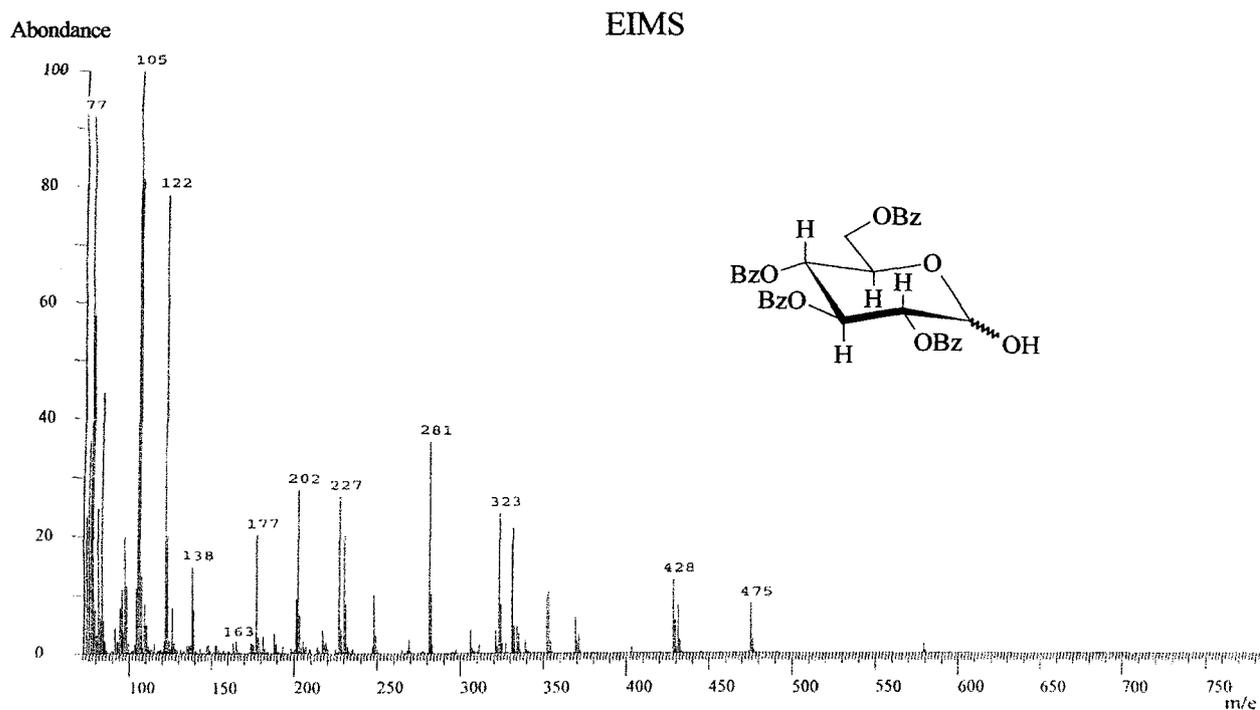
**28-O-acétylbétulinol 8a****3,28-O-diacétylbétulinol 9a**

**3-O-acétyllupéol 18a****28-O-benzoylbétulinol 18b**

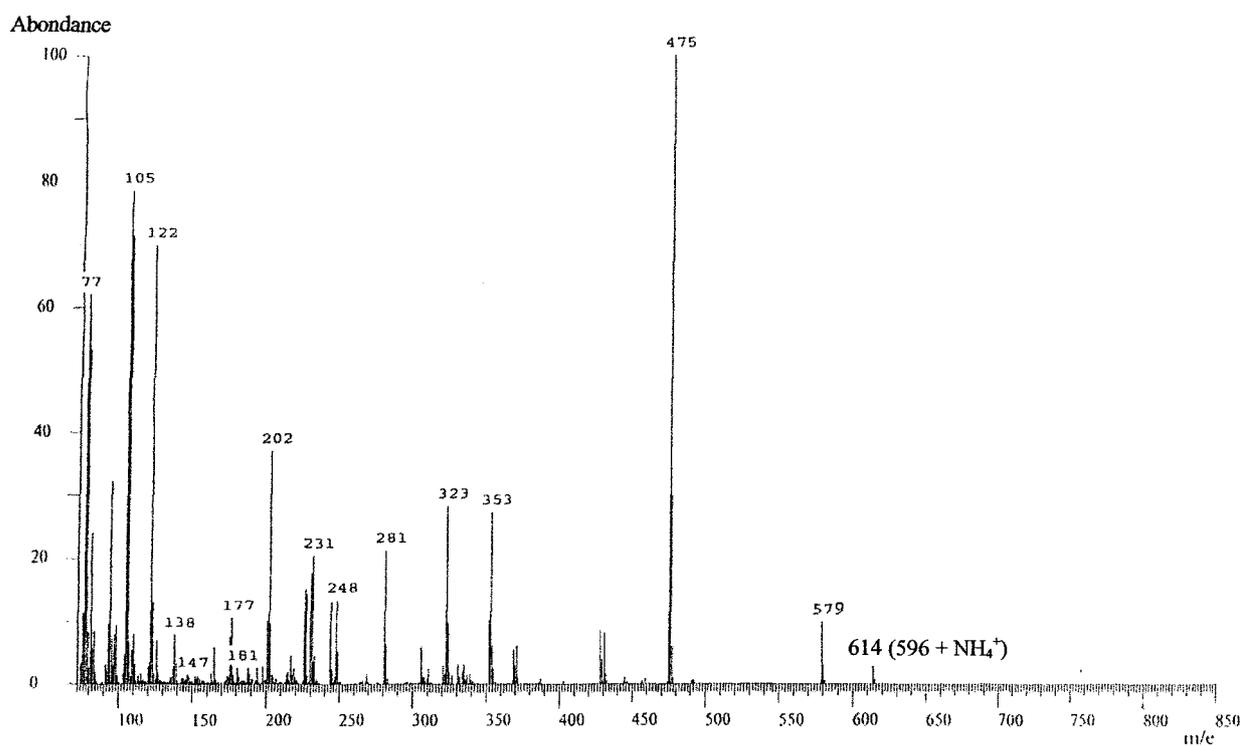
**$\alpha$ -Allobétulinol I 11** **$\alpha$ -Allobétulinol II 12**

**1,2,3,4,6-penta-*O*-acétylglucopyranose 5a****1-hydroxy-2,3,4,6-tétra-*O*-acétylglucopyranose 6a**

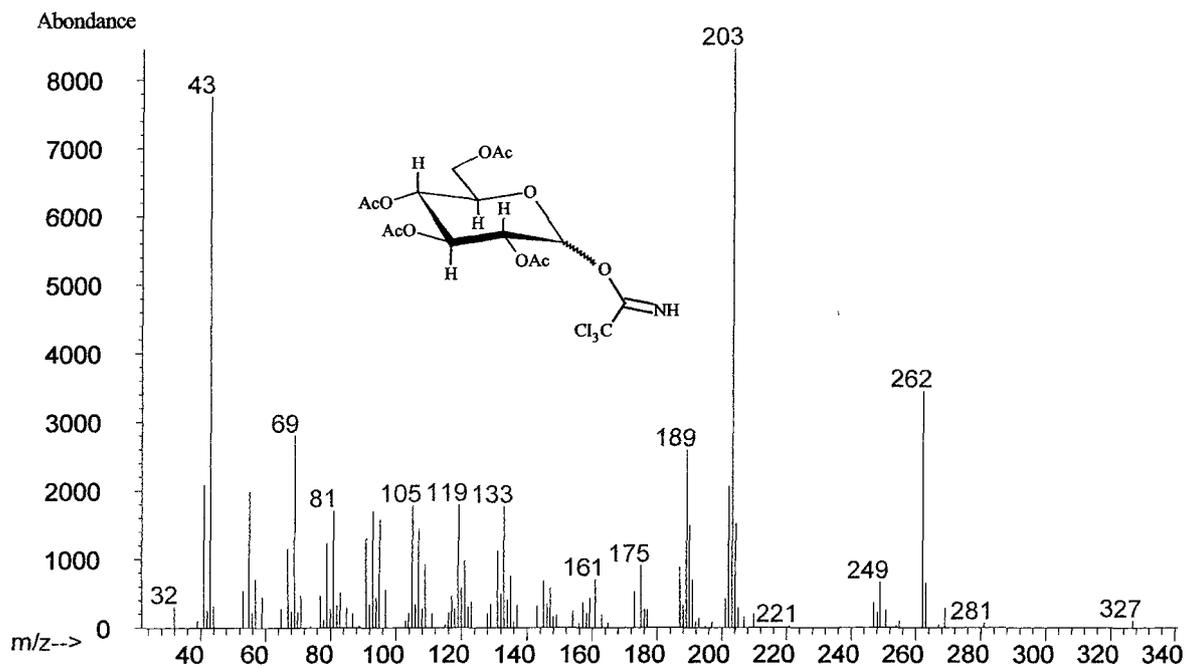
**1-hydroxy-2,3,4,6-tétra-O-benzoylglucopyranose 6b**



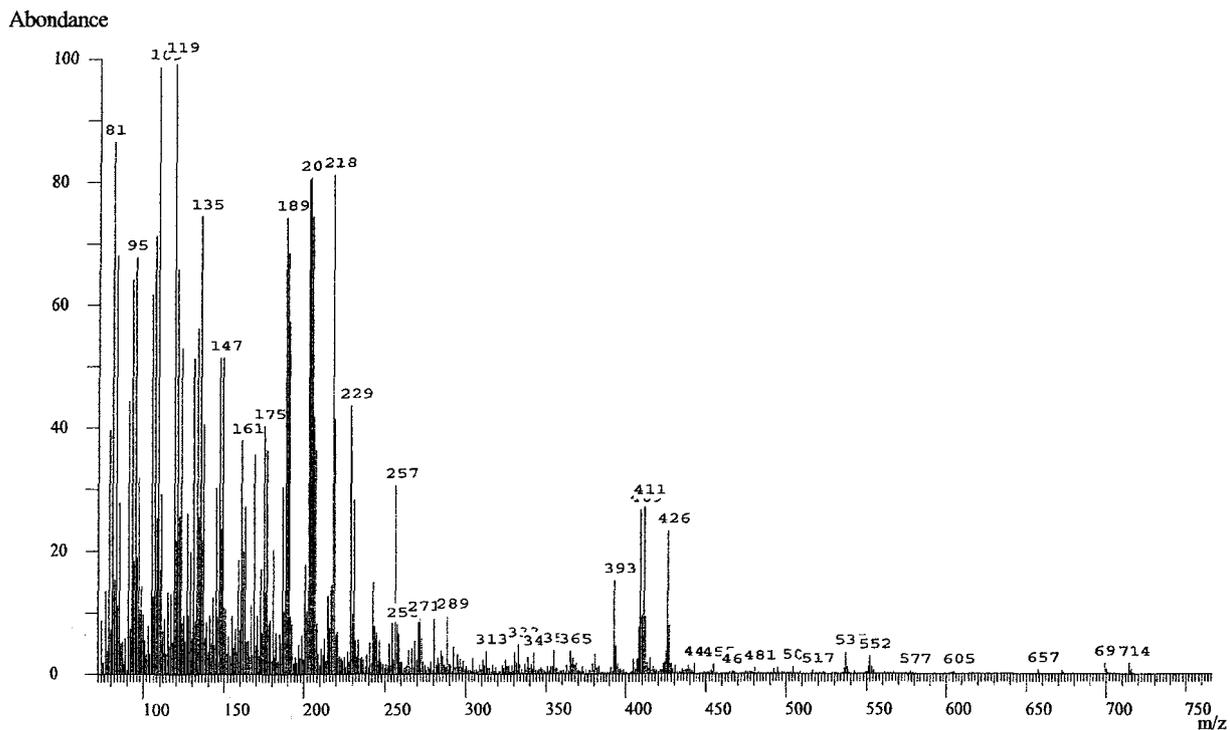
Ionisation chimique : ammoniac



**1-acétimide-2,3,4,6-tétra-O-acétylglucoopyranose 7a**



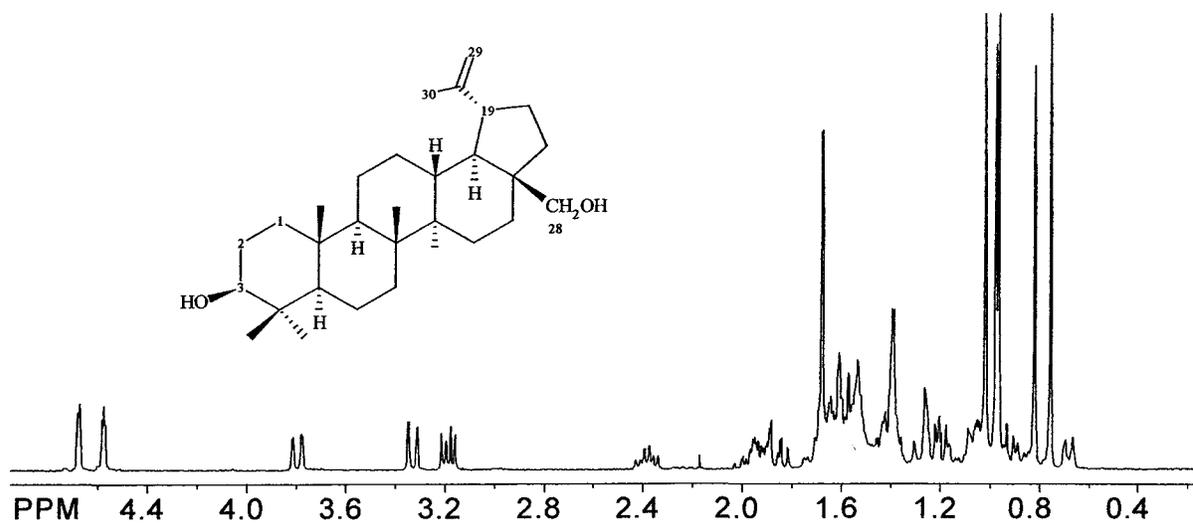
**3-O-[tri-O-acétylglucoopyranosyl]-lupéol 17a**



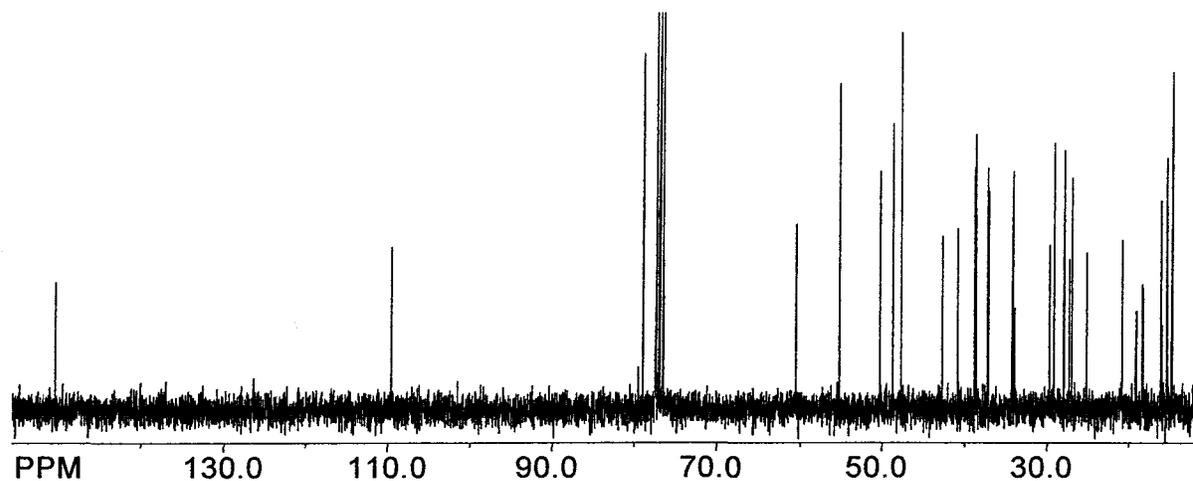
**ANNEXE 3**

**SPECTRES DE RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE**

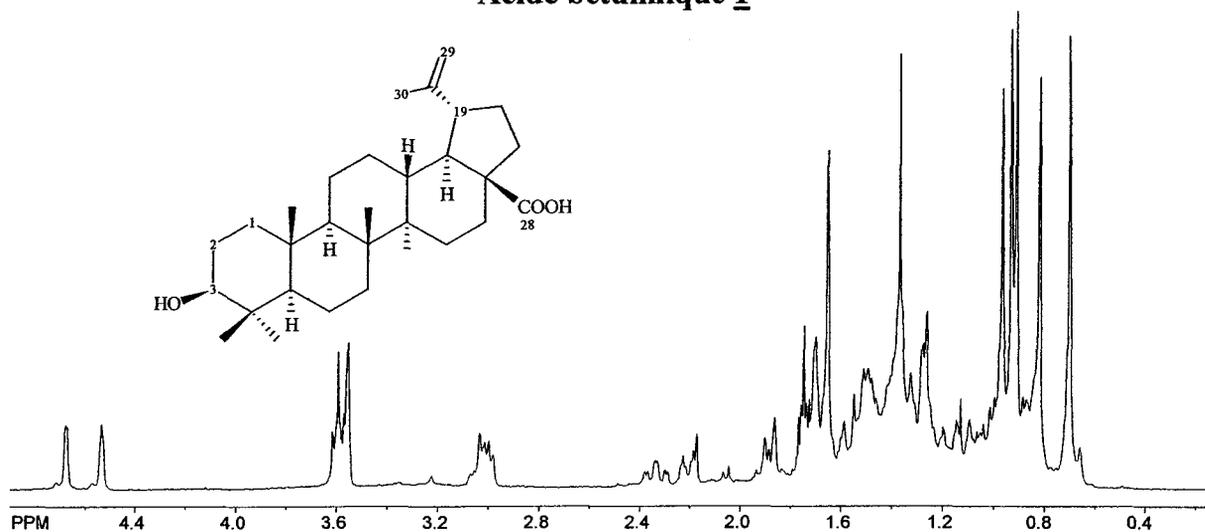
### Bétulinol 2



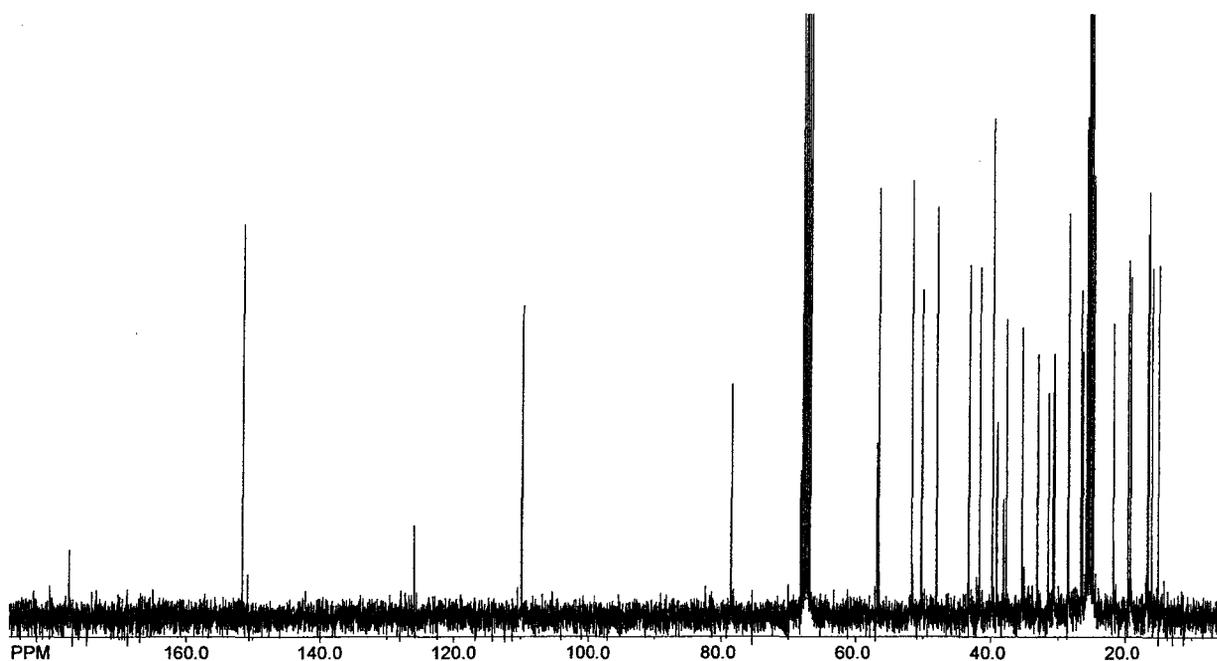
**RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :**  $\delta$  4.68 (1 H, s, H-29), 4.58 (1 H, s, H-29), 3.82 (1 H, d,  $J = 10.9$  Hz, H-28), 3.33 (1 H, d,  $J = 10.9$  Hz, H-28), 3.19 (1 H, dd,  $J = 10.8$  et  $5.2$  Hz, H-3), 2.39 (1 H, td,  $J = 10.4$  et  $5.8$  Hz, H-19), 1.04-2.04 (26 H, c, CH et  $\text{CH}_2$  du squelette), 1.68 (3 H, s,  $\text{CH}_3$ -30), 0.76, 0.82, 0.97, 0.98, 1.02 (tous 3 H, s,  $5 \times \text{CH}_3$ ) [Tinto, W. F. *et al.*; 1992].



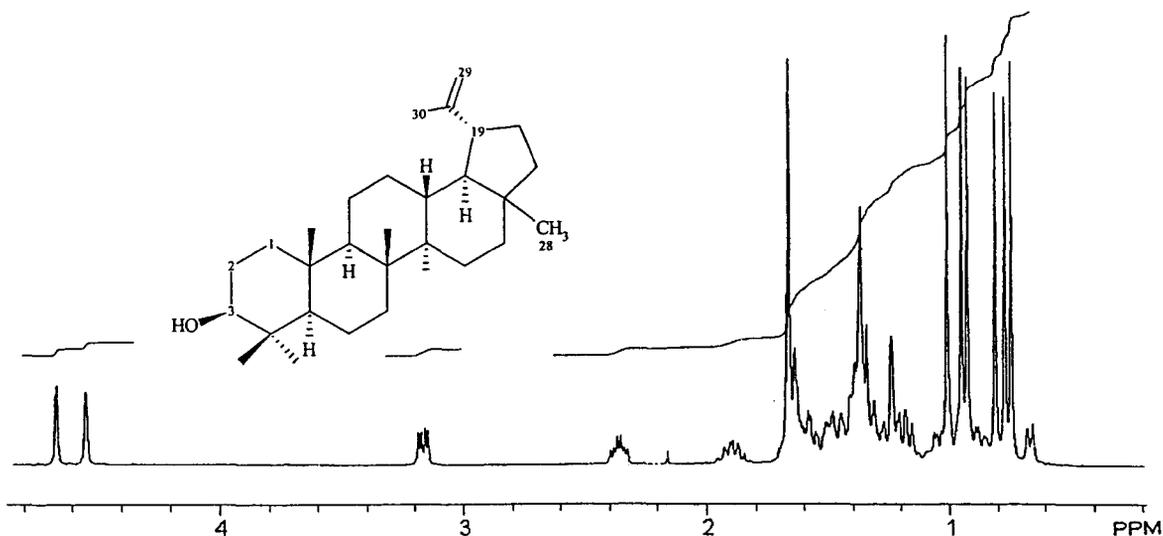
**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :**  $\delta$  150.5 (20), 109.7 (29), 79.0 (3), 60.6 (28), 55.3 (5), 50.4 (9), 48.8 (19), 47.8 (18), 47.8 (17), 42.7 (14), 40.9 (8), 38.9 (4), 38.7 (1), 37.3 (10), 37.2 (13), 34.3 (7), 34.0 (22), 29.8 (21), 29.2 (16), 28.0 (23), 27.4 (2), 27.1 (15), 25.2 (12), 20.8 (11), 19.1 (30), 18.3 (6), 16.1 (25), 16.0 (26), 15.3 (24), 14.8 (27) [Sholichin, M. *et al.*; 1980].

Acide bétulinique 1

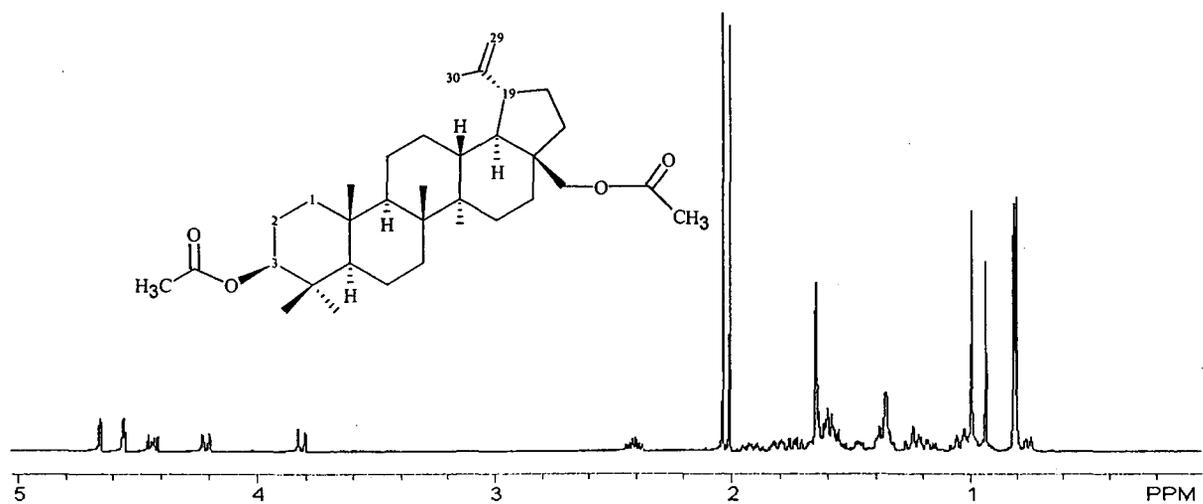
**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, THF-d<sub>8</sub>) :** δ 4.68 (1 H, s, H-29), 4.53 (1 H, s, H-29), 3.02 (1 H, c, H-3), 2.33 (1 H, m, H-19), 1.02-2.26 (26 H, c, CH et CH<sub>2</sub> du squelette), 1.66 (3 H, s, CH<sub>3</sub>-30), 0.70, 0.82, 0.91, 0.93, 0.97 (tous 3 H, s, 5 × CH<sub>3</sub>).



**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, THF-d<sub>8</sub>) :** δ 177.6, 151.6, 109.9, 78.5, 56.6, 51.7, 50.2, 48.0, 43.3, 41.7, 39.8, 39.7, 39.1, 37.7, 35.4, 33.1, 31.5, 30.7, 30.6, 28.5, 28.5, 26.6, 26.4, 21.8, 19.6, 19.3, 16.7, 16.5, 16.1, 15.0.

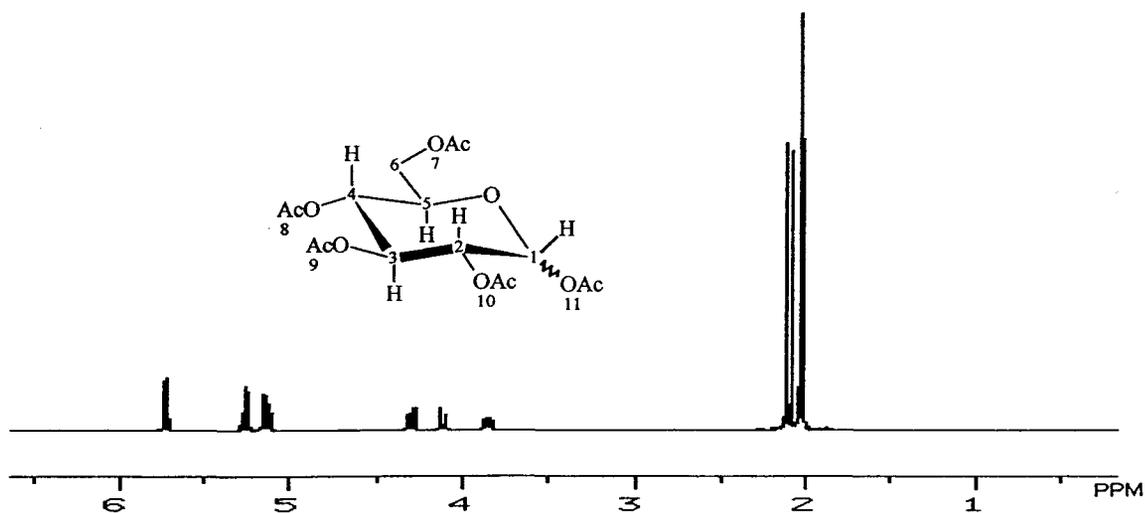
Lupéol 3

**RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** :  $\delta$  4.70 (1H, s, H-29), 4.57 (1H, s, H-29), 3.19 (1H, dd,  $J = 10.6$  et  $5.4$  Hz, H-3), 2.38 (1H, td,  $J = 10.6$  et  $5.8$  Hz, H-19), 1.02-1.95 (26 H, c, CH et CH<sub>2</sub> du squelette du lupane), 1.68 (3H, s, CH<sub>3</sub>-30), 0.76, 0.80, 0.83, 0.95, 0.98, 1.03 (6  $\times$  3H, s, 6  $\times$  CH<sub>3</sub>).

3,28-O-diacétylbétulinol 9a

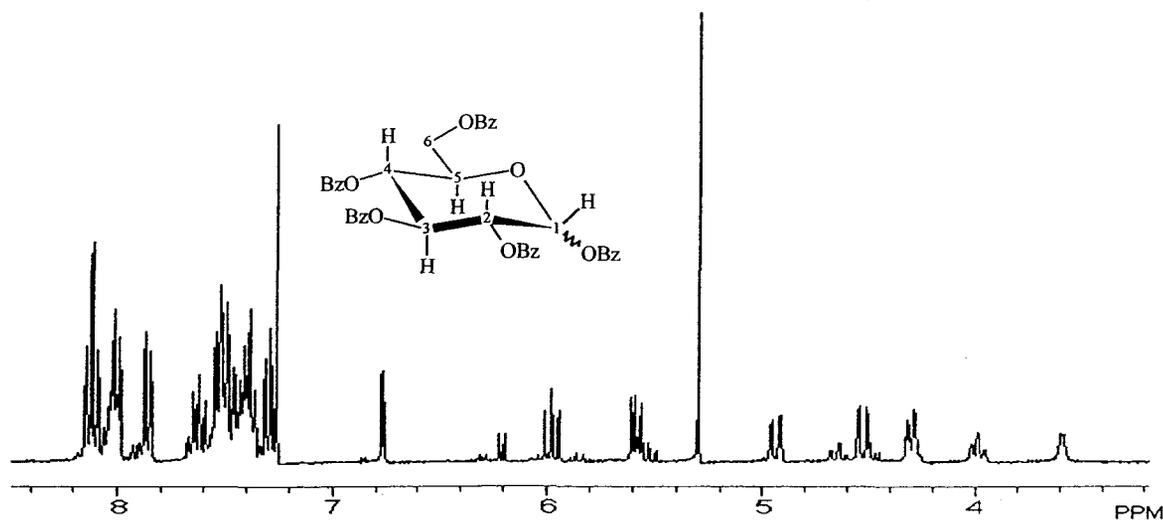
**RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** :  $\delta$  4.66 (1H, s, H-29), 4.56 (1H, s, H-29), 4.44 (1H, dd,  $J=10.4$  et  $5.6$  Hz, H-3), 4.22 (1H, d,  $J=11.2$  Hz, H-28), 3.82 (1H, d,  $J=11.1$  Hz, H-28), 2.41 (1H, td,  $J=11.1$  et  $5.5$  Hz, H-19), 2.04 (3H, s, CH<sub>3</sub>-Acétate), 2.01 (3H, s, CH<sub>3</sub>-Acétate), 1.02-2.95 (26 H, c, CH et CH<sub>2</sub> du squelette du lupane), 1.65 (3H, s, CH<sub>3</sub>-30), 1.0, 0.93, 0.82, 0.81, 0.80 (5  $\times$  3H, s, 5  $\times$  CH<sub>3</sub>).

**1,2,3,4,6-penta-*O*-acetylglucopyranose 5a**



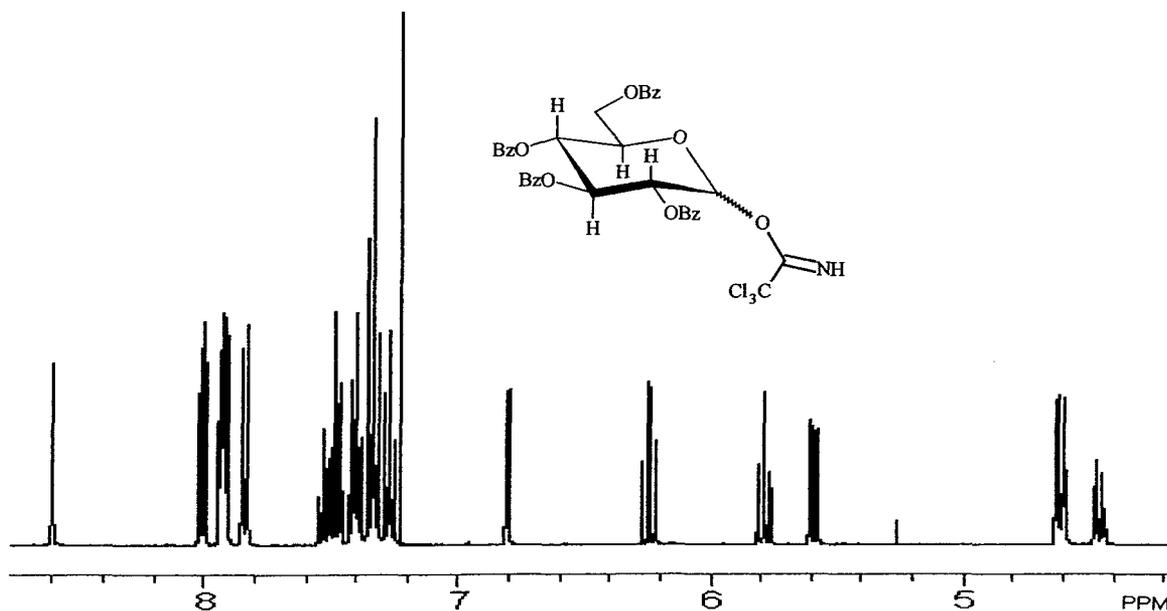
**RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** :  $\delta$  5.73 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz, H-1), 5.26 (1H, t,  $J = 9.4$  Hz, H-2), 5.15 (1H, m, H-3), 5.12 (1H, m, H-4), 4.30 (1H, dd,  $J = 12.6$  et  $4.5$ , H-6), 4.12 (1H,  $J = 12.4$  et  $2.2$  Hz, H-6), 3.86 (1H, m, H-5), 2.12 (3H, s, 3H-7), 2.10 (3H, s, 3H-11), 2.04 (6H, s, 3H-8 et 3H-10), 2.02 (3H, s, 3H-9).

**1,2,3,4,6-penta-benzoylglucopyranose 5b**



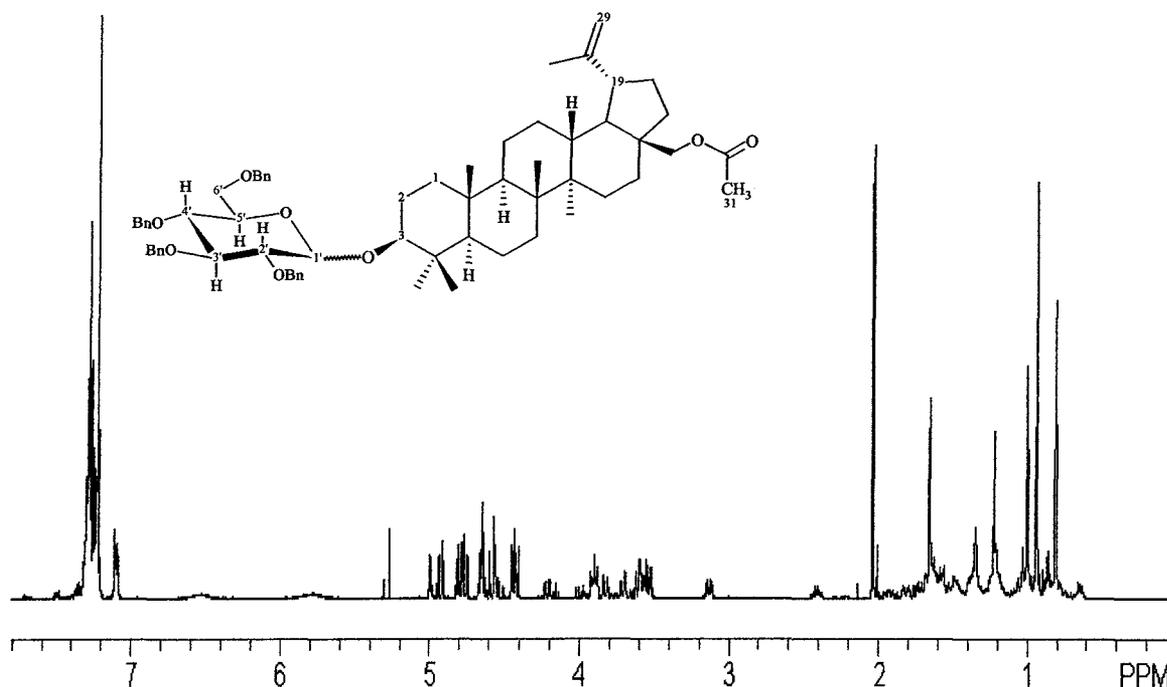
**RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** :  $\delta$  7.25–8.17 (15 H, protons aromatiques des benzoyles), 3.6–6.77 : 7H sur le cycle [6.77 (1H, d,  $J = 3.7$  Hz), 5.97 (1H, t,  $J = 9.7$  Hz), 5.57 (1H, m), 4.93 (1H, dd,  $J = 12.2$  et  $3.4$  Hz), 4.53 (1H, dd,  $J = 13$  et  $2.2$  Hz), 4.30 (1H, td,  $J = 9.7$  et  $2.2$  Hz), 3.98 (1H, t,  $J = 9.6$  Hz), 3.60 (1H, d,  $J = 3.7$  Hz)].

**1-acétimidate-2,3,4,6-tétra-O-benzoylglucopyranose 7b**



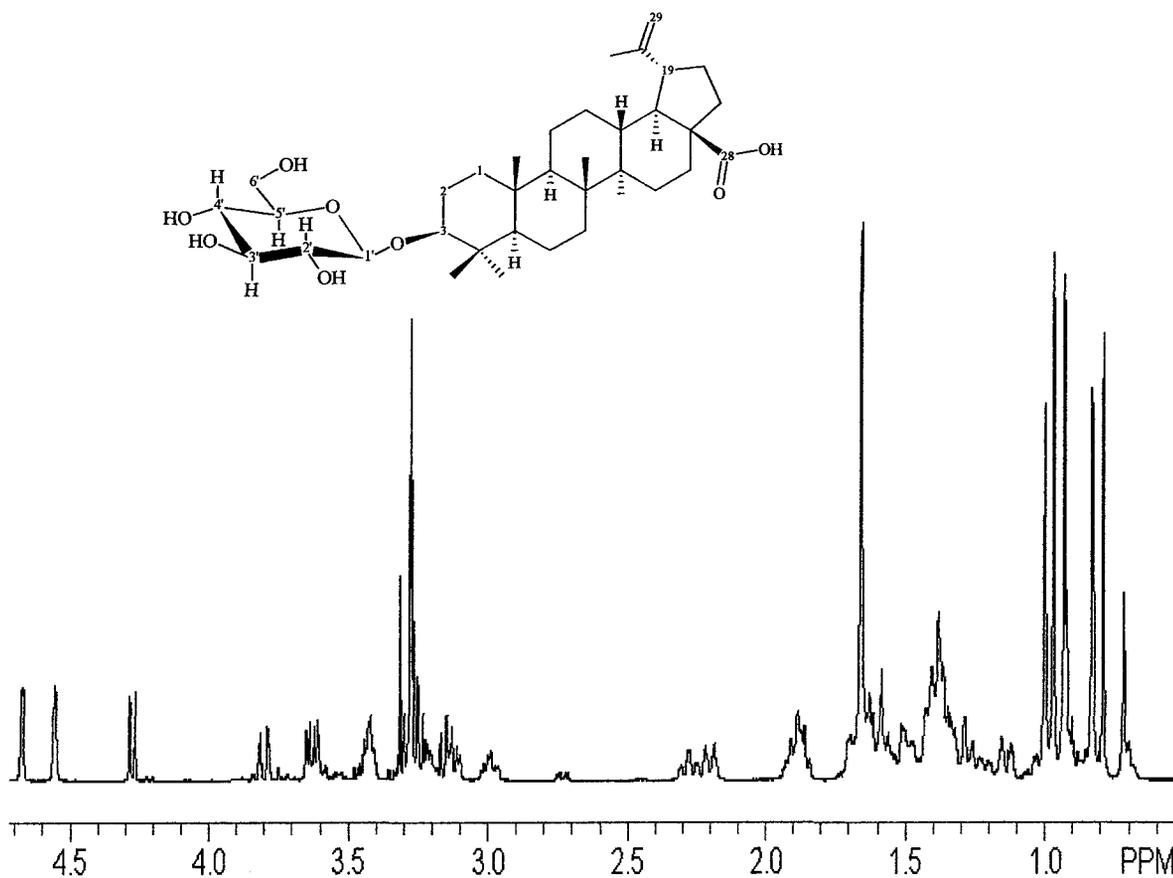
**RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :**  $\delta$  8.30 (1H, s, H sur l'azote), 7.99 (8H, c, H des cycles benzéniques en méta du CO), 7.54 (8H, c, H en ortho), 7.26 (4H, c, H en para), 4.46-6.81 : 7 H sur le cycle [6.81 (1H, d, J = 3.5 Hz), 6.22 (1H, dd, J = 8.7 et 3.5 Hz), 5.78 (1H, t, J = 8.7 Hz), 5.59 (1H, dd, J = 10.4 et 3.5), 4.62 (2H, m, H en 6'), 4.46 (1H, m)].

**3-O-(2,3,4,6-tétra-O-benzyl)glucopyranosylbétulinol 16b**



**RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** :  $\delta$  7.29, 7.23 et 7,11 (20H, c, H des cycles aromatiques), 4.4-5.0 (11H, c, 4 CH<sub>2</sub> groupement benzyle, 2H en 29 et H-1'), 4.22-3.5 (6H, c, H-2', 3', 4', 5', 6'a et b), 3.15 (1H, td, H-3), 2.27 (1H, td, H-19), 2.04 (3H, s, CH<sub>3</sub> de l'acétate-31), 1.65 (3H, s, CH<sub>3</sub>-30), 1.95-1.02 (26 H, c, CH et CH<sub>2</sub> du squelette du lupane), 0.98, 0.92, 0.83, 0.78, 0.71 (5  $\times$  3H, s, 5  $\times$  CH<sub>3</sub>).

**Acide 3-O-β-D-glucopyranosylbétulinique 15**



**RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) :** δ 4.67 (1H, s, H-29), 4.55 (1H, s, H-29), 4.27 (1H, d, J = 8 Hz, H-1' pour anomère β), 3.80 (1H, dd, J = 12 Hz et 2.2 Hz, 6'), 3.63 (1H, dd, J = 12.0 et 5.3 Hz, 6'), 3.41 (1H, m, H-5'), 3.28 (1H, t, J = 10.5, H-4'), 3.20 (1H, m, 3'), 3.14 (1H, dd, H-2'), 2.98 (1H, td, J = 11 et 3.7 Hz, H-3), 2.73 (1H, dd, J = 12 et 4.1, H-2), 2.25 (1H, m, H-19), 1.65 (3H, s, CH<sub>3</sub>-30), 1.95-1.02 (26 H, c, CH et CH<sub>2</sub> du squelette du lupane) 0.98, 0.92, 0.83, 0.78, 0.71 (5 × 3H, s, 5 × CH<sub>3</sub>) (Curatolo et al., (1983)).

**ANNEXE 4**

**RÉSULTATS DES TEST D'ACTIVITÉ ANTICANCÉREUSES *IN VITRO***

**ACIDE BÉTULINIQUE 1****Souche cellulaire:** DLD-1 (Cancer du colon)**EXTRAIT B** Acide  
bétulinique

Bruit de fond soustrait (I13)

Fluorescence relative

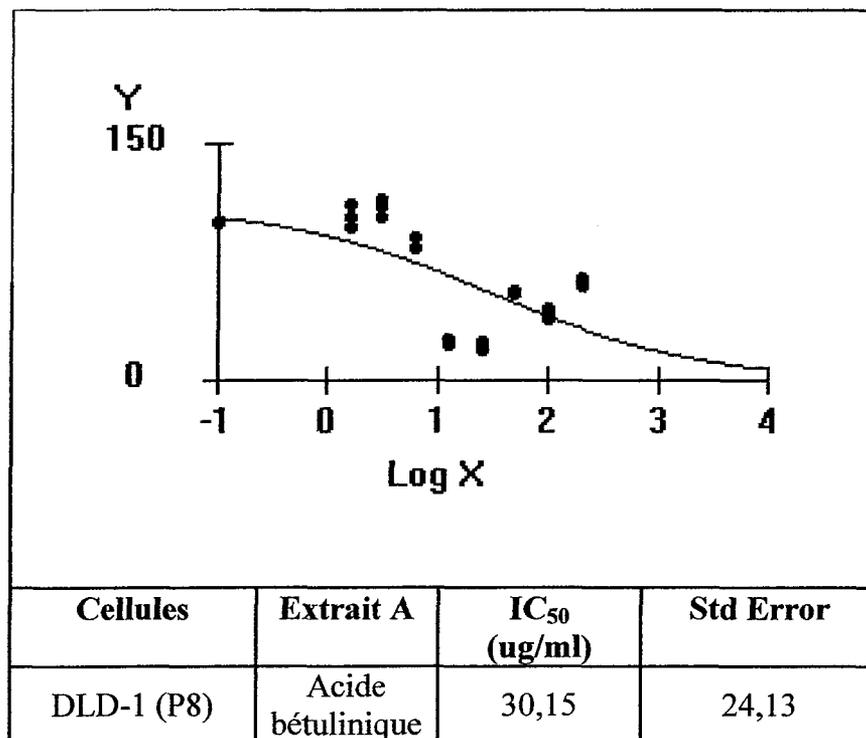
	Conc.	E2- E10	F2- F10	G2- G10
	(ug/ml)			
<b>C0</b>	0	74,46	85,07	81,79
<b>C1</b>	1,563	83,71	81,68	84,61
<b>C2</b>	3,125	84,72	88,22	89,39
<b>C3</b>	6,25	67,16	71,13	68,58
<b>C4</b>	12,5	19,09	18,99	21,43
<b>C5</b>	25	18,09	16,69	19,03
<b>C6</b>	50	41,21	47,52	45,74
<b>C7</b>	100	29,26	37,95	32,33
<b>C8</b>	200	44,21	55,28	53,13

**CELLULES** DLD-1 (P8)

% survie

exp.:	Conc.	E2- E10	F2-F10	G2-G10
	Acide bet. (ug/ml)			
	0	100	100	100
	1,563	112	96	103
	3,125	114	104	109
	6,25	90	84	84
	12,5	26	22	26
	25	24	20	23
	50	55	56	56
	100	39	45	40
	200	59	65	65

Contraints D1=0

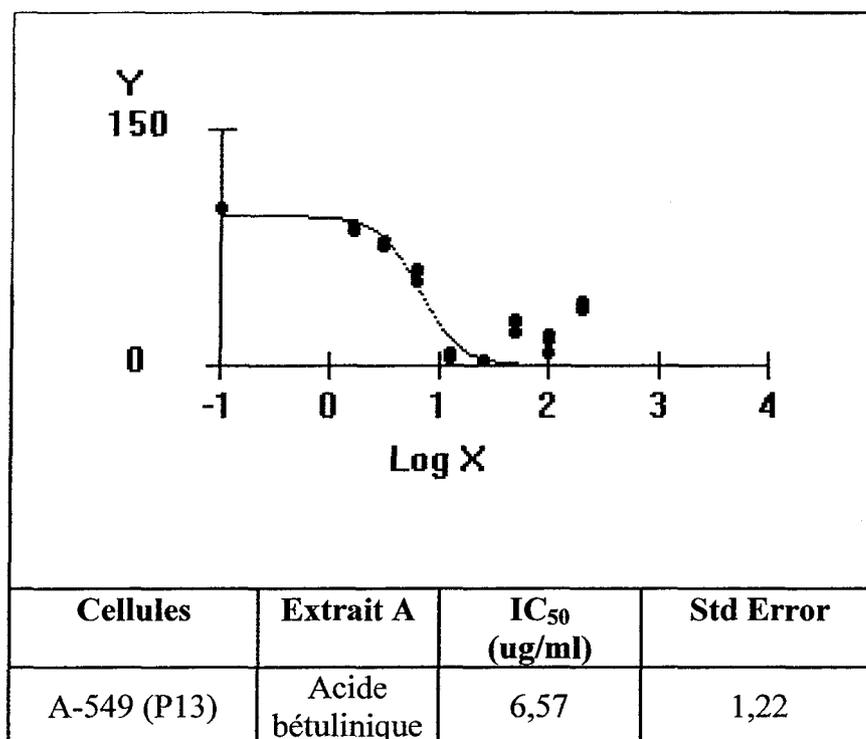


**ACIDE BÉTULINIQUE 1**

Souche cellulaire: A-549 (Cancer du poumon)

		Acide bétulinique		
<i>EXTRAIT B</i>				
Bruit de fond soustrait (I13)				
Fluorescence relative				
	E2- Conc.	F2- F10	G2- G10	
	(ug/ml)			
C0	0	207,99	211,65	222,83
C1	1,563	176,51	189,09	190,31
C2	3,125	155,15	167,70	172,21
C3	6,25	109,63	126,20	136,00
C4	12,5	10,61	14,10	17,21
C5	25	7,49	7,82	9,94
C6	50	43,86	56,16	65,60
C7	100	16,35	34,77	42,13
C8	200	81,88	76,15	90,48

		A-549 (P13)		
<i>CELLULES</i>				
% survie				
	Conc.	E2-E10	F2-F10	
	(ug/ml)			
exp.:	Acide bet.			
C0	0	207,99	211,65	
C1	1,563	176,51	189,09	
C2	3,125	155,15	167,70	
C3	6,25	109,63	126,20	
C4	12,5	10,61	14,10	
C5	25	7,49	7,82	
C6	50	43,86	56,16	
C7	100	16,35	34,77	
C8	200	81,88	76,15	



**GLYCOSIDE (Acide 3-O- $\beta$ -D-glucoopyranosylbétulinique) 15**

Souche cellulaire: DLD-1 (Cancer du colon)

**EXTRAIT B** Glycoside

Bruit de fond soustrait (I13)

Fluorescence relative

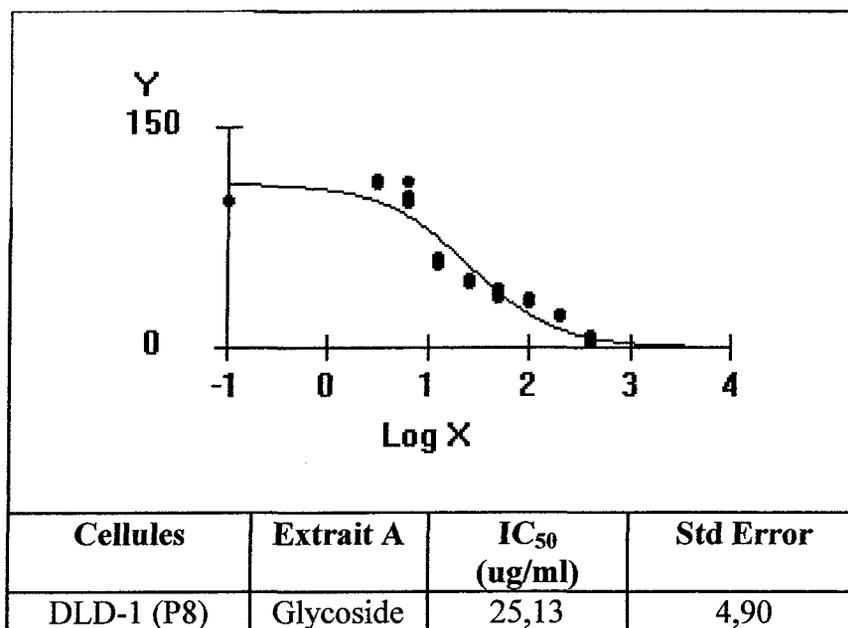
	Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	E2- E10	F2- F10	G2- G10
<b>C0</b>	0	88,78	88,83	87,61
<b>C1</b>	3,125	98,83	98,75	101,13
<b>C2</b>	6,25	87,12	100,59	90,46
<b>C3</b>	12,5	50,16	55,40	52,37
<b>C4</b>	25	38,93	42,02	38,58
<b>C5</b>	50	30,59	31,95	35,69
<b>C6</b>	100	27,69	27,76	29,58
<b>C7</b>	200	18,21	18,98	19,17
<b>C8</b>	400	2,33	4,94	7,38

**CELLULES** DLD-1 (P8)

% survie

exp.:	Conc. Glycoside( $\mu\text{g/ml}$ )	E2- E10	F2-F10	G2-G10
	0	100	100	100
	3,125	111	111	115
	6,25	98	113	103
	12,5	56	62	60
	25	44	47	44
	50	34	36	41
	100	31	31	34
	200	21	21	22
	400	3	6	8

Contraints D1=0



**GLYCOSIDE (Acide 3-O-β-D-glucopyranosylbétulinique) 15**

Souche cellulaire: A-549 (Cancer du poumon)

**EXTRAIT B**

Bruit de fond soustrait (I13)

Fluorescence relative

	<b>E2- Conc.</b>	<b>F2- F10</b>	<b>G2- G10</b>
	<b>(ug/ml)</b>		
<b>C0</b>	0	189,35	204,79
<b>C1</b>	3,125	152,87	170,11
<b>C2</b>	6,25	122,89	136,85
<b>C3</b>	12,5	68,93	80,19
<b>C4</b>	25	62,85	66,98
<b>C5</b>	50	54,16	59,18
<b>C6</b>	100	54,31	61,21
<b>C7</b>	200	44,10	47,22
<b>C8</b>	400	12,49	26,89

**CELLULES A-549 (P13)**

% survie

	<b>Conc.</b>	<b>E2-E10</b>	<b>F2-F10</b>
	<b>Glycoside(ug/ml)</b>		
<b>exp.: C0</b>	0	189,35	200,26
<b>C1</b>	3,125	152,87	167,39
<b>C2</b>	6,25	122,89	133,83
<b>C3</b>	12,5	68,93	82,91
<b>C4</b>	25	62,85	70,74
<b>C5</b>	50	54,16	60,64
<b>C6</b>	100	54,31	61,21
<b>C7</b>	200	44,10	47,22
<b>C8</b>	400	12,49	26,89

